



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

**TERÀPIA MULTIMODAL PER AL TRACTAMENT
DE LA CAQUÈXIA CANCEROSA**

MÍRIAM TOLEDO SOLER

Barcelona 2015



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Memòria presentada per la llicenciada en Bioquímica

Míriam Toledo Soler

per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona.

La present tesi doctoral: "*Teràpia multimodal per al tractament de la caquèxia cancerosa*", ha estat inscrita al programa de Doctorat de Biomedicina i realitzada al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la facultat de Biologia sota la direcció del Dr. Francisco J. López Soriano i la Dra.

Sílvia Busquets Rius.

Dr. Francisco J. López Soriano

Prof. titular Bioquímica i Biología Molecular

Sílvia Busquets Rius

Prof. associada Bioquímica i Biología Molecular

La doctoranda

Míriam Toledo Soler

ABREVIATURES

Abreviatures

Abreviatures

ActRIIB	receptor d'activines de tipus IIB	LMF	factor mobilitzador de lípids
AG	àcid gras	LPL	lipoproteïna lipasa
AMPc	monofosfat d'adenosina cíclica	MAFbx	<i>muscle atrophy Fbox</i>
AMPK	quinasa activada per AMP	MAPK	proteïna quinasa activada per mitògens
ATGL	lipasa adiposa de triglicèrids	MPOC	malaltia pulmonar obstructiva crònica
ATP	trifosfat d'adenosina	MSTN	miostatina
B16	melanoma B16	MuRF1	<i>muscle Ring finger 1</i>
C26	adenocarcinoma de còlon C26	NEFA	àcids grassos no esterificats
COX	ciclooxigenasa	NF-κB	factor nuclear κB
CRH	hormona alliberadora de corticotropina	NPY	neuropèptid Y
DAG	diacilglicèrid	PCR	proteïna C reactiva
DMEM	<i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>	PET	tomografia per emissió de positrons
DNA	àcid desoxiribonucleic	PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
E1	enzim activador d'ubiquitina		
E2	enzim conjugador d'ubiquitina	PI3K	fosfoinositol-3-quinasa
E3	lligasa d'ubiquitina	PIF	factor inductor de la proteòlisi
EDL	<i>extensor digitorum longus</i>	PKC	proteïna quinasa C
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic	PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>		
eIF2α	factor d'iniciació de la traducció eucariòtica 2α	PTHRP	proteïna relacionada amb l'hormona paratiroidal
EPA	àcid eicosapentaenoic	RNA	àcid ribonucleic
FBS	sèrum fetal boví	RNAm	àcid ribonucleic missatger
FFA	àcid gras lliure	ROS	espècies reactives de l'oxigen
FSH	hormona estimuladora del fol·licle	SARM	moduladors selectius d'andrògens
GHSR	receptor de l'hormona de creixement secretagog	SIDA	síndrome d'immunodeficiència adquirida
GLUT	transportador de glucosa	STAT	Transductòr de senyal i activador de la transcripció
GSN	gastrocnemius		
HMB	β-hidroxi β-metilbutirat	TAB	teixit adipós blanc
HSL	lipasa sensible a hormones	TAM	teixit adipós marró
IGF1	factor de creixement similar a la insulina	TG	triglicèrids
IL (1-35)	interleuquina (1-35)	TORC1	<i>Target of rapamycin complex 1</i>
IFN-γ	interferó gamma	TR	transcripció reversa
IR	receptor de la insulina	Ub	ubiquitina
IRS	substrat del receptor de la insulina	UCP	proteïna desacobladora
LDL	lipoproteïna de baixa densitat	VLDL	lipoproteïna de molt baixa densitat
LLC	carcinoma pulmonar de Lewis	ZAG	glicoproteïna zinc-α 2

CONTINGUTS

Continguts

INTRODUCCIÓ.....

1. DEFINICIÓ DE CAQUÈXIA	3
2. EPIDEMIOLOGIA	5
3. DIAGNÒSTIC I AVALUACIÓ	5
4. ETIOPATOGÈNIA	6
4.1. ANORÈXIA	7
4.2. ALTERACIONS METABÒLIQUES	10
4.2.1. Ineficiència energètica	11
4.2.2. Metabolisme glucídic	15
4.2.3. Metabolisme lipídic	16
4.2.4. Metabolisme proteic	20
4.3. INFLAMACIÓ	21
5. MEDIADORS DE LA CAQUÈXIA	23
5.1. CITOQUINES PRO-CAQUÈCTIQUES	24
5.1.1. TNF- α	25
5.1.2. IL-6	28
5.1.3. IL-1	29
5.1.4. IFN- γ	30
5.2. CITOQUINES ANTICAQUÈCTIQUES	30
5.3. FACTORS TUMORALS	31
5.4. LA MIOSTATINA I LA ACTIVINA	32
5.5. CANVIS NEUROENDOCRINS	35
6. MÚSCUL ESQUELETIC	38
6.1. EQUILIBRI MUSCULAR	39
6.2. SÍNTESI PROTEICA MUSCULAR	41
6.2.1. Via IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR	41
6.2.2. Via miostatina-Smad3	44
6.3. DEGRADACIÓ PROTEICA MUSCULAR	46
6.3.1. Sistema ubiquitina-proteasoma	46
6.3.2. Sistema lisosomal-autofàgia	49
6.3.3. Calpaïnes	52
6.3.4. Caspasses	53
7. TERÀPIA ANTITUMORAL	54
8. TERÀPIA ANTICAQUÈCTICA	56
8.1. SUPORT NUTRICIONAL	57
8.1.1. Suport nutricional oral/artificial	57

8.1.2. Suplements nutricionals/Nutraceutics	58
8.2. TRACTAMENT FARMACOLÒGIC	62
8.2.1. Estimulants de la gana	62
8.2.2. Agents antiinflamatoris	66
8.2.3. Agents anabòlics	72
8.3. EXERCICI FÍSIC	77
8.4. TERÀPIA MULTIMODAL	80
OBJECTIUS.....	83
PUBLICACIONS.....	89
PUBLICACIÓ 1: <i>Formoterol in the treatment of experimental cancer cachexia: effects on heart function</i>	95
PUBLICACIÓ 2: <i>Cancer cachexia: Physical activity and muscle force in tumour-bearing rats</i>	105
PUBLICACIÓ 3: <i>Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity</i>	115
PUBLICACIÓ 4: <i>Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance</i>	125
PUBLICACIÓ 5: <i>Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: additive effects of activin type II receptor inhibition and beta-2 agonist</i>	137
PUBLICACIÓ 6: <i>L-Carnitine: an adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer</i>	155
PUBLICACIÓ 7: <i>Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia</i>	167
PUBLICACIÓ 8: <i>Megestrol acetate treatment influences tissue amino acid uptake and incorporation during cancer cachexia</i>	177
PUBLICACIÓ 9: <i>Distinct behaviour of sorafenib in experimental cachexia-inducing tumours: the role of STAT3</i>	185
PUBLICACIÓ 10: <i>A multifactorial anticachectic approach for cancer cachexia: the role of chemotherapy</i>	205

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	225
CONCLUSIONS.....	257
BIBLIOGRAFIA.....	261

INTRODUCCIÓ

1. DEFINICIÓ DE CAQUÈXIA

Caquèxia és un terme procedent del grec, *kakos* i *hexis*, que significa 'mal estat' i al llarg de la història mèdica s'ha associat amb un pacient greu. En els últims anys han aparegut diverses definicions de caquèxia [1–3], però podríem dir que totes elles comparteixen dos factors comuns: la pèrdua de pes -sobretot per la pèrdua de múscul esquelètic i greix corporal- i la inflamació [3]. Així doncs, podríem definir caquèxia com una síndrome metabòlica complexa associada amb una malaltia subjacent que es caracteritza per la pèrdua de pes i massa muscular, amb o sense la pèrdua de massa grassa, sovint associada amb l'anorèxia, processos inflamatoris i alteracions metabòliques com la resistència a la insulina i l'augment de la taxa de recanvi proteic en els teixits entre d'altres [1] (Figura 1).

La caquèxia normalment es manifesta en patologies cròniques com la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA), diabetis, malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC), insuficiència cardíaca o càncer, essent aquest últim el que presenta una pèrdua de massa muscular més ràpida en els pacients, donant lloc a un empitjorament de la qualitat de vida, una menor resposta a la teràpia i s'associa amb un increment de la morbiditat i mortalitat [4,5].

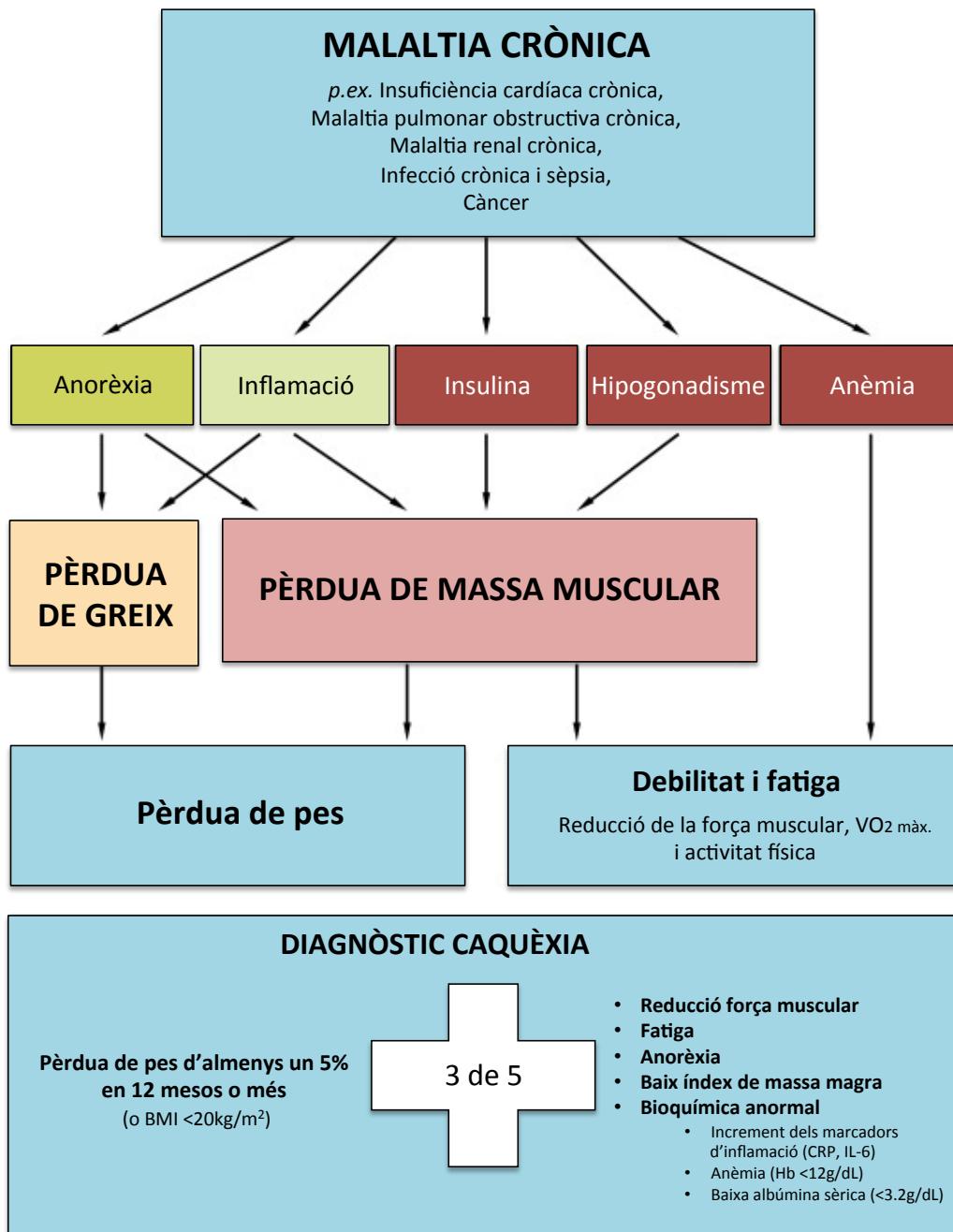


Figura 1. Representació conceptual de la definició de caquèxia.

La caquèxia és el resultat de l'adaptació a una malaltia subjacent, com el càncer. La malaltia crea un entorn que pot ser caracteritzat per la inflamació, pèrdua de gana (anòxia), baixos nivells de testosterone i altres hormones anabòliques i anèmia. La disminució de la ingestió d'aliments i l'anòxia resulten en la pèrdua de massa corporal i muscular. A més, la inflamació, la resistència a la insulina i els baixos nivells d'hormones anabòliques donen lloc a una pèrdua de massa muscular (imatge adaptada de la revisió: *Cachexia: a new definition* [1])

2. EPIDEMIOLOGIA

La incidència de la síndrome entre els pacients de càncer és molt alta ja que aproximadament la meitat de tots els pacients amb càncer experimenten caquèxia, amb una prevalença en augment de fins a un 86% en les últimes setmanes de vida [6], i un 45% dels pacients que perden més del 10% del seu pes original durant la progressió de la malaltia [7]. Una pèrdua de pes superior al 30% es considera irreversible, atribuint-se a la caquèxia un 20% de les morts per càncer [8]. La progressió de la malaltia també varia entre els diferents tipus de càncer, havent-hi una major prevalença de caquèxia en càncer de pàncrees i càncer gàstric (83-85%), un 54-60% en càncers de pulmó, pròstata i còlon, i entre un 32-48% en càncer de mama, sarcomes, limfomes i leucèmies [9]. En càncers d'estómac, pàncrees, pròstata, còlon i càncer de mama, la supervivència dels pacients amb caquèxia és significativament més curta que en altres malalts [9]. Així doncs, el grau de caquèxia està inversament correlacionat amb el temps de supervivència del pacient, i sempre implica un pronòstic desfavorable.

3. DIAGNÒSTIC I AVALUACIÓ

Tals esforços en la definició de la caquèxia són particularment rellevants especialment per a l'objectiu d'identificar les poblacions de pacients més susceptibles a desenvolar la síndrome caquèctica. Degut a la complexa etiologia d'aquesta síndrome, l'avaluació de la caquèxia ha d'incloure diversos paràmetres, com ara

L'aparició de l'anorèxia i la desnutrició, la pèrdua de pes corporal, l'esgotament de teixit adipós, la pèrdua de massa i força muscular, l'hipercatabolisme, la presència d'un estat inflamatori crònic, i finalment, però no menys important, l'impacte psicològic que exerceix la caquèxia en el pacient [5]. En els últims anys han sorgit diversos intents de classificar els malalts de càncer amb caquèxia en diferents fases [10–14]; malgrat tot, l'única metodologia disponible que proporciona un enfocament quantitatius és l'escala anomenada (CASCO) [15], que recentment ha estat validada [16]. La valoració de pacients amb caquèxia cancerosa dintre d'una escala és un aspecte important de la síndrome, així com el disseny de tractaments apropiats dependent del grau de caquèxia del pacient. Tot i que s'han suggerit diversos biomarcadors presents a nivell circulant per a pacients amb caquèxia, estan lluny de ser acceptats universalment i d'esser aplicables a tots els pacients. Aquests possibles biomarcadors inclouen compostos derivats del tumor [17], citoquines inflamatòries [18,19], proteïnes de fase aguda [20] i marcadors de degradació del múscul esquelètic [21].

4. ETIOPATOGÈNIA

S'han dedicat molts esforços en l'estudi de l'etiopatogènia de la caquèxia. Es tracta d'una síndrome complexa i difícil d'entendre, i la seva característica principal, com ja s'ha mencionat anteriorment, és el desgast que pateixen alguns teixits, principalment el múscul esquelètic i el teixit adipós. S'han trobat moltes causes que contribueixen a la pèrdua de pes en els pacients amb càncer, però cap d'aquestes explica totalment l'etiològia d'aquesta síndrome [8]. Malgrat la complexitat de la caquèxia, es poden diferenciar dos components bàsics entre les causes que

condueixen a l'estat caquèctic: la disminució de la ingestió experimentada pel pacient amb càncer i les alteracions de caràcter bioquímic i fisiològic que pateix com a conseqüència de la presència del tumor.

4.1. ANORÈXIA

L'anorèxia es defineix com la pèrdua de gana amb una sensació de sacietat precoç, la qual cosa fa que tingui lloc una hipofàgia a causa de la disminució del nombre d'àpats o de la quantitat de menjar ingerit. És una característica comuna de les patologies cròniques però sovint no és diagnosticada ni tractada, i com a resultat contribueix significativament a la desnutrició [4]. L'anorèxia es troba freqüentment associada amb la caquèxia i, tot i no ser totalment la responsable del desgast tissular que pateixen els pacients neoplàstics, és un factor important que hi contribueix.

S'han proposat diversos mediadors que regulen la ingestió a diferents nivells, la producció o actuació dels quals està alterada en la síndrome de la caquèxia. Alguns d'aquests mediadors són les citoquines proinflamatòries (el factor de necrosi tumoral α (TNF- α), la interleuquina 6 (IL-6) i la interleuquina 1 (IL-1)), les quals modifiquen la gana i la taxa metabòlica de forma directa, o indirectament a través de modulacions dels nivells fisiològics de diversos neuropèptids com són la leptina, el neuropèptid Y (NPY), la melanocortina o el pèptid relacionat amb agoutí [5]. Més específicament, la bioactivitat de les citoquines provoca la inducció de les vies anorexigèniques i la inhibició de les orexigèniques, fet que dóna lloc a la pèrdua de gana i l'augment de la sacietat [22].

En alguns casos, l'anorèxia pot aparèixer com a resultat de la mateixa teràpia antineoplàstica (quimioteràpia, radioteràpia o immunoteràpia). Aquests tractaments produeixen nàusees i vòmits, o bé una reducció de la gana a causa d'alteracions en la percepció del gust i l'olor del menjar [8]. També pot ser la conseqüència del restrenyiment, estomatitis, el dolor i les alteracions psicològiques que experimenten gran part dels pacients diagnosticats d'un càncer [2]. La depressió, l'ansietat o la por són emocions comunes experimentades per persones amb càncer i poden contribuir a l'anorèxia, així com l'estrés d'haver d'enfrontar-se amb els diferents tractaments per al càncer [23]. Altres factors que contribueixen a la situació anorèxica del pacient amb càncer són la disminuïda resposta insulínica a la ingestió, així com l'augment de la concentració circulant de lactat i d'àcids grassos, els quals comporten l'aparició d'un cert quadre d'acidosi metabòlica [24]. D'altra banda, els canvis en les concentracions circulants d'alguns tipus d'aminoàcids també contribueixen significativament a l'estat anorèxic [25].

En altres casos, la disminució de la ingestió s'ha descrit com una conseqüència de l'obstrucció mecànica del tracte gastrointestinal [26]. Aquestes alteracions de l'aparell digestiu es poden deure directament al tumor, si aquest està localitzat en algun punt del tracte gastrointestinal, interferint mecànicament en la digestió, o si es troba en òrgans importants per a la digestió, com en el cas del tumor pancreàtic o quan es localitza en la via biliopancreàtica [27]. Aquestes alteracions poden donar lloc a una malabsorció dels nutrients, contribuint notablement a l'empeorament de l'individu. La malabsorció pot ser també d'origen iatrogènic després d'un tractament quirúrgic, per radiacions o pels fàrmacs antineoplàstics [28]. A més, el tracte digestiu pot ser la diana de compostos alliberats pel tumor, com ara els esteroides, les prostaglandines i les

citoquines, els quals provoquen alteracions en l'absorció de nutrients. De fet, després de l'administració de citoquines (TNF- α o IL-1) s'observa una disminució de l'absorció de lípids i aminoàcids [29,30]. En casos de forta pèrdua de pes, com en estadis avançats de càncer, poden donar-se pèrdues d'enzims digestius, repercutint així a l'absorció de determinats nutrients [26]. Així doncs, el pacient afectat per un tumor, en fracassar en el seu intent d'ingerir, digerir o absorbir els nutrients, desenvolupa un balanç energètic negatiu que el condueix a una accelerada pèrdua de pes i un estat de malnutrició.

Cal destacar però, que la pèrdua de pes, almenys en la caquèxia cancerosa, generalment no ve donada per la simple privació d'aliments. De fet, durant el dejuni, els individus en situacions normals s'adapten a la restricció de nutrients exògens amb una reducció compensatòria de la despresa energètica, i es poden diferenciar clarament dues fases referents al metabolisme proteic: una fase inicial aguda, en la qual es consumeixen proteïnes musculars i hepàtiques, i una segona fase on hi ha restricció del consum proteic i s'incrementa la utilització de les reserves lipídiques. Aquest no és però, el comportament de l'organisme en situació de caquèxia, ja que els individus portadors de tumor presenten una despresa energètica fins i tot augmentada i una mobilització de proteïnes constant, fet que resulta en un balanç de nitrogen negatiu [31–33]. Així mateix, en la caquèxia cancerosa el desgast que presenta el múscul esquelètic contrasta amb la relativa preservació del fetge i altres òrgans, mentre que durant el dejuni aquests també estan afectats [34]. Tanmateix, si la malnutrició fos la principal causa de la caquèxia cancerosa, l'aportació de nutrients exògens a través d'una alimentació forçada (enteral o parenteral) disminuiria els símptomes de la caquèxia, i milloraria la supervivència i la resposta a la teràpia.

Malauradament, això no passa en la caquèxia cancerosa [2]. En alguns casos s'ha demostrat que l'augment de la ingestà de calories no reverteix la pèrdua de massa muscular esquelètica sinó que augmenta el pes corporal a través de la retenció d'aigua i la reposició de les reserves de greix [35,36]. Altres estudis han demostrat que el suport nutricional pot millorar la ingestà de calories i, tot i això, no ajudar a augmentar de pes ni l'antropometria dels pacients, així com tampoc s'observa una millor resposta terapèutica, qualitat de vida o supervivència dels pacients [33]. Per altra banda, amb el suport nutricional parenteral s'observen pocs beneficis [35]. No obstant això, el suport nutricional i el consegüent augment de la ingestà de calories pot ajudar a alleugerir la preocupació dels cuidadors, evitar un major deteriorament de l'estat nutricional i fins i tot millorar els resultats del pacient durant la radioteràpia [37,38].

És obvi que la malnutrició juga un paper important en la caquèxia, però cal destacar que no n'és l'únic factor en el desenvolupament. No obstant, cal promoure el suport nutricional precoç com a part d'un enfocament multimodal de la teràpia anticaquèctica, ja que és necessari per millorar l'estat nutricional del pacient i les complicacions relacionades amb el control de la ingestà d'aliments que influeixen en la seva qualitat de vida [38–40].

4.2. ALTERACIONS METABÒLIQUES

La síndrome caquèctica està associada amb un conjunt d'alteracions metabòliques, les quals condueixen a increments en la despesa energètica, estrès sistèmic i alteració de la funció cel·lular normal. Com a resultat de la presència del tumor i del tractament del pacient (quimioteràpia o radioteràpia), la necessitat de

mantenir l'homeòstasi força a l'organisme a importants canvis metabòlics que impliquen el metabolisme glucídic, lipídic i proteic (Figura 2). Alguns dels canvis són mecanismes clarament compensatoris per protegir l'homeòstasi del pacient, però algunes d'aquestes alteracions metabòliques són realment perjudicials per al pacient, portant-lo a una situació d'ineficiència metabòlica i desgast [26]. L'estat catabòlic que pateix l'hoste, particularment al múscul esquelètic i al teixit adipós, és un dels aspectes més evidents dels canvis en el metabolisme de la caquèxia cancerosa. El desgast que pateixen aquests teixits també afecta al múscul cardíac, fet que comporta disfuncions en aquest òrgan, les quals poden arribar a ser les responsables del 20% de defuncions associades al càncer. Altres òrgans, com ara el fetge, la melsa, els ronyons i les càpsules adrenals, pateixen, a vegades, un increment de pes transitori. Les alteracions metabòliques representen l'aspecte més important de la caquèxia cancerosa, ja que fins i tot en absència de malnutrició poden, *per se*, determinar un balanç energètic i nitrogenat negatiu, juntament amb un greu deteriorament de l'organisme [41].

4.2.1. Ineficiència energètica

L'energia lliure de Gibbs, ΔG , representa el treball útil màxim que pot ser realitzat per qualsevol sistema a temperatura i pressió constant; aquest paràmetre combina la primera i segona llei de la termodinàmica en sistemes biològics. Per tant, per comprendre la utilització d'energia en els sistemes biològics i bioquímics s'han de tenir en compte tant l'entropia com l'eficiència [42]. Curiosament, en situacions de càncer, sembla que hi ha un clar augment en l'entropia, el que reduiria el valor de ΔG ;

qualsevol canvi en aquest paràmetre porta 'el sistema' lluny de l'equilibri i, per tant, l'eficiència energètica disminueix a causa de l'alliberament de calor [43].

La síntesi d'ATP mitocondrial és un procés bioquímic essencial per a qualsevol cèl·lula viva [44], i ha estat demostrat que aquest procés es veu greument afectat en el múscul esquelètic durant la caquèxia cancerosa [45]. Si tenim en compte que el múscul esquelètic representa fins al 40% del pes corporal total, qualsevol deteriorament en la síntesi d'ATP en aquest teixit afectarà greument l'eficàcia del subjecte sotmès a la càrrega tumoral [4,46]. A més, la quimioteràpia també pot afectar la síntesi d'ATP mitocondrial. De fet, s'han descrit agents endògens i farmacològics que produeixen un desacoblament de la formació d'ATP a partir de la dissipació del gradient [47]. El gradient electroquímic de protons a nivell de la membrana mitocondrial interna que impulsa la síntesi d'ATP mitocondrial s'interromp a través de l'activació de les anomenades proteïnes desacobladores (UCPs). L'activitat de diferents UCPs s'ha demostrat estar augmentada en el múscul esquelètic (UCP2 i UCP3) i en el teixit adipós marró (TAM) (UCP1) tant en animals experimentals com en pacients afectats per tumors caquèctics [48,49]. Aquest fenomen està lligat amb el desacoblament mitocondrial de la fosforilació oxidativa. De fet, recentment el nostre grup ha demostrat que aquest és el cas en els ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis [50]. A més de desacoblament, hi ha altres anormalitats importants en les mitocòndries del múscul esquelètic que es produeixen en pacients amb càncer, com ara la disminució de la capacitat oxidativa [51,52], una interrompuda síntesi de proteïnes [53], canvis en la fluïdesa de la membrana [51] i les proteïnes mitocondrials oxidativament modificades [54]; totes elles donant lloc a una funció mitocondrial alterada i també alteracions en l'estructura de l'orgànul [55].

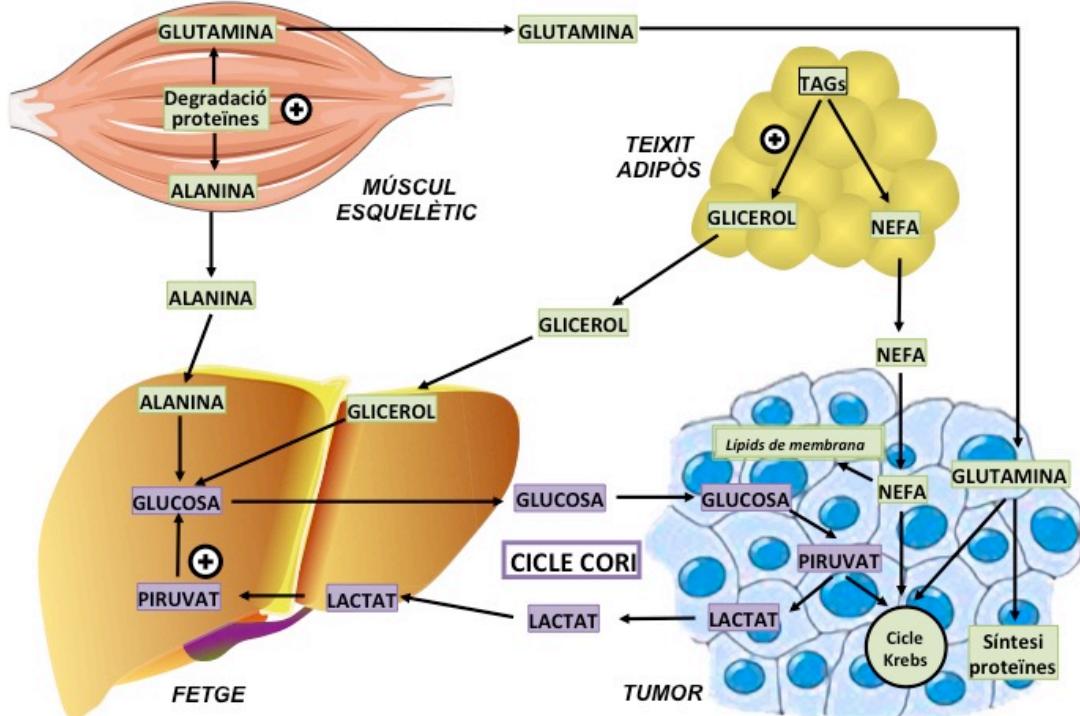


Figura 2. Principals adaptacions metabòliques associades amb el tumor.

Durant el creixement del tumor, tenen lloc alteracions metabòliques importants en pacients amb càncer. La degradació de proteïnes es troba estimulada en el múscul esquelètic, fet que resulta en un flux de sortida d'aminoàcids massiva a la circulació. Per tant, un flux de nitrogen del múscul esquelètic (principalment en forma d'alanina) arriba al fetge, on aquest aminoàcid s'utilitza per mantenir la gluconeogènesi i també la síntesi de proteïnes de fase aguda. La glutamina també s'exporta des del múscul i s'utilitza principalment en el tumor com a donador de nitrogen per a la síntesi de proteïnes i DNA. El tumor, depenent de la disponibilitat de la glucosa, també pot oxidar glutamina. La massa de teixit adipós es redueix a causa de l'activació de les lipases, que participen en la degradació lipolítica de triglicèrids (TG), produint àcids grassos no esterificats (NEFA) i glicerol. El glicerol també es pot utilitzar per sostener la gluconeogènesi hepàtica, mentre que els NEFA són utilitzats per la massa tumoral, tot i que a nivells molt baixos. En canvi, les cèl·lules tumorals utilitzen enormes quantitats de glucosa i per tant generen lactat, que després s'exporta a la circulació. El fetge també utilitza lactat com a substrat de la gluconeogènesi, en part per compensar l'acidosi associada amb la producció de lactat. El reciclatge de lactat constitueix el cicle de Cori (en violeta) entre el fetge i el tumor, que està vinculat amb l'alta ineficiència energètica, com la conversió de glucosa en lactat pel tumor que genera molt menys ATP que la quantitat requerida per produir glucosa a partir de lactat. Símbols circulars "+" indiquen les vies que s'activen durant la caquèxia.

Algunes de les alteracions esmentades podrien atribuir-se a un augment de la producció del co-activador transcripcional 1 α del receptor activat pel proliferador de peroxisomes (PGC-1 α), que s'ha observat en el múscul esquelètic de ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis [56]. De fet, aquesta proteïna sembla tenir un paper important en la regulació de la biogènesi mitocondrial a través de l'activació de factors nuclears respiratori i el factor A de transcripció mitocondrial (TFAM) [57]. A més, citoquines com ara el TNF- α , generat com a conseqüència de l'alta càrrega tumoral, activen MAPK p38, el qual provoca l'estabilització i l'activació de PGC-1 α [58]. La sobreexpressió de PGC-1 α causa un augment de la respiració i l'expressió de gens relacionats amb el desacoblament mitocondrial i la despesa energètica [59].

Actualment, està àmpliament acceptat que una elevada despesa energètica en repòs és un factor determinant en el desenvolupament de la desnutrició en pacients caquèctics [43]. El metabolisme energètic en repòs representa la combustió de fonts de combustible necessaris per proporcionar energia per als processos metabòlics implicats en el manteniment de la funció i la integritat cel·lular i dels òrgans del cos així com per als processos mecànics implicats en mantenir el cos amb vida. És convenient, per tant, assumir que les anormalitats en el metabolisme dels hidrats de carboni, lípids i proteïnes són les principals bases bioquímiques de l'elevada despesa energètica [43,60]. Per compensar aquest desequilibri energètic, l'organisme està obligat a mobilitzar les seves reserves energètiques.

4.2.2. Metabolisme glucídic

Pel que fa al metabolisme glucídic, hi ha dues característiques principals a destacar: per una banda l'augment del reciclatge hepàtic de la glucosa i per l'altra el desenvolupament de la intolerància a la glucosa.

Els tumors de creixement ràpid es caracteritzen per l'alta capacitat glucolítica, que porta a un augment de la gluconeogènesi hepàtica de l'hoste i de l'activitat dels enzims gluconeogènics [61]. De fet, el consum de les reserves energètiques de l'hoste es deu a un recanvi alterat de la glucosa, que desemboca en cicles metabòlics fútils com el cicle de Cori. La producció d'àcid làctic al tumor impulsa la conversió de lactat a piruvat i després a glucosa al fetge, un procés que suposa una elevada despesa energètica (Figura 2), però essencial per a compensar l'acidosi tumoral. Aquesta glucosa passa llavors a la circulació i torna al tumor, on es transforma de nou en lactat, i el cicle continua [7]. A més, l'alliberació perifèrica de lactat (glucòlisi del tumor), aminoàcids (proteòlisi muscular) i glicerol (lipòlisi) augmenta la disponibilitat dels precursores gluconeogènics, els quals poden tenir també un paper en la regulació d'aquesta via. La glucosa generada a partir d'aquest cicle alimenta el tumor, provocant que creixi, produint més àcid làctic i estimulant encara més el cicle [26]. Les cèl·lules tumorals són importants consumidores de glucosa que, juntament amb la glutamina i l'alanina, constitueixen les seves principals fonts d'energia. Les baixes concentracions intracel·lulars de glucosa a les cèl·lules tumorals generen un important gradient de concentració entre la sang i la massa tumoral, que afavoreix el tumor en la competència que s'estableix entre aquest i els teixits de l'hoste, per exemple, donant lloc a una disminució de la captació de glucosa al múscul esquelètic.

Els pacients amb càncer sovint presenten intolerància a la glucosa, que s'observa prèviament a l'aparició de la caquèxia, i la magnitud d'aquesta intolerància es correlaciona amb el desenvolupament tumoral [62]. Diferents estudis han permès observar la presència de resistència a la insulina en pacients amb diversos tipus de tumors, mostrant aquests certa incapacitat d'utilitzar la glucosa exògena i disminució de la sensibilitat a la insulina [63]. Alguns estudis clínics han trobat correlacions entre la resistència a la insulina i el desenvolupament d'atròfia muscular en pacients amb caquèxia per càncer [64], però cal remarcar que fins al moment no estan ben definides les conseqüències funcionals d'una alteració en la senyalització de la insulina en els òrgans afectats per la caquèxia.

No obstant això, en un treball recent es va estudiar la resistència a la insulina en pacients amb càncer de pulmó amb una caquèxia moderada subministrant glucosa i leucina marcades i van explorar les alteracions en el metabolisme de proteïnes en general. Aquest estudi va demostrar la manca de resposta anabòlica proteica a la evident hiperinsulinèmia en pacients caquèctics, els quals exhibeixen resistència a la insulina, i mostra com la capacitat reduïda d'aquesta hormona per estimular la síntesi de proteïnes pot contribuir en el desgast associat a la caquèxia [65]. Curiosament, la resistència a la insulina en aquest grup de pacients també es va associar amb marcadors d'inflamació com una elevada proteïna C-reactiva i IL-6 [64].

4.2.3. Metabolisme lipídic

El metabolisme lipídic també està alterat; freqüentment, el pacient amb caquèxia cancerosa està sotmès a una profunda pèrdua del teixit adipós blanc (TAB).

La constant dissolució d'aquesta massa de greix blanc és el resultat de diferents processos alterats [26]. En primer lloc, hi ha un augment en l'activitat lipolítica, fet que es tradueix en un alliberament important tant de glicerol com d'àcids grassos [66] (Figura 2). El mecanisme d'augment de la lipòlisi s'associa amb l'activació de la lipasa sensible a hormones (sigles en anglès: HSL) en el teixit adipós. A més, en pacients amb caquèxia associada al càncer hi ha una disminució de l'efecte antilipolític de la insulina en adipòcits, juntament amb una major capacitat de resposta a les catecolamines i el pèptid natriurètic atrial, que estimulen la lipòlisi [66]. En segon lloc, al TAB es produeix una important disminució en l'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL), enzim responsable de l'escissió dels triglicèrids endògens i exògens (presents en les lipoproteïnes) en glicerol i àcids grassos i, en conseqüència, l'absorció de lípids es veu greument obstaculitzada, ja que és l'activitat d'aquest enzim la que permet l'entrada dels àcids grassos al TAB. En tercer lloc, la lipogènesi *de novo* en el teixit adipós també es redueix en ratolins i en humans portadors de tumors, donant lloc a una disminució de l'esterificació, ja que la disponibilitat d'àcids grassos per a la síntesi de triacilglicerol disminueix i, en conseqüència, la disminució de la deposició dels lípids (triglicèrids).

En el teixit adipós, s'ha demostrat una clara interacció d'adipoquines i mioquines en càncer [67], recolzant així la importància de la senyalització inter-òrgans entre el múscul esquelètic i el teixit adipós [68]. Les observacions d'increment de la lipòlisi en pacients amb caquèxia cancerosa impliquen lipases, com ara la lipasa adiposa de triglicèrids (sigles en anglès: ATGL) i la HSL, en el desenvolupament de la caquèxia. ATGL intervé en el pas inicial de la descomposició de triglicèrids mitjançant la formació de diacilglicèrid (DAG) i un àcid gras lliure (sigles en anglès: FFA), mentre que HSL completa la hidròlisi per produir àcids grassos lliures addicionals i glicerol. Un

estudi recent en ratolins portadors de dos tumors caquèctics diferents (el carcinoma de pulmó de Lewis (LLC) i el melanoma B16) [69] va mostrar que la supressió gènica de ATGL prevenia d'un augment de la lipòlisi i la mobilització lipídica associada amb el creixement tumoral. La supressió de HSL va conduir a efectes similars però menys marcats. De forma inesperada, la disminució de la lipòlisi es va produir juntament amb una preservació de la massa muscular, fet que suggereix que la descomposició del greix precedeix a la de les proteïnes del múscul esquelètic i que implica que algun senyal (o senyals) generat durant la descomposició dels triglicèrids dels adipòcits pot ser responsable de l'activació de la proteòlisi muscular. Un estudi recent mostrava una acumulació progressiva de gotes lipídiques intramiocel·lulars en el múscul recte de l'abdomen de pacients amb càncer, que semblava estar relacionada amb la pèrdua de pes corporal i augmentava amb la progressió de la caquèxia. L'estudi emfatitzava sobre la potencial importància dels lípids com a marcadors/mediadors de l'atròfia muscular, per tant, que la infiltració de teixit adipós en el múscul esquelètic podria contribuir al desgast d'aquest teixit [70].

Recents investigacions han posat l'èmfasi en que en l'estat de caquèxia es reemplaça l'anomenat teixit adipós blanc per teixit adipós marró en el qual es produeix un increment de despresa d'energia [71,72]. Aquest fenomen de “marronització” del teixit adipós estaria induït per diferents mediadors de la inflamació i la IL-6. Tot apunta a que si s'aconseguís d'alguna manera controlar la conversió de greix blanc a marró es podria disminuir la gravetat de la caquèxia. D'altra banda, aquest procés de conversió, s'ha trobat associat amb l'augment de l'expressió de la proteïna UCP1, encarregada de desacoblar la respiració mitocondrial canviant l'ús del transport d'electrons mitocondrial de la síntesi d'ATP a la termogènesi, fet que resulta en un augment de la

mobilització dels lípids i la despesa energètica. Aquesta conversió cel·lular pot ser desencadenada per mediadors inflamatoris humorals, com la IL-6, i per compostos derivats del tumor, com ara la proteïna relacionada amb l'hormona paratiroïdal (sigles en anglès: PTHRP) [72], que semblen ser els responsables de dirigir l'expressió d'UCP1 en els adipòcits. En els primers assajos següent aquest model s'ha aconseguit que els tractaments que controlen la inflamació, així com l'ús de bloquejadors β -adrenèrgics, redueixen el fenomen de la conversió de l'adipós, resultant en una reducció en la severitat de la caquèxia [71]. Aquests enfocaments representen estratègies farmacològiques interessants i prometedores per millorar la caquèxia en pacients amb càncer.

A diferència del TAB, el teixit adipós marró (TAM) té un paper termogènic perquè acumula àcids grassos (AG) per a ser utilitzats per a la producció de calor a través del desacoblament de la respiració mitocondrial. Tot i que es pensava que el TAM era present només en mamífers petits i nadons, on contribueix a la termogènesi adaptativa durant l'exposició al fred, recents investigacions on s'utilitza la tomografia per emissió de positrons (PET), van mostrar que gairebé el 20% dels adults tenen TAM metabòlicament actiu [73], i que la seva funció va més enllà de la termogènesi, essent important per al manteniment de l'homeòstasi energètica corporal i la protecció contra l'obesitat induïda per la dieta [74].

Diversos estudis en animals portadors de tumors informen d'una clara activació de la termogènesi al TAM durant la caquèxia cancerosa, fet que es tradueix en el desacoblament d'energia a nivell mitocondrial i l'alliberament de calor [75,76], i demostren com l'activitat del TAM pot estar influenciada per la senyalització de citoquines. De fet, l'administració de TNF- α o IL-6 en el cervell va donar lloc a una

disminució del pes corporal i l'esgotament del greix, juntament amb l'augment del consum d'oxigen i de la temperatura corporal, així com l'activació de la senyalització β -adrenèrgica en rates [77,78]. D'altra banda, l'augment d'expressió dels marcadors termogènics al TAM, com ara la UCP1 i el PGC-1 α , suggereix que les accions hipotalàmiques de TNF- α i IL-6 podrien estar involucrades en la caquèxia augmentant els marcadors termogènics al TAM i la despesa d'energia [77,78]. No obstant això, en el model experimental de caquèxia en ratolins (el carcinoma de colon C26), el qual exhibeix alts nivells plasmàtics d'IL-6, l'activació de JAK/STAT de la via de senyalització de citoquines dins del TAM va ser evident, juntament amb la pèrdua de pes, augment de la despesa energètica, i febre [75]. A més, els patrons d'expressió circadians habituals dels reguladors termogènics PGC-1 α , PPAR, deiodinasa 2 i adenilat ciclase 3, juntament amb gens associats implicats en l'absorció de lípids, el metabolisme i la termogènesi, van ser alterats en el TAM dels ratolins caquèctics.

4.2.4. Metabolisme proteic

Referent al metabolisme proteic, la caquèxia cancerosa s'associa invariablement amb la pèrdua de massa muscular i l'atròfia. La pèrdua de proteïnes miofibril·lars a les cèl·lules musculars (Figura 3) és molt rellevant en la síndrome caquèctica, ja que provoca debilitat muscular i fatiga [79]. De fet, la pèrdua de múscul esquelètic és un potent factor de pronòstic, independent de la pèrdua de pes corporal [80]. Hi ha moltes alteracions metabòliques responsables de la pèrdua de massa muscular [81]. Els músculs, en situació normal, poden mantenir la seva massa i funció gràcies al balanç entre síntesi i degradació proteica associades a taxes equivalents de

processos anabòlics i catabòlics respectivament. En el múscul caquèctic, la pèrdua de massa generalment s'atribueix a una reducció de la síntesi proteica, un increment de la degradació o un desequilibri entre tots dos processos. Per tant, el metabolisme dels aminoàcids es troba força alterat. La degradació proteica és estimulada en el múscul esquelètic, fet que dóna lloc a un flux de sortida massiva d'aminoàcids a la circulació (Figura 2). D'aquesta manera s'estableix un flux de nitrogen (principalment en forma d'alanina) del múscul esquelètic cap al fetge, on s'utilitza aquest aminoàcid per sostenir la gluconeogènesi i també la síntesi de proteïnes de fase aguda, totes dues augmentades en estats de caquèxia [26]. La glutamina també s'exporta des del múscul i és utilitzada principalment pel tumor com a font de nitrogen per a la síntesi de proteïnes i DNA. El tumor, depenent de la disponibilitat de la glucosa, també pot oxidar la glutamina [82].

A més d'una pèrdua massiva de proteïna muscular, la caquèxia associada al càncer provoca una disminució del contingut de DNA en aquest teixit, reflexe d'una apoptosis incrementada i, per altra banda, una disminució de la capacitat de regeneració. Totes aquestes alteracions contribueixen clarament al balanç de nitrogen negatiu observat en el múscul esquelètic de pacients amb càncer. De fet, a més a més de la càrrega tumoral, algunes d'aquestes alteracions poden ser una conseqüència del tractament contra càncer (sobretot la quimioteràpia) [83].

4.3 INFLAMACIÓ

La inflamació és un mecanisme estrictament regulat destinat a protegir l'organisme contra alteracions en l'homeòstasi a causa de diferents estímuls, com ara

agents biològics, físics, o químics per un costat, i cèl·lules danyades, infectades, o neoplàsiques per l'altre. La resposta inflamatòria està generalment dotada de propietats d'autoregulació, aconseguida a través d'una xarxa complexa, incloent les cèl·lules immunes/inflamatòries i els mediadors humorals, que regula l'equilibri entre els estímuls pro i antiinflamatoris. Quan l'equilibri entre la resposta pro i antiinflamatòria es perd de manera persistent, es produeix la inflamació crònica [5]. La inflamació juga un doble paper: no només està implicada en la carcinogènesi i la progressió del tumor, sinó també en les alteracions metabòliques induïdes en el pacient per la presència del tumor. Recentment, la relació entre la resposta de fase aguda (inflamació sistèmica) i la caquèxia cancerosa es va proposar des de l'observació que una major síntesi de proteïnes hepàtiques podria conduir a l'hipercatabolisme de proteïnes musculars contribuint a elevar la despresa energètica en repòs [5]. De fet, el propi múscul esquelètic pot esdevenir una font de reactius de fase aguda, probablement desviant aminoàcids de la síntesi de proteïnes estructurals cap a la de mediadors de fase aguda [84]. Durant el càncer, la resposta inflamatòria del pacient està vinculada a la pèrdua de pes i mal estat general, i apareix correlacionada amb una menor supervivència. Molts mediadors inflamatoris són capaços d'influir en les diferents vies metabòliques relacionades amb la caquèxia. La proteïna C reactiva (PCR) s'ha proposat com un paràmetre de pronòstic [85]. De fet, els pacients amb càncer amb nivells elevats de PCR sobreviuen menys que aquells amb nivells baixos/normals [86]. En alguns estudis, la supervivència es prediu amb més precisió pels nivells de PCR que per l'estadi tumoral [86]. En realitat, la presència i la gravetat de la caquèxia es correlaciona pobrament amb la mida del tumor [85], i per tant, les alteracions

metabòliques són més probablement el resultat de mediadors produïts pel tumor o pel cos en resposta al tumor.

5. MEDIADORS DE LA CAQUÈXIA

Les citoquines i mediadors inflamatoris estan íntimament involucrats en la iniciació i progressió del càncer [87], i són els principals determinants de la supervivència dels pacients, la qualitat de vida, la resposta al tractament, i la caquèxia [88]. Les citoquines regulen les interaccions entre cèl·lula i cèl·lula en situacions normals i patofisiològiques, i poden exercir la seva acció de manera autocrina, paracrina o endocrina mitjançant la interacció amb receptors específics que hi ha a la membrana de les cèl·lules diana, induint processos com proliferació, activació, diferenciació o mort. Inicialment es van considerar les citoquines com a reguladores de la resposta immune, però posteriorment s'ha constatat que tenen una funció molt més amplia en la comunicació cel·lular. Actualment se sap que les citoquines formen una xarxa interactiva, de manera que les seves accions poden encavalcar-se, ser antagòniques o sinèrgiques, i induir la producció d'altres citoquines i dels seus receptors [18]. A causa d'aquesta complexitat, han d'haver-hi mecanismes que controlin la seva biosíntesi, alliberació i acció. Pel que fa a la biosíntesi i l'alliberació de les citoquines, aquestes estan estretament regulades per altres citoquines i factors en diferents aspectes: degradació, modulació dels receptors cel·lulars, o en la transducció del senyal. La producció i l'alliberació de les citoquines està influenciada per cicles de retroalimentació positiva i/o negativa de la mateixa citoquina o d'altres citoquines.

S'han descobert dos mecanismes que poden controlar l'acció de les citoquines. El primer implica els antagonistes dels receptors (inhibidors de citoquines de tipus I), els quals són molècules amb una homologia elevada amb les citoquines i que s'uneixen al receptor corresponent bloquejant la transducció del senyal; d'aquesta manera s'estableix una competència. El segon mecanisme consisteix en la unió que s'estableix entre les molècules solubles del receptor (inhibidors de citoquines de tipus II) i les citoquines. Aquestes molècules segregen les citoquines i n'impedeixen la unió amb el receptor de la membrana cel·lular [89].

Les citoquines estan considerades com a una arma de doble tall, ja que poden tenir efectes perjudicials i beneficiosos a la vegada. Així doncs, en el cas de la síndrome que ens ocupa, contribueixen a l'estímul de la resposta immunitària davant el tumor, provocant citotoxicitat a nivell tumoral facilitant la destrucció de les cèl·lules neoplàsiques i, com ja s'ha mencionat, moltes d'elles estan relacionades amb les alteracions metabòliques del procés caquèctic [82,88].

Els nivells circulants de moltes citoquines i els seus receptors solubles són elevats en diversos tipus de càncer. Si en tenim en compte el seu paper en la caquèxia, es poden diferenciar dos grups de citoquines: les pro-caquèctiques (pro-inflamatòries) i les anticaquèctiques (antiinflamatòries).

5.1. CITOQUINES PRO-CAQUÈCTIQUES

Les citoquines que s'han relacionat amb la resposta caquèctica (anomenades citoquines pro-caquèctiques) pertanyen al grup de citoquines pro-inflamatòries, d'entre les quals destaquen el TNF- α , la IL-1, la IL-6 i l'IFN- γ . Aquestes citoquines,

secretades majoritàriament pel sistema immunitari, actuen sobre diversos teixits diana (medul·la òssia, miòcits, hepatòcits, cèl·lules endotelials, adipòcits, etc.) en els quals activen una sèrie de respostes biològiques que condueixen al desgast tissular associat a la caquèxia [90]. Les citoquines pro-caquèctiques, juntament amb la producció/alliberament d'hormones clàssiques i/o factors de creixement alterats, donen lloc a una xarxa complexa que exerceix un efecte inhibidor sobre els processos anabòlics i/o anticatabòlics, a favor de la lipòlisi i proteòlisi [5]. També s'ha observat, que els propis teixits diana, com és el cas del múscul esquelètic, poden produir intrínsecament aquestes citoquines. Aquestes proteïnes comparteixen molts efectes metabòlics i la seva activitat està íntimament interrelacionada; fins i tot es produeixen efectes sinèrgics.

5.1.1. TNF- α

Cal destacar entre les citoquines pro-inflamatòries el TNF- α , ja que és una de les que més impacte ocasiona en la simptomatologia de la caquèxia. El TNF- α és una citoquina classificada com a pro-caquèctica, ja que és inductora de nombroses alteracions metabòliques que condueixen al procés caquèctic i que presenta una marcada pleiotropia, induint nombrosos efectes en molts tipus cel·lulars [18]. A més, el TNF- α és un important estimulador de secreció d'altres citoquines, com ara la IL-6 i diferents quimioquines [91]. El TNF- α és una citoquina citotòxica per a molts tipus cel·lulars tumorals i, a més, induceix necrosi de la vascularització tumoral, a través de la qual impedeix el subministrament sanguini de nutrients al tumor.

En els éssers humans, el catabolisme muscular s'ha atribuït a TNF- α en les malalties inflamatòries que inclouen càncer, insuficiència cardíaca congestiva, SIDA i MPOC [92]. No obstant, l'evidència d'un augment de TNF- α en el plasma de pacients amb càncer és controvertit, potser a causa de les diferents sensibilitats dels mètodes d'assaig, la curta vida mitjana del TNF- α *in vivo* o la producció paracrina localitzada de TNF- α [92]. Estudis en pacients amb càncer de pàncrees i càncer de pròstata van mostrar nivells detectables de TNF- α en el sèrum, especialment en pacients amb malaltia avançada, i aquests nivells es correlacionaven amb l'estat caquèctic i un mal pronòstic de la malaltia [93,94]. D'altres autors informen sobre el paper de la IL-6 com a indicador útil del temps de supervivència dels pacients amb càncer avançat al final de la vida però, en canvi, no observen diferències significatives en els nivells de TNF- α [95].

El mecanisme implicat amb els efectes del TNF- α *in vivo* es manté sense identificar, encara que durant molt temps s'ha reconegut que el TNF- α pot estimular el catabolisme a través de mecanismes indirectes. El TNF- α altera els nivells circulants d'hormones que regulen el creixement muscular i afecta la sensibilitat del teixit a aquests factors. El TNF- α també estimula la producció de citoquines catabòliques i induceix anorèxia, possiblement a través de l'augment dels nivells de CRH (hormona alliberadora de corticotropina) [92]. Qualsevol d'aquests efectes indirectament podria promoure la pèrdua de massa muscular. Els mecanismes pels quals el TNF- α podria estimular directament el catabolisme són menys clars. Un mecanisme potencial seria mitjançant la inhibició de la diferenciació de mioblasts, que podria limitar la resposta regenerativa de les cèl·lules satèl·lit en una lesió muscular [92,96]. L'homeòstasi del múscul esquelètic es manté per una pronunciada capacitat regenerativa, que inclou el

reclutament de cèl·lules mare. Una reducció en el reclutament d'aquestes cèl·lules pot contribuir al deteriorament de la miogènesi [97], i el TNF- α ha estat relacionat amb l'anul·lació de la funció de les cèl·lules satèl·lit, fet que dóna lloc a una regeneració muscular retardada o deteriorada en ratolins després de la lesió [98]. Un segon mecanisme podria ser un efecte catabòlic directe sobre el múscul diferenciat. Una pèrdua de proteïnes accelerada induïda pel TNF- α que sembla estar intervinguda per espècies reactives d'oxigen i pel factor nuclear-kappaB (NF-kB) [96]. Almenys tres vies principals intervenen en la resposta cel·lular al TNF- α amb l'activació de NF-kB, un mediador primari del control transcripcional, sent el principal candidat per a la senyalització catabòlica. TNF- α estimula l'activació i translocació nuclear de NF-kB en cèl·lules del múscul esquelètic [45].

A més del recanvi proteic, TNF- α , IL-6 i IFN- γ són coneudes per inhibir l'activitat de la LPL, reduint així l'emmagatzematge de triglicèrids en el teixit adipós, donant per resultat la hiperlipidèmia. TNF- α , en particular, interfereix amb la síntesi d'enzims lipogènics dels adipòcits i estimula la degradació de triglicèrids mitjançant l'activació de la HSL [99]. En contrast amb els efectes exercits sobre el teixit adipós, TNF- α augmenta la lipogènesi hepàtica, contribuint a la hiperlipidèmia que caracteritza la síndrome caquèctica [99].

No obstant això, tot i induir símptomes de caquèxia a través d'un augment de la gluconeogènesi, lipòlisi i proteòlisi, s'ha demostrat que la inhibició de TNF- α no és capaç d'aturar ni revertir la caquèxia cancerosa. Això indica que aquesta citoquina pot estar implicada en el desenvolupament de la caquèxia, però no és l'únic responsable dels efectes observats en els pacients caquèctics [7].

5.1.2. IL-6

A més del TNF- α , la IL-6 és el mediador principal de la resposta de fase aguda hepàtica en la caquèxia cancerosa. IL-6 inhibeix la producció hepàtica d'albümina i es correlaciona positivament amb els nivells sèrics de la PCR en pacients amb càncer de pàncrees. Els nivells elevats d'IL-6 s'associen amb la mida del tumor gran, a una evident pèrdua de pes i a un mal pronòstic global [100]. Alguns autors han mostrat una correlació dels nivells d'IL-6 amb una reducció de la supervivència [101]. S'ha demostrat en animals experimentals caquèctics, que quan els tumors s'eliminen, la massa corporal pot tornar a la normalitat, i els nivells circulants de IL-6 disminueixen significativament [102]. Treballs addicionals han demostrat que els clons de l'adenocarcinoma C-26 que produeixen IL-6 causen caquèxia, mentre que a aquells als que se'ls va administrar un anticòs quimèric monoclonal anti-IL-6 no tenen cap efecte sobre la massa corporal [103]. Quan s'implanten en ratolins cèl·lules canceroses de melanoma o de pròstata humanes productores d'IL-6 per induir la caquèxia, l'administració d'un anticòs neutralitzant de IL-6 humana impedeix la pèrdua de massa corporal [104], fet que suggereix que la IL-6 que s'estava bloquejant era aquella que estava sent produïda pel tumor. Tot i que la IL-6 s'ha postulat com un factor de creixement tumoral, encara roman incert el paper funcional de la IL-6 produïda pel tumor en la intervenció de la massa muscular esquelètica. No obstant això, l'administració sistèmica d'IL-6 *in vivo* en models animals, suggereix que només les dosis suprafisiològiques d'IL-6 són capaces d'induir l'atròfia muscular en l'absència de malalties subjacentes o un tumor [105]. La regulació directa de l'expressió de la lligasa E3 durant l'atròfia muscular induïda per IL-6 genera controvèrsia [106]. En un model

murí de caquèxia dependent de IL-6, la supressió de la síntesi proteica muscular es va produir aviat i va augmentar amb la progressió de la pèrdua de pes. La degradació de proteïnes dependent d'ATP va augmentar durant l'inici i la progressió de la caquèxia. No obstant això, la degradació de proteïnes dependent d'ATP no va incrementar fins que la caquèxia havia progressat més enllà de la fase inicial. L'anticòs del receptor de la IL-6 va bloquejar la progressió de la caquèxia a través de la supressió de la degradació de la proteïna muscular, mentre que no va rescatar la supressió de la síntesi [107].

Tot i que hi ha menys evidències per demostrar que la IL-6 pot conduir directament a la mobilització de lípids o al recanvi proteic del múscul esquelètic, hi ha una acceptació general tant en estudis en ratolí [84] com en humans [101] que la IL-6 es produeix a partir de macròfags activats i actua com a mediador de la caquèxia cancerosa estimulant el fetge per induir una resposta de fase aguda [108]. El patró de la senyalització de IL-6 és a través del seu receptor unit a membrana i la formació de l'heterodímer mitjançant el receptor de transducció de senyals (gp130). Això conduceix a l'activació de la via JAK/STAT amb la translocació de proteïnes STAT activades en el nucli. Boquejant únicament IL-6 pot fer front als mateixos reptes que la teràpia anti-TNF. Els recents assajos d'un anticòs monoclonal anti-IL-6 en pacients amb càncer de pulmó i pèrdua de pes han mostrat que reverteix en part l'anorèxia, fatiga i anèmia, però no té efecte significatiu sobre la pèrdua de la massa corporal magra (avaluada mitjançant l'anàlisi d'impedància bioelèctrica) [109].

5.1.3. IL-1

La IL-1, en particular, ha estat clarament associada amb la inducció de

l'anorèxia mitjançant el bloqueig de l'alimentació induïda pel NPY [88]. Els nivells d'aquesta molècula (pèptid estimulant de l'alimentació) estan disminuïts en rates portadores de tumors anorèxiques [14] i s'ha trobat una correlació entre la ingestió d'aliments i els nivells de IL-1 al cervell en rates amb càncer anorèxiques. El mecanisme implicat en la disminució de l'activitat del NPY per citoquines pot estar relacionat amb una inhibició de l'activitat cel·lular, una inhibició de la síntesi del NPY, o una atenuació dels seus efectes postsinàptics [88]. Tanmateix, tot i que són ben coneguts els seus efectes anorexigènics i pirògens, l'administració d'un antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1ra) a rates portadors de tumor no van donar lloc a cap millora en el grau de caquèxia [110], fet que suggereix que el seu paper en la caquèxia cancerosa pot ser secundari a les accions d'altres mediadors.

5.1.4. IFN- γ

Un altre candidat interessant per al tractament de la caquèxia és interferó- γ (IFN- γ), que es produeix per les cèl·lules T i cèl·lules *natural killer* (NK) activades i que posseeix propietats similars a TNF- α en la reducció del greix corporal, però sense un efecte sobre la proteïna total del cos [92]. No obstant, no hi ha una associació evident de la citoquina amb la síndrome caquèctica clínica en pacients amb càncer.

5.2. CITOQUINES ANTICAQUÈCTIQUES

Hi ha un altre grup de citoquines, les antiinflamatòries o anticaquèctiques, les quals actuen en sentit contrari, modulant l'acció de les citoquines proinflamatòries. En

aquest grup s'inclouen la IL-10, la IL-4, la IL-13, l'antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), i altres molècules com ara el receptor soluble de la IL-6 (sIL-6R) i els receptors solubles del TNF- α (sTNFR) [88]. La IL-15 és una citoquina que no té un paper antiinflamatori tant potent com les anteriors, però és una candidata important al grup de citoquines anticaquèctiques per al tractament de la caquèxia gràcies a les seves accions anabòliques sobre el múscul esquelètic [111,112].

5.3. FACTORS TUMORALS

A més de mediadors inflamatoris, altres molècules també contribueixen a les anormalitats metabòliques presents en el pacient de càncer. Alguns factors tumorals a part de les citoquines s'han proposat com a factors desencadenants del procés de desgast associat amb la caquèxia cancerosa [26]. Dues d'aquestes molècules, el factor mobilitzador de lípids (sigles en anglès: LMF) i el factor inductor de proteòlisi (sigles en anglès: PIF), s'han trobat en els animals portadors de tumor i en pacients amb càncer [113]. LMF és una glicoproteïna zinc- α 2 (ZAG) que pot sensibilitzar els adipòcits als estímuls lipolítics i té un efecte lipolític directe en el TAM [113]. PIF és un competidor important per promoure l'atròfia al múscul esquelètic, augmentant la degradació de proteïnes a través de la via ubiquitina-proteasoma i deprimint la síntesi de proteïnes a través de la fosforilació del factor d'iniciació de la traducció eucariòtica 2 α (eIF2 α) [113]. Encara que cada un dels factor s'han relacionat amb la pèrdua de pes en els pacients, l'existència d'un homòleg humà de PIF i el seu paper en la caquèxia cancerosa en humans necessita ser estudiat [108].

5.4. LA MIOSTATINA I L'ACTIVINA

Un factor més recent que ha captat l'atenció de molts investigadors és un membre de la família TGF- β , la miostatina. Els animals [114] i humans [115] que presenten una mutació en el gen de la miostatina i no l'expressen, presenten una hipertròfia muscular dramàtica. Un cas particularment informatiu d'aquest exemple es va produir en gossos. Els *Whippets* (una raça que sol ser bastant prima) s'utilitzen per córrer en carreres curtes. Dos animals campions van ser aparellats, el que va donar lloc a un *Whippet* musculós que s'assemblava més a un bulldog [114]. Aquest exemple va demostrar que els animals heterozigots de miostatina serveixen bé en l'escenari particular d'exercici muscular, la qual cosa indica que almenys una pèrdua parcial de miostatina produeix un millor rendiment; no està tan clar si la pèrdua completa de la miostatina millora la funció muscular, i hi ha alguns indicis que no és així. Els ratolins *knockout* per la miostatina (*MSTN* (-/-)) tenen un fenotip hipermusculat degut a la hipertròfia i hiperplàsia de les miofibres. Els músculs engrandits mostren una dependència de la glucòlisi per a la producció d'energia; no obstant això, es va demostrar en aquests ratolins que l'augment de la massa muscular va resultar en una disminució de la força contràctil específica ja que aparentment hi havia una acumulació de proteïna no funcional [116–118].

La miostatina es sintetitza i es secreta principalment a partir de cèl·lules de múscul esquelètic. Aquesta s'uneix al receptor d'activina de tipus IIB (ActRIIB) activant-lo, el qual després recluta a les quinases ALK4 i ALK5, fet que provoca la fosforilació i l'activació del complexe format pels factors de transcripció Smad2 i Smad3 [119,120]. La sobreexpressió de miostatina en ratolins condueix a una pronunciada atròfia del

múscul esquelètic [121] i, per contra, la inhibició per diversos mitjans genètics promou una duplicació de la massa muscular i la mida de les miofibres [122,123]. Encara que el mecanisme pel qual la miostatina promou la pèrdua de múscul no està completament resolt, hi ha estudis que suggereixen que pot haver-hi múltiples vies implicades, per una banda inhibint Akt i per tant les vies de TORC1 que promouen la síntesi de proteïnes, i d'altra banda per l'activació de Smad2/3 que intervé en la inhibició de gens associats amb la diferenciació muscular [119,120,124,125]. Nivells elevats de miostatina en sèrum o un increment en l'expressió en el múscul han estat descrits en pacients amb càncer [126] i altres malalties catabòliques com SIDA, insuficiència renal, MPOC i insuficiència cardíaca [127]. Canvis similars ocorren en models experimentals de caquèxia cancerosa [128,129].

A més de la miostatina, hi ha altres membres de la família TGF- β induïts per citoquines inflamatòries. L'activina A i l'activina B són factors de creixement i diferenciació potents amb un ampli espectre d'efectes biològics, incloent la modulació de l'embriogènesi, la neuroprotecció, l'apoptosi i la fibrosi. La síntesi i l'alliberament d'activines són estimulades per citoquines inflamatòries, lligands de receptors de tipus Toll, i l'estrés oxidatiu [130]. L'activitat biològica de les activines està estretament regulada per diversos factors que les antagonitzen o les modulen, com són la inhibina o la follistatina, entre d'altres [131]. En condicions fisiològiques, l'activina A s'expressa principalment en teixits gonadals i actua com un factor endocrí per estimular la biosíntesi i la secreció de FSH en la glàndula pituïtària. Per tant, l'activina A és ben coneguda pel seu paper en la regulació de les funcions gonadals. Més enllà del seu paper clàssic en la biologia reproductiva, també pot funcionar com un factor paracrí/autocrí en teixits no gonadals, incloent els músculs esquelètic i cardíac.

L'activina A intervé en una àmplia gamma d'activitats biològiques, incloent-hi la cicatrització de ferides, la proliferació i diferenciació cel·lular, la resposta immune i l'angiogènesi [127]. Tanmateix, els nivells d'activina A estan incrementats en molts estats catabòlics associats a malalties, fet que suggereix la seva implicació en la patogènesi de la caquèxia. Molts càncers en humans presenten una expressió alterada d'activina A associada amb un fenotip més maligne. De fet, els tumors també poden induir al propi múscul a estimular l'activina A [132]. Nivells circulants elevats d'activina A s'han observat en pacients amb càncer i s'han associat amb la presència de metàstasis òssies [133]. És d'especial interès el fet que, en el múscul, l'activina A i la miostatina s'uneixen al mateix complex receptor a la superfície cel·lular (receptor d'activines tipus II B (ActRIIB)) i activen la mateixa cascada de senyalització que conduceix a la translocació de Smad2/3 al nucli. L'activació de la transcripció mediada per Smad2/3 estimula la transcripció FoxO-dependent i una major degradació de proteïnes musculars a través del sistema ubiquitina-proteasoma i l'autofàgia. A més, l'activació de Smad inhibeix la síntesi de proteïna muscular mitjançant la supressió de la senyalització d'Akt [127]. Per tant, enllloc d'utilitzar un anticòs contra la miostatina, una de les estratègies ha estat la d'apuntar al receptor comú de la miostatina i les activines: el receptor ActRIIB.

El bloqueig de la senyalització miostatina/activina es pot aconseguir per diversos tipus de proteïnes que interfereixen amb les interaccions lligand-receptor. Alguns exemples d'aquestes molècules inhibidores inclouen pèptids antagonistes, anticossos, receptors solubles trampa i proteïnes d'unió natives, que impedeixen la unió del lligant al complex receptor transmembrana en la superfície de la cèl·lula muscular. Alguns d'aquests agents han demostrat ser eficaços en models preclínics de

la malaltia. En estudis recents s'han utilitzat receptors trampa d'activines ActRIIB per tractar la caquèxia cancerosa en quatre models experimentals de caquèxia diferents en ratolí [129,134]. El tractament amb el receptor soluble ActRIIB va bloquejar la caquèxia en el model C26 sense afectar el creixement del tumor. D'altra banda, aquests ratolins van experimentar un augment del 30% en les taxes de supervivència, fet que suggereix que aquesta estratègia podria ser útil en la caquèxia associada al càncer en humans [129].

5.5. CANVIS NEUROENDOCRINS

La caquèxia no existeix de forma aïllada. El càncer avançat està associat amb una varietat de símptomes, incloent el dolor, que pot conduir a l'activació de la resposta neuroendocrina a l'estrés. Els glucocorticoides són un component clau de la resposta a l'estrés i són ben reconeguts per facilitar la pèrdua de massa muscular en condicions associades amb la inflamació sistèmica greu, com per exemple sèpsia, caquèxia, acidosi metabòlica severa o insulinopènia, les quals s'associen amb un augment en els nivells de glucocorticoides circulants [135]. L'atròfia muscular induïda per glucocorticoides resulta d'un augment de la degradació de proteïnes i una disminució de la síntesi de proteïnes. L'augment de la proteòlisi muscular, en particular a través de l'activació dels sistemes ubiquitina-proteasoma i lisosomal, es considera que té un paper important en l'acció catabòlica dels glucocorticoides [135]. Estudis recents suggereixen que aquest efecte pot estar mediat per la desregulació de l'expressió del cofactor nuclear PGC-1 β , que condueix a augmentar l'expressió de les lligases E3: Atrogin-1 i MuRF1 [136]. L'efecte inhibidor dels glucocorticoides sobre la

síntesi de proteïna muscular es creu que resulta principalment de la inhibició de la via mTOR/S6 quinasa 1. Aquests canvis en el recanvi proteic al múscul podrien explicar-se pels canvis en la producció muscular de dos factors de creixement, el factor de creixement similar a la insulina (IGF1), un factor de creixement anabòlic muscular, i la miostatina, un factor de creixement de catabolisme muscular [135]. Un augment de la secreció de cortisol és un dels primers canvis hormonals en la caquèxia, i en un model murí de caquèxia les concentracions de cortisol en sèrum van augmentar en paral·lel amb la pèrdua de pes, i, a més, la inhibició de l'activitat dels glucocorticoides amb l'antagonista del receptor RU-38486 va atenuar la pèrdua de pes corporal [137,138]. En pacients amb caquèxia cancerosa alguns estudis han suggerit una tendència cap a una elevada excreció urinària de cortisol [139], mentre que altres estudis han suggerit que mentre que l'eix hipotàlem-pituïtari-adrenal roman intacte, el cortisol no és més actiu [108,140]. Altres autors associen la manca d'augment del cortisol en pacients amb càncer a la teràpia amb glucocorticoides, que ha estat conegut per reprimir la producció de cortisol endogen [141].

Hi ha una elevada freqüència de hipogonadisme en pacients masculins amb càncer avançat, el qual s'associa amb símptomes de fatiga i ansietat i una pitjor sensació de benestar. La inflamació sistèmica, la pèrdua de pes, l'ús d'opioides forts i una disminució de la supervivència s'han trobat associats amb una disminució dels nivells de testosterona en els pacients homes amb càncer [142]. La pèrdua muscular secundària a la disminució de la testosterona podria ser a través de la regulació de vies de senyalització de la miostatina, quinasa c-Jun NH₂-terminal, Notch i Akt [143]. La pèrdua de testosterona disminueix l'activitat voluntària en un model de ratolí i redueix dràsticament els nivells del coactivador transcripcional PGC-1 α , associats amb la

disminució de la biogènesi mitocondrial [144]. Hi ha diversos assaigs de moduladors selectius dels receptors d'andrògens (SARMs) en curs per prevenir la pèrdua de massa muscular associada a la caquèxia cancerosa en humans [108].

Entre les principals alteracions que apareixen en la caquèxia associada al càncer trobem la intolerància a la glucosa, deguda a la resistència a la insulina i a un bloqueig de la resposta secretora d'insulina davant d'una hiperglucèmia. Històricament, la resistència a la insulina ha estat classificada com una conseqüència de la pèrdua de massa muscular durant la caquèxia per càncer. No obstant això, donat el paper de la insulina en el manteniment de múscul esquelètic, la resistència a la insulina s'ha de considerar com un mecanisme que contribueix a la progressió de la pèrdua de massa muscular durant la caquèxia per càncer [63]. La reducció de la sensibilitat a la insulina sol estar present tant en models animals com en humans amb caquèxia cancerosa i pot contribuir a la pèrdua de massa muscular a través de la reducció de la senyalització anabòlica en resposta a la ingestió d'aliments [108]. Aquest estat d'insensibilitat pot relacionar-se amb la reducció de l'expressió de proteïna de GLUT4 tant en estat basal com en estat estimulat per insulina, a causa de la inhibició selectiva de la fosforilació estimulada per insulina d'IRS1 [108]. El tractament combinat amb l'hormona del creixement, insulina i la indometacina, s'ha demostrat que alleugen la caquèxia cancerosa en un model de ratolí [145]; no obstant, el tractament de pacients amb dosis baixes d'insulina exògena no millora els beneficis que ja presenta el suport nutricional i els fàrmacs antiinflamatoris en relació a la massa muscular [146].

6. MÚSCUL ESQUELETIC

El múscul està format per un conjunt de cèl·lules fusiformes i multinuclears, els miòcits, també anomenades fibres musculars, unides per teixit conjuntiu. La seva membrana s'anomena sarcolema i el seu citoplasma sarcoplasma. En el sarcoplasma trobem les miofibril·les, formades per dues proteïnes contràctils: l'actina i la miosina. Les miofibril·les estan formades per unes unitats anomenades sarcòmers, cadascú dels quals té entre 2 i 3 mm de longitud. El sarcòmer és la unitat funcional de la fibra muscular (Figura 3). La repetició dels sarcòmers li dona al múscul els seus estriaments característics, els quals es deuen a l'alternança entre zones denses (obscures), anomenades bandes A, i zones menys denses (clares), anomenades bandes I. En la part central del sarcòmer, encreuats amb els filaments d'actina, trobem uns filaments més grossos, els filaments de miosina. El disc Z i les dos zones adjacents, on només hi ha actina, formen les bandes clares (bandes I). Les zones on hi ha actina i miosina són les bandes obscures (bandes A). Quan el múscul està relaxat, en el centre de la banda A apareix una altra, la banda H, en la que només hi ha filaments de miosina. Aquesta banda no apareix al múscul contret. La fibra muscular es contrau per mitjà de la contracció dels sarcòmers; això es deu al lliscament de les fibres d'actina sobre les de miosina, de manera que quan les línies Z s'acosten, la banda I s'aprima i la H desapareix. La contracció muscular s'inicia amb l'arribada d'acetilcolina (neurotransmissor) des de les neurones motores o efectores. L'acetilcolina s'allibera per mitjà d'una sinapsi neuromuscular i produeix l'alliberament de Ca^{2+} en les fibres musculars. El Ca^{2+} provoca nous enllaços entre l'actina i la miosina, fet que produeix l'escurçament del sarcòmer i la conseqüent contracció muscular.

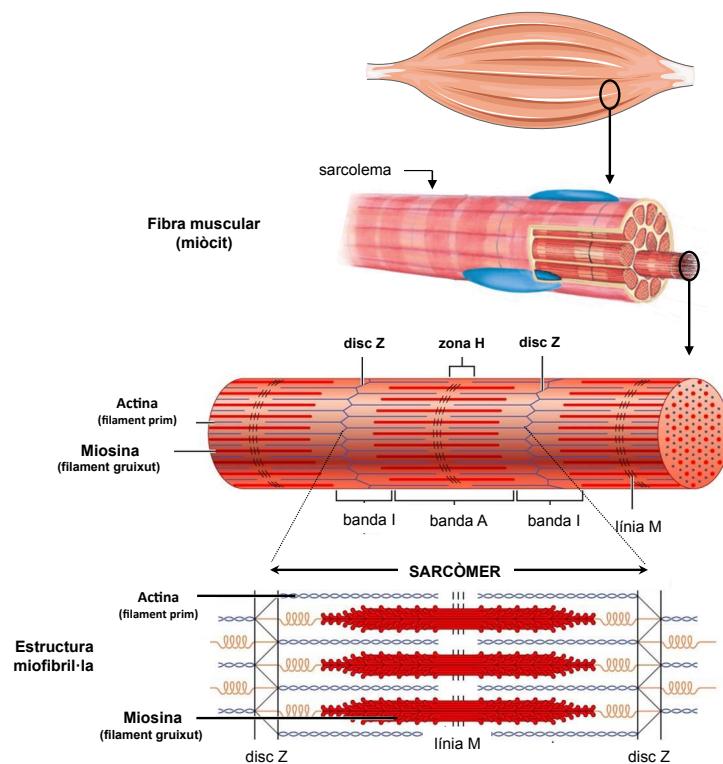


Figura 3. Cèl·lules musculars i anatomia muscular.

6.1. EQUILIBRI MUSCULAR

La massa muscular esquelètica augmenta durant el desenvolupament postnatal a través d'un procés d'hipertròfia, és a dir, l'ampliació de les fibres musculars individuals, i un procés similar pot ser induït en el múscul esquelètic adult en resposta a l'activitat contràctil, com ara exercici de força, o l'estimulació hormonal anabòlica, com ara andrògens i agonistes β -adrenèrgics. La hipertròfia muscular es produeix quan les taxes generals de la síntesi de proteïnes superen les taxes de degradació. Dues de les principals vies de senyalització de control de la síntesi de proteïnes, la via de la Akt

IGF1-mTOR [147], que actua com un regulador positiu, i la via de la miostatina-Smad2/3, actuant com un regulador negatiu, i les vies addicionals, han estat recentment identificades. En individus adults sans, el recanvi proteic és continu i necessari per al manteniment de la proteïna corporal. Aquests individus tenen un balanç nitrogenat en equilibri, on la síntesi proteica és igual a la degradació. L'atròfia muscular es produeix quan les taxes de degradació de proteïnes superen la de síntesi de proteïnes, i pot ser induïda en el múscul esquelètic adult en una gran varietat de condicions, incloent la inanició, la denervació, la caquèxia cancerosa, la insuficiència cardíaca, l'envellediment o l'estimulació hormonal catabòlica (corticosteroides). Dues de les principals vies de degradació de proteïnes, la via d'ubiquitina-proteasoma i la via lisosomal-autofàgia, s'activen durant l'atròfia muscular i contribueixen a la pèrdua de massa muscular de forma variable. Aquestes vies impliquen una varietat de gens relacionats amb l'atròfia anomenats també atrogens, que es controlen per factors de transcripció específics, com ara FoxO3, que està regulada negativament per Akt i NF- κ B, i que s'activa per citoquines pro-inflamatòries [148]. Estudis recents han posat de relleu un escenari complex mitjançant el qual aquestes vies catabòliques es modulen entre si a diferents nivells, i també s'acoblen en diversos punts a les vies biosintètiques. El resultat és un equilibri coordinat entre la degradació i la síntesi de proteïnes que reflecteix l'estat fisiològic de la fibra muscular. Aquest equilibri local té un efecte significatiu sobre l'homeòstasi de proteïnes en general [148].

La caquèxia cancerosa s'associa invariablement amb pèrdua de massa muscular i l'atròfia. La pèrdua de proteïnes miofibril·lars en les cèl·lules musculars (Figura 3) és d'important rellevància en la síndrome que ens ocupa [79], ja que provoca debilitat muscular i fatiga. De fet, la pèrdua de múscul esquelètic és un potent factor de

pronòstic, independentment de la pèrdua de pes corporal [80]. Moltes de les alteracions metabòliques que pateix el pacient caquèctic són responsables de la pèrdua de massa muscular tal com ja s'ha descrit anteriorment, i per tant, en el múscul caquèctic s'observen anormalitats en el recanvi proteic (síntesi i degradació) i el metabolisme d'aminoàcids (transport i oxidació d'aminoàcids de cadena ramificada).

6.2. SÍNTESI PROTEICA MUSCULAR

Dues vies de senyalització principals controlen el creixement del múscul esquelètic: la via IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR actua com a regulador positiu del creixement del múscul, i la via miostatina-Smad3 actua com a regulador negatiu (Figura 4).

6.2.1. Via IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR

El paper de la via IGF1 ha estat recolzada per una varietat d'enfocaments genètics en quant al guany i pèrdua de la seva funció. La inactivació específica al múscul del receptor d'IGF1 perjudica el creixement muscular a causa de la reducció del nombre i la mida de les fibres musculars; en canvi, la sobreexpressió específica al múscul de IGF1 causa hipertròfia muscular [147]. Els estudis de transfecció *in vivo* en músculs de ratolins i rates adultes han ajudat a clarificar les vies de senyalització per sota del receptor d'IGF1. IGF1 es coneix per activar la via de senyalització MAPK/ERK així com la via PI3K-Akt. No obstant això, s'ha descrit que la hipertròfia s'indueix per la via PI3K-Akt i no per la via de ERK [148,149]. Ratolins transgènics en els quals Akt

s'expressa transgènicament i s'indueix la seva activació en el múscul esquelètic, mostren una dramàtica hipertròfia, demostrant la implicació d'aquesta via per sota de IGF1. IGF1 activa la senyalització IRS1-PI3K-Akt, i Akt estimula la síntesi de proteïnes mitjançant el bloqueig de la repressió de mTOR, que al seu torn manté la massa muscular a través de dos complexos diferents, coneguts com TORC1 i TORC2 [148,149]. A més de l'activació de la senyalització de TORC1, Akt també fosforila la família de factors de transcripció *Forkhead* (FoxO). FoxO1 i FoxO3 juguen un paper clau en la inducció de l'activació transcripcional de MuRF1 i Atrogin-1 [150]. Pel que sembla, es requereixen aquests factors de transcripció, ja que IGF1/Akt intervé en la fosforilació de FoxO i en la posterior inhibició del transport de FoxO al nucli, que és suficient per bloquejar l'activació de les ligases E3 que participen en la degradació proteica (Figura 4). Sandri et al. van demostrar que la sobreexpressió transgènica de FoxO3 en el múscul esquelètic era suficient per induir una dramàtica pèrdua de múscul esquelètic [150], mentre que estudis recents recolzen que la inhibició de FoxO evita la pèrdua muscular en un model experimental de caquèxia cancerosa [151].

També s'ha descrit la implicació de l'hormona anabòlica IGF1 en el desenvolupament de la caquèxia cancerosa en models murins. En el model caquèctic de rata, l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, l'expressió muscular de mRNA d'IGF1 va disminuir progressivament mentre que els nivells de mRNA del receptor d'IGF1 i del receptor d'insulina van augmentar en comparació amb els controls [153]. A més, es van reduir els nivells circulants d'IGF1 i d'insulina. No obstant això, el mecanisme exacte de la desregulació d'IGF1 i el seu paper en la pèrdua de massa muscular en caquèxia no és del tot clar, ja que l'administració d'IGF1 exogen a aquestes rates portadores de tumor no va prevenir la caquèxia [153]. D'altra banda, altres estudis han

demostrat, en altres models experimentals de caquèxia cancerosa, que la via de senyalització d'IGF1 no es troba desregulada [154]. Mentre la sobreexpressió muscular d'IGF1 va augmentar l'àrea de secció transversal de la fibra tant en els animals joves com vells, la pèrdua de massa muscular o la reducció de mida de la fibra en ratolins portadors del tumor C26 no es van modificar, fet que suggereix que la pèrdua de massa muscular en els animals portadors de tumor no està associat amb la regulació negativa de molècules implicades en la resposta anabòlica [154].

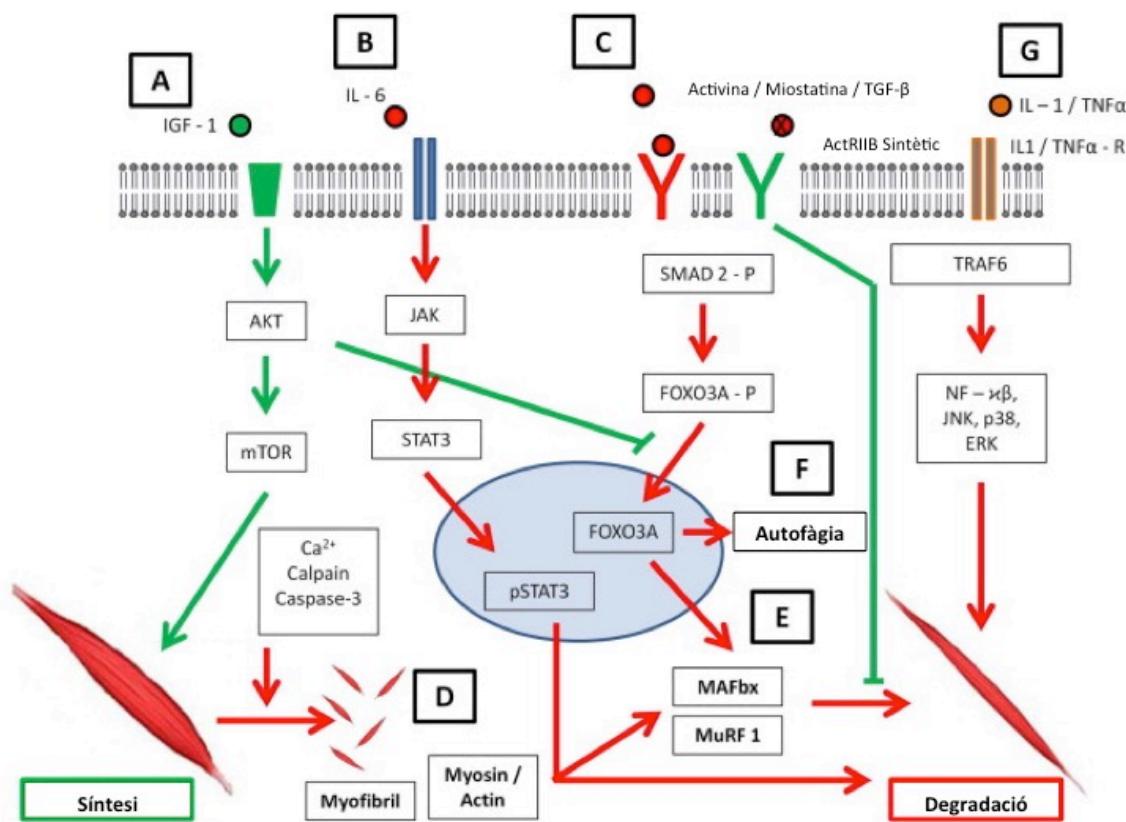


Figura 4. Cinètica de la proteïna muscular en la caquèxia cancerosa.

La regulació de la síntesi muscular a través d'IGF1 induceix hipertròfia (A). Les mioquines activen la via JAK/STAT implicada en la resposta de fase aguda i la degradació muscular (B). TGF- β induceix la via SMAD, activada per la miostatina i l'activina (C). El calci participa en els mecanismes de degradació muscular (D). La degradació muscular intervinguda pel sistema ubiquitina-proteasoma, conduceix a l'activació de les ligasses E3, MuRF1 i MAFbx (E). Activació i transcripció de gens d'autofàgia (F). Senyalització de NF- κ B (G). (Imatge adaptada de la revisió: *Muscle wasting in cancer* [152])

6.2.2. Via miostatina-Smad3

La segona via de senyalització important que controla el creixement del múscul esquelètic implica la miostatina, produïda pel múscul esquelètic i que actua com un regulador negatiu del creixement del múscul [148]. La miostatina purificada inhibeix la síntesi de proteïnes i redueix la mida dels miotubs quan s'afegeix a miotubs diferenciats en cultiu [155]. A més, tal com ja s'ha descrit anteriorment, es pot induir atròfia muscular administrant sistèmicament miostatina en ratolins [127], així com la hipertròfia muscular també pot ser induïda per proteïnes que interfereixen amb les interaccions lligand-receptor, com per exemple el receptor soluble d'activines ActRIIB [127]. Diferents estudis en models experimentals de caquèxia cancerosa van demostrar una senyalització de la miostatina muscular augmentada [128,129] (Figura 4). I com ja s'ha descrit en apartats anteriors, el bloqueig del receptor d'activines ActRIIB per tractar la caquèxia cancerosa en models experimentals de caquèxia [129,134] reverteix la pèrdua de massa muscular, i fins i tot és capaç d'incrementar la supervivència d'aquests animals [129]. En un estudi recent on s'avaluava l'expressió de la miostatina en biòpsies musculars en pacients amb càncer sense pèrdua de pes, els pacients amb càncer gàstric van evidenciar una major expressió de la miostatina mentre que els pacients amb càncer de pulmó no ho van fer [126]. Això suggereix que les alteracions de la miostatina poden variar segons la ubicació del tumor primari, fins i tot en pacients on la caquèxia no és present encara. Actualment hi ha almenys dos assajos clínics de fase II en curs d'estrategies antimiotestatina [152].

La implicació d'una reduïda síntesi proteica en el desenvolupament de la caquèxia cancerosa roman encara incerta i genera controvèrsia sobre quins són els

mecanismes responsables. Estudis amb ratolins portadors de l'adenocarcinoma MAC-16 ja suggerien la supressió de la síntesi proteica en la caquèxia cancerosa [156]. L'ús de L-[4-³H]fenilalanina per marcar les proteïnes en el múscul *gastrocnemius* per determinar la taxa de síntesi de proteïnes, va permetre observar una depressió significativa (60%) de la taxa de síntesi proteica en els animals, amb una pèrdua de pes entre 15% i 30% [156]. Els dos objectius principals per a la reducció de la síntesi de proteïnes en la caquèxia inclouen o bé la inhibició de l'absorció d'aminoàcids o bé la supressió de l'expressió o traducció de RNA d'alguns gens relacionats amb aquesta síntesi proteica [157]. De fet, alguns models tumorals mostren fins a una disminució del 40% en el RNA total del múscul en comparació amb animals control [158]. En el model de caquèxia cancerosa MAC-16, el catabolisme i l'anabolisme semblen ocórrer en tandem, arribant a una caiguda del 60% en la síntesi de proteïnes [159]. En un altre model animal, el ratolí Apc (Min/+), una reducció en la síntesi de proteïnes semblava precedir a un augment de la proteòlisi, fet que suggereix l'activació diferencial de les vies dependent del temps [107]. En un estudi recent dut a terme pel nostre grup s'analitza l'expressió de diversos centenars de gens en el múscul esquelètic de rates portadores d'un tumor que induceix caquèxia, l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, mitjançant l'ús d'un sistema de *microarrays*; els resultats mostren una disminució d'Akt mentre que FoxO apareix sobreexpresat en comparació amb els animals control [160]. En pacients caquèctics es va trobar una disminució del 55% en l'expressió de la proteïna Akt i un 82% de disminució en mTOR fosforilada en el múscul, fet que suggereix que la síntesi de proteïnes es veu afectada també a la caquèxia [161].

6.3. DEGRADACIÓ PROTEICA MUSCULAR

L'atròfia muscular implica la disminució de fibres musculars a causa d'una pèrdua neta de proteïnes, orgànuls i citoplasma. L'atròfia muscular aguda, com passa en moltes condicions patològiques, es deu a la hiperactivació de les principals vies de degradació de la cèl·lula, incloent el sistema ubiquitina-proteasoma i la via de l'autofàgia lisosomal [148]. L'activació dels sistemes proteolítics de la cèl·lula està regulada transcripcionalment, i s'han identificat un subconjunt de gens que es troben comunament sobreexpressats o inhibits en l'atròfia del múscul esquelètic, independentment de la condició catabòlica [148,162,163]. Aquests gens comuns es creu que regulen la pèrdua de components musculars, i per tant es van designar com a gens relacionats amb l'atròfia o *atrogenes* [150,162]. Entre els gens sobreexpressats relacionats amb l'atròfia són els que pertanyen als sistemes ubiquitina-proteasoma i lisosomal-autofàgia. La sobreexpressió de diversos gens relacionats amb el sistema d'ubiquitina-proteasoma i l'autofàgia està normalment bloquejada per Akt a través de la regulació negativa dels factors de transcripció FoxO [150,164].

6.3.1. Sistema ubiquitina-proteasoma

El sistema ubiquitina-proteasoma es requereix per eliminar les proteïnes sarcomèriques en resposta a canvis en l'activitat muscular. Les proteïnes són objecte de degradació pel proteasoma 26S a través de la unió covalent d'una cadena de molècules d'ubiquitina. L'enzim ubiquitina lligasa, o E3, s'uneix al substrat de la proteïna i catalitza el moviment de la ubiquitina de l'enzim E2 al substrat. Aquest és el

pas limitant de la velocitat del procés d'ubiquitinització, la qual cosa afecta la subsegüent degradació dependent del proteasoma. Una vegada que la proteïna és ubiquitinada s'acobla al proteasoma per a la seva degradació, a no ser que es retiri la cadena de poliubiquitina pelsenzims desubiquitinitzants. Entre els diferents E3s coneguts, només uns pocs dels específics del múscul s'han trobat sobreexpressats en processos d'atròfia muscular. Els primers en ser identificats van ser l'Atrogina-1/MAFbx i MuRF1. Aquests dos E3s s'expressen específicament en els músculs estriats i llisos [163,165]. De fet, ha estat demostrat que els ratolins *knockout* per Atrogina-1/MAFbx i MuRF1 són resistentes a l'atròfia muscular induïda per denervació [163]. Fins al moment, MuRF1 ha estat relacionat amb la ubiquitinització de diverses proteïnes estructurals del múscul, incloent la troponina I [166], les cadenes pesades de miosina [167], l'actina [168], la proteïna C d'unió a la miosina i les cadenes lleugeres de miosina 1 i 2 [169]. En canvi, molt poques proteïnes musculars han estat identificades com a substrats per Atrogina-1, i els que han estat identificats semblen estar implicats en els processos relacionats amb el creixement o les vies de supervivència. L'Atrogina-1 promou la degradació de MyoD, un factor de transcripció clau al múscul, i de eIF3-f, un activador important de la síntesi de proteïnes [170]. Al cor, l'Atrogina-1 ubiquitinitza i redueix els nivells de la calcineurina A, un factor important per desencadenar la hipertròfia cardíaca en resposta a la pressió de sobrecàrrega [171]. Probablement hi ha més lligasses E3s addicionals que encara no han estat identificades, les quals també s'activen durant l'atròfia per promoure la liquidació de les proteïnes cel·lulars solubles i regular els processos anabòlics. Algunes lligasses E3s com Trim32, TRAF6 o Mul1, comencen a ser descrites, així com la seva implicació en l'atròfia muscular [148]. Recentment s'han destacat importants funcions reguladores de les E3s en les vies de

senyalització en el múscul esquelètic. Per exemple, la ubiquitina lligassa Fbxo40 regula senyals anabòliques ubiquitinitzant i afectant la degradació del substrat del receptor d'insulina 1 (IRS1) [172].

En el desenvolupament de la caquèxia, se sap que el sistema ubiquitina-proteasoma té un paper fonamental en el procés d'atròfia muscular [163,165,173,174]. El nostre grup d'investigació ha treballat durant molts anys en aquest camp, i ha demostrat la rellevant implicació d'aquest sistema proteolític en la incrementada degradació proteica associada a la caquèxia. Llovera et al. van descriure un augment de l'expressió dels gens relacionats amb el sistema dependent d'ubiquitina al múscul esquelètic de rates portadores d'un tumor caquèctic [173]. Recentment, en músculs de rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 es van avaluar els gens alterats durant la síndrome caquèctica utilitzant un sistema de *microarrays* [160]; els resultats obtinguts van mostrar la sobreexpressió de diversos gens relacionats amb el sistema ubiquitina-proteasoma com ara enzims E2, algunes subunitats del proteasoma, les lligasses E3 (MuRF i MAFbx) i la ubiquitina. Altres estudis han demostrat que MAFbx (Atrogina-1) degrada directament la proteïna MyoD i indirectament les proteïnes miofibril·lars, mentre MuRF1 degrada els filaments gruixuts del múscul esquelètic [169,175]. D'altra banda, es coneix que la transcripció de MuRF1 i Atrogina-1 és induïda per FoxO en absència de la repressió d'AKT [150] (Figura 4). Per tant, l'activació de FoxO1 podria estar relacionada amb l'elevada expressió d'aquest sistema proteolític en la caquèxia cancerosa mitjançant l'activació de les ligasses E3. Un dels possibles mecanismes procaquèctics d'activació de la proteòlisi mitjançant el sistema dependent d'ubiquitina pot ser a través de l'activació de les citoquines proinflamatòries, com ara TNF- α o IL-1, les quals activen la senyalització

en dues vies establertes: la via de NF-kB i de la p38 MAP quinasa. Es requereix d'aquests dos mediadors per activar l'expressió de les lligasses E3 clau (MuRF1 i Atrogina-1), que intervenen en la degradació sarcomèrica i en la inhibició de la síntesi de proteïnes [176]. S'ha descrit que la inhibició de NF-kB és suficient per disminuir de manera significativa la pèrdua de massa muscular induïda pel tumor inhibint la sobreexpressió de MuRF1 [177].

Pel que fa a les investigacions clíiques, en pacients amb càncer gàstric amb una pèrdua de pes mitjà del 5,2%, es va observar un augment de l'activitat del sistema ubiquitina-proteasoma en comparació amb els controls, amb un efecte més marcat amb l'augment de l'estadi tumoral, la pèrdua de pes i la disminució d'albúmina [178]. En una altra investigació en pacients amb diversos tipus de càncer i una mínima variació de pes, els nivells de mRNA de diferents components del sistema ubiquitina-proteasoma es van incrementar entre 2-4 cops en pacients amb càncer [179]. El concepte de canvis en l'activació del sistema ubiquitina-proteasoma d'acord amb el grau de desenvolupament de la caquèxia en el pacient és recolzat per diverses observacions tant en humans com en models animals amb caquèxia [180-182].

6.3.2. Sistema lisosomal-autofàgia

El sistema lisosomal-autofàgia és un altre sistema proteolític que s'activa en condicions catabòliques i que està sota la regulació de FoxO [46] (Figura 4). L'autofàgia és un mecanisme homeostàtic molt conservat que s'utilitza per a la degradació i el reciclatge de la major part de les proteïnes de vida llarga i orgànuls del citoplasma, a través de la maquinària lisosomal [46]. Tot i que l'autofàgia es va considerar

inicialment una via de degradació no selectiva, la presència de formes més selectives d'autofàgia està sent cada vegada més evident. De fet, l'autofàgia pot desencadenar l'eliminació selectiva d'orgànuls específics, com ara mitocondris. Els orgànuls i les porcions de citoplasma són segregats en vacúols de doble membrana (autofagosomes), que es fusionen amb els lisosomes i són digerits per enzims lisosomals [183]. Els lisosomes intracel·lulars contenen una sèrie d'enzims necessaris per a la digestió de macromolècules, incloent proteases, carbohidrases, lipases i nucleases. Les catepsines L, B, D i H són les principals proteases lisosomals, i determinen principalment la capacitat proteolítica dels lisosomes [41]. La catepsina-L, en particular, s'indueix d'hora en estats catabòlics, i els seus nivells es correlacionen amb un augment de la degradació de proteïnes. L'augment de l'activitat de la catepsina s'ha demostrat en diversos models de pèrdua de massa muscular, incloent la caquèxia cancerosa, diabetis mellitus, atròfia induïda per dexametasona, desús, dejuni i distròfia muscular [184]. La via de l'autofàgia és necessària per conduir substrats als lisosomes, i la proteòlisi lisosomal depèn de l'activitat de les catepsines [185]. Fa uns 15 anys es va identificar en llevats una classe de gens anomenats Atg (gens relacionats amb l'autofàgia), i es van trobar i caracteritzar funcionalment els seus ortòlegs de mamífers. El nivell d'expressió i la localització intracel·lular d'algunes d'aquestes proteïnes es pot utilitzar per controlar l'autofàgia. En particular, beclin-1 com a un indicador de la inducció de l'autofàgia, la conversió LC3B-I a la seva forma LC3B-II lipidada per mesurar l'abundància d'autofagosomes, i P62/SQSTM1 com un indicador de la captura de substrat i la degradació subsegüent [184].

La rellevància de l'autofàgia en l'homeòstasi muscular es demostra a partir de relació de diverses miopaties, com ara alguns tipus de distròfies musculars amb taxes

alterades d'autofàgia [186]. De fet, moltes d'aquestes miopaties presenten una reducció de la capacitat d'autofàgia, el que dóna lloc a l'acumulació de substrats no desitjats. Des d'aquest punt de vista, les estratègies destinades a augmentar l'autofàgia, com l'exercici o l'activació d'AMPK, podrien resultar beneficioses [184]. Les dades emergents en els últims anys mostren clarament que la proteòlisi lisosomal-autofàgia també està implicada en la patogènia de la pèrdua de massa muscular en caquèxia. En un estudi recent, es va demostrar un increment de l'autofàgia en el múscul dels ratolins implantats amb el tumor C26 [187]. Altres estudis han suggerit l'activació de la proteòlisi lisosomal en l'atròfia muscular, com ara un augment de l'expressió i l'activitat de les proteases lisosomals en rates sèptiques o en models experimental i clínics de caquèxia cancerosa [188]. En la majoria dels estudis on s'estudien els mecanismes implicats en l'inducció de l'autofàgia, aquesta s'ha associat amb un augment de l'activació de la transcripció dependent de FoxO3A dels gens relacionats amb l'autofàgia com LC3B i Bnip3 [188]. En el múscul esquelètic d'animals portadors de tumors, es mostren nivells elevats de LC3B-II; aquests incrementen encara més quan la fusió de l'autofagosoma amb els lisosomes és inhibida pel tractament amb colquicina, la qual cosa demostra que la taxa de segregació es veu incrementada. Sorprendentment, l'augment de la retenció de l'autofàgia en el múscul dels portadors de tumor està associat amb alts nivells de P62, fet que suggerix una acumulació d'autofagosomes no processats, que possiblement depenen de la incapacitat de degradació lisosomal [187].

En pacients amb càncer també s'indueix l'autofàgia muscular. Els nivells de mRNA de Bnip3 i els nivells de proteïna LC3B-II augmenten en les biòpsies musculars de pacients amb càncer de pulmó en comparació amb els individus control, mentre

que l'expressió dels gens de les lligasses d'ubiquitina específiques de múscul no es modifica. Aquesta modulació de l'expressió dels gens d'autofàgia s'associa amb un augment de citoquines proinflamatòries circulants i l'activació muscular de NF- κ B [189]. Finalment, un treball molt recent [190] mostra que, tot i no haver-hi diferències en l'activitat del proteasoma, la calpaïna i la caspasa 3 en el múscul esquelètic de pacients amb càncer d'esòfag en comparació amb els controls, poden observar-se un increment en l'activitat de les catepsines B i L i en els nivells de LC3B-II. La inducció de l'autofàgia en pacients amb càncer probablement s'associa amb el balanç energètic negatiu que sorgeix de la reducció de la ingesta d'aliments, el dany mitocondrial, i les alteracions metabòliques [184]. Això porta a que no es processen tots els autofagosomes acabats de formar, fet que produeix per una banda una persistent manca de substrats anabòlics, i per l'altra l'acumulació de proteïnes i orgànuls danyats, contribuint a una atròfia de les miofibres i a una pèrdua d'integritat i funcionalitat [184].

6.3.3. Calpaïnes

Hi ha diversos sistemes d'enzims dependents de calci, incloent les calpaïnes. Les calpaïnes són enzims intracel·lulars, no-lisosomals, la majoria de les quals són citosòliques, que intervenen l'escissió de substrats específics en un gran nombre de processos cel·lulars reguladors [191]. En quantitats excessives, les calpaïnes són capaces de degradar elements del citoesquelet, canals iònics, molècules d'adhesió cel·lular i receptors de la superfície cel·lular. Les calpaïnes ubiqües 1 i 2 (també anomenades μ i m) han estat implicades tant en la degradació inicial de les proteïnes

miofibril·lars, com ara α -actinina, desmina, titina, i nebulina, durant el desgast muscular [192] com en la necrosi associada amb la distròfia muscular [193]. També s'han associat a la degradació de proteïnes sarcomèriques i del citoesquelet en miotubs en cultiu [194], i en aquest estudi en particular l'addició d'un inhibidor de la calpaïna va donar lloc a una reducció del 20% en la degradació de proteïnes en general. Molts estudis han demostrat que el sistema de calpaïna té un paper important tant en la pèrdua de massa muscular, que es produeix en diverses condicions patològiques, com en el moviment metabòlic de les proteïnes miofibrilar. [195,196]. En músculs caquèctics de rates portadores de tumor, s'ha observat un augment d'expressió de la calpaïna [160]. Se sap que les concentracions de Ca^{2+} lliure intracel·lular causen la interrupció del procés normal d'acoblament d'excitació-contracció i poden estimular l'activitat de la calpaïna. [195,197–199]. En un estudi amb pacients amb càncer gàstric amb una pèrdua de pes mínima (1%), es va observar un increment en l'activitat de la calpaïna al múscul recte del 70% en comparació amb els controls, el que suggereix un paper primerenc de les calpaïnes en el desenvolupament de la síndrome caquèctica abans d'evidenciar-se alteracions clíiques significatives [200].

6.3.4. Caspasses

Les caspasses són un grup d'enzims generalment associats amb la inducció de l'apoptosi cel·lular en resposta a senyals de mort. Les caspasses podrien exercir un pas inicial en la proteòlisi miofibril·lar mitjançant el trencament de l'actomiosina. En aquest sentit, les caspasses, que són proteïnes executores de l'apoptosi, podrien estar

preparant les proteïnes miofibril·lars per fer-les accessibles a la ubiquitinització [201].

Hi ha algunes evidències del paper de les caspasses en l'apoptosi en el desgast muscular experimentat pels pacients caquèctics. Les biòpsies musculars de pacients amb pèrdua de pes amb càncer gastrointestinal superior van mostrar un augment de tres vegades en la fragmentació del DNA muscular en comparació amb els subjectes control [202,203].

7. TERÀPIA ANTITUMORAL

El diagnòstic i la teràpia dels pacients amb tumors malignes ha progressat de forma intensa i accelerada durant els últims anys. Tanmateix, a diferència de la cirurgia i la radioteràpia, la quimioteràpia per al càncer és un tractament sistèmic que afecta tot el cos. En conseqüència, suposadament hi ha més efectes secundaris amb la quimioteràpia que amb la cirurgia i la radioteràpia. Els efectes secundaris relacionats amb la nutrició que es pateixen amb més freqüència són l'anorèxia, modificacions en el gust, sacietat precoç, nàusees, vòmits, esofagitis, diarrea i restrenyiment [204].

Actualment hi ha nous fàrmacs de disseny molecular que tenen com a objectiu fonamental el control de la proliferació cel·lular (citostàtics) i que en principi no estan destinats a destruir cèl·lules tumorals (efecte citotòxic de la quimioteràpia clàssica). La teràpia del càncer es dirigeix cada vegada més a bloquejar les vies de senyalització tumorals i inhibir l'angiogènesi del tumor. Aquestes molècules estan focalitzades contra les vies moleculars que són responsables de la proliferació de cèl·lules tumorals, com la via de PI3K, AKT i mTOR, que estan associades amb la iniciació del càncer i també estan involucrades en l'activació de l'anabolisme de les proteïnes musculars.

[119,205] (Figura 5). Per tant, seria d'esperar que els fàrmacs dirigits a aquestes vies produixin certa toxicitat sobre el múscul esquelètic. La quinasa mTOR integra senyals de nutrients (aminoàcids i energia), insulina i factors de creixement per a regular el creixement cel·lular, la progressió del cicle cel·lular i la síntesi de proteïnes en el múscul esquelètic. A més, les vies de participació Ras, Raf, MEK i ERK regulen la proliferació de cèl·lules musculars. Aquestes vies anabòliques i proliferatives són la diana d'agents antineoplàstics com ara everolimus i sorafenib (Figura 5). El sorafenib s'ha demostrat que causa atròfia del múscul esquelètic, independent de la resposta a la malaltia [206].

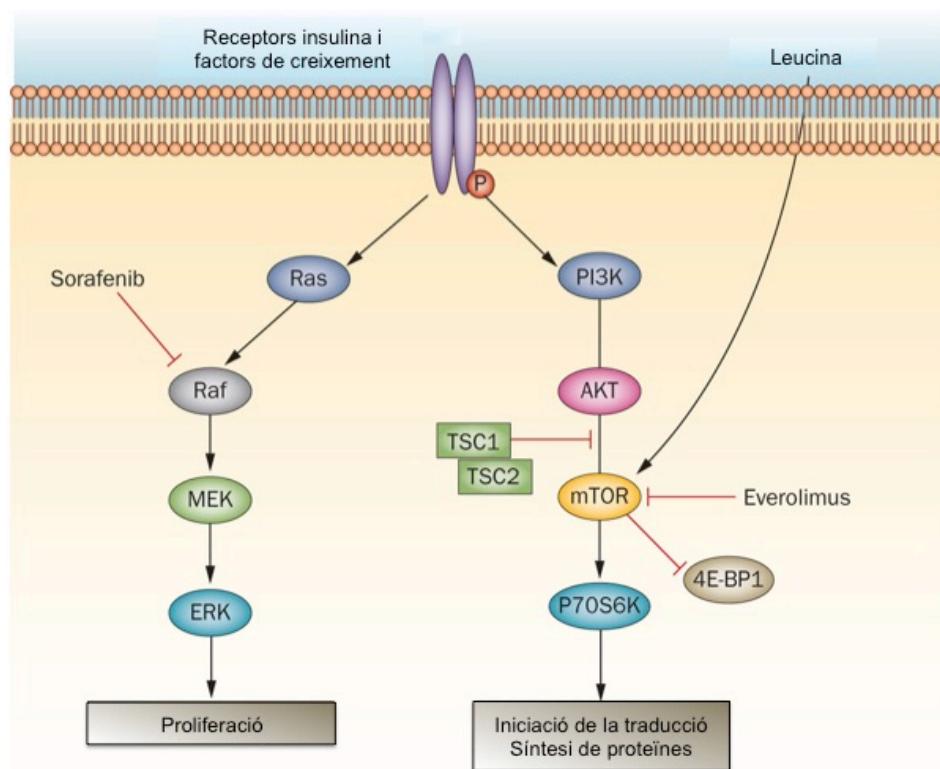


Figura 5. La proliferació de cèl·lules musculars i la síntesi de proteïnes en resposta a factors de creixement i aminoàcids es poden veure afectades per les teràpies dirigides contra el càncer. (imatge adaptada de *Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia* [81]).

Diversos estudis en humans han demostrat que la pèrdua de pes associada amb el càncer estava relacionada amb la toxicitat del tractament, l'anèmia i una supervivència més curta [207,208]. Prado et al. [208] es van centrar en l'estudi de la composició corporal com un determinant potencial de toxicitat en resposta als agents antineoplàstics utilitzats actualment. Aquests autors van fer èmfasi en la importància d'establir un ajust del tractament antitumoral dependent del pes corporal, a causa de la relació entre l'esgotament del múscul esquelètic sever i l'excés de toxicitat durant la quimioteràpia. De fet, Antoun et al. [206] van informar que la pèrdua de múscul es va agreujar específicament pel tractament amb sorafenib, i el van descriure com un efecte advers de la droga relacionada amb astènia, fatiga i discapacitat física. Aquesta pèrdua de pes és el pronòstic de la gravetat dels efectes tòxics relacionats amb el tractament i de la reducció de la supervivència [209]. Està descrit que una pèrdua de pes del 5% és un predictor significatiu dels efectes tòxics relacionats amb la quimioteràpia [209]. L'augment de la prevalença d'efectes adversos tòxics associats amb aquesta pèrdua de pes són de suficient gravetat com per requerir reduccions de la dosi, retards en el tractament o la finalització definitiva del tractament, de manera que els pacients amb pèrdua de pes, al no poder tolerar el tractament, no aconsegueixen el benefici potencial de la seva teràpia contra el càncer [210,211].

8. TERÀPIA ANTICAQUÈCTICA

Tradicionalment, controlar l'avanç del càncer es considerava com la millor manera de contenir la caquèxia. No obstant això, s'ha demostrat que el tractament dels símptomes per si sol pot millorar la supervivència dels pacients amb càncer

avançat, i un enfocament multifacètic ja ha demostrat ser parcialment eficaç. La creixent comprensió dels mecanismes que sustenen la caquèxia ha portat a un gran nombre d'assaigs clínics a centrar-se en potents teràpies dirigides a mediadors involucrats en afavorir l'hipoanabolisme i l'hipercatabolisme, així com en l'estat nutricional del pacient.

8.1. SUPORT NUTRICIONAL

Les persones diagnosticades de càncer s'enfronten al risc de la desnutrició a causa de la mateixa malaltia, ja sigui a causa del tractament contra el càncer com la cirurgia, la radiació o el tractament farmacològic o a l'anorèxia associada a la malaltia.

8.1.1. Suport nutricional oral/artificial

El mètode preferit de suport nutricional és l'oral, amb l'ús de modificacions dietètiques dirigides a reduir els símptomes relacionats amb els tractaments del càncer. El suport nutricional individualitzat en pacients amb diferents tipus de càncers s'ha demostrat que permet una millor tolerància al tractament amb radioteràpia amb guany de pes en alguns casos i una millora en la qualitat de vida [38,212–214]. La nutrició enteral s'indica quan les vies gastrointestinals són funcionals però la via oral és insuficient per omplir els requisits nutricionals, com és el cas de les neoplàsies malignes de les regions del cap i el coll, esòfag i estòmac. Els beneficis de la nutrició enteral o l'alimentació per sonda que continuen utilitzant l'intestí, tenen menys complicacions com infecció i mal funcionament orgànic, solen administrar-se més

fàcilment i el seu cost és inferior en comparació amb la nutrició parenteral [215,216]. D'altra banda, els nutrients són metabolitzats i utilitzats més eficaçment pel cos [217]. Quan les vies gastrointestinals no funcionen bé, es pot indicar la nutrició parenteral total però, l'ús estès és polèmic a causa de que hi ha poques proves que mostrin una millora en la supervivència dels pacients amb càncer avançat. La nutrició parenteral només ha mostrat beneficis en un nombre petit de pacients, concretament en els pacients postoperatoris que han estat sota tractament intensiu i que han mostrat una taxa de resposta positiva. Un estudi recent va informar que els pacients amb càncer gastrointestinal es van beneficiar del suport perioperatori amb nutrició parenteral total, amb un terç menys de complicacions i disminució de la mortalitat [218].

Tot i els nombrosos beneficis d'aconseguir un estat de nutrició favorable mitjançant el suport nutricional, diversos estudis han demostrat que les estratègies nutricionals no són suficients per invertir la síndrome caquèctica. Això assenyala la necessitat que qualsevol enfocament terapèutic basat en l'augment de la ingestió d'aliments, ha de ser combinat amb una estratègia farmacològica per contrarestar canvis metabòlics.

8.1.2. Suplements nutricionals/Nutraceutics

A. Carnitina

Entre els suplements nutricionals orals, la L-carnitina, amb el seus efectes nutricional, antioxidant, i antimiopàtic és un dels suplements més prometedors. La L-carnitina és un cofactor essencial per a la producció mitocondrial d'acetil coenzim A a través de la via d'oxidació, i juga un paper fonamental en el metabolisme energètic

cel·lular [219]. El coenzim A és necessari per la β -oxidació, pel metabolisme dels aminoàcids i la síntesi de la piruvat deshidrogenasa, i es requereix per activar el cicle de l'àcid tricarboxílic. Diversos estudis que es van realitzar en pacients amb càncer i en pacients amb altres malalties cròniques, van demostrar la capacitat de la suplementació amb L-carnitina per millorar la qualitat de vida, especialment la fatiga i altres símptomes, com pèrdua de pes, el dolor i la neuropatia, i els efectes secundaris de la quimioteràpia [220]. En particular, un estudi de fase II va mostrar que el tractament amb L-carnitina (6 g/dia durant 30 dies) va millorar significativament la massa corporal magra, la gana, la qualitat de vida i la fatiga, en una població de pacients amb càncer avançat amb diferents tumors [221]. Recentment, un estudi prospectiu, controlat amb placebo doble cec aleatoritzat de 72 pacients que patien de càncer de pàncrees avançat, van rebre L-carnitina oral (4 g) o un placebo durant 12 setmanes; durant el tractament, l'índex de massa corporal va augmentar en els pacients que van rebre L-carnitina, mentre que en els pacients del grup control va disminuir. D'altra banda, l'estat nutricional i els paràmetres de qualitat de vida van millorar en els pacients que van rebre L-carnitina [222].

B. Suplements omega-3

L'administració de suplements d'àcids grassos poliinsaturats ω -3 s'ha demostrat que inhibeix la producció de TNF- α i IL-1 a través d'un bloqueig de la COX i les vies de lipo-oxigenasa [223]. L'àcid eicosapentaenoic (EPA) és el principal component d'aquesta família i es troba en grans quantitats en l'oli de peix. L'interès en els àcids grassos ω -3 es va originar a partir de l'observació que les poblacions que consumeixen una dieta rica en aquests constituents mostren la menor incidència de certs tipus de

càncer [224]. En un assaig aleatoritzat, doble cec, utilitzant un suplement oral enriquit en àcids grassos ω-3, es va observar una millora en la massa corporal magra i la qualitat de vida sempre que el seu consum d'EPA era igual o superior a 2,2 g/dia [225]. No obstant això, dades posteriors derivades d'un assaig controlat amb placebo, doble cec, multicèntric, indica que l'administració d'EPA per si sola no té èxit en el tractament de la pèrdua de pes en pacients amb càncer gastrointestinal avançat o de pulmó. [226] D'altra banda, un meta-anàlisi basat en cinc estudis clínics va concloure que no hi havia dades suficients per establir si l'EPA oral era millor que el placebo. Les comparacions d'EPA combinat amb un suplement proteic calòric *versus* un suplement de proteïna sense EPA, en presència d'un estimulant de la gana (acetat de megestrol), no van aportar proves que l'EPA millora els símptomes associats amb la síndrome de caquèxia que sovint s'observen en pacients amb càncer avançat [227]. No obstant això, altres estudis recolzen els beneficis de la teràpia d'oli de peix per a la caquèxia. Ryan et al., en un assaig aleatoritzat, doble cec, van utilitzar la nutrició enteral basada EPA en pacients amb cirurgia de càncer d'esòfag, i els resultats van demostrar efectes beneficiosos sobre el pes corporal [228]. Altres investigadors van utilitzar la nutrició oral enriquida en EPA en pacients amb càncer de pulmó evidenciant uns efectes positius sobre el pes corporal i la qualitat de vida [229]. Un estudi similar va suggerir que la intervenció nutricional amb EPA millora el pes corporal i redueix la inflamació [230]. De la mateixa manera, en dos assaigs aleatoris doble cec utilitzant àcids grassos ω-3 en pacients amb carcinoma de pulmó no microcític, van informar de l'augment del pes corporal i d'una millora en la qualitat de vida i la condició física en comparació amb els subjectes control que van rebre suplement nutricional estàndard [231,232]. Finalment, en un estudi randomitzat, doble cec, en pacients amb insuficiència cardíaca,

els olis de peix van produir efectes antiinflamatoris reduint la producció de TNF- α i van millorar el pes corporal [233].

C. Aminoàcids

Els aminoàcids de cadena ramificada són aminoàcids neutres amb efectes metabòlics interessants i rellevants clínicament. El seu paper potencial com a agents orexigènics i anticaquèctics va ser proposat fa molts anys [234,235]. Nombrosos estudis han provat que els aminoàcids de cadena ramificada, en particular leucina i el seu metabòlit β -hidroxi- β -metilbutirat (HMB), són altament efectius en la prevenció de l'anorèxia i la caquèxia mitjançant la millora de metabolisme de les proteïnes i la promoció de la gana i la ingestió d'aliments [236,237]. Pel que fa als estudis en pacients amb càncer, es van observar resultats interessants; en particular, els pacients amb càncer avançat (estadi IV) que van rebre un suplement de HMB, arginina i glutamina, van guanyar pes en 4 setmanes i van presentar un increment en la composició corporal, el qual es va mantenir durant 24 setmanes [238]. Berk et al., en canvi, van mostrar una forta tendència cap a una major massa i composició corporal en pacients tractats amb el suplement de HMB, arginina i glutamina, però no van provar adequadament la capacitat de d'aquests aminoàcids per revertir o prevenir la caquèxia cancerosa, ja que la majoria dels pacients no van completar l'estudi [239]. En un assaig clínic controlat, doble cec aleatori, es va demostrar recentment que la nutrició enteral perioperatòria amb una fórmula enriquida amb arginina augmenta la supervivència a llarg termini de pacients amb càncer de cap i coll sotmesos a cirurgia i quimioteràpia [240]. Finalment, en pacients amb càncer de pulmó els quals rebien quimioteràpia o radioteràpia, el suplement nutricional de proteïnes riques amb cisteïna va causar un

augment de pes i va millorar la força d'agafada i els paràmetres de qualitat de vida [241].

8.2. TRACTAMENT FARMACOLÒGIC

Malgrat que l'anorèxia representa un factor molt important en el desenvolupament de la caquèxia, s'ha de tenir en compte que en la majoria de casos el suport nutricional no atura la pèrdua de pes corporal. Com ja s'ha descrit, sembla que els canvis a nivell metabòlic presents a l'hoste tenen un paper molt important conjuntament amb l'anorèxia en el desenvolupament de la caquèxia. Per tant, les estratègies terapèutiques estan focalitzades en aquests dos factors. És important fer especial èmfasi en que cap de les estratègies farmacològiques o nutricionals resulten efectives per elles mateixes, i per tant el que cal és dissenyar una teràpia multimodal que integri una o varíes aproximacions farmacològiques i nutricionals a la vegada per poder aturar en gran mesura l'estat catabòlic del pacient, així com afavorir-ne l'anabolisme.

8.2.1. Estimulants de la gana

De vegades el suport nutricional no és suficient per combatre l'anorèxia que pateixen els malalts. Els últims anys s'han dedicat molts esforços en trobar fàrmacs per tal d'estimular la gana dels pacients i combatre la desnutrició que presenten alguns malalts de càncer.

A. Cannabinoides

Els cannabinoides, presents en la marihuana i els seus derivats, són coneguts per estimular la gana i reduir les nàusees, i per aquest motiu han estat utilitzats per incrementar la ingestió en pacients amb càncer [242]. El mecanisme pel qual els cannabinoides exerceixen els seus efectes no és del tot clar. S'ha suggerit que actuen mitjançant els receptors d'endorfina o bé inhibint la síntesi de prostaglandines [242]. Altres estudis proposen que els derivats de la marihuana podrien actuar inhibint la producció/secreció de citoquines [243,244]. Existeixen però, efectes adversos com són: eufòria, empitjorament de les funcions cognitives, vertígens i somnolència. El dronabinol és l'ingredient actiu i responsable d'aquests efectes.

La majoria de treballs en la caquèxia s'han desenvolupat en la SIDA. En un assaig aleatoritzat, doble cec i controlat amb placebo en 139 pacients amb SIDA, va mostrar que una petita dosi oral de THC (5 mg) millorava significativament la gana i les nàusees en comparació amb el placebo, i també millorava l'estat d'ànim i l'augment de pes [245]. Pel que fa al tractament de la caquèxia cancerosa, diversos estudis han descrit una millora en la ingestió en pacients amb càncer avançat després de l'administració del delta-9-tetrahidrocannabinoid, un derivat de cannabinoids [246–248], tot i que en cap d'ells s'ha observat un increment de pes.

B. Corticosteroides

Els corticosteroides varen ser la primera aproximació farmacològica pel tractament de l'anorèxia en càncer. S'han utilitzat per incrementar la ingestió en pacients amb càncer, i molts estudis demostren que els símptomes de la caquèxia, com l'anorèxia i l'astènia, poden ser parcialment mitigats amb un tractament amb

corticosteroides com la dexametasona i la prednisolona [249,250]. No obstant això, els efectes són de curta durada (menys de 4 setmanes) i es troben associats a efectes secundaris de llarga durada, com la resistència a la insulina, retenció de líquids, miopatia, fragilitat de la pell, insuficiència adrenal i trastorns cognitius i del son [249].

El mecanisme d'acció dels corticosteroides no és del tot ben conegit, però la seva acció antiinflamatòria està probablement relacionada amb la inhibició de l'alliberament de IL-1, TNF- α [251], i leptina, així com l'estimulació del NPY. Malgrat els resultats, l'ús de corticosteroids en la pràctica clínica de la caquèxia cancerosa probablement no és la millor alternativa terapèutica ja que han estat relacionats amb atròfia muscular [251,252].

C. Progestàgens

Una de les aproximacions terapèutiques que s'utilitza actualment en pacients amb caquèxia és l'ús de derivats de la progesterona com ara l'acetat de megestrol (AM) o la medroxiprogesterona (MPA), utilitzats en humans per millorar la gana, la ingestió calòrica i l'estat nutricional [253–255]. Els derivats de la progesterona són fàrmacs sintètics que s'utilitzaven en un principi en el tractament de les neoplàsies hormona-dependents, però es va observar un guany de pes i una estimulació de la gana tant en els pacients que responien al tractament com els que no [256].

En el cas del AM es desconeix la raó associada al guany de pes, tot i que el seu mecanisme d'acció podria estar relacionat amb l'activitat dels corticosteroides, ja que a nivell químic són similars a ells. Aquests progestàgens actuen induint la gana amb la estimulació del neuropèptid Y [257]. Per altra banda, s'ha demostrat que el MPA redueix la producció *in vitro* de serotoninines i citoquines (IL-1, IL-6, TNF- α) en plasma de

pacients amb càncer [258]. Tots aquests factors humorals estan implicats en la resposta caquèxia-anorèxia. Al 1993, l'Administració Federal de Drogues (FDA) dels Estats Units va aprovar l'ús d'AM per al tractament de la caquèxia associada al càncer, així com per a la caquèxia associada a malalties cròniques com la SIDA. Fins ara, cap tractament farmacològic ha demostrat una eficàcia i una major tolerància que l'AM [9].

Nombrosos assaigs clínics en humans han demostrat que l'AM (480-800mg/dia), en general, té un efecte favorable millorant la gana, la ingestió d'aliments, les nàusees i augmentant el pes del pacient amb caquèxia [248,259–261], que és sens dubte positiu per a la imatge corporal, però això ha estat atribuït principalment a un augment de massa grassa i no a la massa muscular. Tot i les millors que exerceix sobre la ingestió i el guany de pes, fins ara no hi ha estudis que informin dels efectes beneficiosos de l'AM sobre la massa magra, qualitat de vida i la supervivència de pacients amb càncer [262,263].

D. Grelina

La grelina és una hormona alliberada per l'estòmac, que té la capacitat d'unir-se al receptor de l'hormona de creixement secretagog (GHSR) [264]. És un estimulant de la gana i la ingestió d'aliments de gran abast [265]. L'administració de grelina en rates caquèctiques, a més d'estimular la ingestió d'aliments, va donar lloc a un marcat guany de pes així com un increment en la massa del teixit adipós [266] i la massa magra [267]. A més, la grelina sembla atenuar el dany epitelial gastrointestinal induït per la doxorubicina [268], suggerint que la grelina pot ser un factor de protecció contra els efectes tòxics de la quimioteràpia.

A la pràctica clínica, l'ús de grelina i agonistes de la grelina ha conduït a resultats prometedors en pacients caquèctics amb càncer. En pacients amb càncer metastàtic, l'administració de la infusió de grelina va augmentar el consum d'energia en un 30% i va millorar l'apreciació del menjar [269]. En canvi, en un altre estudi en pacients amb càncer avançat, l'administració de la infusió de grelina no va tenir cap efecte en la ingestió d'aliments o el pes corporal [270]. Recentment, en un estudi clínic en pacients amb càncer gastrointestinal, es va observar que la injecció de la grelina durant dos mesos a la dosi alta (13 mg/kg/dia) va millorar la gana, va reduir la pèrdua de teixit adipós i una tendència cap a una major massa corporal magra [271].

En un estudi pilot en voluntaris sans, utilitzant l'agonista de la grelina RC-1291 (Anamorelina), va causar un augment de pes dependent de la dosi [272]. Un assaig aleatori controlat amb placebo en pacients sans, va mostrar que l'ús d'anamorelina va donar lloc a un augment de pes i l'augment de la concentració de IGF1 circulant [273]. Recentment, en un pilot aleatoritzat, doble cec, es va evidenciar que l'anamorelina produeix un augment del pes corporal i de la concentració de IGF1 circulant així com una millora en la ingestió de nutrients i la gana en pacients amb càncer incurable [274]. Malgrat resultats encoratjadors, calen assajos addicionals per avaluar l'eficàcia d'aquests agents com a teràpies potencials per a la caquèxia cancerosa.

8.2.2. Agents antiinflamatoris

La inflamació sistèmica juga un paper crític en la fisiopatologia de la síndrome caquèctica. Les citoquines pro-inflamatòries, com ara TNF- α , IL-1, i IL-6, han estat implicades en el desenvolupament de la caquèxia cancerosa i s'ha demostrat que

presenten efectes sinèrgics. Per tant, múltiples estratègies terapèutiques s'han desenvolupat per reduir la resposta inflamatòria mitjançant el bloqueig de la síntesi o acció de les citoquines.

A. Talidomida

Les primeres indicacions de la talidomida van ser com a sedant i antiinflamatori, però es va abandonar la seva utilització per la tragèdia deguda als seus efectes teratogènics. De fet, el seu ús com a sedant en dones embarassades va causar més de 10000 casos de malformacions severes en els recent nascuts [92]. Tanmateix, la talidomida ha demostrat ser un tractament viable per diverses condicions mèdiques. Inhibeix el TNF- α en malalts amb càncer, SIDA i altres malalties [275]. A més, la talidomida ha estat relacionada per ser eficaç en diversos síndromes relacionats amb càncer avançat, com la síndrome de la caquèxia cancerosa, nàusees cròniques, insomni, febre d'origen neoplàstic, angiogènesi i dolor [275]. En un estudi clínic obert en pacients amb càncer metastàtic, es va trobar que l'administració de la talidomida (100 mg a la nit durant deu dies), millorava la gana i la sensació de benestar, així com la ingestió d'aliments [276]. Un estudi clínic en pacients amb càncer d'esòfag inoperable, va mostrar que l'administració de la talidomida (200 mg al dia durant catorze dies) va donar com a resultat l'augment de pes i un guany de massa corporal magra [277]. En un altre assaig controlat amb placebo i aleatoritzat en pacients amb càncer de pàncrees inoperable, la talidomida (200 mg al dia durant vint setmanes) va ser ben tolerada i va atenuar la pèrdua de pes i de massa corporal magra [278]. Finalment, en un estudi recent es va demostrar que prenent talidomida (50 mg al dia durant catorze dies) va millorar la gana i la qualitat de vida dels pacients amb càncer

avançat, però no va afectar en la pèrdua de pes [279]. Actualment, per tant, no hi ha evidències suficients per donar suport o refutar l'ús de la talidomida en el tractament de la caquèxia en pacients amb càncer [280].

B. La melatonina

La melatonina és una hormona endògena secretada per la glàndula pineal i que s'utilitza per desordres del son. El seu mecanisme d'acció en la caquèxia cancerosa és la inhibició de la secreció de TNF- α . Un estudi aleatoritzat [281] en pacients amb càncer avançat que no responien al primer cicle de quimioteràpia, van rebre 20 mg/dia de melatonina oral durant 2 mesos; en un total de 1.440 malalts, els que rebien melatonina la freqüència de la caquèxia, astènia, trombocitopènia i linfocitopènia va ser significativament menor que els que no la van rebre. En un segon estudi, es va avaluar la influència de melatonina en l'eficàcia i la toxicitat de la quimioteràpia en un grup de 200 pacients amb tumors sòlids metastàsics resistentes a la quimioteràpia, que van ser assignats aleatoriament per rebre quimioteràpia sola o la quimioteràpia més melatonina; els pacients tractats amb melatonina (20 mg al dia) van mostrar una estabilització de la malaltia així com una menor toxicitat associada al tractament que els pacients tractats amb placebo [281]. Altres treballs d'aquest grup d'investigació han descrit que l'ús de la melatonina en pacients amb càncer avançat millora la taxa de resposta al tractament i la supervivència [281–283]. Malgrat aquestes observacions satisfactories, altres estudis han mostrat resultats opositius. De fet, en un estudi pilot aleatoritzat en pacients amb càncer gastrointestinal avançat, el fet de prendre melatonina (18 mg diaris) no va induir efectes sobre l'estat inflamatori i la pèrdua de pes [284]. A més, un assaig clínic doble cec en pacients caquèctics amb càncer avançat,

ha demostrat recentment que prendre melatonina per via oral 20 mg a la nit no va millorar la gana, el pes, la supervivència o la qualitat de vida en comparació amb el placebo [285]. Per tant, es necessita més investigació per determinar si la melatonina té un paper potencial en el tractament simptomàtic de pacients amb caquèxia per càncer.

C. Antiinflamatoris no esteroïdals

Els medicaments antiinflamatoris no esteroïdals (AINE), incloent els inhibidors de la ciclooxygenasa-2 (COX-2), la indometacina i l'ibuprofè, redueixen l'alliberament de proteïnes de fase aguda i citoquines [286]. En estudis amb animals, la inhibició de la síntesi de prostaglandines va atenuar la progressió tumoral i va disminuir la incidència de la caquèxia cancerosa [287,288]. Els AINE inhibeixen la síntesi de prostaglandines, i per tant, bloquegen els efectes de la inflamació sistèmica. Lundholm et al. van demostrar que l'ús de indometacina pot prolongar la supervivència en pacients caquèctics amb tumors sòlids metastàsics, incloent el càncer de pàncrees [289]. Altres assaigs clínics controlats han demostrat que l'ibuprofè pot disminuir els nivells de PCR, augmentar el pes corporal i la massa muscular i millorar la qualitat de vida, especialment quan es combina amb progestàgens [290]. D'altra banda, s'ha observat experimentalment en ratolins caquèctics portadors de tumor C26, que el tractament amb celecoxib (AINE que inhibeix selectivament la COX-2) va prevenir el desenvolupament de la caquèxia [291], fet que suggereix un benefici probable per al seu ús clínic. En un estudi pilot aleatoritzat, es va demostrar que els pacients amb càncer que rebien celecoxib a més de càpsules d'oli de peix, mostraven un guany de massa magra i massa grassa, major força d'agafada i una disminució de la concentració

de PCR circulant, en comparació amb els pacients tractats només amb les càpsules d'oli de peix [292]. En un altre assaig clínic pilot en pacients amb càncer de cap i coll o de tracte gastrointestinal, s'ha demostrat que l'administració de celecoxib va causar un marcat augment de pes, un increment de l'índex de massa corporal i una millora en la qualitat de vida [293]. Finalment, un estudi no aleatoritzat de fase II va demostrar que després del tractament amb celecoxib, es va incrementar la massa magra, la concentració de TNF- α circulant va ser disminuïda, i la força d'agafada i la qualitat de vida havien millorat [294].

Basant-se en aquests resultats, hi ha evidència que els AINEs poden millorar el pes dels pacients caquèctics. També poden millorar l'estat funcional, qualitat de vida i l'estat inflamatori. Per tant s'hauria considerar l'ús d'aquests com a part de la teràpia anticaquèctica.

D. Anticossos i receptors solubles

L'ús d'anticossos o receptors solubles anticitoquines podria ser una opció terapèutica viable. De fet, els estudis en animals han mostrat certa eficàcia. En rates caquèctiques portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, es va demostrar que la injecció d'un anticòs polyclonal anti-TNF- α causa una disminució en la degradació de proteïnes en el múscul esquelètic; no obstant això, aquest tractament no va ser capaç d'evitar la reducció de pes [295]. En models murins de caquèxia, la injecció d'un anticòs monoclonal anti-IL-6 va inhibir la pèrdua de pes induïda pel tumor [103]. En un altre estudi amb ratolins caquèctics portadors del LLC, la injecció d'anticossos monoclonals anti-IFN- γ va resultar en una reducció en la pèrdua de pes i la massa grassa [296].

En humans, en canvi, s'han realitzat un nombre molt limitat d'estudis clínics. L'ús d'un compost, etanercept, s'ha posat a prova. Es tracta d'una proteïna de fusió que uneix la fracció soluble p75 del receptor de TNF- α amb un fragment Fc d'una immunoglobulina de tipus G; aquesta s'uneix a TNF- α *in vivo* i bloqueja la seva interacció amb els receptors de la superfície cel·lular [297]. En un assaig clínic pilot, es va observar que els pacients amb càncer avançat tractats amb etanercept combinat amb un agent antitumoral (docetaxel), patien menys fatiga i presentaven una millor tolerància al tractament antitumoral [298]. No obstant això, un assaig clínic en pacients amb diversos càncers sòlids, va mostrar que el tractament amb etanercept no va tenir cap efecte sobre la gana, la pèrdua de pes i la supervivència [299]. Un altre estudi de fase II, on es va utilitzar un anticòs monoclonal anti-TNF- α (infliximab) per tal de millorar els símptomes de la caquèxia en pacients amb càncer de pàncrees, tampoc no van mostrar resultats satisfactoris [300].

Pel que fa a la IL-6, recentment s'ha demostrat en pacients amb càncer de pulmó no microcític (NSCLC) que un anticòs humanitzat anti-IL-6 (anomenat ALD518), va disminuir la pèrdua de massa corporal magra en comparació amb el placebo [109]. Finalment, amb una estratègia alternativa utilitzant un antagonista del receptor d'IL-6, tocilizumab, alguns pacients van mostrar alguns efectes prometedors, com ara l'augment de pes o reducció dels nivells de PCR [301–303]. No obstant això, s'han mostrat alguns casos de malignitat associada a l'ús del tocilizumab [304], el que requereix la implementació d'assajos clínics a major escala per avaluar la seguretat i eficàcia.

8.2.3. Agents anabòlics

A. Esteroides anabolitzants

L'ús d'esteroides anabòlics, com la testosterona, és vinculant per la seva incapacitat per separar els efectes anabòlics desitjats en el múscul dels efectes secundaris androgènics no desitjats [305]. Els pacients amb NSCLC en tractament de quimioteràpia van ser tractats amb decanoat de nandrolona (200 mg setmanal durant quatre setmanes), i es va demostrar que el derivat de l'esteroide anabòlic de testosterona tendeix a disminuir la pèrdua de pes i augmentar la supervivència [306]. En canvi, els pacients aleatoritzats amb càncer d'esòfag es va demostrar que el tractament amb decanoat de nandrolona no va implicar cap efecte beneficiós en l'estat nutricional [307]. Per tant, cal trobar substituts preferentment causant un efecte anabòlic. La necessitat d'aquests agents ha estimulat el desenvolupament de moduladors selectius del receptor d'andrògens (SARM). El enobosarm, també conegut com Ostarine o Gtx-024, és un SARM no esteroïdal que té una activitat farmacològica específica androgènica i anabòlica d'un determinat teixit [308]. En dos estudis clínics de fase II recents s'ha demostrat que el tractament dels pacients amb càncer amb enobosarm genera un guany de massa corporal magra i la millora de l'activitat física, sense causar efectes tòxics associats amb l'activitat androgènica [309,310].

B. Agonistes β_2 -adrenèrgics

Els agonistes del receptor β_2 -adrenèrgic són molècules potencialment interessants des que es van observar els efectes sobre el metabolisme proteic al múscul esquelètic. Són potents promotores del creixement muscular en moltes espècies

animals, donant lloc a una hipertròfia muscular esquelètica [311–314], mentre que causen una reducció del contingut adipós del cos [315,316]. Aquests canvis en la composició estan associats a una redistribució dels substrats energètics, que són mobilitzats des de les reserves cap a la utilització per part de teixits com el múscul i el teixit adipós marró [315]. El nostre grup va descriure que els agonistes del receptor β_2 -adrenèrgic, concretament el clenbuterol, suprimien l'activació de la proteòlisi muscular associada a la caquèxia inhibint la seva acció sobre el sistema proteolític dependent de ubiquitina durant el creixement tumoral [317]. S'ha vist que en pacients amb insuficiència cardíaca crònica, el tractament amb salbutamol durant 3 setmanes augmenta la força de la musculatura respiratòria; de totes maneres, no és capaç de millorar les anormalitats en quàdriceps o la capacitat de realitzar exercici [318].

El gran nombre de funcions fisiològiques controlades pels receptors β -adrenèrgics suggereix que els mecanismes pels quals es donen els canvis observats en la composició corporal poden ser extremadament complexos. Un mecanisme proposat podria ser l'efecte directe de l'agonista sobre els receptors β -adrenèrgics en el múscul esquelètic i teixit adipós. D'altra banda, hi ha estudis previs que indiquen que l'estimulació selectiva dels receptors β_2 -adrenèrgics protegeix de canvis en la morfologia cel·lular i la fragmentació nuclear, característiques de l'apoptosi en miòcits cardíacs i altres cèl·lules [319]. Els agonistes- β_2 actuen sobre la cèl·lula del múscul per mitjà de la via de senyalització que impliquen el receptor β_2 -adrenèrgic, la proteïna quinasa A (PKA) i el factor de transcripció CREB (sigles en anglès: cAMP response element-binding) [320]. La via PI3K/Akt/mTOR també s'ha vist involucrada en la resposta biològica dels teixits muscolars al tractament amb agonistes- β_2 [320–322]. S'ha de tenir en compte que les propietats farmacodinàmiques d'un agonista concret

són complexes i varien entre espècies, i també en una mateixa espècie depenen de l'edat o de la dieta [323]. El clenbuterol és un d'aquests compostos amb importants efectes anticaquèctics en models animals. El mecanisme d'acció d'aquesta droga es basa en la seva capacitat per prevenir la degradació muscular mitjançant la inhibició de la proteòlisi en el múscul esquelètic [317]. De totes maneres, la toxicitat d'aquesta droga en humans [324] no ha afavorit la realització dels assajos clínics.

El formoterol és un potent agonista del receptor β_2 -adrenèrgic selectiu que combina avantatges clínics de ràpida acció amb durada d'acció. Aquesta llarga durada d'acció es deu a la seva naturalesa lipofílica [325]. Aquest compost ja s'està utilitzant en humans pel tractament de broncoespasme associat a asma. *In vitro*, aquest compost és un relaxant muscular potent amb alta eficàcia, alta afinitat i selectivitat pels β_2 -adrenoceptors. A més, el formoterol també inhibeix un ampli rang de processos inflamatoris aguts en models animals [326]. El formoterol actua relaxant la musculatura llisa dels bronquis i proporcionant importants beneficis clínics en la simptomatologia dels pacients amb MPOC [327]. Aquest compost, com altres agonistes β_2 -adrenèrgics, atenua la reacció asmàtica tardana induïda per agents al·lergènics [328] i, sota algunes condicions, té més efectes que d'altres agonistes β_2 -adrenèrgics com el salbutamol i el salmeterol [329].

En particular, l'ús d'aquest agonista β_2 -adrenèrgic en animals d'experimentació ha demostrat ser molt útil en la reversió de l'atròfia muscular associada amb el càncer [330]. A més de la seva toxicitat relativament baixa, el formoterol és capaç de revertir el procés de pèrdua muscular. Els efectes del fàrmac contra el desgast muscular es basen tant en la taxa d'activació de la síntesi proteica com en la taxa d'inhibició de la proteòlisi dels músculs. Experiments realitzats al nostre grup posen de manifest que el

tractament amb formoterol dóna lloc a una disminució en l'expressió del sistema ubiquitina-proteasoma, ja que es mostra una disminució de l'expressió de gens relacionats en aquest sistema proteolític com la ubiquitina, subunitats del proteasoma, i lligasses E3 com MuRF1 i atrogina-1 en el múscul esquelètic, que, juntament amb la disminució de l'activitat del proteasoma, suggereix que la principal acció antiproteolítica del fàrmac es basa en la inhibició d'aquest sistema proteolític [330,331]. L'agonista β_2 -adrenèrgic també es capaç de disminuir l'augment de la taxa d'apoptosi en múscul present en animals portadors de tumors, així com de facilitar la regeneració muscular al estimular la proliferació de les cèl·lules satèl·lit [332].

L'ús de β_2 -agonistes, però, es relaciona amb un nombre d'efectes adversos. Aquests efectes limiten actualment l'ús de β_2 -agonistes per al tractament de pèrdua de massa muscular en éssers humans. L'administració de β_2 -agonistes pot provocar símptomes com ara tremolars, rampes musculars, mal de cap i vasodilatació perifèrica, però l'efecte advers més prominent de l'administració crònica de β_2 -agonistes és una alteració de l'estruatura i la funció del múscul cardíac. Taquicàrdia, hipertròfia cardíaca, la infiltració de col·lagen a les parets del ventricle esquerre i reducció de la pressió ventricular esquerra s'han associat amb l'ús de agonistes- β_2 en rata i ratolí [333–336]. Les diferències entre els estudis són essencialment relacionades amb la pròpia molècula agonista- β_2 , la dosi utilitzada i la durada del tractament agonista- β_2 . No obstant això, la hipertròfia cardíaca és completament reversible després de la interrupció de l'administració del agonista- β_2 (clenbuterol, formoterol) en rata [337,338]. També cal destacar que la hipertròfia cardíaca associada amb l'administració de l'agonista- β_2 pot conferir alguns beneficis fisiològics a l'atenuar

L'atròfia dels cardiomioècits associats amb els dispositius d'assistència ventricular esquerra [339].

C. Inhibidors de la miostatina

Una altra estratègia analitzada per fer front a la caquèxia són els antagonistes de la miostatina, la qual regula negativament el creixement i el desenvolupament muscular [148]. Molts investigadors s'han centrat en el potencial terapèutic de la inhibició de la via de senyalització miostatina/activina. El bloqueig de senyalització miostatina/activina es pot aconseguir per diversos tipus de proteïnes que interfereixen amb les interaccions lligand-receptor. En els últims anys s'han dissenyat diverses molècules que han demostrat ser eficaces en models preclínics de la malaltia. La inhibició de la miostatina dirigida per anticossos va atenuar l'atròfia del múscul esquelètic i la pèrdua de capacitat d'exercir força muscular en un model murí de caquèxia cancerosa, en part per la reducció de l'apoptosi [340]. Un altre estudi va posar de manifest que l'administració sistèmica de ACVR2B-Fc (proteïna de fusió Fc al domini extracel·lular del receptor de activina) va inhibir el desgast muscular i les reserves adiposes en dos models experimentals de caquèxia, sense afectar el creixement tumoral [134]. H.Q. Han i el seu equip van dissenyar un receptor soluble de la miostatina (sActRIIB), el qual reverteix la pèrdua de massa muscular i l'atròfia cardíaca associada a la caquèxia, i per altra banda incrementa la supervivència dels ratolins [129]. No obstant això, la informació sobre la participació d'alguns d'aquests agents en assaigs clínics és escassa, i fins al moment cap de les substàncies conegudes ha tingut un efecte positiu en pacients. MYO-029 és un anticòs específic de la miostatina humana recombinant que no va mostrar cap millora significativa en la força

muscular i en la funció muscular en les distròfies musculars en adults [341]. L'altre compost desenvolupat per la companyia farmacèutica Amgen, AMG 745, té una composició desconeguda, però la seva prova es va aturar després de la fase I d'assajos clínics [342], i no se sap si continuarà el desenvolupament d'aquest compost. Una altra forma soluble del receptor ActRIIB desenvolupat per Acceleron Pharma, ACE-031, ha demostrat ser ben tolerat i augmenta la massa magra en dones postmenopàsiques sanes, i es preveu seguir el desenvolupament de ACE-031 [343]. Finalment, BYM338, un anticòs humà que actua com un inhibidor de la miostatina, desenvolupat per Novartis Pharmaceuticals per tractar la caquèxia associada al càncer de pulmó o de pàncrees, és actualment testat en un assaig multicèntric, aleatoritzat, doble cec i controlat amb placebo de fase II [344]. Aquest estudi està dirigit a pacients caquèctics amb un diagnòstic confirmat de càncer de pulmó no microcític en estadi IV o d'adenocarcinoma de pàncrees en estadi III/IV. La valoració dels resultats primaris és la mesura dels canvis en la massa muscular de la cuixa mitjançant ressonància magnètica; els resultats secundaris inclouen una prova de marxa de 6 minuts i l'eficàcia en el tractament de pèrdua de pes total no intencional. L'estudi ja ha estat completat tot i que els resultats no han estat publicats encara.

8.3. EXERCICI FÍSIC

Aproximadament el 25% dels casos de càncer a tot el món es deuen a un excés de pes i un estil de vida sedentari. L'activitat física pot reduir el risc de diversos tipus de càncer per diversos mecanismes, entre ells la disminució de les hormones sexuals, hormones metabòliques i la inflamació i millorar la funció immune. El nivell d'activitat

física també pot estar associat amb el pronòstic en persones amb càncer. Assaigs clínics aleatoritzats han demostrat que les intervencions d'activitat física poden canviar biomarcadors de risc de càncer [345]. Tot i estar ben documentada la capacitat de l'exercici crònic per contrarestar la inflamació relacionada amb la malaltia subjacent, desafortunadament s'han realitzat molt pocs estudis, tant clínics com experimentals, per definir l'efectivitat de l'exercici contra la caquèxia [346]. El fonament per a l'ús d'exercici és bastant simple: s'ha demostrat que durant la caquèxia la força muscular i la resistència es redueix dràsticament [347,348]. Aquestes alteracions limiten severament la capacitat de realitzar activitats diàries i, en conseqüència, posen en perill la qualitat de vida del pacient. L'entrenament amb exercicis, per contra, és capaç d'augmentar la força i la resistència en condicions saludables, dependent del tipus d'exercici. D'altra banda, s'ha demostrat que actua com un excel·lent impuls anabòlic per al múscul esquelètic en combinació amb esteroides anabòlics o altres fàrmacs anabòlics muscolars [349].

No obstant això, per considerar l'exercici en malalts amb càncer s'han de considerar diversos factors, en particular les alteracions metabòliques que podrien limitar la capacitat per fer exercici i, per tant, els efectes beneficiosos o perjudicials resultants. En realitat, molts pacients de càncer pateixen de fatiga crònica, ja sigui degut a la pròpia malaltia o al seu tractament, sent aquest últim un factor de confusió que limita la pràctica d'exercici. De fet, dades recents del nostre laboratori suggereixen que l'exercici no és aconsellable quan l'anèmia és present, ja que quan s'exerciten ratolins portadors de tumors que pateixen d'una disminució significativa en l'hematòcrit, la seva condició empitjora [350]. L'anèmia és una característica freqüent dels pacients amb caquèxia cancerosa, contribuint a la pèrdua de pes, disminució de la

capacitat d'exercici, i l'homeòstasi d'energia alterada [351]. La incidència de l'anèmia varia amb el tipus de tumor, l'estadi i l'edat del pacient: fins a un terç dels pacients amb càncer són anèmics al moment del diagnòstic [352] i la quimioteràpia poden fins i tot augmentar aquest nombre. No obstant això, el tipus d'exercici a realitzar en una població de pacients de càncer és molt important.

La pràctica d'exercici induceix l'anabolisme muscular; per tant, l'exercici de força podria antagonitzar l'atròfia muscular a la caquèxia i l'entrenament aeròbic podria millorar la fatiga [353]. Si considerem el manteniment de la massa muscular com a objectiu principal que s'ha d'assolir en la caquèxia, és preferible l'exercici de força enlloc de l'exercici de resistència; mentre que el primer exerceix una acció anabòlica, l'últim estimula adaptacions metabòliques oxidatives amb petits canvis en la massa muscular [350]. No obstant això, l'anabolisme induït per l'exercici de força no implica necessàriament un efecte anticatabòlic. Per contra, l'exercici aeròbic lleu podria contrarestar la reducció de la capacitat oxidativa present en la caquèxia experimental [354]. L'estimulació del metabolisme oxidatiu podria impedir directament la hiperlipidèmia, i per tant millorar la resistència a la insulina. Finalment, l'exercici aeròbic induceix adaptacions fisiològiques que resulta en l'atenuació de la resposta inflamatòria [355].

A diferència de l'exercici de força, l'exercici de resistència es pot realitzar desproveït d'equips, és ben tolerat pels pacients, i es pot observar un efecte antiinflamatori fins i tot a baixa intensitat [346]. Com a resultat, l'exercici aeròbic ha estat el tipus d'exercici d'elecció en la majoria dels estudis realitzats fins a la data. Alguns estudis en pacients han demostrat que l'exercici de resistència redueix la fatiga i el malestar psicològic en pacients amb càncer que reben quimioteràpia [356], i va

portar a una millora de la funció física dels pacients amb càncer de mama [357]. Un altre metanàlisi [358] va informar dels efectes diferencials exercits per l'exercici, dependent de la patologia considerada i el tipus d'exercici realitzat, tot i que només es va observar un efecte positiu global de l'exercici quan es van agrupar totes les patologies considerades. Un assaig aleatori més recent va mostrar que, en els pacients amb càncer avançat, l'exercici és factible i tot i que la fatiga no es va veure reduïda, el rendiment físic va millorar considerablement [359]. Altres estudis han informat que l'entrenament físic, ja sigui aeròbic, de força o protocols combinats, ha estat àmpliament adoptat en el tractament de pacients amb molts tipus i estadis de tumors, i en diferents fases del tractament. Aquesta estratègia ha resultat en una millor qualitat de vida i el manteniment funcional en càncer de pit [360], càncer de pulmó incurable [361], i càncer de pròstata [362], així com en els limfomes [363]. Per tant, els beneficis de l'exercici per als pacients amb càncer són inequívocs.

8.4. TERÀPIA MULTIMODAL

La manca de consciència dels problemes de nutrició i l'estat dels pacients amb càncer per molts oncòlegs [364], juntament amb la manca d'evidències d'una teràpia adequada, fa de la caquèxia una gestió rarament activa, que freqüentment resulta en una progressiva pèrdua de pes que va avançant sense diagnosticar fins que es torna greu. La implicació crítica de la resposta inflamatòria de l'hoste en el desenvolupament de la caquèxia, i en particular l'esgotament de la massa corporal magra, limita la resposta a un suport nutricional estàndard [81]. Tenint en compte que la caquèxia és una síndrome multifactorial, és poc probable que un sol medicament sigui efectiu per

contrarestar-la. Per tant, la línia de recerca futura és el disseny d'un enfocament multimodal, és a dir, una combinació de fàrmacs que actuen sobre diferents vies fisiopatològiques, per prevenir o retardar l'aparició de la caquèxia en malalts de càncer. En primer lloc, l'estrategia terapèutica ideal hauria de contemplar el suport nutricional, ja sigui mitjançant suplements nutricionals, incorporant nutracèutics o fàrmacs [365]. En segon lloc, la teràpia multimodal hauria d'iniciar una doble estratègia, tant anticatabòlica com anabòlica. De fet, el bloqueig de l'estat catabòlic vinculat a la caquèxia que pateixen els pacients amb càncer és absolutament essencial. No obstant això, considerant l'alta demanda d'aminoàcids per part del tumor, l'enfocament terapèutic també hauria d'iniciar un agent anabòlic per potenciar la síntesi de proteïna muscular. Tal enfocament pot millorar la tolerància als tractaments contra el càncer aggressiu i la capacitat funcional i la qualitat de vida, fins i tot en etapes avançades de la malaltia. A més, els tractaments futurs s'haurien d'iniciar en el moment del diagnòstic del càncer i s'haurien d'adaptar a l'estadi de caquèxia del pacient [15]. El tractament de la caquèxia per a un pacient terminal ha de ser principalment pal·liatiu, i ha de ser diferent del d'un pacient que té un estadi de càncer inicial; des d'aquest punt de vista, establir una escala dels pacients caquèctics és absolutament essencial per a l'aplicació d'una teràpia adequada i ha d'anar acompanyada de guies clíniques [26].

En els últims anys s'han realitzat alguns assaigs clínics enfocats a aquesta línia de teràpia multimodal. Un estudi clínic controlat de fase III ha comparat 5 tractaments, AM, EPA, L-carnitina, talidomida i la combinació de tots ells, en un període de 4 mesos. Els resultats van mostrar que la combinació dels 4 fàrmacs va ser superior als fàrmacs utilitzats de manera individual per millorar la gana i l'astènia, en la reducció de despesa

Introducció

d'energia en repòs, en l'augment de la massa magra i en la reducció dels nivells d'IL-6 [294]. En un altre assaig de fase III en pacients amb càncer ginecològic, es va observar que el tractament format per la combinació de AM, carnitina, antioxidants i celecoxib, va donar lloc a un augment de la massa corporal magra, una reducció de l'estrés oxidatiu i de la inflamació i a millorar la qualitat de vida, en comparació amb els pacients tractats només amb AM [261].

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és demostrar la necessitat d'establir una teràpia multimodal per al tractament de la caquèxia cancerosa que englobi agents anabòlics i anticatabòlics amb base nutricional o farmacològica.

Pel disseny d'una bona estratègia multimodal s'utilitzen diferents aproximacions: d'una banda, es testen una sèrie de fàrmacs candidats per a combatre les alteracions metabòliques i l'anorèxia associades a l'estat caquèctic, i d'altra banda, per poder dissenyar una bona estratègia necessitem generar el model preclínic que millor s'aproximi a la condició humana, com és un model experimental de caquèxia cancerosa tractat amb una teràpia antitumoral. Els models tumorals utilitzats en aquesta tesi doctoral són l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 (en rata de la soca Wistar), el carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) (en ratolí de la soca C57BL/6), l'adenocarcinoma de colon C-26 (en ratolí de la soca Balb) i el melanoma B-16 (en ratolí de la soca C57BL/6). Tots quatre es caracteritzen per ser tumors de creixement ràpid i que indueixen la síndrome de la caquèxia en un temps relativament curt.

Dins d'aquest objectiu general, s'engloben diferents qüestions que conformen el cos de la tesi. De forma detallada, els objectius específics es defineixen com:

- 1. Avaluació dels efectes del tractament amb formoterol sobre la funció cardíaca en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130.**

El tractament amb formoterol ha demostrat ser un bon candidat per la teràpia contra la caquèxia, donada la seva capacitat de reduir la pèrdua de massa muscular associada amb l'estat caquèctic en animals portadors de tumor. Però atès que alguns agonistes- β_2 han mostrat una certa cardiotoxicitat, l'objectiu d'aquesta investigació ha estat analitzar els efectes del tractament amb formoterol sobre la funció cardíaca en rates caquèctiques portadores de tumor.

2. Determinació de la possible correlació entre desgast muscular i pèrdua de funcionalitat del múscul esquelètic.

Els animals portadors d'un tumor caquèctic experimenten un desgast muscular que es reflexa en una disminució en els pesos dels músculs. El que es pretén estudiar en aquest apartat és si aquesta pèrdua de pes es tradueix amb una manca de funcionalitat muscularavaluant la força muscular i l'activitat física dels animals. En cas afirmatiu, aquesta eina ens serà de gran utilitat per poder avaluar la efectivitat dels tractaments testats, no només a nivell dels pesos dels músculs, sinó a nivell de la condició física en que es troben dels animals, per aproximar-nos en cert grau, a poder mesurar la qualitat de vida dels animals.

3. Avaluació de diferents estratègies terapèutiques unimodals per al tractament de la caquèxia cancerosa.

En aquest bloc s'han testat diferents aproximacions terapèutiques per combatre la caquèxia cancerosa. S'ha avaluat el potencial anticaquèctic de diferents

agents anabòlics i anticatabòlics com són l'agonista β_2 -adrenergic formoterol o el receptor soluble d'activines sActRIIB, per contrarestar la pèrdua de massa muscular, així com agents per contrarestar l'anorèxia com són l'acetat de megestrol o la carnitina.

A partir del resultats obtinguts, s'ha avaluat la combinació d'algunes d'aquestes aproximacions per estudiar-ne la interacció entre elles amb la finalitat dissenyar una teràpia multimodal.

4. Aplicació d'una teràpia multimodal per al tractament de la caquèxia i anàlisi de la interacció amb la quimioteràpia.

Concretament, es pretén estudiar la possible millora de l'estat i la condició física dels animals tractats amb una teràpia multimodal anticaquèctica i antitumoral, respecte als animals tractats amb una teràpia únicament antitumoral. Això permetrà valorar la necessitat d'aplicar teràpies multimodals, dirigides tant a combatre el tumor com a mitigar la caquèxia de l'individu. Aquest objectiu es subdivideix en dos blocs:

1. Per generar l'entorn preclínic que millor s'aproximi a la situació clínica necessitem un model experimental de caquèxia tractat amb una teràpia antitumoral, i per això és necessari posar a punt un tractament antitumoral (sorafenib) en els diferents models de tumor experimentals.
2. Avaluar l'efecte d'un tractament anticaquèctic múltiple, en aquesta tesis s'estudia concretament el tractament constituït per formoterol i acetat de megestrol en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 i

tractades amb l'agent antitumoral sorafenib. D'aquesta manera, es pretén avaluar si el fet d'afegir acetat de megestrol a la teràpia anticaquèctica millora de manera significativa l'efecte anticaquèctic del formoterol i d'altra banda, analitzar si la teràpia anticaquèctica és capaç d'augmentar l'efectivitat de la teràpia antitumoral i/o disminuir-hi la toxicitat.

PUBLICACIONS

Sívia Busquets Rius i Francisco Javier López Soriano, com a co-directors de la Tesi Doctoral presentada per **Míriam Toledo Soler** i que porta per títol "**Teràpia multimodal per al tractament de la caquèxia cancerosa**", presenten aquest informe relatiu a la contribució de la doctoranda als diferents treballs presentats a l'esmentada Tesi Doctoral:

PUBLICACIÓ 1

Formoterol in the treatment of experimental cancer cachexia: effects on heart function.

Míriam Toledo, Jochen Springer, Sívia Busquets, Anika Tschirner, Francisco J. López-Soriano, Stefan D. Anker and Josep M. Argilés.

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 2014, DOI: 10.1007/s13539-014-0153-y

Índex d'Impacte (SCI): 7,413

La doctoranda ha dut a terme els experiments al laboratori de Recerca Aplicada en Caquèxia del Departament de Cardiologia de la Facultat de Medicina Charité (Berlín, Alemanya) realitzant les següents tasques: la manipulació dels animals experimentals, l'anàlisi de la composició corporal i dels resultats obtinguts, així com l'estudi estadístic.

PUBLICACIÓ 2

Cancer cachexia: Physical activity and muscle force in tumour-bearing rats.

Míriam Toledo, Sívia Busquets, Sònia Sirisi, Roberto Serpe, Marcel Orpí, Joana Coutinho, Raquel Martínez, Francisco J. López-Soriano and Josep M. Argilés.

Oncology Reports 25: 189-193, 2011

Índex d'Impacte (SCI): 2,191

La doctoranda ha dut a terme els experiments, la manipulació dels animals experimentals i l'avaluació dels resultats obtinguts, així com l'estudi estadístic.

PUBLICACIÓ 3

Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity.

Sílvia Busquets*, Míriam Toledo*, Sònia Sirisi, Marcel Orpí, Roberto Serpe, Joana Coutinho, Raquel Martínez, Josep M Argilés, Francisco J López-Soriano.

* Contributed equally,

Experimental and therapeutic medicine 2(4):731-735, 2011

Índex d'Impacte (SCI): 0,941

La doctoranda ha participat en la manipulació dels animals experimentals, l'avaluació dels paràmetres de condició física, així com en l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

PUBLICACIÓ 4

Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance.

Sílvia Busquets, Míriam Toledo, Marcel Orpí, David Massa, Maria Porta, Eva Capdevila, Núria Padilla, Valentina Frailis, Francisco J López-Soriano, H Q Han, Josep M Argilés.

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 3(1):37-43, 2012

Índex d'Impacte (SCI): 7,413

La doctoranda ha participat en la manipulació dels animals experimentals, les determinacions de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real, l'avaluació dels paràmetres de condició física, així com en l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

PUBLICACIÓ 5

Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: additive effects of activin type II receptor inhibition and beta-2 agonist, Míriam Toledo, Sílvia Busquets, Fabio Penna, Xiaolan Zhou, Enrica Marmonti, Angelica Betancourt, David Massa, Francisco J. López-Soriano, H.Q. Han and Josep M. Argilés

Manuscrit preparat per sotmetre a *Cancer Research*.

La doctoranda ha dut a terme els experiments, la manipulació dels animals experimentals, l'avaluació dels paràmetres de condició física, la detecció de la taxa de degradació i de síntesi proteïques, les determinacions de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real, així com l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

PUBLICACIÓ 6

L-Carnitine: an adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer.

Sílvia Busquets, Roberto Serpe, Míriam Toledo, Angélica Betancourt, Enrica Marmonti, Marcel Orpí, Fabrizio Pin, Eva Capdevila, Clelia Madeddu, Francisco J. López-Soriano, Giovanni Mantovani, Antonio Macciò, Josep M. Argilés

Clinical Nutrition 31(6):889-95, 2012

Índex d'Impacte (SCI): 3,940

La doctoranda ha participat en la manipulació dels animals experimentals, les determinacions de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real, les incubacions in vitro dels músculs, l'avaluació dels paràmetres de condició física, així com en l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

PUBLICACIÓ 7

Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia.

Sílvia Busquets, Roberto Serpe, Sónia Sirisi, Míriam Toledo, Joana Coutinho, Raquel Martínez, Marcel Orpí, Francisco J. López-Soriano and Josep M. Argilés

Clinical Nutrition 29(6):733-7, 2010

Índex d'Impacte (SCI): 3,940

La doctoranda ha participat en la manipulació dels animals experimentals, les determinacions de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real, les incubacions in vitro dels músculs, l'avaluació dels paràmetres de condició física, així com en l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

PUBLICACIÓ 8

Megestrol acetate treatment influences tissue amino acid uptake and incorporation during cancer cachexia.

Míriam Toledo, Enrica Marmonti, David Massa, Marina Mola, Francisco J. López-Soriano, Sílvia Busquets, Josep M. Argilés

e-SPEN Journal 7(4):e135–e138, 2012

La doctoranda ha participat en la manipulació dels animals experimentals, les determinacions de la taxes d'incorporació de leucina en el teixit muscular i de captació d'aminoàcids neutres pel teixit muscular i hepàtic, així com en l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

PUBLICACIÓ 9

Distinct behaviour of sorafenib in experimental cachexia-inducing tumours: the role of STAT3.

Míriam Toledo*, Fabio Penna*, Sílvia Busquets, Francisco J. López-Soriano and Josep M. Argilés.

* Contributed equally

PlosONE 9(12):e113931, 2014

Índex d'Impacte (SCI): 3,534

La doctoranda ha participat en la manipulació dels animals dels tres models utilitzats, l'avaluació dels paràmetres de condició física, la determinació dels nivells d'IL-6, així com en l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

PUBLICACIÓ 10

A multifactorial anticachectic approach for cancer cachexia: the role of chemotherapy.

Míriam Toledo, Fabio Penna, Francesc Oliva, Melania Luque, Angelica Betancourt, Enrica Marmonti, Francisco J. López-Soriano, Josep M. Argilés and Sílvia Busquets

Acceptat a la revista Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle

Índex d'Impacte (SCI): 7,413

La doctoranda ha dut a terme els experiments, la manipulació dels animals experimentals, l'avaluació dels paràmetres de condició física, les determinacions de l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real, així com l'anàlisi estadística i la discussió de les dades obtingudes.

Barcelona, a 5 de febrer de 2015.

Signat: Sílvia Busquets Rius

Signat: Francisco J. López Soriano

PUBLICACIÓ 1

Formoterol in the treatment of experimental cancer cachexia: effects on heart function

Míriam Toledo, Jochen Springer, Sílvia Busquets, Anika Tschirner, Francisco J. López-Soriano, Stefan D. Anker and Josep M. Argilés.

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 2014, DOI: 10.1007/s13539-014-0153-y

El formoterol és un agonista β_2 -adrenèrgic selectiu altament potent, promotor del creixement muscular en moltes espècies animals, el qual dóna lloc a una hipertròfia del múscul esquelètic. Estudis previs realitzats en el nostre laboratori han demostrat que el tractament amb formoterol en els animals portadors de tumor va prevenir la pèrdua de múscul a través de diferents mecanismes que inclouen l'apoptosi i la proteòlisi muscular. L'estudi se centra en rates portadores del model de tumor ascític Yoshida AH-130, el qual induceix un alt grau de caquèxia, tractades amb formoterol (0,3 mg/kg). L'administració de formoterol a rates caquèctiques portadores de tumor va produir una reducció significativa de la pèrdua de pes muscular i va incrementar la massa magra corporal i l'aigua corporal. El tractament, però, no va influir en el pes del cor, en el qual la càrrega tumoral va produir una disminució de pes. Les rates portadores de tumor no tractades van mostrar canvis importants en els paràmetres relacionats amb la funció del cor: fracció d'ejecció del ventricle esquerre, fracció d'escurçament, diàmetre i volum del ventricle esquerre en diàstole, volum sistòlic d'ejecció, la massa i el gruix de la paret posterior del ventricle esquerre (PWT) (totes dues sistòlica i diastòlica). L'administració de formoterol va afectar el diàmetre i volum del ventricle esquerre, el volum sistòlic d'ejecció i la massa del ventricle esquerre.

Els resultats suggereixen que el tractament amb formoterol, a més de reduir la pèrdua de massa muscular, no altera negativament la funció cardíaca en animals afectats per la caquèxia cancerosa; de fet, alguns paràmetres cardíacs es veuen fins i tot millorats.

Formoterol in the treatment of experimental cancer cachexia: effects on heart function

Míriam Toledo · Jochen Springer · Sílvia Busquets ·
Anika Tschirner · Francisco J. López-Soriano ·
Stefan D. Anker · Josep M. Argilés

Received: 11 February 2014 / Accepted: 2 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Background and aims Formoterol is a highly potent β 2-adrenoceptor-selective agonist, which is a muscle growth promoter in many animal species, resulting in skeletal muscle hypertrophy. Previous studies carried out in our laboratory have shown that formoterol treatment in tumour-bearing animals resulted in an amelioration of muscle loss through different mechanisms that include muscle apoptosis and proteolysis.

Methods The study presented involved rats bearing the Yoshida AH-130 ascites tumour model—which induces a high degree of cachexia—treated with the beta-2 agonist formoterol (0.3 mg/kg BW).

Results The administration of formoterol to cachectic tumour-bearing rats resulted in a significant reduction of muscle weight loss. The treatment also increased lean body mass and body water. The treatment, however, did not influence heart weight, which was much decreased as a result of tumour burden. Untreated tumour-bearing rats showed important changes in parameters related with heart function:, left

ventricle (LV) ejection fraction, fractional shortening, LV diameter and volume (diastolic) and LV stroke volume, LV mass and posterior wall thickness (PWT) (both systolic and diastolic). The administration of formoterol affected LV diameter and volume, LV stroke volume and LV mass.

Conclusions The results suggest that formoterol treatment, in addition to reducing muscle wasting, does not negatively alter heart function—in fact, some cardiac parameters are improved—in animals affected by cancer cachexia.

Keywords Cancer · Cachexia · Muscle wasting · Heart function · Formoterol

1 Introduction

Cachexia is a multifactorial syndrome and appears usually in advanced cancer. It occurs in the last stages in the majority of cancer patients being responsible for a 22 % of their deaths [1]. The degree of cachexia is inversely correlated with the expected survival time and always prognoses a poor outcome [2]. Cancer cachexia features anorexia; weight loss; muscle loss and atrophy; anaemia; and alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism [3].

Recent murine studies indicate that skeletal muscle and cardiac muscle wasting in cancer cachexia are associated [4–8]. The decrease in heart weight is accompanied by changes in the cardiac function, which are suggestive of congestive heart failure [4–8]. According to Schünemann, “cancer fatigue syndrome reflects clinically non-overt heart failure”, which clearly gives heart abnormalities part of the blame in the fatigue of cancer patient [9]. Tian et al. suggested that cardiac alterations in a mouse cancer cachexia model include as follows: marked fibrosis, disrupted myocardial ultrastructure and altered composition of contractile proteins such as tropinin I and myosin heavy chain [7]. Similarly, Mühlfeld et al., in

M. Toledo · S. Busquets · F. J. López-Soriano · J. M. Argilés
Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

S. Busquets · F. J. López-Soriano · J. M. Argilés
Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB),
Barcelona, Spain

J. Springer · A. Tschirner · S. D. Anker
Applied Cachexia Research, Department of Cardiology, Charité Medical School, Berlin, Germany

S. Busquets (✉)
Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain
e-mail: silviabusquets@ub.edu

the cachectic tumour rodent model Lewis lung carcinoma, observed a reduction of the total number of axons in the left ventricle as a consequence of tumour burden [8]. This altered innervation came along with a reduced expression of nerve growth factor [8]. The challenged heart function observed in tumour-bearing animals seems to be specifically related to cardiac alterations [10]. The heart atrophy seems to be linked to increased cardiac muscle proteolysis, shown through elevated protein ubiquitination and expression of MURF-1 and atrogin-1 [10]. However, Cosper and Leinwand suggest that the cardiac proteolysis is rather caused by increased autophagy [11], contrary to what happens in skeletal muscle. Surprisingly, in experimental animal, the inhibition of NF- κ B protects against tumour-induced cardiac atrophy [12]. Drott and Lundholm also observed an increase in oxygen consumption (as well as cardiac atrophy)—most likely related to the anaemia so common in cancer patients—in the heart of an experimental cancer rodent model [13]. Important ultrastructural changes also occurred such as an increased ratio of myofibrils/mitochondria and also sarcomeric alterations, consistent with those observed during cardiac failure. The higher oxygen consumption can be caused by increased energy expenditure, converting the heart in an additional organ involved in generating energy inefficiently. Indeed, the heart rate seems to be elevated in cancer patients [14]. The heart rate seems to be a very effective measure of cancer death risk, although the association between these two parameters is still unclear. The increased heart rate might be a marker of chronic stress and anxiety: a natural consequence of the disease.

Therapeutic approaches to treat or prevent cachexia have not been very satisfactory, mainly because of the toxicity and side effects of the used drugs. The most common anti-cachexia treatments currently used are based on nutritional approaches, progestagens—such as megestrol acetate [15]—or glucocorticoids, the latter showing important adverse effects. Our laboratory introduced the use of β_2 -adrenergic agonists as possible drugs for the treatment of cachexia [16]. These agents are known as potent muscle growth promoters in many animal species, causing skeletal muscle hypertrophy [17–20], while they reduce the body fat content [21, 22], but unfortunately, β_2 -adrenergic agonists also show a certain cardiotoxicity [23–25]. Formoterol is a highly potent β_2 -adrenoceptor-selective agonist, which combines the clinical advantages of the rapid onset of action with a long lasting duration of action. This compound is already prescribed to humans for the treatment of bronchospasm associated with asthma. Our previous studies have shown that formoterol treatment in tumour-bearing animals improved muscle loss through different mechanisms such as muscle apoptosis and proteolysis [26]. A phase II clinical study involving formoterol has also shown positive results in patients with advanced cancer [27].

Bearing all this in mind, and since some β_2 -agonists are involved in cardiotoxicity, the aim of the present investigation

was to analyse the effects of formoterol treatment on heart function in tumour-bearing cachectic rats.

2 Material and methods

2.1 Animals

Male Wistar rats (Harlan-Winkelmann, Borchen, Germany) of 5 weeks of age were used in the different experiments. The animals were maintained at 22 ± 2 °C with a regular light–dark cycle (light on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free access to food and water. The food intake was measured daily. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

2.2 Tumour inoculation and treatment

Rats were divided into two groups, namely controls ($n=7$) and tumour hosts ($n=16$). The latter received an intraperitoneal inoculum of 10^8 AH-130 Yoshida ascites hepatoma cells obtained from exponential tumours [28]. The tumour group was further divided into treated ($n=8$) and untreated ($n=8$), the former being administered a daily intraperitoneal (i.p.) dose of formoterol (0.3 mg/kg body weight (bw)) and the latter a corresponding volume of solvent. On day 8 after tumour transplantation, the animals were weighed and anaesthetized with an i.p. injection of ketamine/xylazine mixture (3:1) (Imalgene and Rompun, respectively). The tumour was harvested from the peritoneal cavity and its volume and cellularity evaluated. Tissues were rapidly excised, weighted and frozen in liquid nitrogen.

2.3 Body composition analysis

A nuclear magnetic resonance spectroscopy device (EchoMRI-700™, Echo Medical Systems, Houston, TX) was used to assess body composition with a sensitivity of 2 g [29]. Total body fat, lean mass and body fluids can be measured by this system. In this study, body composition was analysed 1 day before starting the treatment and 1 day before sacrifice (8 days), and the results are expressed as the difference between both measurements.

2.4 Echocardiographic study

Rats were anaesthetized using 1.5 % isoflurane and laid in supine position on a platform with all legs taped to ECG electrodes for heart rate monitoring. Body temperature was monitored and maintained at 39 °C using a heating pad. All hair was removed from the chest. A high-resolution echocardiography system (Vevo 770; VisualSonics Inc, Toronto,

Canada) was used [29]. The following parameters were assessed using M-mode: the thickness of intraventricular septum (IVS), left ventricular (LV) posterior wall thickness (PWT), LV end-diastolic diameter (LVDd) and LV end-systolic diameter (LVDs). In this study, echocardiography was performed 1 day before starting the treatment (results not shown) and 1 day before sacrifice (8 days).

2.5 Statistical analysis

Statistical analyses of the data were performed by two-way analysis of variance (ANOVA). Statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups.

3 Results

Formoterol treatment resulted in significant increases in lean body mass and water both in controls and tumour-bearing rats as compared with untreated animals (Fig. 1). Tumour burden resulted in an important decrease not only in lean body mass but also in body fat; the loss of fat mass was unaltered by formoterol treatment (Fig. 1a). In a similar way, the beta-2 agonist did not inflict any changes in body fat in control animals (Fig. 1a). The increase in lean body mass was reflected by an increased weight of all analysed muscles (Fig. 2). In healthy control animals, formoterol treatment resulted in significant increases in gastrocnemius (10 %), tibialis (9 %) and EDL (13 %). In tumour-bearing animals, the treatment promoted an increase of gastrocnemius (15 %), soleus (11 %), EDL (14 %), tibialis (14 %) and diaphragm (23 %) (Fig. 2). Although the results did not reach statistical significance ($p=0.083$), there was a tendency for formoterol to increase heart weight (Fig. 2). Other studies have, however,

clearly shown an increase in heart weight in formoterol-treated tumour-bearing animals [26, 27]. The observed effects of formoterol on muscle mass clearly agree with previous studies both in mice [26] and rats [26, 27].

Additionally, we decided to investigate the effects of formoterol on heart parameters in the experimental rat model used in our study. The results presented in Table 1 indicate that tumour-bearing animals displayed an overall deterioration of cardiac function: untreated tumour-bearing rats showed a significant impairment of the left ventricular ejection fraction and the fractional shortening being associated with a worse heart contractility. Also, the stroke volume (LVSF) and the end-diastolic volume (LV vol dia) were reduced in the tumour group compared to control rats, while the end-systolic volume was non-significantly increased.

The administration of formoterol prevented the loss of left ventricular diameter (LVD) (in diastole and systole) (Table 1); in fact, the loss of LV mass is correlated with survival, and its prevention after the treatment with drugs commonly used to treat heart failure improved survival [35]. Furthermore, formoterol could increase LV stroke volume (LVSF) and the end-diastolic and end-systolic volume (LV vol).

4 Discussion

Formoterol is able to ameliorate muscle wasting in tumour-bearing rats through different mechanisms that include decreased protein degradation [26], increased protein synthesis, decreased apoptosis [26] and increased muscle regeneration [30]. Formoterol also reduces oxidative stress associated with muscle wasting [31]. A factor to be taken into consideration is the presence of β -adrenoceptors in tissues other than skeletal muscle. From this point of view, any therapy involving the systemic administration of formoterol must take into account that it affects tissues other than the skeletal muscle,

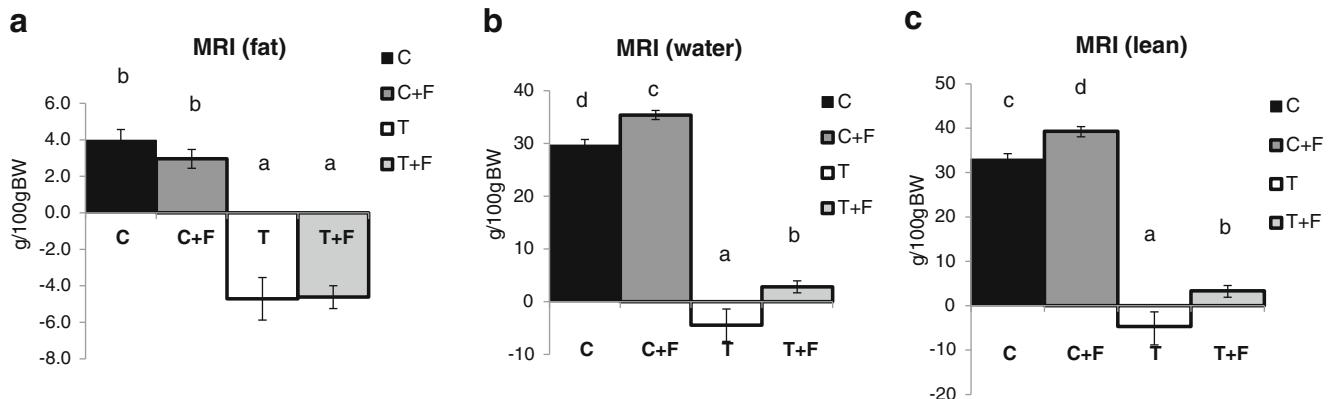


Fig. 1 Body composition in tumour-bearing rats. Results are expressed as the difference between day 0 (tumour inoculation) and day 8; mean \pm SEM. C control rats, C + F control rats treated with formoterol, T tumour-bearing rats, T + F tumour-bearing rats treated with formoterol. Statistical

significance of the results by two-way analysis of variance (ANOVA). Statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups

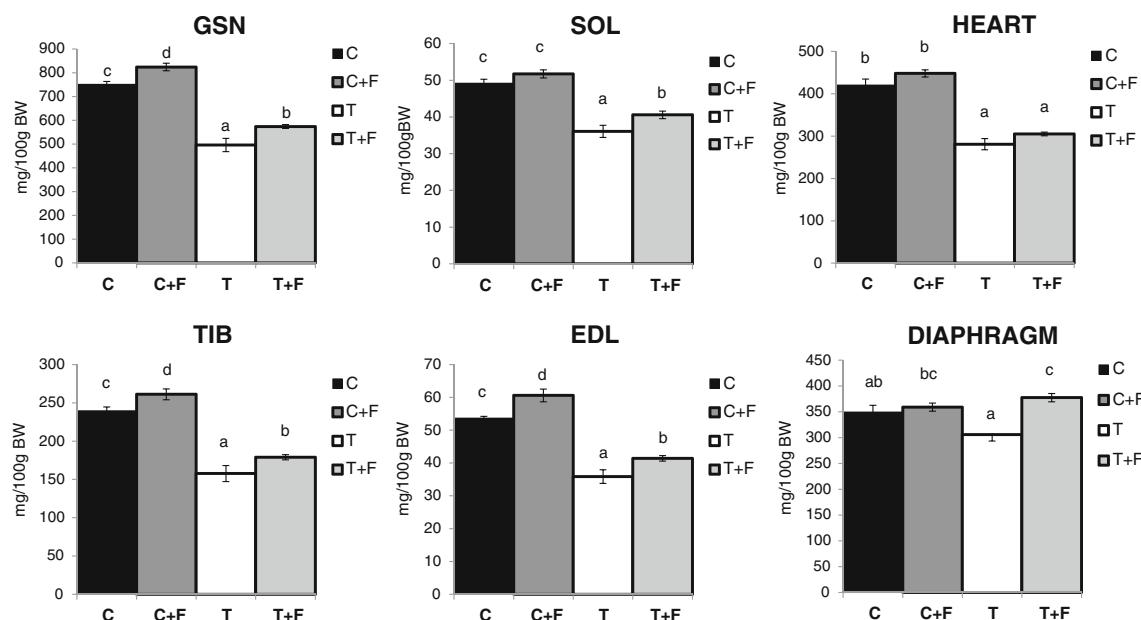


Fig. 2 Skeletal muscles and heart weights in tumour-bearing rats. Results are mean \pm SEM. Muscle weights are expressed as mg/100 g of initial body weight (IBW). C control rats, C + F control rats treated with formoterol, T tumour-bearing rats, T + F tumour-bearing rats treated with

formoterol. Statistical significance of the results by two-way analysis of variance (ANOVA). Statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups

particularly the heart. However, as promising as formoterol seems as a therapeutic drug for cancer-related muscle wasting and weakness (asthenia) through its effect on pathways that modulate skeletal muscle growth, the intracellular pathway involved— β -agonist signalling—has been well described and shows selective coupling to a heterotrimeric G-protein in order to initiate downstream

signalling, traditionally believed to occur via the stimulatory G α subunit (G α_s) coupling to adenylate cyclase (AC), and resulting in the conversion of ATP to cyclic AMP (cAMP) with the subsequent activation of protein kinase A (PKA) is highly susceptible to down regulation via chronic stimulation, with possible adverse effects if administration is discontinued.

Table 1 Effect of formoterol on cardiac function

Experimental group	C	C + F	T	T + F	ANOVA		
					A	B	A+B
LV ejection fraction (%)	77 \pm 0.7	73 \pm 0.6	68 \pm 2.4	67 \pm 2.3	0.000	ns	ns
Fractional shortening (%)	47 \pm 0.7	44 \pm 0.5	38 \pm 1.8	38 \pm 1.7	0.000	ns	ns
LVD dia (mm)	6.3 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	5.4 \pm 0.2	5.8 \pm 0.1	0.000	0.000	ns
LVD sys (mm)	3.4 \pm 0.0	3.9 \pm 0.0	3.3 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1	ns	0.000	ns
PWT dia (mm)	1.7 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	0.000	ns	ns
PWT sys (mm)	2.7 \pm 0.1	2.5 \pm 0.0	2.0 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	0.000	0.043	ns
LV vol dia (μ l)	201 \pm 5	258 \pm 6	136 \pm 5	156 \pm 7	0.000	0.000	0.007
LV vol sys (μ l)	38 \pm 2.2	57 \pm 2.2	43 \pm 2.8	51 \pm 3.3	ns	0.000	ns
LVSV (μ l)	163 \pm 6	201 \pm 6	93 \pm 5	105 \pm 7	0.000	0.000	ns
LVmass (mg)	453 \pm 15	515 \pm 17	292 \pm 23	303 \pm 8	0.000	0.032	ns
Cardiac output (mL/min)	71 \pm 3	83 \pm 3	35 \pm 3	35 \pm 2	0.000	ns	0.048

Echocardiographic data at day 8 of non-tumour-bearing rats (C), non-tumour-bearing rats treated with formoterol (C + F), tumour-bearing rats (T) and tumour-bearing rats treated with formoterol (T + F). Results are mean \pm SEM. LV ejection fraction (LV vol dia-LV vol sys)/LV vol dia; fractional shortening (LVD dia-LVD sys)/LVD sys; left ventricle diameter in diastole (LVD dia); left ventricle diameter in systole (LVD sys); posterior wall thickness in diastole (PWT dia); posterior wall thickness in systole (PWT sys); left ventricle volume in diastole (LV vol dia); left ventricle volume in systole (LV vol sys); left ventricle stroke volume (LVSV) (LV vol dia-LV vol sys); left ventricle mass (LV mass) (expressed as mg/100 g of initial body weight); cardiac output (expressed as mL/min). Statistical significance of the results by two-way analysis of variance (ANOVA); ns non-significant differences. A (tumour effect); B (treatment effect); A*B (interaction effect of tumour and treatment)

Based on a clinical study with over 4,000 autopsy reports, Houten and Reilley [32] suggest that at least 11 % of cancer deaths are due to heart problems. In fact, these data could be underestimated since a high percentage of deaths are actually attributed to infections, drug-induced toxicity and alterations in the osmotic balance, which are directly related to heart problems. McBride et al. [33] observed that more than 50 % of multiple myeloma patients suffered cardiac failure in the cause of a neoplastic process. Our own data also indicate that in experimental animals, tumour implantation resulted in a lower heart weight [5]. Drott and Lundholm [13] observed a heart-related increase in oxygen consumption in an experimental cancer model. Furthermore, several studies also reported important ultrastructural changes characterized by an increase in the ratio of myofibrils/mitochondria and sarcomeric alterations as also observed during cardiac failure [7]. Moreover, a clear systolic dysfunction is associated with tumour growth [4], and, in mice, cancer induces cardiomyocyte remodelling and hypoinnervation in the left ventricle [8]. The cardiac parameters analysed in the present study are signs for a myocardial dysfunction induced after tumour inoculation. In addition, the reduction of the posterior wall thickness (PWT) suggests atrophy of the myocardium as shown by a reduced LV mass and heart weight in the tumour-bearing rats (Table 1). All these results are similar to the previously reported results by Springer et al. [34, 35]. The authors reported that there was an impairment of the heart function at day 7 due to an increased proteolysis, decreased anabolism and elevated rate of autophagy in the heart in tumour-bearing rats [35].

The results presented here suggest that formoterol may inhibit, to some extent, atrophic mechanisms in the heart, therefore improving heart function. It should be taken into consideration, however, that the improvement in ventricle diameter could also be due to larger chambers. If this were the case, it would suggest heart dilation and incoming failure. Furthermore, the posterior wall is not getting thinner what is typical for dilation. The beneficial effect of formoterol could be explained by the fact that the activation of beta-2-adrenergic receptors can induce anti-apoptotic signalling [26, 36, 37]. Some authors have suggested that inhaled formoterol administration does not show negative effects on healthy subjects [38]. Moreover, formoterol could have some beneficial effects on isolated rat hearts where it improves contractility and thus heart rate [39].

The results suggest that formoterol treatment, in addition to reducing muscle wasting, does not negatively alter heart function in animals affected by cancer cachexia; to the contrary, some cardiac parameters are indeed improved by the β 2-adrenoceptor-selective agonist. Future anti-cachectic multi-modal treatment including formoterol may, thus, contribute to decrease cardiomyopathy associated with cancer cachexia.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-26091-2011). The authors certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing of the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* (von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for authorship and publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2010;1:7–8.).

Conflict of interest statement and statement of authorship Each author has participated sufficiently, intellectually or practically in the work to take public responsibility for the content of the article, including the conception, design and for data interpretation. All authors have read and approved the final manuscript. All authors of this research have no conflict of interest related with employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations and grants or other funding: Miriam Toledo, Jochen Springer, Silvia Busquets, Anika Tscherner, Francisco J. López-Soriano, Stefan D. Anker and Josep M Argilés declares that they have no conflict of interest.

References

- Warren S. The immediate cause of death in cancer. *Am J Med Sci*. 1932;184:610–3.
- Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:405–9.
- Argiles JM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev*. 1997;17:477–98.
- Xu H, Crawford D, Hutchinson KR, Youtz DJ, Lucchesi PA, Velten M, et al. Myocardial dysfunction in an animal model of cancer cachexia. *Life Sci*. 2011;88:406–10.
- Olivan M, Springer J, Busquets S, Tscherner A, Figueras M, Toledo M, et al. Theophylline is able to partially revert cachexia in tumour-bearing rats. *Nutr Metab*. 2012;9:76.
- Der-Torossian H, Gourin CG, Couch ME. Translational implications of novel findings in cancer cachexia: the use of metabolomics and the potential of cardiac malfunction. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2012;6:446–50.
- Tian M, Nishijima Y, Asp ML, Stout MB, Reiser PJ, Belury MA. Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol*. 2010;37:347–53.
- Mühlfeld C, Das SK, Heinzel FR, Schmidt A, Post H, Schauer S, et al. Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart. *PLoS One*. 2011;6:e20424.
- Schünemann M, Anker SD, Rauchhaus M. Cancer fatigue syndrome reflects clinically non-overt heart failure: an approach towards oncocardiology. *Nat Clin Pr. Oncol*. 2008;5:632–3.
- Tian M, Asp ML, Nishijima Y, Belury MA. Evidence for cardiac atrophic remodeling in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol*. 2011;39:1321–6.
- Casper PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer Res*. 2011;71:1710–20.
- Wysong A, Couch M, Shadfar S, Li L, Rodriguez JE, Asher S, et al. NF- κ B inhibition protects against tumor-induced cardiac atrophy *in vivo*. *Am J Pathol*. 2011;178:1059–68.
- Drott C, Lundholm K. Glucose uptake and amino acid metabolism in perfused hearts from tumor-bearing rats. *J Surg Res*. 1990;49:62–8.
- Hyltander A, Drott C, Körner U, Sandström R, Lundholm K. Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. *Eur J Cancer*. 1991;27:9–15.

15. Argilés JM, Anguera A, Stemmler B. A new look at an old drug for the treatment of cancer cachexia: megestrol acetate. *Clin. Nutr.* 2013;32: 319–24.
16. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Novel approaches to the treatment of cachexia. *Drug Discov Today.* 2008;13:73–8.
17. Agbenyega ET, Wareham AC. Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1992;102:141–5.
18. Rajab P, Fox J, Riaz S, Tomlinson D, Ball D, Greenhaff PL. Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:R1076–81.
19. Hinkle RT, Hodge KMB, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve.* 2002;25:729–34.
20. Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Pitts SA, Potter DE, Paulsen DF. Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature male rats. *Cells Tissues Organs.* 2002;171: 188–98.
21. Yang YT, McElligott MA. Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J.* 1989;261:1–10.
22. Mersmann HJ. Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci.* 1998;76:160–72.
23. Burniston JG, Ng Y, Clark WA, Colyer J, Tan L-B, Goldspink DF. Myotoxic effects of clenbuterol in the rat heart and soleus muscle. *J Appl Physiol.* 2002;93:1824–32.
24. Libretto SE. A review of the toxicology of salbutamol (albuterol). *Arch Toxicol.* 1994;68:213–6.
25. Pack RJ, Alley MR, Dallimore JA, Lapwood KR, Burgess C, Crane J. The myocardial effects of fenoterol, isoprenaline and salbutamol in normoxic and hypoxic sheep. *Int J Exp Pathol.* 1994;75:357–62.
26. Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res.* 2004;64: 6725–31.
27. Greig CA, Johns N, Gray C, Macdonald A, Stephens NA, Skipworth RJE, et al. Phase I/II trial of formoterol fumarate combined with megestrol acetate in cachectic patients with advanced malignancy. *Support Care Cancer.* 2014;22:1269–75.
28. Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, Baccino FM. Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys.* 1993/10/01 ed. Dipartimento di Medicina ed Oncologia Sperimentale, Universita di Torino, Italy.; 1993;306:52–8.
29. Akashi YJ, Palus S, Datta R, Haleem H, Taylor JE, Thoene-Reineke C, et al. No effects of human ghrelin on cardiac function despite profound effects on body composition in a rat model of heart failure. *Int J Cardiol.* 2009;137:267–75.
30. Ametller E, Busquets S, Fuster G, Figueras MT, Olivan M, de Oliveira CCF, et al. Formoterol may activate rat muscle regeneration during cancer cachexia. *Insciences J.* 2011;1:1–17.
31. Montalbano AM, Anzalone G, Albano GD, Di Sano C, Gagliardo R, Bonanno A, et al. Beclomethasone dipropionate and formoterol reduce oxidative/nitrosative stress generated by cigarette smoke extracts and IL-17A in human bronchial epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2013;718:418–27.
32. Houton L, Reiley AA. An investigation of the cause of death from cancer. *J Surg Oncol.* 1980;13:111–6.
33. McBride W, Jackman JD, Gammon RS, Willerson JT. High-output cardiac failure in patients with multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1988;319:1651–3.
34. Springer J, Tschermer A, Hartman K, von Haehling S, Anker SD, Doehner W. The xanthine oxidase inhibitor oxypurinol reduces cancer cachexia-induced cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2013;168:3527–31.
35. Springer J, Tschermer A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, et al. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *Eur Heart J.* 2013.
36. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation.* 1999;100:2210–2.
37. Shizukuda Y, Buttrick PM. Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:823–31.
38. De Mey C, Nassr N, Lahu G. No relevant cardiac, pharmacokinetic or safety interactions between roflumilast and inhaled formoterol in healthy subjects: an open-label, randomised, actively controlled study. *BMC Clin Pharmacol.* 2011;11:7.
39. Watson DC, Sargianou M, Leivaditis V, Anagnostopoulos C. Beta2-adrenergic activation via administration of atenolol/formoterol combination increases contractility and coronary blood flow in isolated rat hearts. *Hell J Cardiol.* 2013;54:341–7.

PUBLICACIÓ 2

Cancer cachexia: Physical activity and muscle force in tumour-bearing rats

Míriam Toledo, Sílvia Busquets, Sònia Sirisi, Roberto Serpe, Marcel Orpí, Joana Coutinho, Raquel Martínez, Francisco J. López-Soriano and Josep M. Argilés.

Oncology Reports 25: 189-193, 2011

La caquèxia cancerosa es produeix en la majoria dels pacients amb càncer abans de la mort, i és responsable de la mort del 22% dels pacients amb càncer. Una de les característiques més rellevants de la caquèxia és l'astènia, que reflecteix un significatiu desgast muscular observat en pacients amb càncer caquèctics.

Les rates inoculades amb l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 estan sotmeses a una important pèrdua de pes, que és acompanyada per anorèxia al final del cicle tumoral. Els resultats presentats aquí mostren clarament que la presència del tumor induceix una ràpida reducció de la condició física, que afecta tant a l'activitat física com la força muscular. A partir de dia 4 de creixement tumoral, els moviments totals dels animals comencen a disminuir de forma significativa. De manera similar, comencen a disminuir la velocitat mitjana, la distància recorreguda i el temps que dediquen a realitzar moviments ràpids i lents, passant a estar més temps en repòs. L'activitat física de les rates portadores de tumor va disminuint a mesura que avancen els dies fins a dia 11 de creixement tumoral on les rates comencen a morir degut a l'estat avançat de caquèxia. Pel que fa a la força muscular també observem una reducció en les rates portadores de tumor, tot i que apareix més tard en el temps, sent evident a dia 7 de creixement tumoral i molt marcada a dia 11.

Cancer cachexia: Physical activity and muscle force in tumour-bearing rats

MIRIAM TOLEDO¹, SILVIA BUSQUETS¹, SONIA SIRISI¹, ROBERTO SERPE², MARCEL ORPI¹, JOANA COUTINHO¹, RAQUEL MARTINEZ¹, FRANCISCO J. LOPEZ-SORIANO¹ and JOSEP M. ARGILÉS¹

¹Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Medical Oncology, Azienda Ospedaliero Universitaria di Cagliari, S.S, Monserrato (CA), Italy

Received April 30, 2010; Accepted July 6, 2010

DOI: 10.3892/or_00001060

Abstract. Rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma are subjected to substantial weight loss, which is accompanied by anorexia at the end of the tumour cycle. Total physical activity (measured using the IR Actimeter system and Actitrack software) was determined during 11 days in control and tumour-bearing animals, skeletal muscle strength being also by the grip-strength test. The results presented clearly show that the presence of the tumour induces an earlier decrease in physical performance, which affects both skeletal muscle force and physical activity (both locomotor movements and stereotyped movements and distance travelled, among others parameters).

Introduction

The Yoshida AH-130 ascites hepatoma is a highly cachectic rat tumour of rapid growth and poorly differentiated cells. This tumour is characterized by a relatively short doubling time of one day (1,2) and is widely used in experimental studies (3,4). The implantation of the tumour leads to a very fast weight loss, which is accompanied by anorexia in the terminal state. The weight loss is associated with both fat and skeletal muscle wasting, as has been shown previously by our research group (5-7).

These abnormalities together associated with weight loss, muscle loss and atrophy, anaemia and alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism (8-10) are the main characteristics of the cancer cachexia syndrome. The degree of cachexia is inversely correlated with the survival time of the patient and it always implies a poor prognosis

(11-13). Perhaps one of the most relevant characteristics of cachexia is that of asthenia, which reflects the substantial muscle waste that takes place in the cachectic cancer patient (14). Lean body mass depletion is one of the main trends of cachexia and it involves not only skeletal muscle but it also affects cardiac proteins, resulting in considerable alterations in heart performance. In addition to the increased muscle protein degradation found during cancer growth, the presence of the tumour also induces an increased rate of DNA fragmentation in skeletal muscle in both rats and mice (15). All these mechanisms contribute to a marked muscle wasting.

The aim of the present investigation was to determine the influence of the cachectic state on the physical performance of the animals.

Materials and methods

Animals. Male Wistar rats (Interfauna, Barcelona, Spain), five weeks of age were used in the different experiments. The animals were maintained at 22±2°C with a regular light-dark cycle (light on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free access to food and water. The body weight and food intake was measured daily. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

Tumour inoculation. Rats were divided into two groups, namely controls and tumour hosts. The latter received an intraperitoneal inoculum of 10⁸ AH-130 Yoshida ascites hepatoma cells obtained from exponential tumours (16). On different days after tumour transplantation, the animals were weighed and anaesthetized with an i.p. injection of ketamine/xylazine mixture (3:1) (Imalgene® and Rompun®, respectively). The tumour was harvested from the peritoneal cavity and its volume and cellularity evaluated. Tissues were rapidly excised, weighed, and frozen in liquid nitrogen.

Total physical activity. Total physical activity (IR Actimeter system and Actitrack software from Panlab, Barcelona) was determined during 11 days in control and tumour-bearing animals using activity sensors that translate individual changes in the infrared pattern caused by movements of the animals

Correspondence to: Dr Josep M. Argilés, Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028-Barcelona, Spain
E-mail: jargiles@ub.edu

Key words: physical activity, grip force, cancer cachexia, skeletal muscle

into arbitrary activity counts. Data were collected for a total period of 24 h separated into 12-h periods (dark and light phases). For the measurements, animals remained in their home cage, a frame containing an infra-red beam system was placed on the outside of the cage. This minimised stress to the animals.

Grip force assessment. Skeletal muscular strength in rats was quantified by the grip-strength test (17,18). The grip-strength device (Panlab-Harvard Apparatus, Spain) comprised a triangular pull bar connected to an isometric force transducer (dynamometer). Basically, the grip strength meter was positioned horizontally and the rats are held by the tail and lowered towards the device. The animals are allowed to grasp the triangular pull bar and were then pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the bar just before it lost grip was recorded as the peak tension. At least three measurements were taken per rat on both baseline and test days, and the results were averaged for analysis. This force was measured in grams/grams initial body weight.

Statistical analysis. Statistical analysis of the data was performed by means of the Student's t-test.

Results and Discussion

As can be seen in Fig. 1, the growth of the tumour has two clear phases. In the first one, following a certain lag, the tumour grows exponentially until day 7 after tumour inoculation, when it enters the second phase, which is clearly stationary, since the number of doubling cells equals that of the dying ones. This fast tumour growth induces weight loss from day 4 onwards with a maximum of about 22% (Fig. 1). Interestingly, as can be seen in Fig. 1, no anorexia exists until about day 4 when the animals progressively stop eating. At day 10 after tumour inoculation, the reduction in food intake accounts for 87%. Previous studies carried out in our laboratory have shown that weight loss in this animal model is associated with both adipose and skeletal muscle wasting (6,7).

The muscle loss is due to several factors that include increased proteolysis (5), increased apoptosis (15), increased amino acid oxidation (19,20) and decreased muscle regeneration (21,22).

Bearing all this in mind, the objective of the present investigation was to see to what extent the loss of weight, particularly muscle, is reflected into the physical performance of the animals. As can be seen in Fig. 2, tumour growth is associated with a decreased total physical activity as measured by the total number of movements undertaken by the animals for a period of 24 h. The decrease is already significant at day 4. Interestingly, when total activity is separated into the two light phases, the differences induced by the tumour burden are more marked during the dark phase (night). It is well known that rodents are normally more active during this phase (23). The decrease in physical activity affects both locomotor (movements with displacement) and stereotyped (movements without displacement: eating and cleaning) movements. Again, the decreased activity is more marked for both types of movements during the dark

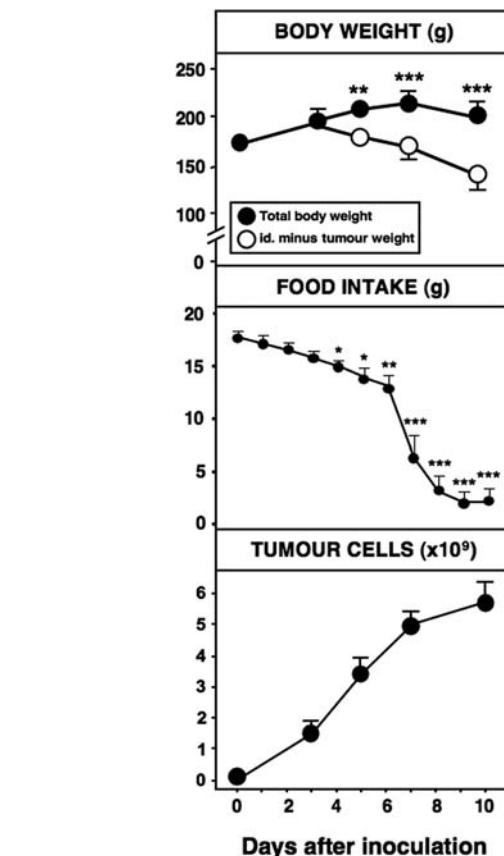


Figure 1. Body weight, food intake and tumour content in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Food intake is expressed in gram (g) and refers to the ingestion during the period of the experiment prior to sacrifice which took place 10 days after tumour inoculation. Body weight is expressed in g. Tumour cell content is expressed in millions of cells. Values that are significantly different by the Student's t-test from the non-tumour-bearing animals group are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

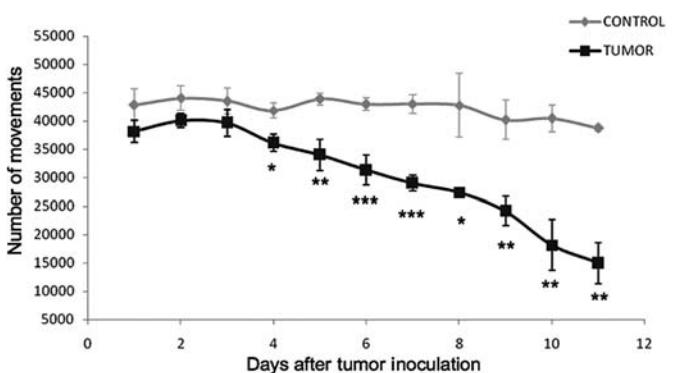


Figure 2. Twenty-four hours total physical activity in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. For more details, see the experimental section. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Number of movements includes the total number of movements (locomotor and stereotyped movements) performed by the animals. Values that are significantly different by the Student's t-test from the non-tumour-bearing animals group are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

phase (Fig. 3). In Fig. 4, the distance covered by the tumour-bearing rats is depicted. The distance decreases as tumour burden increases and again it seems to be affected more

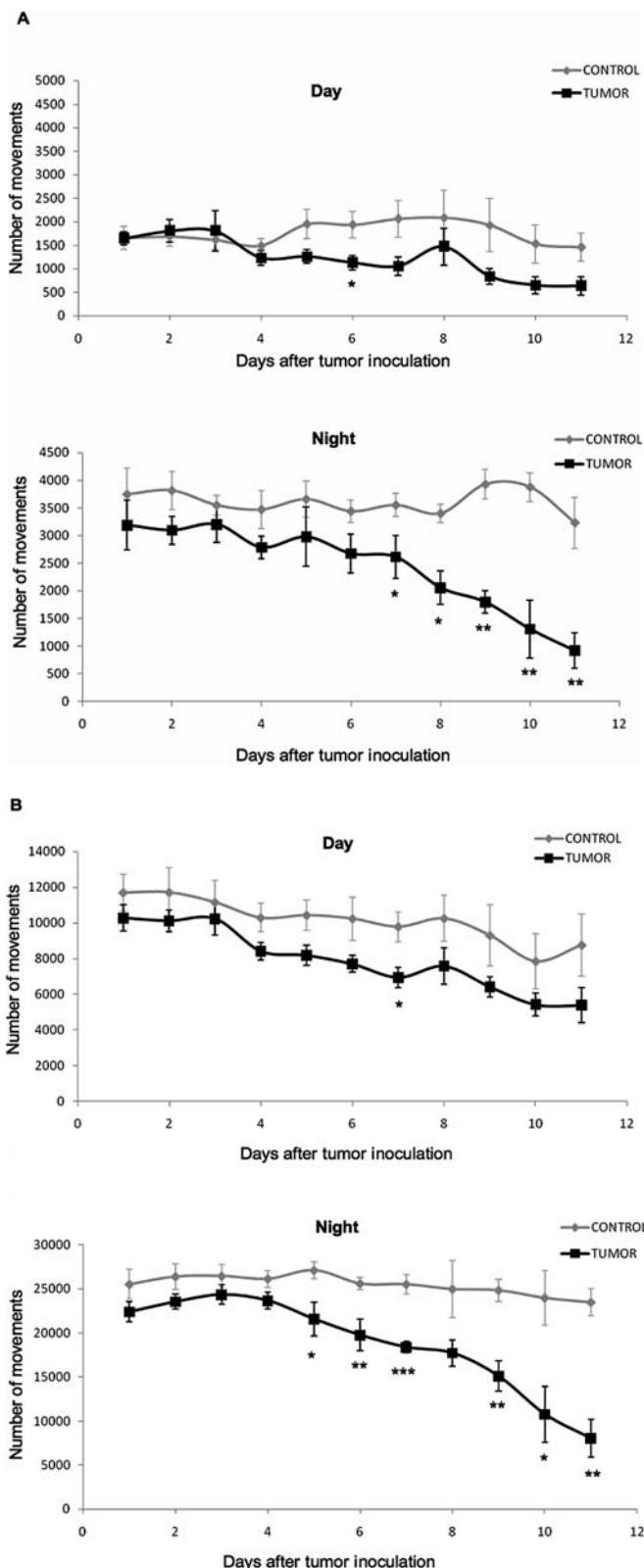


Figure 3. Light and dark phase physical activity in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. (A) Stereotyped movements include movements without displacement, i.e. eating and cleaning movements. For more details, see the experimental section. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Values that are significantly different by the Student's t-test from the non-tumour-bearing animals group are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (B) Locomotor movements include movements with displacement. For more details, see the experimental section. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Values that are significantly different by the Student's t-test from the non-tumour-bearing animals group are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

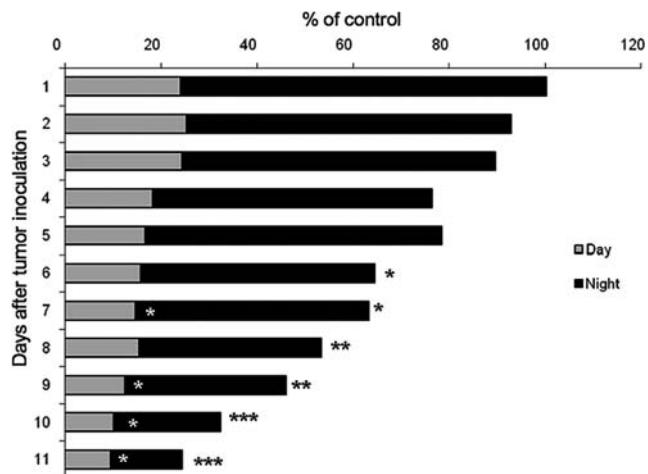


Figure 4. Light and dark phase distance travelled in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. For more details, see the experimental section. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Results are expressed as percentage of control (non-tumour-bearing animals group). Values that are significantly different by the Student's t-test from the non-tumour-bearing animals group are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

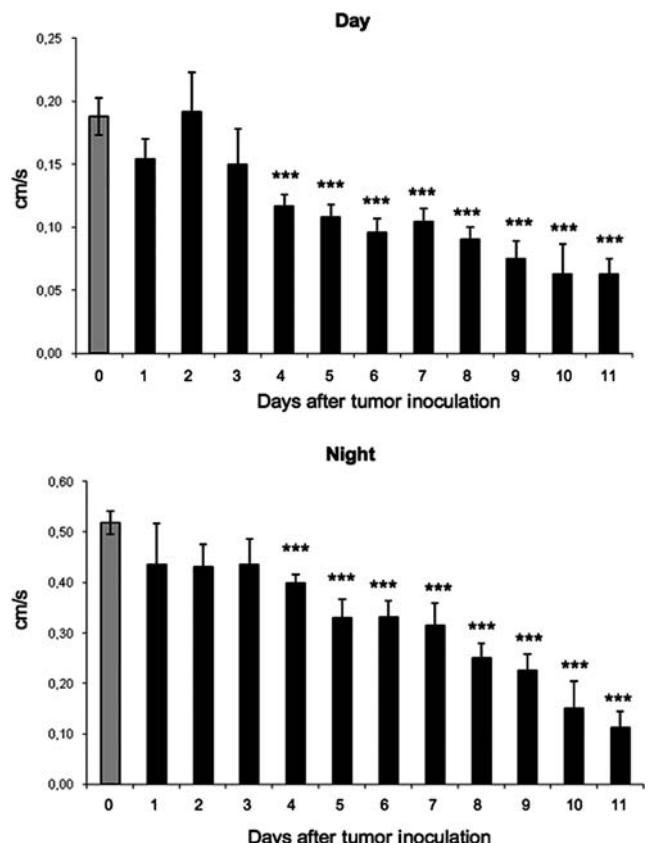


Figure 5. Light and dark phase average velocity in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. For more details, see the experimental section. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Results are expressed as cm/s. Values that are significantly different by the Student's t-test from time 0 are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

severely during the dark phase. Interestingly, in addition to the distance travelled by the animals, the velocity of the displacement is also decreased as a result of tumour inoculation (Fig. 5). Again, the presence of the tumour seems

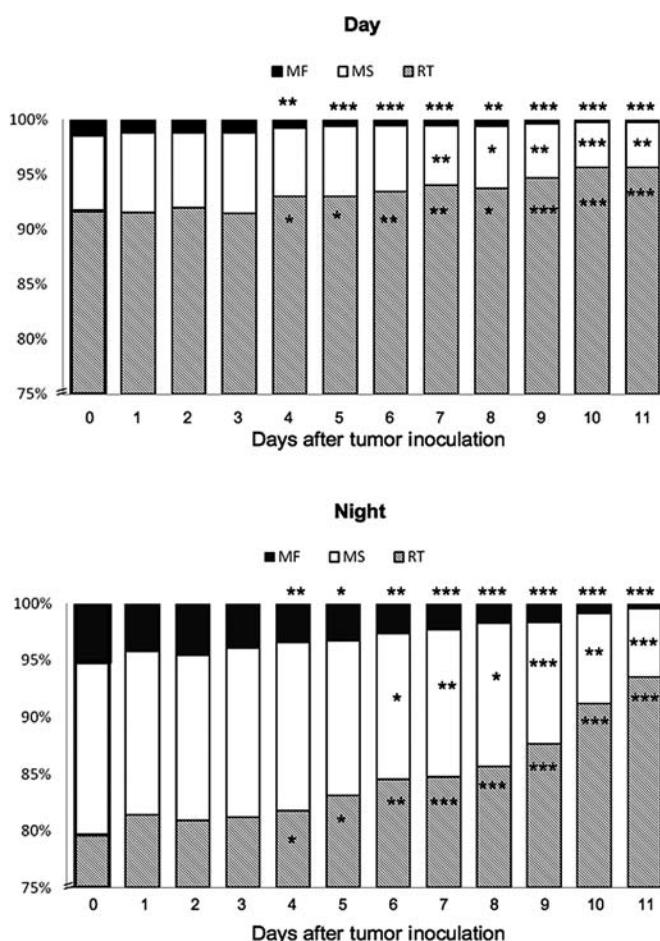


Figure 6. Time involved in resting, slow and fast movements during light and dark phase in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. For more details, see the experimental section. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Results are expressed as percentage of total time. RT, time involving resting (sleeping, cleaning and eating time), 0-2 cm/s; MS, time involving slow movements, 2-5 cm/s; MF, time involving fast movements, >5 cm/s. Values that are significantly different by the Student's t-test from time 0 are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

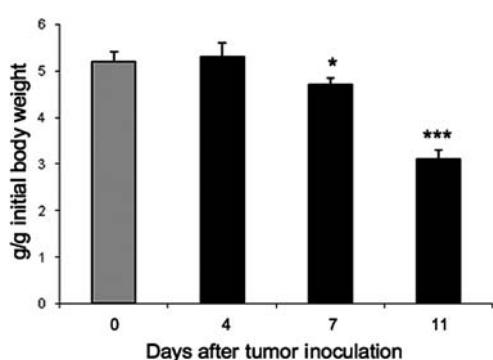


Figure 7. Grip force in cachectic tumour-bearing rats. For more details, see the experimental section. Results are mean \pm SEM for 8 animals. Results are expressed as g/g initial body weight. Values that are significantly different by the Student's t-test from the non-tumour-bearing animals group are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

to influence the velocity of the animals to a higher extent during the dark phase. Finally, as expected, the time involved

in physical activity is also influenced by tumour-burden. Indeed, as can be seen in Fig. 6, resting time was increased with tumour burden in the light and dark phases. Conversely, slow and fast movement times were significantly decreased as tumour presence increased, the difference being more marked in the dark phase. Similar results have been described in humans under cancer cachexia (24,25). In experimental animals, similar results have also been found using the C26 adenocarcinoma model (26).

Interestingly, as can be seen in Fig. 7, tumour inoculation also resulted in decreased muscle force as measured by the gripping power of the animals.

From the results presented here, it can be concluded that muscle waste associated with experimental cancer leads to substantial decrease in physical performance.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-02284-2008) and from the Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060907).

References

- Tessitore L, Bonelli G, Cecchini G, Amenta JS and Baccino FM: Regulation of protein turnover versus growth state: ascites hepatoma as a model for studies both in the animal and in vitro. *Arch Biochem Biophys* 255: 372-384, 1987.
- Marzabal M, Garcia-Martinez C, Comas J, Lopez-Soriano FJ and Argiles JM: A flow cytometric study of the rat Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Cancer Lett* 72: 169-173, 1993.
- Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, *et al*: Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest* 38: 531-538, 2008.
- Fuster G, Busquets S, Ametller E, *et al*: Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer Res* 67: 6512-6519, 2007.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ and Argiles JM: Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer* 61: 138-141, 1995.
- Costelli P, Garcia-Martinez C, Llovera M, *et al*: Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-independent proteolytic pathway. *J Clin Invest* 95: 2367-2372, 1995.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, *et al*: Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* 64: 6725-6731, 2004.
- Argiles JM, Alvarez B and Lopez-Soriano FJ: The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev* 17: 477-498, 1997.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, *et al*: Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 142: 183-189, 1998.
- Rivera S, Azcon-Bieto J, Lopez-Soriano FJ, Miralpeix M and Argiles JM: Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. *Biochem J* 249: 443-449, 1988.
- Harvey KB, Bothe A Jr and Blackburn GL: Nutritional assessment and patient outcome during oncological therapy. *Cancer* 43: 2065-2069, 1979.
- Nixon DW, Heymsfield SB, Cohen AE, *et al*: Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. *Am J Med* 68: 683-690, 1980.
- DeWys W: Management of cancer cachexia. *Semin Oncol* 12: 452-460, 1985.
- Argiles JM, Garcia-Martinez C, Llovera M and Lopez-Soriano FJ: The role of cytokines in muscle wasting: its relation with cancer cachexia. *Med Res Rev* 12: 637-652, 1992.
- Van Royen M, Carbo N, Busquets S, *et al*: DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: a link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun* 270: 533-537, 2000.

16. Tessitore L, Costelli P, Bonetti G and Baccino FM: Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys* 306: 52-58, 1993.
17. Sinis N, Guntinas-Lichius O, Irinchev A, et al: Manual stimulation of forearm muscles does not improve recovery of motor function after injury to a mixed peripheral nerve. *Exp Brain Res* 185: 469-483, 2008.
18. Zangarelli A, Chanseaume E, Morio B, et al: Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB J* 20: 2439-2450, 2006.
19. Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ and Argiles JM: Alanine metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Cancer Lett* 87: 123-130, 1994.
20. Costelli P, Llovera M, Garcia-Martinez C, Carbo N, Lopez-Soriano FJ and Argiles JM: Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer Lett* 91: 73-78, 1995.
21. Mehl KA, Davis JM, Berger FG and Carson JA: Myofiber degeneration/regeneration is induced in the cachectic apcmin/+ mouse. *J Appl Physiol* 99: 2379-2387, 2005.
22. Coletti D, Moresi V, Adamo S, Molinaro M and Sasoon D: Tumor necrosis factor-alpha gene transfer induces cachexia and inhibits muscle regeneration. *Genesis* 43: 120-128, 2005.
23. Lane-Petter W: The physical environment of rats and mice. Academic Press, London, 1963.
24. Fouladiun M, Korner U, Gunnebo L, Sixt-Ammilon P, Bosaeus I and Lundholm K: Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia. *Clin Cancer Res* 13: 6379-6385, 2007.
25. Kulstad R and Schoeller DA: The energetics of wasting diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 488-493, 2007.
26. Van Norren K, Kegler D, Argiles JM, et al: Dietary supplementation with a specific combination of high protein, leucine, and fish oil improves muscle function and daily activity in tumour-bearing cachectic mice. *Br J Cancer* 100: 713-722, 2009.

PUBLICACIÓ 3

Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity.

Sílvia Busquets*, Míriam Toledo*, Sònia Sirisi, Marcel Orpí, Roberto Serpe, Joana Coutinho, Raquel Martínez, Josep M Argilés, Francisco J López-Soriano.

Experimental and therapeutic medicine 2(4):731-735, 2011

* Contributed equally

L'objectiu del present estudi va ser avaluar si l'agonista β_2 -adrenèrgic formoterol s'associa amb una millora en els paràmetres fisiològics com ara la força d'agafada i l'activitat física total en rates caquèctiques. L'administració de l'agonista β_2 -adrenèrgic formoterol (0,3 mg/kg durant 7 dies) en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, va donar lloc a una reversió significativa del procés de pèrdua de massa muscular, com es reflecteix pels pesos dels músculs individuals. També es van observar els efectes protectors del fàrmac en termes d'activitat física total i força d'agafada, fet que es tradueix en una millora de la condició física de les rates caquèctiques portadores de tumor.

Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity

SÍLVIA BUSQUETS^{1,2*}, MÍRIAM TOLEDO^{1*}, SÒNIA SIRISI¹, MARCEL ORPÍ¹, ROBERTO SERPE^{3,4}, JOANA COUTINHO¹, RAQUEL MARTÍNEZ¹, JOSEP M. ARGILÉS^{1,2} and FRANCISCO J. LÓPEZ-SORIANO^{1,2}

¹Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), 08028 Barcelona, Spain;

³Department of Medical Oncology, University of Cagliari, 09124 Cagliari; ⁴Nutrискh, I-09010 Pula, Italy

Received February 18, 2011; Accepted April 13, 2011

DOI: 10.3892/etm.2011.260

Abstract. Cancer cachexia occurs in the majority of cancer patients before death, and it is responsible for the death of 22% of cancer patients. One of the most relevant characteristics of cachexia is that of asthenia, which reflects significant muscle wasting noted in cachectic cancer patients. The aim of the present study was to assess whether the β_2 -adrenergic agonist formoterol is associated with an improvement in physiological parameters such as grip force and total physical activity in cachectic rats. Administration of the β_2 -agonist formoterol (0.3 mg/kg for 7 days) in rats bearing Yoshida AH-130 ascites hepatoma tumors, a model which induces a strong loss of both body and muscle weight, resulted in a significant reversal of the muscle wasting process, as reflected by individual muscle weights. The anti-wasting effects of the drug were also observed in terms of total physical activity and grip force, thus resulting in an improvement in physical performance in cachectic tumor-bearing rats.

Introduction

Cancer cachexia occurs in the majority of cancer patients before death, and it is responsible for the death of 22% of cancer patients (1). Abnormalities associated with cancer cachexia include anorexia, weight loss, muscle loss and atrophy, anemia and alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism (2,3). The degree of cachexia is inversely correlated with the survival time of the patient and is always

indicative of a poor patient prognosis (4-6). Perhaps one of the most relevant characteristics of cachexia is that of asthenia, which reflects the significant muscle wasting that occurs in the cachectic cancer patient (7). Depletion of lean body mass is one of the main consequences of cachexia which involves not only skeletal muscle but also affects cardiac proteins, resulting in alterations in heart performance. In addition to the increased muscle protein degradation found during cancer growth, the presence of the tumor also induces an increased rate of DNA fragmentation in skeletal muscle in both rats and mice (8).

β_2 -adrenergic agonists are potent muscle growth promoters in many animal species (9,10). Treatment with β_2 -adrenergic agonists results in skeletal muscle hypertrophy (11-14), while they cause a reduction in the body fat content (15,16). Formoterol, one of these compounds, is a highly potent β_2 -adrenoceptor-selective agonist which combines the clinical advantages of rapid onset of action with duration of action. This compound is currently in use in humans for the treatment of bronchospasm associated with asthma. *In vitro*, formoterol is a potent airway smooth muscle relaxant with high efficacy and high affinity and selectivity for the β_2 -adrenoceptor (17). Moreover, formoterol relaxes bronchial smooth muscle and also provides important clinical benefits in symptomatic patients with chronic obstructive pulmonary disease (18).

Previous studies carried out in our laboratory demonstrated that formoterol treatment in tumor-bearing animals resulted in an amelioration of muscle loss through different mechanisms that include muscle apoptosis and proteolysis (19). In light of these findings, the aim of the present investigation was to determine the influence of the cachectic state on the physical performance of rats, and to assess whether the β_2 -adrenergic agonist formoterol is associated with an improvement in physiological parameters such as grip force and total physical activity.

Materials and methods

Correspondence to: Dr Sílvia Busquets, Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain
E-mail: silviabusquets@ub.edu

*Contributed equally

Key words: formoterol, β_2 -agonists, cancer cachexia, skeletal muscle, physical activity, muscle force

Animals. Male Wistar rats (Interfauna, Barcelona, Spain), 5 weeks of age, were used in the different experiments. The animals were maintained at 22±2°C under a regular light-dark cycle (lights on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free

Table I. Food intake, body weight and muscle weight in tumor-bearing rats.

	C	C+F	T	T+F
Food intake	106±2.0	112±2.5	78±4.4 ^a	85±2.1 ^a
Body weight				
Initial	128±2.4	122±3.5	127±4.4	125±2.2
Final	164±4.3	159±3.5	123±7.2 ^a	126±2.8 ^a
Difference	36±2.2	37±0.9	-4.1±4.8 ^a	1.6±2.0 ^a
Muscle weight				
Gastrocnemius	663±16	725±20 ^d	545±8.5 ^a	627±9.6 ^{a,f}
Tibialis	215±5.7	238±3.8 ^e	188±3.6 ^b	208±4.8 ^{a,d}
EDL	51±1.9	60±2.5 ^d	41±2.0 ^c	48±1.3 ^b
Diaphragm	279±14	362±14 ^f	117±11 ^a	131±7.3 ^{a,d}
Heart	412±16	493±14 ^e	318±8.1 ^a	367±8.8 ^{a,e}
Carcass weight	90±1.8	91±2.5	72±1.1 ^a	78±0.7 ^{a,f}
Tumor cell content	-	-	3638±179	3752±558

C, control; F, formoterol-treated; T, tumor-bearing rat group. EDL, extensor digitorum longus muscle. Results are represented as the mean ± SEM for 8 animals. Food intake is expressed in g/100 g initial body weight (ibw) and refers to the ingestion during the period of the experiment prior to sacrifice which took place 7 days after tumor inoculation. Carcass (body without organs or tumor) weight is expressed as g/100 g ibw. Final weight, body weight without tumor weight. Tumor cell content is expressed in millions of cells. Values significantly different from the non-tumor-bearing animal group are indicated by ^ap<0.001, ^bp<0.01, ^cp<0.05 (Student's t-test). Values significantly different from the non-treated animal groups are indicated by ^dp<0.05, ^ep<0.01, ^fp<0.001 (Student's t-test).

access to food and water. The food intake was measured daily. All animal manipulations were carried out in accordance with the European Commission guidelines for the use of laboratory animals.

Tumor inoculation. Rats were divided into two groups: controls and tumor-bearing hosts. The latter received an intraperitoneal inoculum of 10⁸ Yoshida ascites AH-130 hepatoma cells obtained from cells exhibiting exponential growth as previously described (20). Both groups were further divided into treated and untreated groups, the former being administered a daily subcutaneous (s.c.) dose of formoterol [0.3 mg/kg body weight (bw) dissolved in physiological saline solution], and the latter a corresponding volume of solvent. On day 7 after tumor transplantation, the animals were weighed and anesthetized with an intraperitoneal injection (i.p.) of ketamine/xylazine mixture (3:1) (Imalgene® and Rompun®, respectively). Each tumor was harvested from the peritoneal cavity, and the volume and cellularity were evaluated. Tissues were rapidly excised, weighed and frozen in liquid nitrogen.

Total physical activity. Total physical activity was determined for 7 days in the control and tumor-bearing animals (non-treated and treated rats) using activity sensors (IR Actimeter System and Actitrak software from Panlab, Barcelona, Spain) that translate individual changes in an infrared pattern caused by movements of the animals into arbitrary activity counts. Data were collected for a total period of 24 h. In order to carry out the measurements, animals remained in their home cage, and a frame containing an infrared beam system was placed on the outside of the cage. This minimized stress to the animals.

Grip force assessment. Skeletal muscular strength in rats was quantified by the grip-strength test as previously described (21,22). The grip-strength device (Panlab-Harvard Apparatus) comprised a triangular pull bar connected to an isometric force transducer (dynamometer). In brief, the grip strength meter was positioned horizontally, and the rats were held by the tail and lowered towards the device. The animals were allowed to grasp the triangular pull bar and were then pulled backwards in a horizontal plane. The force applied to the bar just before the grip was lost was recorded as the peak tension. At least three measurements were taken per rat at baseline and on test days, and the results were averaged for analysis. This force was measured in grams.

Statistical analysis. Statistical analysis of the data was performed by means of the Student's t-test.

Results and Discussion

Implantation of the tumors resulted in a significant decrease in food intake (26%) of the rats (Table I). This was not reversed upon formoterol treatment, repudiating any possible implication of the β₂-agonist in the reversal of cancer-induced anorexia.

Seven days after tumor inoculation, a clear decrease in body weight associated with a significant decrease in muscle weight was noted (Table I). The decrease in body weight was attenuated by formoterol treatment; in fact, formoterol treatment resulted in significant increases in muscle weight in the tumor-bearing rats (Table I). This effect was observed in the gastrocnemius, tibialis and extensor digitorum longus

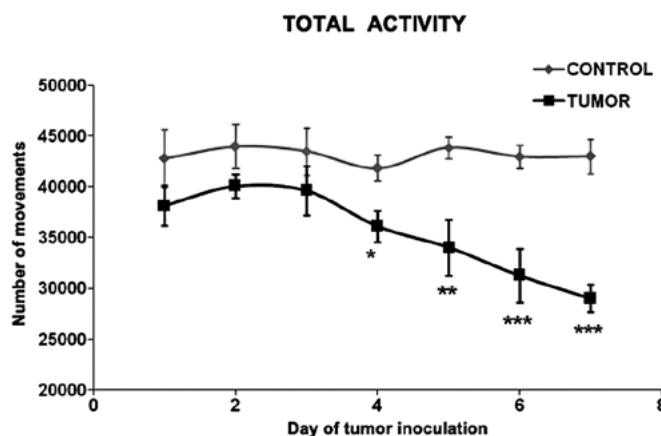


Figure 1. Total physical activity in cachectic tumor-bearing rats. Number of movements represent the total number of movements (locomotor and stereotyped movements) performed by the animals. Stereotyped movements were movements made without displacement (eating and cleaning movements) and locomotor movements were those with displacement. Results are represented as the mean \pm SEM for 8 animals and are expressed as the number of movements during the 7-day period after tumor inoculation. Values significantly different from the non-tumor-bearing animal group are indicated by * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (Student's t-test).

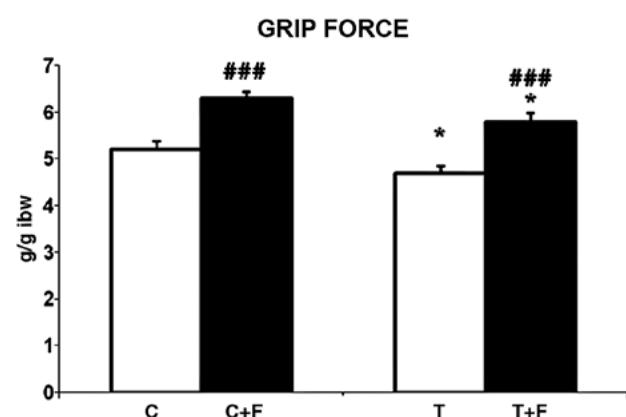


Figure 2. Effects of formoterol on grip force in the cachectic tumor-bearing rats. For more details refer to the Material and methods section. Results are represented as the mean \pm SEM for 8 animals. Results are expressed as g/g initial body weight (ibw). C, control; F, formoterol-treated; T, tumor-bearing group. Values significantly different from the non-tumor-bearing animal group are indicated by * $p<0.05$ (Student's t-test). Values significantly different from the non-treated animal groups are indicated by *** $p<0.001$ (Student's t-test).

(EDL) muscles and also in the heart. Similar results were previously described by our research group (19,23). Indeed, formoterol and other β_2 -agonists such as clenbuterol were found to be effective in ameliorating muscle weight loss during wasting (19,23,24).

At the biochemical level, the mechanisms underlying the effects of the β_2 -agonist are complex. Formoterol was found to decrease protein degradation in skeletal muscle by inhibiting the ubiquitin-proteasome pathway (19). In addition, formoterol was found to decrease the enhanced apoptosis observed in skeletal muscle during cancer cachexia (19). Thirdly, at least *in vitro* formoterol increased protein synthesis in skeletal muscle (19). Notably, these effects of the β_2 -agonist appear to be associated with an increased muscle regeneration capacity (25).

In spite of these previously demonstrated positive effects of the β_2 -agonist at the biochemical level, no measures of physical performance associated with formoterol treatment during cancer cachexia have been reported. Therefore, the aim of the present investigation was to assess whether formoterol, in addition to improving physical and biochemical parameters in an experimental model of cancer cachexia, also affects various factors involved in improving quality of life such as total physical activity and muscle strength. In fact, previous investigations with β_2 -agonists and muscle strength have led to controversial results. Lanigan *et al* assessed limb muscle strength and endurance following administration of β_2 -agonists and found no beneficial effects on muscle performance (26). Conversely, Signorile *et al* reported that, at least in patients with muscular atrophy following spinal cord injury, β_2 -adrenergic agonist treatment resulted in an improvement in muscle strength (27).

In the present study, tumor burden significantly affected the total physical activity in the rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma cell tumors (Fig. 1). As early as 4 days after

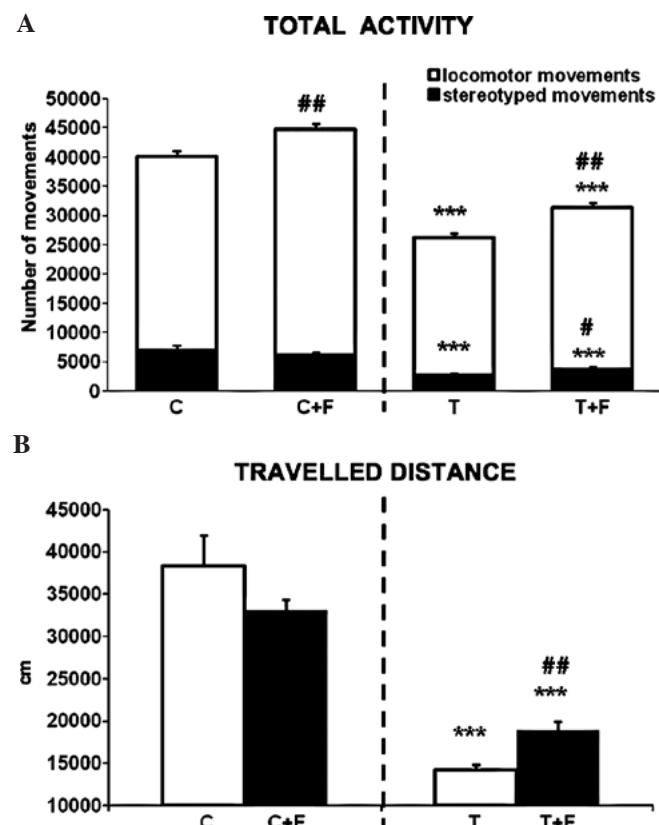


Figure 3. Effects of formoterol on physical activity and distance travelled in the cachectic tumor-bearing rats. (A) Total activity (24 h) was measured as the number of movements that included the total number of movements (locomotor and stereotyped movements) performed by the animals. Stereotyped movements were movements without displacement such as eating and cleaning movements and locomotor movements were movements with displacement. (B) Total travelled distance (cm). Parameters were monitored during the last 24 h before sacrifice (day 7 after tumor inoculation). Results are represented as the mean \pm SEM for 8 animals and are expressed as the number of movements. C, control; F, formoterol-treated; T, tumor-bearing group. Values significantly different from the non-tumor-bearing animal group are indicated by *** $p<0.001$ (Student's t-test). Values significantly different from the non-treated animal groups are indicated by # $p<0.05$, ## $p<0.01$ (Student's t-test).

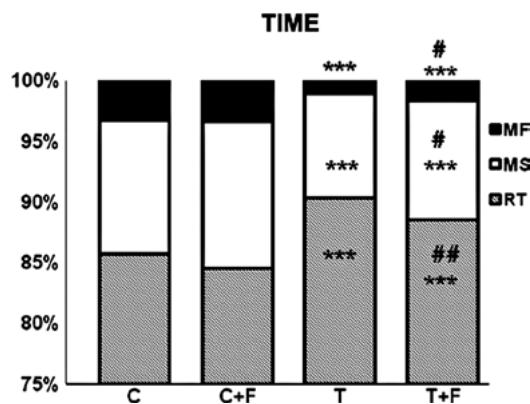


Figure 4. Effects of formoterol on time distribution in cachectic tumor-bearing rats. For more details refer to the Material and methods section. Results are represented as the mean \pm SEM for 8 animals. Results are expressed as the percentage of total time. RT, time involving resting (sleeping, cleaning and eating time): 0.2 cm/sec; MS, time involving slow movements: >2.5 cm/sec; MF, time involving fast movements: >5 cm/sec. C, control; F, formoterol-treated; T, tumor-bearing group. Values significantly different from time 0 are indicated by *** $p<0.001$ (Student's t-test). Values significantly different from the non-treated animal groups are indicated by # $p<0.05$, ## $p<0.01$ (Student's t-test).

tumor implantation – at which point body and muscle weight loss are already apparent (28) – a significant decrease in physical activity was observed. The decrease continued up until day 7 after tumor inoculation. Similar results have been previously reported using the same tumor model (29). Tumor burden causes a reduction in total physical activity through the activation of muscle wasting either via the release of tumor factors (30) or alternatively through changes in circulating and tissular cytokines or cytokine receptors (31,32).

We demonstrated that formoterol treatment significantly improved grip force in the tumor-bearing rats (23%) (Fig. 2). This correlated with an increase in muscle weight as shown in Table I. Therefore, the β_2 -agonist clearly acts at the biochemical level, and its action is reflected in a physiological parameter, grip force, in this case. Notably, formoterol also improved the physical performance of the animals. Total physical activity and total distance travelled by the rats were significantly increased by treatment with formoterol (19 and 33% respectively) (Fig. 3). Moreover, resting time, which was increased in the tumor-bearing rats, was decreased by formoterol treatment. Conversely, slow and fast movement times, which decreased in the tumor-bearing rats, increased in the formoterol-treated rats (Fig. 4).

Collectively, the results presented here allow us to conclude that the treatment of tumor-bearing animals with the β_2 -agonist formoterol clearly resulted in an improvement in both muscle force and total physical performance. This, together with previous results obtained by our research group (19), clearly indicate that formoterol may be a good candidate drug for the treatment of muscle wasting associated with cancer cachexia. Further preclinical studies are therefore warranted.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-02284-2008). The authors would

like to thank Industriale Chimica s.r.l. (Saronno, Italy), which kindly provided micronized formoterol fumarate. Dr Roberto Serpe was supported by grant CRPI_296 from the Regione Autonoma della Sardegna by PO Sardegna FSE 2007-2013 (L.R.7/2007) titled "Promotion of Scientific and Technological Research in Sardinia", Italy.

References

- Warren S: The immediate causes of death in cancer. *Am J Med Sci* 184: 610-615, 1932.
- Argiles JM, Alvarez B and Lopez-Soriano FJ: The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev* 17: 477-498, 1997.
- Argiles JM and Lopez-Soriano FJ: Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med Hypotheses* 32: 151-155, 1990.
- Harvey KB, Bothe A Jr and Blackburn GL: Nutritional assessment and patient outcome during oncological therapy. *Cancer* 43: 2065-2069, 1979.
- Nixon DW, Heymsfield SB, Cohen AE, *et al*: Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients. *Am J Med* 68: 683-690, 1980.
- DeWys W: Management of cancer cachexia. *Semin Oncol* 12: 452-460, 1985.
- Argiles JM, Garcia-Martinez C, Llovera M and Lopez-Soriano FJ: The role of cytokines in muscle wasting: its relation with cancer cachexia. *Med Res Rev* 12: 637-652, 1992.
- Van Royen M, Carbo N, Busquets S, *et al*: DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: a link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun* 270: 533-537, 2000.
- Kim YS and Sainz RD: Beta-adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci* 50: 397-407, 1992.
- Stock MJ and Rothwell NJ: Effects of beta-adrenergic agonists on metabolism and body composition. In: Control and Manipulation of Animal Growth. Butterly PJ, Hayes NB and Lindsay DB (eds.) Butterworths, London, pp 249-257, 1985.
- Agbenyega ET and Wareham AC: Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 102: 141-145, 1992.
- Rajab P, Fox J, Riaz S, Tomlinson D, Ball D and Greenhaff PL: Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1076-R1081, 2000.
- Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK and Isfort RJ: Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve* 25: 729-734, 2002.
- Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Pitts SA, Potter DE and Paulsen DF: Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature male rats. *Cells Tissues Organs* 171: 188-198, 2002.
- Yang YT and McElligott MA: Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J* 261: 1-10, 1989.
- Mersmann HJ: Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci* 76: 160-172, 1998.
- Anderson GP: Pharmacology of formoterol: an innovative bronchodilator. *Agents Actions Suppl* 34: 97-115, 1991.
- Mahler DA: The effect of inhaled beta2-agonists on clinical outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 110: S298-S303, 2002.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, *et al*: Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* 64: 6725-6731, 2004.
- Tessitore L, Costelli P, Bonetti G and Baccino FM: Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys* 306: 52-58, 1993.
- Sinis N, Guntinas-Lichius O, Irintchev A, *et al*: Manual stimulation of forearm muscles does not improve recovery of motor function after injury to a mixed peripheral nerve. *Exp Brain Res* 185: 469-483, 2008.
- Zangarelli A, Chanseaume E, Morio B, *et al*: Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB J* 20: 2439-2450, 2006.

23. Fuster G, Busquets S, Ametller E, et al: Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer Res* 67: 6512-6519, 2007.
24. Costelli P, Garcia-Martinez C, Llovera M, et al: Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J Clin Invest* 95: 2367-2372, 1995.
25. Ametller E, Busquets S, Fuster G, et al: Formoterol may activate rat muscle regeneration during cancer cachexia. *Insciencies J* 1: 1-17, 2011.
26. Lanigan C, Howes TQ, Borzone G, Vianna LG and Moxham J: The effects of beta 2-agonists and caffeine on respiratory and limb muscle performance. *Eur Respir J* 6: 1192-1196, 1993.
27. Signorile JF, Banovac K, Gomez M, Flipse D, Caruso JF and Lowenstein I: Increased muscle strength in paralyzed patients after spinal cord injury: effect of beta-2 adrenergic agonist. *Arch Phys Med Rehabil* 76: 55-58, 1995.
28. Marzabal M, Garcia-Martinez C, Comas J, Lopez-Soriano FJ and Argiles JM: A flow cytometric study of the rat Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Cancer Lett* 72: 169-173, 1993.
29. Toledo M, Busquets S, Sirisi S, et al: Cancer cachexia: physical activity and muscle force in tumour-bearing rats. *Oncol Rep* 25: 189-193, 2011.
30. Argiles JM, Busquets S, Toledo M and Lopez-Soriano FJ: The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 3: 263-268, 2009.
31. Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, et al: Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 142: 183-189, 1998.
32. Argiles JM, Busquets S and Lopez-Soriano FJ: Cytokines as mediators and targets for cancer cachexia. *Cancer Treat Res* 130: 199-217, 2006.

PUBLICACIÓ 4

Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance.

Sílvia Busquets, Míriam Toledo, Marcel Orpí, David Massa, Maria Porta, Eva Capdevila, Núria Padilla, Valentina Frailis, Francisco J López-Soriano, H Q Han, Josep M Argilés

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 3(1):37-43, 2012

La inhibició de la senyalització miostatina/activina pel receptor soluble ActRIIB reverteix la pèrdua de múscul esquelètic i allarga la supervivència en alguns models experimentals de caquèxia. L'objectiu d'aquesta investigació va ser examinar l'efecte del receptor d'activines tipus IIB soluble (sActRIIB) en animals portadors del carcinoma de pulmó de Lewis caquèctic (LLC) analitzant els canvis en la proteòlisi muscular i en la qualitat de vida. L'administració de sActRIIB va resultar en una millora en els pesos corporal i dels músculs. L'administració de sActRIIB també va donar lloc a una millora en la força muscular. Aquests resultats suggereixen que el bloqueig de la via de miostatina podria ser una estratègia terapèutica prometedora per al tractament de la caquèxia cancerosa.

Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance

Sílvia Busquets · Míriam Toledo · Marcel Orpí · David Massa · Maria Porta · Eva Capdevila · Núria Padilla · Valentina Frailis · Francisco J. López-Soriano · H. Q. Han · Josep M. Argilés

Received: 30 July 2011 / Accepted: 28 October 2011 / Published online: 8 November 2011
© The Author(s) 2011. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract

Background Cachexia is a multiorganic syndrome associated with cancer, characterized by body weight loss, muscle and adipose tissue wasting and inflammation.

Methods The aim of this investigation was to examine the effect of the soluble receptor antagonist of myostatin (sActRIIB) in cachectic tumor-bearing animals analyzing changes in muscle proteolysis and in quality of life.

Results Administration of sActRIIB resulted in an improvement in body and muscle weights. Administration of the soluble receptor antagonist of myostatin also resulted in an improvement in the muscle force.

Conclusions These results suggest that blocking myostatin pathway could be a promising therapeutic strategy for the treatment of cancer cachexia.

Keywords Myostatin · Cancer cachexia · Skeletal muscle · Physical activity · Muscle force · Ubiquitin

1 Introduction

Cachexia is a multiorganic syndrome associated with cancer, characterized by body weight loss (at least 5%), muscle and adipose tissue wasting and inflammation, being often associated with anorexia [1]. The abnormalities associated with cachexia include alterations in carbohydrate, lipid, and protein metabolism [1–3]. In advanced malignant diseases, cachexia appears to be one of the most common systemic manifestations. The presence of cachexia always implies a poor prognosis, having a great impact on the patients' quality of life and survival [4]. Several important molecular mechanisms have been shown to be involved in the increased muscle catabolism observed in cancer-induced cachexia, such as greater ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis, apoptosis, and activation of uncoupling proteins [2, 5–7]. Interaction of these mechanisms leads to muscle-mass loss by promoting protein and DNA breakdown and energy inefficiency.

Myostatin, also known as GDF-8 (growth and differentiation factor-8), is a member of the TGF- β superfamily of secreted growth factors and is a negative regulator of skeletal muscle development [8–10]. During embryogenesis, myostatin expression is restricted to developing skeletal muscles, but the protein is still expressed and secreted by skeletal muscles in adulthood [11, 12]. Mice and cattle with genetic deficiencies in myostatin exhibit dramatic increases in skeletal muscle mass, therefore supporting the role of myostatin in suppressing muscle growth [13]. Myostatin acts systemically (it is produced in muscle, adipose tissue, and

S. Busquets · M. Toledo · M. Orpí · D. Massa · M. Porta · E. Capdevila · N. Padilla · V. Frailis · F. J. López-Soriano · J. M. Argilés
Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

S. Busquets · F. J. López-Soriano · J. M. Argilés
Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

H. Q. Han
Departments of Metabolic Disorders and Protein Science, Amgen Research, Thousand Oaks, CA 91320, USA

S. Busquets (✉)
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain
e-mail: silviabusquets@ub.edu

heart [14] and released to the circulation) and binds to cell-surface receptors causing muscle loss. The myostatin protein circulates in the blood in a latent form as a full-length precursor that is cleaved into an amino-terminal pro-peptide and a carboxy-terminal mature region, which is the active form of the molecule. Once activated, myostatin has high affinity for the activin IIB receptor (Acvr2b, also known as ActRIIB) and weak affinity for Acvr2a (also known as ActRII and ActRIIA), both of which, like other receptors for TGF- β family members, bind multiple ligands [15, 16]. Liu et al. used a myostatin anti-sense RNA and found that the oligonucleotides could suppress myostatin expression in vivo resulting in an increase in muscle growth both in healthy and cachectic mice [17]. Interestingly, the effect of the RNA oligonucleotides was a significant upregulation of MyoD expression, therefore reinforcing the role of this transcription factor in muscle wasting [18, 19]. Although the use of the deacetylase inhibitors to increase the levels of follistatin (an antagonist of myostatin) has not lead to any positive results in the treatment of cachexia in experimental animals [20, 21], the use of the activin receptor extracellular domain/Fc fusion protein (ACVR2B-Fc) has been shown to be effective in the treatment of muscle wasting in tumor-bearing animals [21]. Finally, and very recently, Zhou et al. have shown that the administration of a high-affinity activin type II receptor leads to prolonged survival in tumor-bearing mice [22]. This receptor regulates the expression of target genes through to a TGF β pathway. Myostatin signaling acts through this receptor in skeletal muscle by setting in motion an intracellular cascade of events involving SMAD proteins, p38 MAPK, ERK1/2, PI3-K/AKT, and Wnt pathways [23–26].

Bearing all this in mind, the objective of the present investigation was to analyze in animals bearing the Lewis lung carcinoma the effects of ActRIIB antagonism on both muscle weights and force.

2 Material and methods

2.1 Animals

C57Bl/6 male mice (Criffa, Barcelona, Spain), of about 20 g were used in the different experiments. The animals were maintained at $22\pm2^\circ\text{C}$ with a regular light–dark cycle (light on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free access to food and water. The diet (Panlab, Barcelona, Spain) consists of 54% carbohydrate, 17% protein, and 5% fat (the residue was nondigestible material). The food intake was measured daily. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

2.2 Tumor inoculation and treatment

Mice received an intramuscular (hind leg) inoculum of 5×10^5 Lewis lung carcinoma cells obtained from exponential tumors. The Lewis lung carcinoma is a highly cachectic rapidly growing mouse tumor containing poorly differentiated cells, with a relatively short doubling time [27]. The animals were divided into three groups: control (C), tumor-bearing mice (TB), and tumor-bearing mice treated with the soluble receptor antagonist of myostatin (sActRIIB) [22] at the dose of 10 mg/kg s.c. twice a week (Fig. 1). sActRIIB sequesters Activin A and Myostatin in vivo [22]. At day 14, after tumor transplantation, the animals were weighed and anesthetized with a ketamine/xylazine mixture (i.p.) (Imalgene® and Rompun® respectively). The tumor was harvested from the hind leg, its volume and mass evaluated, and number of lung metastasis evaluated under the microscope. The metastases weight was evaluated according to the methodology used by Donati et al. [28]. Tissues were rapidly excised, weighed, and frozen in liquid nitrogen.

2.3 Real-time polymerase chain reaction

Total RNA from tibialis muscle was extracted by TriPureTM kit (Roche, Barcelona, Spain), a commercial modification of the acid guanidinium isothiocyanate/phenol/chloroform method [29]. First-strand cDNA was synthesized from total RNA with oligo dT15 primers and random primers pdN6 by using a cDNA synthesis kit (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche, Barcelona, Spain). Analysis of mRNA levels for the genes from the different proteolytic systems was performed with primers designed to detect the following gene products: ubiquitin (FORWARD 5' GAT CCA GGA CAA GGA GGG C 3', REVERSE 5' CAT CTT CCA GCT GCT TGC CT3'); E2 (FORWARD: 5' AGG CGA AGA TGG CGG T 3'; REVERSE 5' TCA TGC CTG TCC ACC TTG TA 3'); C8 proteasome subunit (FORWARD 5' AGA CCC CAA CAT GAA ACT GC 3'; REVERSE 5' AGG TTT GTT GGC AGA TGC TC 3'); MuRF-1 (FORWARD 5' TGT CTG GAG GTC GTT TCC G 3'; REVERSE 5' ATG CCG GTC CAT GAT CAC TT 3'); Atrogin-1(FORWARD 5'

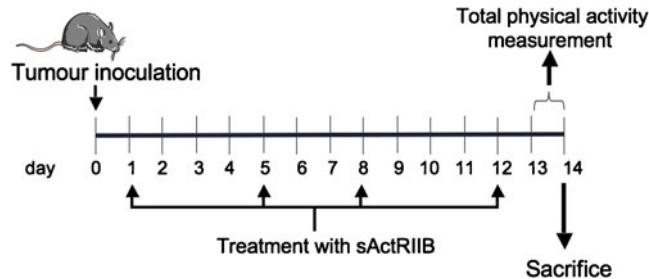


Fig. 1 Experimental protocol

Table 1 Effects of sActRIIB treatment on body weights and food intake in mice bearing the Lewis lung carcinoma

	C	T	T+A	ANOVA	
				A	B
Initial body weight (g)	19.4±0.3	19.3±0.2	19.2±0.4	ns	ns
Final body weight (g)	19.8±0.3	17.7±0.2	21.0±0.6	0.0032	0.0000
Body weight increase (%)		-8.20%	9.30%		
Carcass	77±2	57±0.7	70±2.1	0.0000	0.0000
Total food intake	13.5±0.2	11.8±0.2	13.0±0.4	0.0008	0.0053

Results are mean±S.E.M. Food intake is expressed in g/100 g of initial body weight and refers to the ingestion during the period of the experiment prior to sacrifice which took place 14 days after tumor inoculation. Final body weight excludes the tumor weight. Carcass (body without organs or tumor) is expressed as g/100 g of initial body weight (IBW). Statistical significance of the results by two-way analysis of variance (ANOVA)

C control mice ($n=6$), T tumor-bearing mice ($n=8$), T+A tumor-bearing mice treated with sActRIIB ($n=8$), ns nonsignificant differences, A (tumor effect), B (treatment effect)

CCA TCA GGA GAA GTG GAT CTA TGT T 3'; REVERSE 5' GCT TCC CCC AAA GTG CAG TA 3'; m-calpain (FORWARD 5' TTG AGC TGC AGA CCA TC 3'; REVERSE 5' GCA GCT TGA AAC CTG CTT CT 3'), cathepsin B (FORWARD 5' CTG CTG AGG ACC TGC TTA C 3'; REVERSE 5' CAC AGG GAG GGA TGG TGT A 3') and p0 (FORWARD 5' GAG GTC CTC CTT GGT GAA CA 3'; REVERSE 5' CCT CAT TGT GGG AGC AGA CA 3'). To avoid the detection of possible contamination by genomic DNA, primers were designed in different exons. The real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using a commercial kit (LightCycler™ FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, Roche, Barcelona, Spain). The relative amount of all mRNA was calculated using comparative C_T method. Acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA was used as the invariant control for all studies.

2.4 Total physical activity

Total physical activity (IR ACTIMETER System and ACTITRAK software from Panlab, Barcelona) was determined during the last 24 h before the sacrifice of the animals in a two subgroups of four TB mice (non-treated) and four TB mice (treated with the sActRIIB) using activity sensors that translate individual changes in the infrared pattern caused by movements of the animals into arbitrary activity counts. For the measurements, animals remained in their home cage. A frame containing an infrared beam system was placed on the outside of the cage; this minimized stress to the animals.

2.5 Grip force assessment

Skeletal muscular strength in mice was quantified by the grip strength test [30, 31]. The grip strength device (Panlab-Harvard Apparatus, Spain) comprised a triangular pull bar connected to an isometric force transducer (dynamometer).

Basically, the grip strength meter was positioned horizontally and the mice are held by the tail and lowered towards the device. The animals are allowed to grasp the triangular pull bar and were then pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the bar just before it lost grip was recorded as the peak tension. At least three measurements were taken per mouse on both baseline and test days, and the results were averaged for analysis. This force was measured in grams/gram initial body weight.

2.6 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed by means of one-way and two-way analysis of variance.

3 Results and discussion

The mouse Lewis lung carcinoma is a suitable model system to study the mechanisms involved in the establishment of

Table 2 Effects of sActRIIB treatment on muscle weights in mice bearing the Lewis lung carcinoma

	C	T	T+A	ANOVA	
				A	B
Gastrocnemius	581±11	446±9	587±15	0.0000	0.0000
Tibialis	174±5	130±4	177±7	0.0000	0.0000
EDL	84±3	25±3	31±3	0.0000	ns
Soleus	54±5	23±2	28±2	0.0000	ns

Results are mean±S.E.M. Muscle weights are expressed as mg/100 g of initial body weight. Statistical significance of the results by two-way analysis of variance (ANOVA)

EDL extensor digitorum longus, C control mice ($n=6$), T tumor-bearing mice ($n=8$), T+A tumor-bearing mice treated with sActRIIB ($n=8$), ns nonsignificant differences, A (tumor effect), B (treatment effect)

Table 3 Effects of sActRIIB treatment on tumor mass and metastases in mice bearing the Lewis lung carcinoma

	T	T+A	ANOVA
Tumor weight (mg)	4,354±213	3,790±153	0.0497
Tumor volume (ml)	5.0±0.33	4.2±0.2	0.0492
Metastases number	6.2±1.1	3.6±0.8	ns
Metastases volume	29.9±13.3	28.7±11	ns
% Lung metastases	15.7±6.7	19.9±7.5	ns

Results are mean±S.E.M. for eight animals. Statistically significant difference by post hoc Duncan test. Statistical significance of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), treatment effect *T* tumor-bearing mice, *T+A* tumor-bearing mice treated with sActRIIB, *ns* nonsignificant differences

cachexia. This tumor has been described as an anaplastic epidermoid with a marked haemorrhagic tendency, which produces multiple lung metastasis and is extremely refractory to most chemotherapeutic agents [32]. It is a well-known neoplasia that because of its fast growth rate and lung metastatic potential quickly causes death [27]. The growth of the Lewis lung carcinoma causes a rapid and progressive loss of body weight and tissue wasting, particularly in skeletal muscle [33]. Different therapeutic approaches have lead to positive results in neutralizing muscle wasting in this experimental model [34, 35], and recently a new strategy has been developed: to specifically block myostatin pathway [22].

As can be seen in Table 1, administration of sActRIIB resulted in an improvement in final body weight, the body weight increase being around 9%, while in untreated animals, the loss of weight was around 8%. This increase in body weight resulted also in an increase in carcass weight (mainly muscle and bone). Interestingly, sActRIIB treatment also resulted in an increase in food intake. Moreover, the increase in body weight affected individual muscle weights. Thus, as can be seen in Table 2, sActRIIB treatment resulted in a significant increase in gastrocnemius and tibialis muscles (31% and 36%, respectively). In fact, similar results has recently been published using the sActRIIB administration strategy in another mouse tumor model [22]. The authors concluded that in addition of an amelioration of muscle weight, treatment with the myostatin antagonist leads to prolonged survival [22]. In the rest of muscles analyzed (EDL and soleus), a clear tendency for bigger muscles as a result of treatment was observed; however, the differences did not reach statistical significance. Treatment slightly decreases the tumor weight and its volume, although it did not influence the metastatic lung area or the volume of the metastasis (Table 3).

Bearing in mind, the effects of the treatment on body weight and particularly in individual muscle weights, a set of experiments to measure physical performance were carried out using a physical actimeter [36]. As can be seen in Table 4, the implantation of the tumor resulted in a decrease of total physical activity (75%), mean velocity

Table 4 Last 24 h of physical activity in mice bearing the Lewis lung carcinoma treated with sActRIIB

	C	T	T+A	ANOVA	
				A	B
Physical activity					
Total physical activity	56,401±531	14,118±2,633	12,395±1,199	0.0000	ns
Stereotyped movements	4,005±876	1,245±387	1,517±330	0.0087	ns
Locomotor movements	52,396±1,373	12,874±2,615	10,878±1,240	0.0000	ns
Mean velocity	0.32±0.04	0.06±0.01	0.09±0.02	0.0000	ns
Total traveled distance	27,455±3,316	5,603±599	7,979±1,234	0.0000	ns
Time					
Resting time (%)	86.9±0.5	95.7±0.5	91±1.8	0.0009	0.0292
Slow-movements time (%)	9.4±0.7	4.0±0.6	8.6±1.7	0.0074	0.0173
Fast-movements time (%)	3.6±0.66	0.3±0.03	0.4±0.12	0.0002	ns

Physical activity is expressed in activity units. Stereotyped movements include movements without displacement (eating and cleaning movements); conversely, locomotor movements include movements with displacement. Mean velocity is expressed in centimeters per second. Traveled distance is expressed in centimeters. Time is expressed as percentage of total time (24 h). The thresholds of time are the following: time involving resting (sleeping, cleaning, and eating time): [0–2] cm/s, time involving slow movements: [2–5] cm/s and time involving fast movements: [>5] cm/s. Results are mean±S.E.M. for four animals. Statistical significance of the results by two-way analysis of variance (ANOVA)

C control mice, T tumor-bearing mice, T+A tumor-bearing mice treated with sActRIIB, ns nonsignificant differences, A (tumor effect), B (treatment effect)

Table 5 Effects of sActRIIB treatment on muscle force in mice bearing the Lewis lung carcinoma

	C	T	T+A
Grip force (day 0)	5.1±0.21 ^{a,c}	4.7±0.20 ^{a,c}	5.2±0.24 ^{a,c}
Grip force (day 14)	5.0±0.23 ^{a,c}	2.8±0.16 ^{b,d}	4.4±0.3 ^{a,c}

Grip force is expressed as grams per gram IBW. Results are mean±S.E.M. Statistical significance of the results by one-way analysis of variance (ANOVA). Statistically significant difference by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups (a and b: differences between C, T, and T+A groups the same day of measurement; and c and d: differences between days 0 and 14 in the same group)

C control mice ($n=4$), T tumor-bearing mice ($n=8$), T+A tumor-bearing mice treated with sActRIIB ($n=8$)

(81%), and total traveled distance (80%). Resting time was increased and the time involved in different types of movements was decreased. Similar results from our laboratory have been obtained in another tumor model [36]. As a result of the sActRIIB treatment, there was a decrease in the resting time percentage and an increase in the period of time related with slow movements (Table 4). These data suggest that sActRIIB treatment caused a slight improvement in physical performance.

In order to see if the increase of muscle weight and physical performance was related with increased muscle performance, grip force was determined using a specialized device dynamometer. The results presented in Table 5

clearly show an increase in muscle force as a result of sActRIIB treatment.

Finally, and since muscle wasting during cancer has been related with the activity of different proteolytic systems involved in enhanced muscle protein breakdown during catabolic conditions [5, 34, 37, 38], the mRNA expression levels of different genes related to proteolysis was measured following sActRIIB treatment. Indeed, tumor burden resulted in generalized increases in the majority of the components of the ubiquitin-dependent proteolytic system analyzed. An increase in m-Calpain (calcium-dependent system) and Cathepsin B (lysosomal system) were also observed in the tibialis muscle of the tumor-bearing animals (Table 6). Surprisingly, sActRIIB treatment did not influence the mRNA expression levels of the different components of the ubiquitin-dependent proteolytic system. However, sActRIIB treatment significantly decreases both calcium-dependent and lysosomal markers (Table 6). PCR real-time analysis of tibialis muscle revealed that tumor-bearing mice myostatin expression increased 1.5-fold over non-tumor bearing mice and that tumor-bearing mice treated with sActRIIB expressed similar levels of myostatin as found in non-treated tumor-bearing mice (Table 6).

It has to be pointed out that the calpain system could well play an important role in muscle proteolysis during cancer. From this point of view, Costelli et al. have reported an important role of calcium-dependent proteolysis both in animals [39] and humans [40]. In addition, Hasselgren et al.

Table 6 Effects of sActRIIB treatment on tibialis muscle mRNA content of the different proteolytic systems and myostatin in mice bearing the Lewis lung carcinoma

	C	T	T+A	ANOVA	
				A	B
Proteolytic system					
Ubiquitin-dependent					
Ubiquitin	100±5	159±9	152±9	0.0001	ns
C8 proteasome subunit	100±5	159±8	144±8	0.0000	ns
MuRF-1	100±24	207±15	206±49	0.0116	ns
Atrogin-1	100±24	266±21	250±36	0.0001	ns
E2	100±5	115±5	108±6	ns	ns
Calcium-dependent					
m-Calpain	100±7	146±6	107±5	0.0001	0.0004
Lysosomal					
Cathepsin B	100±6	126±7	90±8	0.0430	0.0040
Myostatin	100±5	159±9	152±9	0.0158	ns

Results are mean±S.E.M. for four to eight animals. The results are expressed as a percentage of controls. Statistical significance of the results by two-way analysis of variance (ANOVA)

C control animals, T tumor-bearing mice, T+A tumor-bearing mice treated with sActRIIB, ns nonsignificant differences, A (tumor effect), B (treatment effect)

have attributed a key role to calpains in the early stages of muscle protein degradation [41]. Indeed, the calcium-dependent proteases participate in the release of the myofilaments from the sarcomere; these myofilaments would later be degraded by the ubiquitin-dependent proteolytic system [41]. Very recently, a role for lysosome activity in muscle degradation during cancer cachexia has been also pointed out. Indeed, activation of FoxO3 stimulates lysosomal proteolysis in muscle by activating autophagic-related genes [42]. It is well-known that FoxO3 is one of the main transcription factors involved in the activation of atrogenes, a family of genes responsible for triggering atrophy in skeletal muscle [43].

From the results presented here, it can be concluded that exploring the inhibition of the myostatin system could well be an optimal strategy, particularly in combination with a nutritional approach, for the amelioration of a cachectic syndrome in humans.

Acknowledgments This work was supported by a grant the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-02284-2008). The authors of this manuscript certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* [44]. The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008;27:793–9.
- Argiles JM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev*. 1997;17:477–98.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med Hypotheses*. 1990;32:151–5.
- Harvey KB, Bothe Jr A, Blackburn GL. Nutritional assessment and patient outcome during oncological therapy. *Cancer*. 1979;43:2065–9.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17:223–6.
- Sanchis D, Busquets S, Alvarez B, Ricquier D, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Skeletal muscle UCP2 and UCP3 gene expression in a rat cancer cachexia model. *FEBS Lett*. 1998;436:415–8.
- van Royen M, Carbo N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ, et al. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: a link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270:533–7.
- Lee SJ, McPherron AC. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:604–7.
- Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R. Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci Rev*. 2001;29:155–8.
- Tsuchida K. Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2008;11:487–94.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387:83–90.
- Elkasrawy MN, Hamrick MW. Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*. 2010;10:56–63.
- Lee SJ. Sprinting without myostatin: a genetic determinant of athletic prowess. *Trends Genet*. 2007;23:475–7.
- Breitbart A, Auger-Messier M, Molkentin JD, Heineke J. Myostatin from the heart: local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H1973–82.
- de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:1–11.
- Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One*. 2009;4:e4937.
- Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R, et al. Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene Ther*. 2008;15:155–60.
- Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Moore-Carrasco R, Crepaldi S, Grieco G, et al. Skeletal muscle wasting in tumor-bearing rats is associated with MyoD down-regulation. *Int J Oncol*. 2005;26:1663–8.
- Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, Lopez-Soriano FJ, Fearon KC, et al. Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clin Nutr*. 2007;26:614–8.
- Bonetto A, Penna F, Minero VG, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM, et al. Deacetylase inhibitors modulate the myostatin/follistatin axis without improving cachexia in tumor-bearing mice. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009;9:608–16.
- Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:1548–54.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*. 2010;142:531–43.
- Allendorph GP, Vale WW, Choe S. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7643–8.
- Joulia-Ekaza D, Cabello G. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7:310–5.
- Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB J*. 2006;20:580–2.
- Lokireddy S, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R, et al. (2011) Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *Am J Physiol Cell Physiol*. Sep 7.
- Lippman MM, Lester WR, Abbott BJ, Venditti J, Baratta M. Antitumor activity of macromomycin B (NSC 170105) against murine leukemias, melanoma, and lung carcinoma. *Cancer Res*. 1975;35:939–45.
- Donati MB, Mussoni L, Poggi A, De Gaetano G, Garattini S. Growth and metastasis of the Lewis lung carcinoma in mice defibrinated with batroxobin. *Eur J Cancer*. 1978;14:343–7.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annals of Biochemistry*. 1987;162:156–9.

30. Sinis N, Guntinas-Lichius O, Irinchev A, Skouras E, Kuerten S, Pavlov SP, et al. Manual stimulation of forearm muscles does not improve recovery of motor function after injury to a mixed peripheral nerve. *Exp Brain Res.* 2008;185:469–83.
31. Zangarelli A, Chanseaume E, Morio B, Brugere C, Mosoni L, Rousset P, et al. Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB J.* 2006;20:2439–50.
32. Henry N, van Lamsweerde AL, Vaes G. Collagen degradation by metastatic variants of Lewis lung carcinoma: cooperation between tumor cells and macrophages. *Cancer Res.* 1983;43: 5321–7.
33. Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Garcia I, et al. Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett.* 1998;130:19–27.
34. Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res.* 2004;64:6725–31.
35. Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Busquets S. Novel approaches to the treatment of cachexia. *Drug Discov Today.* 2008;13: 73–8.
36. Toledo M, Busquets S, Sirisi S, Serpe R, Orpi M, Coutinho J, et al. Cancer cachexia: physical activity and muscle force in tumour-bearing rats. *Oncol Rep.* 2011;25:189–93.
37. Costelli P, Baccino FM. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003;6:407–12.
38. Attai D, Combaret L, Bechet D, Taillandier D. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy in cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2008;2:262–6.
39. Costelli P, Tullio RD, Baccino FM, Melloni E. Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br J Cancer.* 2001;84:946–50.
40. Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FM. Ca (2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2134–46.
41. Hasselgren PO, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg.* 2001;233:9–17.
42. 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.* 2007;6:472–83.
43. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:16260–5.
44. von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for authorship and publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2010;1:7–8.

PUBLICACIÓ 5

Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: additive effects of activin type II receptor inhibition and beta-2 agonist

Míriam Toledo, Sílvia Busquets, Fabio Penna, Xiaolan Zhou, Enrica Marmonti, Angelica Betancourt, David Massa, Francisco J. López-Soriano, H.Q. Han and Josep M. Argilés

Per sotmetre a la revista Cancer Research

L'objectiu de la present investigació és avaluar els efectes d'una combinació del receptor d'activines tipus IIB soluble (sActRIIB) i el β_2 -agonista formoterol en el model de caquèxia LLC. L'estudi presentat inclou ratolins portadors del LLC tractats amb formoterol, sActRIIB o amb la combinació de tots dos i es va observar que la combinació va ser extremadament eficaç en la reversió de desgast muscular associat amb la caquèxia cancerosa experimental. Els pesos muscualars d'animals amb tumor van ser completament recuperats després del tractament i això també es va reflectir en la mesura de la força d'agafada. Aquesta combinació va fer augmentar la ingestió d'aliments, tant en els animals control com en els portadors de tumor. El doble tractament també allarga significativament la supervivència sense afectar ni el pes ni el creixement del tumor primari i fins i tot es redueixen significativament el nombre de metàstasis. Pel que fa als mecanismes per a la preservació de la massa muscular durant la caquèxia, els efectes del formoterol i sActRIIB semblen ser additius, ja que el formoterol redueix la taxa de degradació de les proteïnes (mesurada a partir de l'alliberament de tirosina dels músculs incubats *ex vivo*), mentre que sActRIIB clarament només afecta la síntesi de proteïnes (mesura *in vivo* utilitzant fenilalanina tritiada). El formoterol també augmenta la taxa de síntesi de proteïnes i sembla estar afavorida per la presència del sActRIIB. La combinació de formoterol i sActRIIB sembla ser un tractament molt prometedor per a la caquèxia cancerosa experimental.

COMPLETE REVERSAL OF MUSCLE WASTING IN EXPERIMENTAL CANCER CACHEXIA: ADDITIVE EFFECTS OF ACTIVIN TYPE II RECEPTOR INHIBITION AND BETA-2 AGONIST

Míriam Toledo¹, Sílvia Busquets^{1,2}, Fabio Penna¹, Xiaolan Zhou³, Enrica Marmonti¹, Angelica Betancourt¹, David Massa¹, Francisco J. López-Soriano^{1,2}, H.Q. Han³ and Josep M. Argilés^{1,2}

¹Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain.

³ Departments of Metabolic Disorders and Protein Science, Amgen Research, Thousand Oaks, CA 91320, USA.

ABSTRACT

Background and aims: Formoterol is a highly potent β 2 - adrenoceptor - selective agonist which is a muscle growth promoter in many animal species, resulting in skeletal muscle hypertrophy. The inhibition of myostatin/activin by soluble ActRIIB prevents and reverses skeletal muscle loss and prolongs the survival of tumor-bearing animals. The aim of the present investigation is to evaluate the effects of a combination of the soluble receptor antagonist of myostatin and the β 2-agonist formoterol in the cachectic Lewis lung carcinoma model (LLC).

Methods: The study presented involved mice bearing the LLC treated with either the beta-2 agonist formoterol, or the soluble ActRIIB or with the combination of both.

Results: The combination of formoterol and soluble ActRIIB is extremely effective in reversing muscle wasting associated with experimental cancer cachexia in mice. Muscle weights from tumour-bearing animals are completely recovered following treatment and this is also reflected in the measured grip strength. This combination increases food intake both in control and tumour-bearing animals. The double treatment also prolongs survival significantly without affecting the weight and growth of the primary tumour. However, it significantly reduces the number of metastasis. Concerning the mechanisms for the preservation of muscle mass during cachexia, the effects of formoterol and soluble ActRIIB seem to be additive, since formoterol reduces the rate of protein degradation (as measured *in vitro* as tyrosine release, using incubated isolated individual muscles) while soluble ActRIIB clearly only affects protein synthesis (as measured *in vivo* using tritiated phenylalanine). Formoterol also increases the rate of protein synthesis and this seems to be favoured by the presence of soluble ActRIIB.

Conclusions: Combining formoterol and the soluble ActRIIB seems to be a very promising treatment for experimental cancer cachexia. Further studies in humans patients are necessary and may lead to one of the most effective treatment for muscle wasting associated with cancer.

Address for correspondence:

Dr. Sílvia Busquets, Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028-Barcelona, Spain. Telephone: 34-934034609 / telefax: 34-934021559 / e-mail: silviabusquets@ub.edu

Keywords: cancer cachexia, skeletal muscle, formoterol, anti-myostatin, multitherapy, ActRIIB

INTRODUCTION

Cachexia is a multi-factorial syndrome found in 50 to 80% of cancer patients (1), particularly at advanced stages of disease, leading to a decrease in quality of life and physical performance. Cancer cachexia is clinically relevant since it is considered a predictor of reduced survival, accounting for more than 20% of cancer deaths (2,3). The pathogenesis of cancer cachexia is characterized by the loss of skeletal muscle mass and fat, often associated with anorexia. However, muscle wasting should be regarded as the most important trait, since it is responsible for most of the cancer cachexia-associated symptoms, including survival (4).

The competition for nutrients between the tumour and the host and the inflammatory status promote profound metabolic disturbances that include a massive nitrogen flow from the skeletal muscle to the liver (5). Consequently, muscle plays a central role in whole-body protein metabolism by serving as the principal reservoir for amino acids to maintain protein synthesis in peripheral tissues in the absence of amino acid absorption from the gut and by providing hepatic gluconeogenic precursors (5,6). The negative protein balance results from altered rates on both sides of muscle protein turnover, reduced synthesis and increased degradation, as revealed by several preclinical studies of cancer cachexia and even cancer patients (7–9). Multiple studies reported that muscle protein degradation in wasting conditions is primarily mediated by the ubiquitin-proteasome pathway, and two muscle-specific E3 ubiquitin ligases, Atrogin-1 and MuRF-1, which play a crucial role in activating the degradation machinery (10–12). Beyond the proteasome, there are other protein degradation systems such as autophagy-lysosomal pathway (13), calpains (14–16) or even apoptosis (17) that might play a role in muscle wasting associated with cancer cachexia.

However, there is still a missing link between the tumour-induced adaptation (i.e. both tumour (18) and host-derived (19) humoral factors) and protein degradation. During the past, the Akt/FOXO signalling pathway has been causally connected with the induction of Atrogin-1 and MuRF-1 (12,20), albeit its relevance to cancer cachexia has been questioned (21). Myostatin, also known as GDF-8 (growth and differentiation factor-8), is a member of the TGF- β superfamily of secreted growth factors and is a negative regulator of skeletal muscle growth (22,23). The administration of a myostatin anti-sense oligonucleotides resulted in increased muscle mass in both healthy and cachectic mice (24). Although the use of the deacetylase inhibitors to increase the levels of follistatin (the endogenous myostatin inhibitor) failed to prevent experimental cancer cachexia (25,26), the use of an activin receptor extracellular domain/Fc fusion protein (ACVR2B-Fc) was effective in similar experimental models (27). Finally, Zhou et al. showed that the administration of a high-affinity activin type II receptor leads to prolonged survival in Colon26-bearing mice (26) and our group reported the improvement of muscle weight and function in the Lewis lung carcinoma model (28).

So far, the growing data regarding the cancer cachexia pathogenesis has still not turned into an effective therapeutic intervention available to the healthcare system. Studies in our laboratory have shown a very positive action of β -adrenergic agents upon experimental muscle wasting (29). One of this compounds, formoterol, combines the clinical advantages of rapid onset of action with duration of action and it is currently in use in humans for the treatment of bronchospasm associated with asthma (30). The suggested anti-wasting action is based on its ability to prevent muscle proteolysis. The anti-wasting effects of the drug were also observed in terms of total physical activity and grip force, surrogate for the estimation of muscle function and

quality of life in rodents (31). A clinical study involving formoterol treatment in cancer patients is also available; a cohort with advanced cancer cachexia, an 8-week course of megestrol and formoterol in combination was reported to be safe and well tolerated (32).

Taking into consideration the therapeutic potential of myostatin/activin blockers and β_2 -adrenergic agonists for the treatment of cancer cachexia, the aim of the present investigation was to examine the effectiveness of the combined use of formoterol and soluble receptor antagonist of myostatin/activin in a mouse model of cancer cachexia, in order to obtain a broad spectrum effect that targets both anabolism and catabolism, potentially being suitable for the majority of cancer patients.

METHODS

Animals, tumor inoculation and treatment

Male C57BL6 mice (Harlan, Barcelona, Spain) weighing about 20 g were used. The animals were maintained on a regular light-dark cycle (light on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free access to food and water. The diet (Panlab, Barcelona, Spain) consists of 54% carbohydrate, 17% protein and 5% fat (the residue was non digestible material). Mice received an intramuscular (hind leg) inoculum of 5×10^5 Lewis lung carcinoma cells obtained from exponential tumours. The Lewis lung carcinoma is a highly cachectic rapidly growing mouse tumour containing poorly differentiated cells, with a relatively short doubling time. The animals were divided in two groups namely controls (C) and tumour-bearing mice (TB). Both groups were further divided into four subgroups: untreated (vehicle administered), treated with Formoterol (1mg/kg body weight, subcutaneous (s.c.), daily), treated with the soluble receptor antagonist of myostatin/activin, sActRIIB (10 mg/kg body weight, s.c., twice a week) and treated with both drugs.

sActRIIB sequesters Activin A and Miostatin in vivo (27). At day 14 after tumour transplantation the animals were weighed and anesthetized with a ketamine/xylacine mixture. The tumour was harvested from the hind leg, its volume and mass evaluated. For the visualization of metastases, the lungs were removed after blood removal and euthanasia of the mouse. Metastatic nodules were counted using an anatomical microscope and the metastases weights were evaluated according the methodology used by Donati et al (33). Several tissues were rapidly excised, weighed, and frozen in liquid nitrogen.

Total physical activity

Total physical activity (IR ACTIMETER System and ACTITRAK software from PANLAB, Barcelona) was determined during 20h on day 14 (the day before sacrifice) in the following subgroups: C: control mice; T: tumour-bearing mice; T+A: mice treated with sActRIIB; T+F: mice treated with formoterol; T+A+F: mice treated with sActRIIB and with formoterol. Total physical activity was determined using activity sensors that translate individual changes in the infrared pattern caused by movements of the animals into arbitrary activity counts (34). For the measure, animals remained in their home cage –a frame containing an infrared beam system was placed on the outside of the cage-. This minimises stress to the animals.

Grip force assessment

Skeletal muscular strength in mice was quantified by the grip-strength test (34). The grip-strength device (Panlab-Harvard Apparatus) comprised a bar connected to an isometric force transducer (dynamometer). In brief, the grip strength meter was positioned horizontally, and the mice were held by the tail and lowered towards the device. The animals were allowed to grasp the pull bar and were then pulled backwards in a horizontal plane. The force applied to the bar just before the grip was lost was recorded as

the peak tension. At least three measurements were taken per animal at baseline and on test days, and the results were averaged for analysis. This force was measured in Newtons/100g initial body weight.

In vivo rate of protein synthesis

Protein synthesis was quantified by determining the amount of Phe-³H incorporated into the tissues, as previously reported (35). Briefly, three hours prior to sacrifice, the animals received an IP dose of tritiated phenylalanine (500μCi/Kg). The muscles were then homogenized and the protein precipitated with trichloroacetic acid (12%). Finally, the samples were resuspended in sodium deoxycholate (0.4%), NaOH (4%) and boiled for 3 hours. Total radioactivity was measured with a β liquid scintillation counter at the Radioisotope Service of the Department of Biology (University of Barcelona).

In vitro rate of protein degradation

Isolated EDL muscles were fixed to a stainless-steel clip in order to maintain the muscle under slight tension (making it comparable to resting length) during the incubation. Such muscles are able to maintain normal ATP and phosphocreatine concentrations during a 3 h incubation period (36). The muscles were incubated in a shaking-thermostatized water bath at 35 °C for 3 h in 2 ml of Krebs-Henseleit physiological saline pH 7.4, containing 5 mM glucose and 20 mM HEPES. After the addition of the muscles to the vials the incubation started at a shaking rate of 45 cycles/min. Vials were gassed with O₂/CO₂ 19:1 during the whole incubation period. The muscles were preincubated for 30 minutes in Krebs-Henseleit buffer and then incubated for 120 minutes in fresh supplemented medium. Total protein degradation was calculated as the rate of tyrosine released in the last two hours of incubation into the medium in the presence of 0.5 mM cycloheximide in order to block the reincorporation of tyrosine into tissue protein.

Tyrosine was measured fluorimetrically as previously described (37).

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA from tibialis muscle was extracted by TriPureTM kit (Roche, Barcelona, Spain). Reverse transcription (RT) reactions were prepared using by First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche, Barcelona, Spain) following the manufacturer's instructions. Analysis of mRNA levels for the genes from the different proteolytic systems was performed with primers designed to detect the following gene products: ubiquitin (FORWARD 5' GAT CCA GGA CAA GGA GGG C 3'; REVERSE 5' CAT CTT CCA GCT GCT TGC CT3'); E2 (FORWARD: 5' AGG CGA AGA TGG CGG T 3'; REVERSE 5' TCA TGC CTG TCC ACC TTG TA 3'); C8 proteasome subunit (FORWARD 5' AGA CCC CAA CAT GAA ACT GC 3'; REVERSE 5' AGG TTT GTT GGC AGA TGC TC 3'); MuRF-1 (FORWARD 5' TGT CTG GAG GTC GTT TCC G 3'; REVERSE 5' ATG CCG GTC CAT GAT CAC TT 3'); Atrogin-1(FORWARD 5' CCA TCA GGA GAA GTG GAT CTA TGT T 3'; REVERSE 5' GCT TCC CCC AAA GTG CAG TA 3'); m-calpain (FORWARD 5' TTG AGC TGC AGA CCA TC 3'; REVERSE 5' GCA GCT TGA AAC CTG CTT CT 3'), cathepsin B (FORWARD 5' CTG CTG AGG ACC TGC TTA C 3'; REVERSE 5' CAC AGG GAG GGA TGG TGT A3') and p0 (FORWARD 5' GAG GTC CTC CTT GGT GAA CA 3'; REVERSE 5' CCT CAT TGT GGG AGC AGA CA 3'). To avoid the detection of possible contamination by genomic DNA, primers were designed in different exons. The real-time PCR was performed using a commercial kit (LightCycler™ 480 SYBR Green I Master, Roche, Barcelona, Spain). The relative amount of all mRNA was calculated using comparative C_T method. Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0 mRNA was used as the invariant control for all studies.

ELISA

Serum TNF- α , IL-1- β and IL-6 levels were detected by using Milliplex MAP mouse cytokine assay kit, used according to the manufacturer instructions (Millipore). Serum from each animal was assayed in duplicate.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed for each studied variable and the means and SE were

calculated. Intergroup differences were evaluated statistically using multiple-way analysis of variance (ANOVA). *Post hoc* pairwise comparisons (Duncan test) were performed when was appropriated. Survival curves were computed with the Kaplan-Meier method, and differences in survival were validated with Log-rank test (Mantel-Cox). All statistical tests were performed using SPSS version 21.

Table 1. Effects of the combination of formoterol and sActRIIB treatment on food intake, body weight and muscle weight in mice bearing the Lewis lung carcinoma.

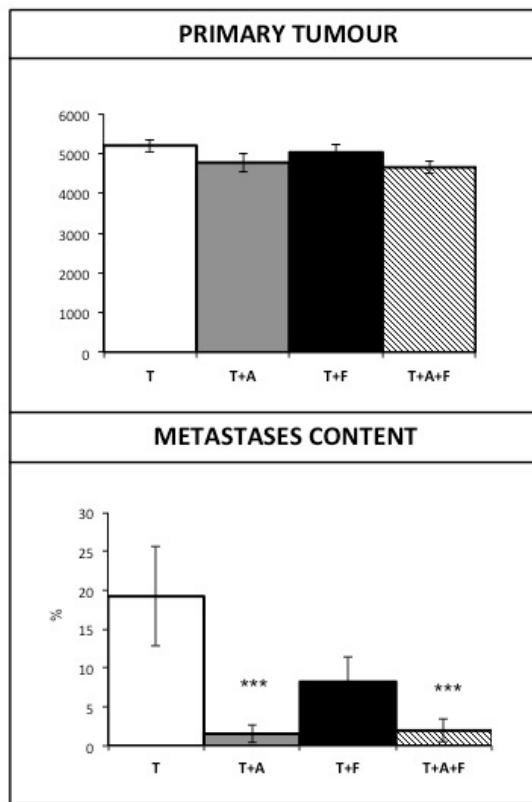
Parameter	Experimental group							
	C (13)	C+F (7)	C+A (7)	C+A+F (7)	T (16)	T+F (16)	T+A (16)	T+A+F (16)
Food intake	226 ± 7 ^{ab}	258 ± 4 ^c	260 ± 8 ^c	256 ± 13 ^c	216 ± 7 ^a	221 ± 3 ^a	215 ± 3 ^a	240 ± 4 ^b
Body Weight								
IBW	20,6 ± 0,4	20,9 ± 0,5	21,0 ± 0,8	21,0 ± 0,7	20,3 ± 0,3	20,4 ± 0,4	20,3 ± 0,4	20,5 ± 0,3
FBW	22,1 ± 0,6 ^b	24,5 ± 0,7 ^c	27,2 ± 0,9 ^e	27,3 ± 0,7 ^e	19,8 ± 0,5 ^a	21,6 ± 0,4 ^b	24,0 ± 0,6 ^c	24,9 ± 0,6 ^d
Weight change	7%	17%	29%	30%	-6%	6%	18%	21%
Carcass	15,1 ± 0,4 ^b	16,6 ± 0,5 ^c	18,8 ± 0,7 ^e	18,8 ± 0,5 ^e	13,1 ± 0,4 ^a	14,6 ± 0,2 ^b	16,4 ± 0,3 ^c	17,4 ± 0,5 ^d
Muscle Weight								
GSN	571 ± 13 ^b	690 ± 8 ^c	793 ± 14 ^d	837 ± 17 ^e	469 ± 13 ^a	579 ± 11 ^b	606 ± 17 ^b	727 ± 23 ^c
Tibialis	182 ± 4 ^b	213 ± 4 ^{cd}	277 ± 7 ^e	280 ± 10 ^e	146 ± 4 ^a	180 ± 7 ^b	191 ± 5 ^{bc}	227 ± 8 ^d
Diaphragm	288 ± 20 ^a	355 ± 20 ^b	426 ± 32 ^c	472 ± 10 ^c	247 ± 12 ^a	259 ± 17 ^a	296 ± 13 ^a	351 ± 16 ^b
Heart	559 ± 12 ^a	638 ± 12 ^{bc}	585 ± 22 ^{ab}	647 ± 34 ^c	553 ± 13 ^a	549 ± 11 ^a	565 ± 16 ^a	581 ± 10 ^{ab}

Results are mean ± S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. Food intake is expressed as g/100g IBW and refers to the cumulative intake (14 days). IBW: initial body weight is expressed as g. FBW: final body weight (without tumour) is expressed as g. Carcass is expressed as g. Tissue weights are expressed as mg/100 g of initial body weight. GSN: gastrocnemius muscle. C: mice without tumour; T: tumour-bearing mice; C+F and T+F: treated with formoterol; C+A and T+A: treated with sActRIIB; C+A+F and T+A+F: treated with both sActRIIB and formoterol. Statistical significance of the results by full factorial three-way ANOVA (fixed factors: tumour, formoterol treatment and sActRIIB treatment). P-values of all the parameters detailed in Supplemental data. Statistically significant differences by *post hoc* Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

RESULTS AND DISCUSSION

The results presented in Table 1 clearly show that treatment with either formoterol (F) or the myostatin soluble receptor antagonist sActRIIB (A) resulted in a significant increase in food intake in the control group. In tumour-bearing

animals, only the combination of both treatments (A+F) resulted in a significant appetite improvement (Table 1). Both F and A determined a relevant increase in body weight in all the experimental groups studied and the combined treatment exerted a cumulative effect.

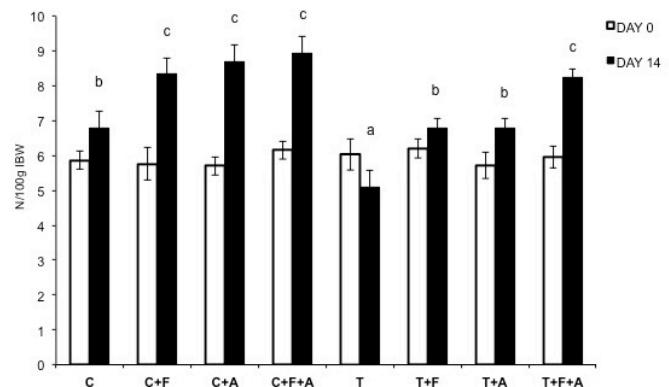
**Figure 1. Tumour weight and metastases.**

Results are mean \pm S.E.M. for the 16 animals per group. T: tumour-bearing mice; T+F: treated with formoterol; T+A: treated with sActRIIB; T+A+F: treated with both sActRIIB and formoterol. Statistical significance of the results by full factorial two-way ANOVA (fixed factors: formoterol treatment, and sActRIIB treatment): no differences in formoterol treatment, sActRIIB treatment $p<0.001$.

The same effects were observed when the carcass weight – instead of total weight – was considered. Formoterol promoted a significant increase in skeletal muscle weights and heart, both in control and tumour hosts. These results agree with previous observations in our laboratory (38). Interestingly, sActRIIB treatment also resulted in significant increments in gastrocnemius (21%), tibialis (52%) and diaphragm (48%) in control animals and also in tumour-bearing animals (29% and 31% for gastrocnemius and tibialis respectively). The combination treatment A+F resulted in larger increases in muscle weights than the individual treatments. It is noteworthy that the combination

treatment significantly increased heart weight both in control and LLC-bearing animals. This is interesting because important abnormalities associated with heart function have been described during cancer cachexia (39,40).

All the above-reported observations did not associate with changes of primary tumour weight (Figure 1). However, sActRIIB treatment resulted in a significant reduction of metastases content (92%). Such reduction was not modified by the combination with F.

**Figure 2. Muscle strength.** Results are mean \pm S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. Grip force is expressed as Newtons/100g initial body weight. C: mice without tumour (n=13); T: tumour-bearing mice (n=16); C+F (n=7) and T+F (n=16): treated with formoterol; C+A (n=7) and T+A (n=16): treated with sActRIIB; C+A+F (n=7) and T+A+F (n=16): treated with both sActRIIB and formoterol. Statistical significance of the results by full factorial three-way ANOVA (fixed factors: tumour, formoterol treatment, and sActRIIB treatment): tumour *** $p<0.001$, formoterol treatment *** $p<0.001$, sActRIIB treatment *** $p<0.001$. Statistically significant difference by post hoc Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

As a consequence of the observed bigger muscles following the distinct treatments, a clear gain of muscle strength was recorded (Figure 2). Both formoterol and sActRIIB caused an increase of this parameter in control as well as in tumour-bearing mice. Interestingly the combined treatment induced a larger increase in muscle

force as compared with sActRIIB or formoterol alone, suggesting additive effects.

The beneficial effects of gaining muscle mass were also seen when animal behaviour was monitored. As shown in Table 2, formoterol treatment was associated with a tendency to improve total physical activity while sActRIIB did

not modulate this parameter. The recovery promoted by the beta₂-agonist was mainly associated with locomotor movements as previously reported by our laboratory (41). Interestingly the double treatment (F+A) resulted in a significant improvement of mean velocity and travelled distance (Table 2).

Table 2. Effects of the combination of formoterol and sActRIIB treatment on total physical activity and grip force in mice bearing the Lewis lung carcinoma.

	C (10)	T (10)	T + F (10)	T + A (10)	T + A + F (7)	ANOVA
Physical activity						p-value
Total activity	65321 ± 2643 ^b	15451 ± 1152 ^a	19627 ± 1085 ^a	17041 ± 1383 ^a	19900 ± 631 ^a	0,000
Stereotyped movement	5312 ± 300 ^b	1893 ± 327 ^a	1545 ± 118 ^a	1769 ± 157 ^a	1888 ± 154 ^a	0,000
Locomotor movements	60010 ± 2636 ^b	13558 ± 1060 ^a	18082 ± 1019 ^a	15272 ± 1326 ^a	18012 ± 689 ^a	0,000
Velocity and distance						
Mean Velocity (cm/s)	0,64 ± 0,03 ^c	0,10 ± 0,03 ^a	0,14 ± 0,01 ^{ab}	0,13 ± 0,01 ^{ab}	0,17 ± 0,01 ^b	0,000
Travelled distance (cm)	46443 ± 990 ^c	7190 ± 737 ^a	10623 ± 1062 ^{ab}	9324 ± 784 ^{ab}	12172 ± 768 ^b	0,000
Time (%)						
Resting	73,3 ± 1,4 ^a	93,4 ± 0,6 ^c	89,7 ± 1,5 ^{bc}	90,3 ± 1,1 ^{bc}	87,3 ± 1,9 ^b	0,000
Slow movements	17,9 ± 1,2 ^c	6,2 ± 0,5 ^a	9,4 ± 1,3 ^{ab}	9,0 ± 1,0 ^{ab}	11,7 ± 1,7 ^b	0,000
Fast movements	8,8 ± 0,03 ^b	0,4 ± 0,08 ^a	0,9 ± 0,20 ^a	0,6 ± 0,11 ^a	1,0 ± 0,16 ^a	0,000

Results are mean ± S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. C: mice without tumour; T: tumour-bearing mice; T+F: treated with formoterol; T+A: treated with sActRIIB; T+A+F: treated with both sActRIIB and formoterol. Physical activity is expressed in activity units. Stereotyped movements include movements without displacement (eating and cleaning movements); conversely, locomotor movements include movements with displacement. Mean velocity is expressed in cm/s. Travelled distance is expressed in cm. Time is expressed as percentage of total time (24 hours). The thresholds of time are the following: time involving resting (sleeping, cleaning and eating time): [0-2] cm/s, time involving slow movements: [2-5] cm/s and time involving fast movements: [>5] cm/s. Statistical significance of the results by one-way ANOVA following a *post hoc* Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

Since the improvement in terms of skeletal muscle mass and performance might impact on animal survival, an experiment was repeated in order to assay such parameter. The results presented in Figure 3 clearly show that while formoterol alone had no influence on survival,

treatment with myostatin soluble receptor antagonist or the combination clearly resulted in enhanced survival. Thus while untreated tumour-bearing mice lived for 27 days, the double treatment was able to enlarge survival up to 36 days. This is likely due to the effect of sActRIIB

on the number of metastases; Zhou et al. reported that treatment with sActRIIB during cancer cachexia caused myostatin and activin to be sequestered by this soluble receptor, leading to reduced availability of these ligands to activate the ActRIIB receptor, which leads to decreased activin signalling, thus preventing muscle atrophy (27). Therefore, high levels of activin had been implicated in the pathogenesis of metastasis in different tumours (42–44). Thereby, taking into consideration that the cause of death of this tumour model is associated with loss of respiratory capacity due to invasion of the lungs, it may be related with activin blockade promoted by ActRIIB treatment.

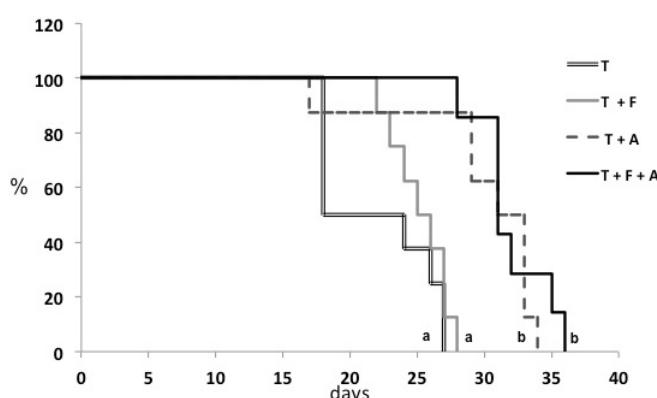


Figure 3. Survival. Kaplan-Meier survival analysis. Results are mean \pm S.E.M. for the 8 animals per group. T: tumour-bearing mice; T+A: tumour-bearing mice treated with the soluble receptor antagonist of myostatin (sActRIIB); T+F: tumour-bearing mice treated with formoterol; T+A+F: tumour-bearing mice treated with sActRIIB and with formoterol. Comparison of survival curves were analyzed by Log-rank test (Mantel-Cox). The global comparison for the treatments has a P value=0.000. Different subscripts means significant differences detected by pairwise comparisons (Bonferroni correction). P values < 0.05 were considered significant.

The results presented in Figure 4 demonstrated that tumour growth was associated with an important inflammatory response. Indeed, we observed a dramatic increase in the circulating

levels of several cytokines: TNF α , IL-1 β and IL-6 in agreement with previous observations (19,45,46). Treatment with either formoterol or sActRIIB elicited a significant decrease in TNF α and IL-6.

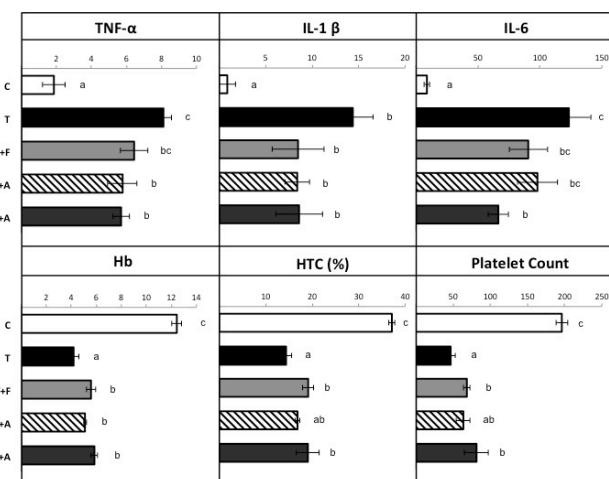


Figure 4. Circulating cytokine levels (TNF α , IL-1 β and IL-6), haemoglobin, haematocrit and platelet count in tumour-bearing mice. Results are mean \pm S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. C: mice without tumour; T: tumour-bearing mice; T+F: treated with formoterol; T+A: treated with sActRIIB; T+A+F: treated with both sActRIIB and formoterol. Statistical significance of the results by full factorial one-way ANOVA following a post hoc Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

Moreover, the combined treatment was even more effective than the individual ones in lowering IL-6. Since the latter cytokine seems to have a very important role in different models of cancer cachexia (47), it becomes clear that the observed effects upon muscle weights, force and activity can partly be explained by preventing high levels of the cytokines. The different treatments were also associated with an improvement in haemoglobin, haematocrit and platelet count (Figure 4).

Our next step was to try and assess the mechanism by which the different treatments influenced muscle weight. We therefore

estimated both protein synthesis and degradation in the skeletal muscle.

The results presented in Figure 5 show the rate of protein synthesis as estimated by the incorporation of tritiated phenylalanine into protein. It can be seen that for all the skeletal muscle studied (gastrocnemius, tibialis and vastus lateralis) tumour burden resulted in very important decrease in protein synthesis rate. As can be observed treatment with formoterol resulted in an increment in protein synthesis only in the vastus lateralis muscle, while sActRIIB promoted increases in the rate of protein synthesis in both tibialis and vastus lateralis.

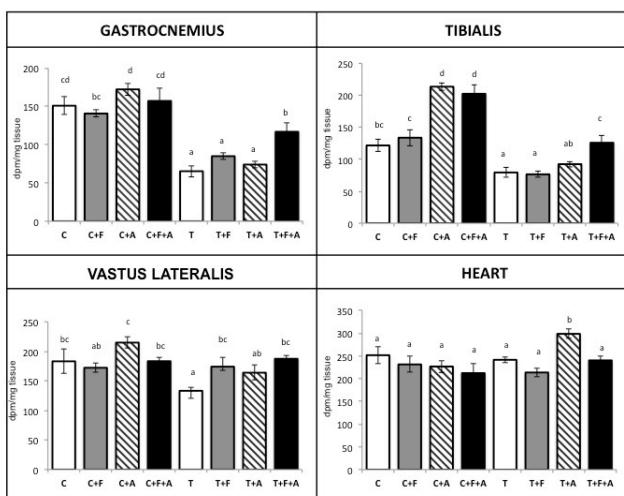


Figure 5. Protein synthesis. Results are mean \pm S.E.M. for 7–8 animals per group. Protein synthesis is expressed as dpm/g tissue. C: control mice; T: tumour-bearing mice; C+A and T+A: mice treated with the soluble receptor antagonist of myostatin (sActRIIB); C+F and T+F: mice treated with formoterol; C+A+F and T+A+F: mice treated with sActRIIB and with formoterol. Statistical significance of the results by full factorial three-way ANOVA (fixed factors: tumour, formoterol treatment, and sActRIIB treatment). P-values of all the parameters detailed in Supplemental data. Statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

Very interestingly, the combined treatment resulted in improvement of this parameter in all the skeletal muscle studied. Thus can be concluded that both formoterol and sActRIIB

were able to improve somehow, depending the type of muscle, the rate of protein synthesis.

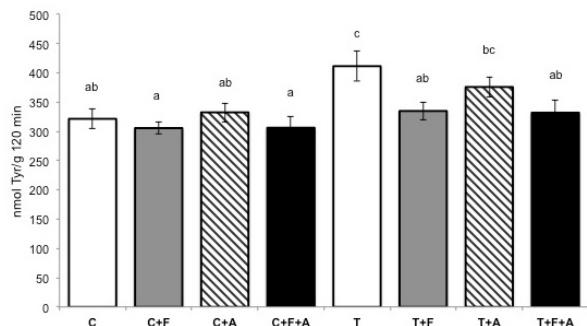


Figure 6. Skeletal muscle proteolytic rate in isolated EDL muscles in vitro. Results are mean \pm S.E.M. for 7 animals in control groups and 8 animals in tumour groups. Proteolytic rates were measured in the presence of cycloheximide (0.5 mmol/L) and are expressed as nanomoles tyrosine per gram and 2 hours of incubation. C: control mice; T: tumour-bearing mice; C+A and T+A: mice treated with the soluble receptor antagonist of myostatin (sActRIIB); C+F and T+F: mice treated with formoterol; C+A+F and T+A+F: mice treated with sActRIIB and with formoterol. Statistical significance of the results by full factorial three-way ANOVA (fixed factors: tumour, formoterol treatment, and sActRIIB treatment): tumour ***p=0.001, formoterol treatment **p=0.004. Statistically significant difference by post hoc Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

Concerning protein degradation, this parameter was measured in isolated EDL muscles from both control and tumour hosts. The results presented in Figure 6 clearly show that formoterol was able to decrease protein degradation in both control and tumour-bearing mice. Conversely sActRIIB did not affect the in vitro rate of protein degradation. Interestingly, the effects of formoterol on protein degradation were indirectly confirmed by analysing the transcript levels of genes belonging to different proteolytic systems (Table 3). Indeed, formoterol reduced the expression of several components of the ubiquitin-dependent proteolytic system, including atrogin-1 and MuRF-1 and of other proteolytic systems, such as m-calpain and cathepsin B,

suggesting that the effects of β_2 -agonist is upstream all the proteolytic systems.

Summarizing, the improved status triggered by the multifactorial treatment seems to be related with an improving in muscle mass and force

where F decreases protein degradation and increases protein synthesis and sActRIIB acts mainly in favouring protein synthesis and reducing the number of metastasis, which is reflected by an increased survival.

Table 3. Effects of the combination of formoterol and sActRIIB treatment on tibialis gene expression in mice bearing the Lewis lung carcinoma.

	C (6)	T (7)	T + F (7)	T + A (6)	T + A + F (7)	ANOVA
Proteolytic system						p-value
Ubiquitin-dependent						
Atrogin-1	100 ± 23 ^a	264 ± 20 ^c	196 ± 21 ^{bc}	250 ± 34 ^{bc}	173 ± 33 ^{ab}	0,000
MuRF-1	100 ± 22 ^a	206 ± 14 ^b	167 ± 29 ^{ab}	206 ± 45 ^b	178 ± 34 ^{ab}	0,000
Ubiquitin	100 ± 6 ^a	158 ± 8 ^b	118 ± 10 ^a	153 ± 9 ^b	109 ± 15 ^a	0,000
E2	100 ± 5 ^{ab}	118 ± 6 ^c	103 ± 6 ^{ab}	108 ± 7 ^{bc}	89 ± 4 ^a	0,000
C8 proteasome subunit	100 ± 6 ^a	160 ± 8 ^c	135 ± 7 ^b	145 ± 8 ^{bc}	120 ± 10 ^{ab}	0,000
Calcium-dependent						
m-Calpain	100 ± 8 ^{ab}	147 ± 7 ^c	116 ± 6 ^b	107 ± 6 ^b	86 ± 8 ^a	0,000
Lysosomal						
Cathepsin B	100 ± 6 ^b	126 ± 8 ^b	35 ± 20 ^a	92 ± 8 ^b	7 ± 2 ^a	0,000

Results are mean ± S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. C: mice without tumour; T: tumour-bearing mice; T+F: treated with formoterol; T+A: treated with sActRIIB; T+A+F: treated with both sActRIIB and formoterol. Statistical significance of the results by full factorial one-way ANOVA following a *post hoc* Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

In conclusion, the combined treatment presented here acts at two different levels. The first one influenced muscle mass by both increasing protein synthesis and reducing protein degradation. This is associated with recovery of physical activity and muscle strength, resulting in an improvement of quality of life. Second, the treatment diminished the number of metastases, this clearly being associated with extended survival. The results obtained in this preclinical setting originate solid

fundamentals for the design of an effective therapy for cancer cachexia in humans. The combined approach will allow to face the anti-tumour treatments in improved health conditions, thus improving their overall effectiveness. On the other side, the anti-metastatic action reported here will strengthen the effect of anti-tumour drugs. The results presented here clearly show that a multimodal approach including both anti-myostatin and β_2 -adrenergic agonists seems to be the more

suitable option for the treatment of cancer cachexia, particularly considering the high variability of pathogenic events typical of such syndrome due to the heterogeneity of neoplasms that causes cachexia. Not to mention that the combination of the two drugs will potentially allow a reduction of their effective dose, blunting their possible side effects.

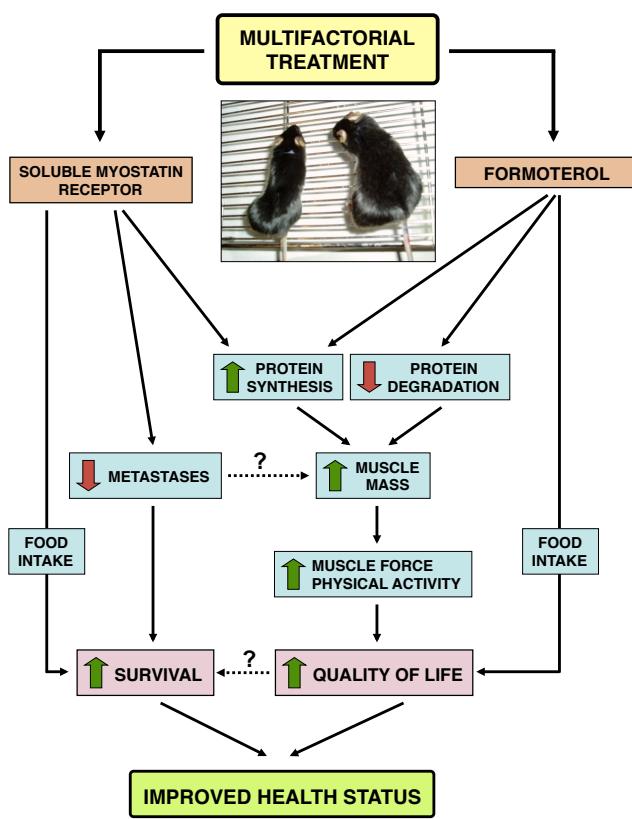


Figure 7. Proposed model of action of the multifactorial treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-26091-2011). FP was an AIRC/Marie Curie fellow when the study was performed. The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, Bellantone R, Rossi Fanelli F. Prevention and treatment of cancer cachexia: new insights into an old problem. *Eur J Cancer*. 2006;42:31–41.
2. Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. *CA Cancer J Clin*. 2007;57:225–41.
3. Fearon KCH. Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. *Eur J Cancer*. 2008;44:1124–32.
4. Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:90–9.
5. Argiles JM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev*. 1997/09/01 ed. Department de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Spain. argiles@porthos.bio.ub.es; 1997;17:477–98.
6. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:475–82.
7. Smith KL, Tisdale MJ. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. *Br J Cancer*. 1993;67:680–5.
8. Costelli P, Carbó N, Tessitore L, Bagby GJ, Lopez-Soriano FJ, Argilés JM, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J Clin Invest*. 1993;92:2783–9.
9. Gallagher IJ, Stephens NA, MacDonald AJ, Skipworth RJE, Husi H, Greig CA, et al. Suppression of skeletal muscle turnover in cancer cachexia: evidence from the transcriptome in sequential human muscle biopsies. *Clin Cancer Res*. 2012;18:2817–27.
10. Llovera M, García-Martínez C, Agell N, Marzábal M, López-Soriano FJ, Argilés JM. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett*. 1994;338:311–8.
11. 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.* 2007;6:472–83.
12. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117:399–412.
 13. Penna F, Baccino FM, Costelli P. Coming back: autophagy in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014;17:241–6.
 14. Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, Hasselgren PO. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB J.* 1999;13:1435–43.
 15. Smith IJ, Aversa Z, Hasselgren P-O, Pacelli F, Rosa F, Doglietto GB, et al. Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. *Muscle Nerve.* 2011;43:410–4.
 16. Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FM. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2134–46.
 17. Van Royen M, Carbó N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, López-Soriano FJ, et al. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270:533–7.
 18. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* 2009;89:381–410.
 19. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2009;3:263–8.
 20. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* 2004;14:395–403.
 21. Penna F, Costamagna D, Fanzani A, Bonelli G, Baccino FM, Costelli P. Muscle wasting and impaired myogenesis in tumor bearing mice are prevented by ERK inhibition. *PLoS One.* 2010;5:e13604.
 22. Lee SJ, McPherron AC. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9:604–7.
 23. Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R. Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci Rev.* 2001;29:155–8.
 24. Liu C-M, Yang Z, Liu C-W, Wang R, Tien P, Dale R, et al. Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene Ther.* 2008;15:155–60.
 25. Bonetto A, Penna F, Minero VG, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM, et al. Deacetylase inhibitors modulate the myostatin/follistatin axis without improving cachexia in tumor-bearing mice. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9:608–16.
 26. Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391:1548–54.
 27. Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell.* Departments of Metabolic Disorders and Protein Science, Amgen Research, Thousand Oaks, CA 91320, USA.; 2010;142:531–43.
 28. Busquets S, Toledo M, Orpí M, Massa D, Porta M, Capdevila E, et al. Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2012;3:37–43.
 29. Carbó N, López-Soriano J, Tarragó T, González O, Llovera M, López-Soriano FJ, et al. Comparative effects of beta2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumour growth. *Cancer Lett.* 1997;115:113–8.
 30. Moore RH, Khan A, Dickey BF. Long-acting inhaled beta2-agonists in asthma therapy. *Chest.* 1998;113:1095–108.
 31. Busquets S, Toledo M, Sirisi S, Orpí M, Serpe R, Coutinho J, et al. Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity. *Exp Ther Med.* 2011;2:731–5.

32. Greig CA, Johns N, Gray C, MacDonald A, Stephens NA, Skipworth RJE, et al. Phase I/II trial of formoterol fumarate combined with megestrol acetate in cachectic patients with advanced malignancy. *Support Care Cancer.* 2014;22:1269–75.
33. Donati MB, Mussoni L, Poggi A, De Gaetano G, Garattini S. Growth and metastasis of the Lewis lung carcinoma in mice defibrinated with batroxobin. *Eur J Cancer.* 1978;14:343–7.
34. Toledo M, Busquets S, Sirisi S, Serpe R, Orpí M, Coutinho J, et al. Cancer cachexia: physical activity and muscle force in tumour-bearing rats. *Oncol Rep.* 2011;25:189–93.
35. Emery PW, Lovell L, Rennie MJ. Protein synthesis measured in vivo in muscle and liver of cachectic tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 1984;44:2779–84.
36. Busquets S, Alvarez B, Llovera M, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM. Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. *J Cell Physiol.* 2000;184:380–4.
37. WAALKES TP, UDENFRIEND S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med.* 1957;50:733–6.
38. Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res.* 2004;64:6725–31.
39. Toledo M, Springer J, Busquets S, Tschirner A, López-Soriano FJ, Anker SD, et al. Formoterol in the treatment of experimental cancer cachexia: effects on heart function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014;5:315–20.
40. Tian M, Nishijima Y, Asp ML, Stout MB, Reiser PJ, Belury MA. Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol.* Department of Human Nutrition, College of Education and Human Ecology, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA.; 2010;37:347–53.
41. Busquets S, Toledo M, Sirisi S, Orpí M, Serpe R, Coutinho J, et al. Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity. *Exp Ther Med. Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.*; 2011;2:731–5.
42. Leto G, Incorvaia L, Badalamenti G, Tumminello FM, Gebbia N, Flandina C, et al. Activin A circulating levels in patients with bone metastasis from breast or prostate cancer. *Clin Metastasis.* 2006;23:117–22.
43. Antsiferova M, Huber M, Meyer M, Piwko-Czuchra A, Ramadan T, MacLeod AS, et al. Activin enhances skin tumourigenesis and malignant progression by inducing a pro-tumourigenic immune cell response. *Nat Commun.* Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011;2:576.
44. Panopoulou E, Murphy C, Rasmussen H, Bagli E, Rofstad EK, Fotsis T. Activin A suppresses neuroblastoma xenograft tumor growth via antimitotic and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* 2005;65:1877–86.
45. Pfitzenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace D, Corey E. Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer.* 2003;97:1211–6.
46. Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ, Fearon KC. Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *Br J Surg.* 2000;87:53–8.
47. Bonetto A, Aydogdu T, Kunzevitzky N, Guttridge DC, Khuri S, Koniaris LG, et al. STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. *PLoS One.* 2011;6:e22538.

SUPPLEMENTAL DATA**ANOVA Table 1**

	T	F	A	T*A	T*F	A*F	T*A*F
Food Intake	p=0.000	p=0.005	p=0.009	ns	ns	ns	p=0.03
IBW	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
FBW	p=0.005	p=0.017	p=0.000	ns	ns	ns	ns
Carcass	p=0.000	p=0.004	p=0.000	ns	ns	ns	ns
GSN	p=0.000	p=0.017	p=0.000	p=0.067	ns	ns	p=0.055
Tibialis	p=0.000	p=0.000	p=0.000	p=0.03	ns	ns	ns
Diaphragm	p=0.000	p=0.000	p=0.000	p=0.040	ns	ns	ns
Heart	p=0.002	p=0.007	ns	ns	p=0.020	ns	ns

ANOVA Figure 5

	T	F	A	T*A	T*F	A*F	T*A*F
Gastrocnemius	p=0.000	ns	p=0.005	ns	p=0.002	ns	ns
Tibialis	p=0.000	ns	p=0.000	p=0.003	ns	ns	p=0.059
Vastus	p=0.014	ns	p=0.024	ns	p=0.006	ns	ns

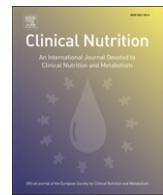
PUBLICACIÓ 6

L-Carnitine: an adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer

Sílvia Busquets, Roberto Serpe, Míriam Toledo, Angélica Betancourt, Enrica Marmonti, Marcel Orpí, Fabrizio Pin, Eva Capdevila, Clelia Madeddu, Francisco J. López-Soriano, Giovanni Mantovani, Antonio Macciò, Josep M. Argilés

Clinical Nutrition 31(6):889-95, 2012

L'administració de L-carnitina (1 g/kg de pes corporal) a rates portadores de l'hapatoma ascític Yoshida AH-130 va donar lloc a una millora significativa de la ingestió d'aliments i del pes dels músculs. Aquests efectes beneficiosos estan directament relacionats amb la millora de la condició física (activitat física total, la mitjana de velocitat de moviment i la distància total recorreguda). L'administració de L-carnitina va disminuir l'activitat del proteasoma i l'expressió de gens relacionats amb aquesta activitat, com són la ubiquitina, subunitat C8 del proteasoma i MuRF-1. Curiosament, el tractament de L-carnitina també va disminuir el contingut de mRNA de la caspasa-3, fet que suggereix una modulació de l'apoptosi. D'altra banda, l'addició de L-carnitina 50 mM a músculs incubats *ex vivo* va provocar una disminució significativa de la taxa proteolítica fet que suggereix un efecte directe de la L-carnitina sobre el múscul. Es pot concloure que la suplementació amb L-carnitina podria ser un bon mètode per a una teràpia multifactorial per al tractament de la caquèxia cancerosa.



Original article

L-Carnitine: An adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer

Sílvia Busquets ^{a,b,*}, Roberto Serpe ^{c,e}, Míriam Toledo ^{a,b}, Angélica Betancourt ^{a,b}, Enrica Marmonti ^a, Marcel Orpí ^a, Fabrizio Pin ^a, Eva Capdevila ^a, Clelia Madeddu ^c, Francisco J. López-Soriano ^{a,b}, Giovanni Mantovani ^c, Antonio Macciò ^d, Josep M. Argilés ^{a,b}

^a Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Department of Medical Oncology, University of Cagliari, Cagliari, Italy

^d Department of Obstetrics and Gynecology, Sirai Hospital, Carbonia, Italy

^e Nutrisearch, Edificio 5 A1 Parco scientifico e tecnologico Polaris, 09010 Pula, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2011

Accepted 20 March 2012

Keywords:

L-Carnitine
Cancer cachexia
Skeletal muscle
Physical activity
Muscle strength
Incubated muscles
Proteolysis
Proteasome
Apoptosis

SUMMARY

Background & aims: Tumour growth is associated with weight loss resulting from both adipose and muscle wasting.

Methods: Administration of L-carnitine (1 g/kg body weight) to rats bearing the AH-130 Yoshida ascites hepatoma, a highly cachectic rat tumour.

Results: The treatment results in a significant improvement of food intake and in muscle weight (gastrocnemius, EDL and soleus). These beneficial effects are directly related to improved physical performance (total physical activity, mean movement velocity and total travelled distance). Administration of L-carnitine decreases proteasome activity and the expression of genes related with this activity, such as ubiquitin, C8 proteasome subunit and MuRF-1. Interestingly, L-carnitine treatment also decreases caspase-3 mRNA content therefore suggesting a modulation of apoptosis. Moreover, addition of 50 μM of L-carnitine to isolated EDL muscles results in a significant decrease in the proteolytic rate suggesting a direct effect.

Conclusions: It can be concluded that L-carnitine supplementation may be a good approach for a multi-targeted therapy for the treatment of cancer-related cachexia.

© 2012 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

1. Introduction

Cachexia is a multiorganic syndrome associated with cancer, characterized by inflammation, body weight loss (at least 5%) and muscle and adipose tissue wasting.¹ The abnormalities associated with cachexia include alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism, being often associated with anorexia.^{1–3} Cachexia occurs in the majority of terminal ill patients, and it is responsible for the deaths of 22% of cancer patients.⁴ In addition, survival of patients affected by different types of neoplasias is clearly dependent on the presence of weight loss.⁵ Therefore, cachexia prevention represents an important factor in the treatment of cancer

patient, affecting not only survival but also the efficacy of anti-cancer treatment, quality of life and, ultimately, sanitary costs. It is thus clear that there is both a medical and a social need for the treatment of cancer cachexia. Although anorexia represents a very important factor in the development of cachexia, it has to be pointed out that, in many cases, the use of total parenteral nutrition does not stop the loss of body weight.⁶ It seems, therefore, quite evident that metabolic disturbances present in the host (increased energy inefficiency, insulin resistance and abnormal carbohydrate metabolism, adipose tissue dissolution and hypertriglyceridemia, and muscle wasting) have a definitive role in the development of cachexia.^{2,6} Different mediators are involved in the metabolic disturbances but proinflammatory cytokines seem to play a major role.^{7–9} Bearing in mind the fact that both anorexia and metabolic disturbances are involved in the cachectic syndrome, the development of different therapeutic strategies has been focused on these two factors. For these reasons, the ideal candidate for anti-cachectic drug would be a compound able both to increase food

* Corresponding author. Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034609; fax: +34 934021559.

E-mail address: silviabusquets@ub.edu (S. Busquets).

intake and to improve muscle weight loss (which is the main component of the cachectic syndrome).

L-Carnitine is synthesised from lysine and methionine that seems to have these properties. It is a natural compound free from toxicity up to 6 g/day in human subjects with cancer¹⁰ and up to 9 g/day i.v. in patients with acute cardiac infarction.^{11,12} Since it is readily excreted, supplement ingestion is well tolerated. The main role of L-carnitine is associated with the mitochondrial transport of fatty acids across the inner membrane.¹³ Indeed, L-carnitine facilitates the entry into the mitochondria of fatty acids in the form of acyl-carnitine derivatives thus resulting in increased β-oxidation. Therefore it plays an essential role in mitochondrial integrity and function.^{14–16} Skeletal muscle contains at least 95% of the total body L-carnitine¹⁷ and therefore, alterations in carnitine content in this tissue may result in a lack of functionality. From this point of view, it has already been reported that cancer patients have an abnormally high renal clearance of carnitine¹⁸ and a significantly decreased carnitine level in the skeletal muscle tissue.¹⁹ This could be associated with fatigue and possibly muscle wasting, as shown in several clinical trials involving advanced cancer patients. In some of these, the strategies to counteract loss of lean body mass, fatigue and worsened quality of life included carnitine supplementation. Gramignano et al. showed that L-carnitine administration was effective in improving fatigue and increasing lean body mass and appetite in 12 patients.¹⁰ A study by Cruciani et al. clearly showed that L-carnitine supplementation was able to increase L-carnitine serum levels, even though supplementation at maximal doses of 2 g/day for 10 days did not reverse cancer-related fatigue in carnitine-deficient patients.²⁰ In a randomized phase III clinical trial involving cachectic cancer patients, L-carnitine treatment (4 g/day for 4 weeks) was effective in improving the Glasgow Prognostic Score and ECOG Performance Status.²¹ On the other hand, L-carnitine supplements have been used to treat muscle wasting and fatigue due to HIV drugs.²² Dalakas et al. have shown that the use of zidovudine (AZT) for the treatment of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) results in a reduction of carnitine content in skeletal muscle.²² Therefore, L-carnitine supplementation results in an improvement in AZT-related myopathy.²² Several studies in experimental tumour-bearing animals also involve L-carnitine. Indeed, Silverio et al. have shown that, in tumour-bearing rats, L-carnitine treatment resulted in a normalization of the lipid metabolism in adipose tissue.²³ Our group described in muscle of tumour-bearing rats an increase in carnitine palmitoyltransferase-I (MCPTI), the main limiting enzyme in the transport of fatty acid across the mitochondrial membrane.²⁴

Taking all this into consideration, the objective of the present investigation was to see if L-carnitine administration was able to ameliorate muscle wasting in tumour-bearing rats and to ascertain the possible molecular mechanisms involved.

2. Methods and materials

2.1. Animals

Male Wistar rats (Interfauna, Barcelona, Spain) of 5 weeks of age were used. The animals were maintained at 22 ± 2 °C with a regular light–dark cycle (light on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free access to food (Harlan Teklad Global Diet 2014) and water. The food intake was measured daily. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

2.2. Tumour inoculation and treatment

Male rats were divided into two groups, namely tumour and tumour-treated hosts. Both groups received an intraperitoneal

inoculum of 10⁸ AH-130 Yoshida ascites hepatoma cells obtained from exponential tumours.²⁵ The treated animals received a daily intragastrically (i.g.) dose of L-carnitine (1 g/kg body weight, Sigma-Tau, Spain).²⁶ Untreated animals received the corresponding volume of solvent (corn oil). On day 7 after tumour transplantation, the animals were weighed and anaesthetized with an i.p. injection of ketamine/xylazine mixture (3:1) (Imalgene® and Rompun® respectively). The tumour was harvested from the peritoneal cavity and its volume and cellularity evaluated. Tissues were rapidly excised, weighed, and frozen in liquid nitrogen.

2.3. RNA isolation and real-time PCR

Total RNA from gastrocnemius muscle was extracted by Tri-PureTM kit (Roche, Barcelona, Spain), a commercial modification of the acid guanidinium isothiocyanate/phenol/chloroform method.²⁷ First-strand cDNA was synthesized from total RNA with oligo dT15 primers and random primers pdN6 by using a cDNA synthesis kit (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche, Barcelona, Spain). Analysis of mRNA levels for the genes from the different proteolytic systems was performed with primers designed to detect the following gene products: ubiquitin (FORWARD 5' GAT CCA GGA CAA GGA GGG C 3', REVERSE 5' CAT CTT CCA GCT GCT TGC CT3'); E2 (FORWARD: 5' AGG CGA AGA TGG CGG T 3'; REVERSE 5' TCA TGC CTG TCC ACC TTG TA 3'); C8 proteasome subunit (FORWARD 5' AGA CCC CAA CAT GAA ACT GC 3'; REVERSE 5' AGG TTT GTT GGC AGA TGC TC 3'); MuRF-1 (FORWARD 5' TGT CTG GAG GTC GTT TCC G 3'; REVERSE 5' ATG CCG GTC CAT GAT CAC TT 3'); Atrogin-1 (FORWARD 5' CCA TCA GGA GAA GTG GAT CTA TGT T 3'; REVERSE 5' GCT TCC CCC AAA GTG CAG TA 3'); m-calpain (FORWARD 5' TTG AGC TGC AGA CCA TC 3'; REVERSE 5' GCA GCT TGA AAC CTG CTT CT 3'), cathepsin B (FORWARD 5' CTG CTG AGG ACC TGC TTA C 3'; REVERSE 5' CAC AGG GAG GGA TGG TGT A 3'), caspase 3 (FORWARD 5' CCG TGG AGG CTG ACT TCC TGT A 3'; REVERSE 5' GGA TGA ACC ACG ACC CGT CCT T 3') and Hmbs (FORWARD 5' TGC CAG AGA AAA GTG CCG TGG G 3'; REVERSE 5' TGC AGC TCA TCC AGC TTC CGT 3'). To avoid the detection of possible contamination by genomic DNA, primers were designed in different exons. The real-time PCR was performed using a commercial kit (LightCycler TM 480 SYBR Green I Master, Roche, Barcelona, Spain). The relative amount of all mRNA was calculated using comparative CT method. Hmbs (Hydroxymethylbilane synthase) mRNA was used as the invariant control for all studies.

2.4. Determination of proteasome activity

The chymotrypsin-like activity of the muscle proteasome was determined by evaluating the cleavage of the specific fluorogenic substrate succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY). The gastrocnemius muscle was homogenized in 20 mmol/L TRIS-HCl pH 7.2 containing 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 2-mercaptoethanol, 5 mmol/L ATP, 20% glycerol, and 0.04% (v/v) Triton X-100. Muscle homogenates were then centrifuged at 13,000g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and protein concentration was determined using the BCA assay (Pierce Chemical Co.). Aliquots of 40 µg protein were then incubated for 60 min at 37 °C in the presence of LLVY (40 µM). The incubation buffer for the evaluation of proteasome activity was 50 mmol/L HEPES pH 8.0 containing 5 mmol/L EGTA. Fluorescence was read with a spectrofluorometer (380 nm excitation and 460 nm emission; RF-5001 PC spectrofluorophotometer, Shimadzu). The activity of proteasome was calculated taking into consideration the substrate degraded with and without the presence of 25 µmol/L lactacystin, a specific proteasome inhibitor, and by using free amido-coumarin as working standard.

2.5. Muscle preparations and incubations

The dissection, isolation and incubation of the *extensor digitorum longus* (EDL) muscles were carried out under ketamine/xylazine mixture anaesthesia as described previously.^{28,29} The muscles were preincubated for 60 min: 30 min in Krebs–Henseleit buffer and 30 min in supplemented medium containing 1, 5, 50 and 500 µM L-carnitine or none, and then incubated for 120 min in fresh supplemented medium. Such muscles are able to maintain normal ATP concentrations during a 3 h incubation period.²⁸ Total protein degradation by the isolated muscles was calculated as the rate of tyrosine released in the last 2 h of incubation into the medium in the presence of 0.5 mM cycloheximide in order to block the reincorporation of tyrosine into tissue protein. Tyrosine was measured fluorimetrically as described previously.³⁰

2.6. Total physical activity

Total physical activity (IR ACTIMETER System and ACTITRAK software from PANLAB, Barcelona) was determined during the last 21 h before the sacrifice of the animals in control and tumour-bearing animals, using activity sensors that translate individual changes in the infrared pattern, caused by movements of the animals, into arbitrary activity counts. For the measurements, animals remained in their home cage. A frame containing an infrared beam system was placed on the outside of the cage; this minimised stress to the animals.

2.7. Grip force assessment

Skeletal muscular strength in rats was quantified by the grip-strength test.^{31,32} The grip-strength device (Panlab-Harvard Apparatus, Spain) comprised a triangular pull bar connected to an isometric force transducer (dynamometer). Basically, the grip strength meter was positioned horizontally and the rats were held by the tail and lowered towards the device. The animals were allowed to grasp the triangular pull bar and were then pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the bar just before it lost grip was recorded as the peak tension. At least three measurements were taken per rat on both baseline and test days, and the results were averaged for analysis. This force was measured in g/g initial body weight.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed by means of the Student's *t* test.

3. Results

As can be seen in Table 1, L-carnitine administration resulted in over a 15% increase in food intake. L-carnitine treatment did not result in any effects on tumour cell content (Table 1). In addition to the increase in food intake, the effects of L-carnitine on individual skeletal muscle weights were clearly beneficial: GSN, EDL and soleus were increased significantly as a result of L-carnitine treatment (7%, 7% and 8% respectively). No changes were observed in the weight of the rest of the studied tissues (Table 1). As can be seen in Table 2, L-carnitine treatment resulted in a significant increase in physical activity (measurement of stereotyped and locomotor movements). Both the mean velocity and the total travelled distance were also increased. At the same time, the percentage of resting time was decreased significantly, whereas the percentage of slow-movement time and fast-movement time increased. Interestingly, L-carnitine treatment resulted in a marked tendency to

Table 1

Effects of L-carnitine treatment on muscle, organ weights, tumour content and food intake.

	T	T + C
Initial body weight (g)	126 ± 1.4 (23)	127 ± 2.2 (17)
Final body weight (g)	126 ± 2.4 (22)	129 ± 2.6 (17)
Carcass weight	72 ± 1 (21)	72 ± 1 (17)
Total food intake	70 ± 2.4 (18)	80.7 ± 2.9 (12)**
Gastrocnemius	515 ± 7 (20)	550 ± 8 (14)**
Tibialis	175 ± 3 (22)	181 ± 3 (17)
EDL	41 ± 1 (23)	44 ± 1 (15)**
Soleus	35 ± 1 (21)	38 ± 1 (16)*
WATd	400 ± 26 (20)	465 ± 40 (16)
WATp	494 ± 26 (21)	472 ± 43 (16)
BAT	109 ± 26 (21)	106 ± 6 (16)
Liver	4830 ± 103 (21)	4975 ± 138 (17)
Heart	320.7 ± 5.7 (24)	330 ± 8.4 (17)
Diaphragm	314.9 ± 9.9 (12)	284 ± 15 (8)
Tumour volume (ml)	37 ± 1.2 (21)	38 ± 1.5 (17)
Tumour total cell number ($\times 10^6$)	3882 ± 115 (20)	3979 ± 122 (15)

Results are mean ± S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. Final body weight excludes the tumour weight. Food intake is expressed in g/100 g IBW and refers to the ingestion during the period of the experiment prior to sacrifice which took place 7 days after tumour inoculation. Carcass weight (body without organs or tumour) is expressed as g/100 g of initial body weight (IBW). Tissue weights are expressed as mg/100 g of initial body weight. EDL: extensor digitorum longus. WATd: dorsal white adipose tissue, WATp: perigenital white adipose tissue; BAT: brown adipose tissue. T: tumour-bearing rats; T + C: carnitine treated tumour-bearing animals. Values that are significantly different by the Student's *t*-test from the non-treated animals groups are indicated by **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (vs T group).

increase grip force (Table 2), although the results did not reach statistical significance (*p* = 0.223).

In order to assess the mechanisms influencing the beneficial effect of L-carnitine on muscle wasting, we decided to study the main proteolytic systems in skeletal muscle. As can be seen in Table 3, L-carnitine treatment indeed resulted in a significant decrease in proteasome activity. This observation was associated with significant decreases in muscle mRNA content for ubiquitin (28%), C8 proteasome subunit (28%) and MuRF-1 (46%). No effects of L-carnitine were observed on other proteolytic systems such as calcium-dependent or lysosomal (Table 3). As can be seen in

Table 2

Effects of L-carnitine on physical activity and grip force in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma.

	T	T + C
<i>Physical activity 21 h</i>		
Total physical activity	22,468 ± 627 (7)	27,933 ± 1119 (6)***
Stereotyped movements	2344 ± 125 (7)	2978 ± 150 (6)***
Locomotor movements	20,124 ± 537 (7)	24,956 ± 978 (6)***
Mean velocity	0.16 ± 0.01 (7)	0.21 ± 0.01 (6)**
Total travelled distance	12,424 ± 431 (7)	15,776 ± 717 (6)**
<i>Time</i>		
Resting time (%)	90.6 ± 0.3 (7)	88.3 ± 0.5 (6)***
Slow-movements time (%)	8.4 ± 0.3 (7)	10.3 ± 0.4 (6)**
Fast-movements time (%)	1.0 ± 0.1 (7)	1.4 ± 0.1 (6)**
<i>Grip Force</i>		
Day 0	4.12 ± 0.09 (6)	4.22 ± 0.11 (8)
Day 7 (after tumour inoculation)	4.08 ± 0.26 (6)	4.50 ± 0.19 (8)

Results are mean ± S.E.M. for the number of animals in parenthesis. Physical activity is expressed in activity units. Stereotyped movements include movements without displacement (eating and cleaning movements); conversely, locomotor movements include movements with displacement. Mean velocity is expressed in cm/s. Travelled distance is expressed in cm. Time is expressed as percentage of total time (24 h). The thresholds of time are the following: time involving resting (sleeping, cleaning and eating time): [0–2] cm/s, time involving slow movements^{2–5}: cm/s and time involving fast movements: [>5] cm/s. Grip force is expressed as g/g initial body weight. T: tumour-bearing rats; T + C: carnitine treated tumour-bearing animals. Values that are significantly different by the Student's *t*-test from the non-treated animals groups are indicated by ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 (vs T group).

Table 3

Effects of L-carnitine on gastrocnemius muscle mRNA content of the different proteolytic systems and on proteasome activity in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma.

	T	T + C
Proteasome activity	100 ± 7 (7)	58 ± 14 (6)*
Gene expression of the main components of the proteolytic systems		
Ubiquitin-dependent		
Ubiquitin	100 ± 7 (7)	72 ± 7 (6)*
C8 proteasome subunit	100 ± 11 (8)	72 ± 3 (6)*
MuRF-1	100 ± 17 (6)	54 ± 12 (6)*
Atrogin-1	100 ± 24 (6)	59 ± 14 (5)
E2	100 ± 18 (8)	108 ± 11 (6)
Calcium-dependent		
Calpain m	100 ± 9 (7)	84 ± 4 (7)
Lysosomal		
Cathepsin B	100 ± 15 (5)	136 ± 22 (6)
Apoptotic marker		
Caspase 3	100 ± 12 (5)	66 ± 12 (5) \$

For more details see the Methods and Materials section. Results are mean ± S.E.M. for the number indicated in parentheses. The results of gene expression and the activity of proteasome are expressed as a percentage of controls. T: tumour-bearing rats; T + C: carnitine treated animals. Values that are significantly different by the Student's t-test from the tumour-bearing group are indicated by \$ $p < 0.1$, * $p < 0.05$.

Table 3, L-carnitine treatment decreased caspase 3 mRNA expression.

We also examined the effects of L-carnitine directly on skeletal muscle tissue and with this aim we incubated isolated EDL muscles from healthy rats in the presence of different concentrations of L-carnitine. We measured tyrosine release as an estimation of the proteolytic rate. As can be seen in Table 4, L-carnitine was able to decrease proteolysis, particularly at the concentration of 50 μ M.

4. Discussion

The results presented here clearly show that L-carnitine administration increases food intake. Although previous studies, performed in non-cachectic animals, did not report any effects on food intake,^{33–38} a very recent investigation reported an increase in food consumption in L-propionylcarnitine-treated MCA-sarcoma-bearing rats.³⁹ It may be suggested that the increase in food intake reported in the present investigation can be accounted for as a result of both the effects of L-carnitine on blood lipid levels⁴⁰ and the increase of fatty acid oxidation.⁴¹ It is known that FFA promote anorexia,^{35,42,43} through changes in the cytoplasmic pool of long-chain fatty-acyl-CoA and malonyl-CoA, an intermediate of the de-novo fatty acid synthesis in hypothalamic neurons that integrate hormonal and nutrient-derived signals to control feeding

behaviour.⁴³ In fact, elevated hypothalamic malonyl-CoA content results in a decrease of appetite in cachexia.⁴⁴ Therefore the effects of L-carnitine on food intake could be partially the result of the decrease in circulating FFA. Additionally, L-carnitine has been shown to decrease cytokine production^{39,40,45} (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) which are known to induce anorexia.⁴⁶

From the results presented here, it is clear that L-carnitine treatment is beneficial for tumour-bearing animals from the point of view of muscle mass (Table 1). However, muscle mass and function are not often encompassed. Bearing this in mind, we decided to see if the increase of muscle mass was accompanied with an increase in muscle performance. As can be seen, L-carnitine treatment resulted in a significant increase in physical activity (total stereotyped and locomotor movements), mean velocity, and total travelled distance. At the same time, the percentage of resting time was significantly decreased, whereas the percentage of slow-movements time and fast-movements time were increased. These data demonstrate that L-carnitine treatment, in addition of increasing muscle mass, also results in an improvement in physical performance. Interestingly, L-carnitine treatment resulted in a marked tendency to increase grip force. In order to assess the mechanisms influencing the beneficial effect of L-carnitine on muscle wasting, we decided to measure the activity of the main proteolytic systems in skeletal muscle. It has to be pointed out here that the muscle loss associated with cancer is linked with an important activation of proteolysis, both in experimental animals^{29,47} and humans.^{48,49} Among the proteolytic systems involved in protein degradation in muscle during catabolic conditions, the ubiquitin-proteasome system is considered the main one. As our group has shown previously,^{9,50,51} the accelerated muscle protein breakdown in both the AH-130 hepatoma and Lewis lung carcinoma hosts is basically achieved through the activation of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system. Indeed, L-carnitine treatment resulted in a significant decrease in proteasome activity, and this observation was associated with significant decreases in muscle mRNA content for ubiquitin, C8 proteasome subunit and MuRF-1. It can be suggested that L-carnitine is able to modulate proteolytic activity in skeletal muscle. In fact, recent investigations also demonstrate that L-carnitine is able to inhibit the ubiquitin proteasome system in piglets.^{52,53}

In addition to increased proteolysis, muscle wasting was accompanied by an increase of apoptosis, as we have reported previously.⁵⁴ In fact, apoptosis could precede proteolysis.⁵⁵ From this point of view, we also examined the expression of caspase 3, a protein that interacts with caspase 8 and caspase 9; the sequential activation of caspases plays a central role in cell apoptosis.⁵⁶ As can be seen in Table 3, L-carnitine treatment decreased caspase 3 mRNA expression. This result is in agreement with those of Vescovo et al. showing that L-carnitine treatment blocks apoptosis in skeletal muscle myopathy associated with heart failure.⁵⁷

Bearing all this in mind, we can suggest that, in addition on the beneficial effects on food intake, L-carnitine is also an anti-proteolytic and anti-apoptotic compound with beneficial effects on muscle integrity. However, the effects of L-carnitine could simply be indirect through the commented decrease on cytokine production.⁴⁰ Indeed, it is well known that cytokines are able to activate both the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system and the apoptotic cascade.^{8,47,55} It is for this reason that we decided to examine the effects of L-carnitine directly on skeletal muscle tissue. With this aim, we incubated isolated EDL muscles from healthy rats in the presence of different concentrations of L-carnitine and, as can be seen in Table 4, L-carnitine was able to decrease proteolysis. It can be concluded that, in addition to the possible effects both of cytokines and on proteolysis, L-carnitine is able to directly modulate skeletal muscle proteolysis.

Table 4

Skeletal muscle proteolytic rate in isolated EDL muscles *in vitro*.

Tyr released into the medium	
Control	178 ± 7
L-Carnitine 1 μ M	182 ± 14
L-Carnitine 5 μ M	162 ± 6
L-Carnitine 50 μ M	154 ± 5*
L-Carnitine 500 μ M	150 ± 6**

Results are mean ± S.E.M. for 5 samples. Proteolytic rates were measured in the presence of cycloheximide (0.5 mM) and are expressed as nanomols per gram of muscle and 120 min. Values that are significantly different by the Student's t-test from the non-treated EDL group are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

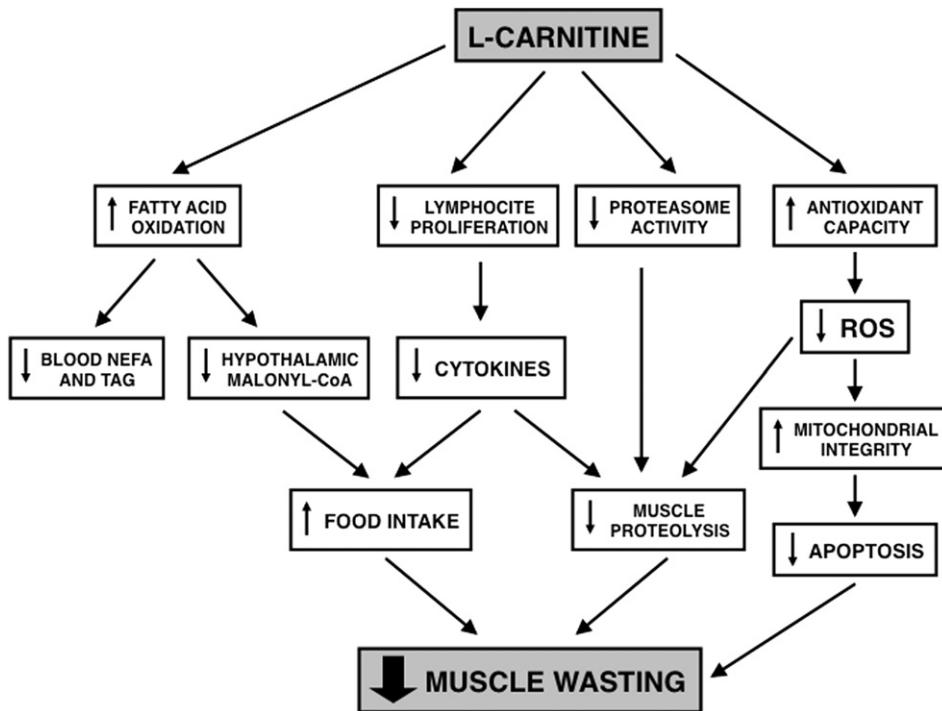


Fig. 1. Targets of L-carnitine in skeletal muscle.

From all the results obtained, we could hypothesize that: 1) as it is well known, L-carnitine stimulates fatty acid oxidation,⁴¹ resulting in decreased circulating levels of both fatty acids and triglycerides.^{40,58} It has to be remarked that in cancer-bearing states hypertriglyceridemia and high levels of circulating fatty acids are observed.^{59,60} These high levels of fatty acids are related to cancer anorexia,⁵⁹ therefore L-carnitine administration in cancer can serve to increase food intake (Fig. 1); 2) the effects of L-carnitine on food intake may also be mediated through a decrease in anorexia-inducing cytokines (Fig. 1). Indeed, several studies suggest that L-carnitine impairs macrophage activity and proliferation⁴⁵; 3) L-carnitine is able to modulate proteolytic activity directly, thus resulting in less muscle protein breakdown and therefore contributing to ameliorate muscle wasting (Fig. 1); 4) Finally, as it has widely been described, L-carnitine has antioxidant capacity^{61,62} and therefore decreases lipid peroxidation and reactive oxygen species (ROS) formation, this resulting in a decreased rate of apoptosis.⁶³ In addition, L-carnitine has been reported to increase mitochondria biogenesis and integrity,⁶² a phenomenon that could be related with apoptosis (Fig. 1).

L-Carnitine supplementation has been recently included in clinical trials with encouraging results. The large phase III study published by Mantovani et al. clearly highlights that the combination arm with carnitine was the most effective in counteracting the clinical symptoms of cachexia.^{64,65} In a similar manner, Gramignano et al., using a total dose of 6g/day reported a significant improvement of fatigue and quality of life as well as a significant increase of nutritional variables such as lean body mass and appetite.¹⁰ However, other clinical trials, testing L-carnitine supplementation, did no report any significant improvement of cachexia symptoms, probably due, in part, to the low dose used.²⁰

In conclusion, the reported results clearly demonstrate that L-carnitine supplementation increases food intake and can prevent muscle wasting in animals with cancer cachexia. Further clinical trials are needed to clarify its efficacy in the cancer patient;

however, the results presented here suggest that L-carnitine may be an essential component for a multi-targeted approach of nutritional intervention in cancer cachexia.

Statement of authorship

Each author has participated sufficiently, intellectually or practically, in the work to take public responsibility for the content of the article, including the conception, design, and conduction of the experiment and for data interpretation (authorship). SB and RS carried out the studies, sample analysis, and data analyses, performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. MT, AB, EM, MO, FP and EC helped to carry out the studies. CM, FJLS, GM, AM participated in the design and coordination of the study and helped to draft the manuscript. SB, RS and JMA conceived the study, participated in the design, coordination of the study, drafted the manuscript and revised critically it. All authors have read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest

All authors of this research have not conflict of interest related with employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-02284-2008). Dr. Roberto Serpe was supported by grants CRP1_296 from the Regione Autonoma della Sardegna by PO Sardegna FSE 2007-2013 (L.R.7/2007) titled "Promotion of scientific and technological research in Sardinia", Italy.

References

- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008;27(6):793–9.
- Argiles JM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev* 1997;17(5):477–98.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med Hypotheses* 1990;32(2):151–5.
- Warren S. The immediate cause of death in cancer. *Am J Med Sci* 1932;184:610–3.
- Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *East Coop Oncol Group Am J Med* 1980;69(4):491–7.
- Ng EH, Lowry SF. Nutritional support and cancer cachexia. Evolving concepts of mechanisms and adjunctive therapies. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991;5(1):161–84.
- Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Metabolic interrelationships between liver and skeletal muscle in pathological states. *Life Sci* 2001;69(12):1345–61.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Garcia I, et al. Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett* 1998;130(1–2):19–27.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Carbo N, Agell N, Lopez-Soriano FJ, et al. Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 1998;142(1–2):183–9.
- Gramignano G, Lusso MR, Madeddu C, Massa E, Serpe R, Deiana L, et al. Efficacy of L-carnitine administration on fatigue, nutritional status, oxidative stress, and related quality of life in 12 advanced cancer patients undergoing anticancer therapy. *Nutrition* 2006;22(2):136–45.
- Iliceto S, Scrutinio D, Bruzzi P, D'Ambrosio G, Boni L, Di Biase M, et al. Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico (CEDIM) Trial. *J Am Coll Cardiol* 1995;26(2):380–7.
- Rebouche CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1033:30–41.
- Bremer J. Carnitine—metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983;63(4):1420–80.
- Nikula P, Ruohola H, Alhonen-Hongisto L, Janne J. Carnitine prevents the early mitochondrial damage induced by methylglyoxal bis(guanylhydrazone) in L1210 leukaemia cells. *Biochem J* 1985;228(2):513–6.
- McFalls EO, Paulson DJ, Gilbert EF, Shug AL. Carnitine protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1986;38(6):497–505.
- Hagen TM, Ingwersen RT, Wehr CM, Lykkesfeldt J, Vinarsky V, Bartholomew JC, et al. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9562–6.
- Minkler PE, Brass EP, Hiatt WR, Ingalls ST, Hoppel CL. Quantification of carnitine, acetylcarnitine, and total carnitine in tissues by high-performance liquid chromatography: the effect of exercise on carnitine homeostasis in man. *Anal Biochem* 1995;231(2):315–22.
- Dodson WL, Sachan DS, Krauss S, Hanna W. Alterations of serum and urinary carnitine profiles in cancer patients: hypothesis of possible significance. *J Am Coll Nutr* 1989;8(2):133–42.
- Rossle C, Pichard C, Roulet M, Bergstrom J, Furst P. Muscle carnitine pools in cancer patients. *Clin Nutr* 1989;8(6):341–6.
- Cruciani RA, Dvorkin E, Homel P, Culliney B, Malamud S, Shaiová L, et al. L-carnitine supplementation for the treatment of fatigue and depressed mood in cancer patients with carnitine deficiency: a preliminary analysis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1033:168–76.
- Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Gramignano G, Serpe R, Massa E, et al. Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment for patients with cancer cachexia: interim results. *Nutrition* 2008;24:305–13.
- Dalakas MC, Leon-Monzon ME, Bernardini I, Gahl WA, Jay CA. Zidovudine-induced mitochondrial myopathy is associated with muscle carnitine deficiency and lipid storage. *Ann Neurol* 1994;35(4):482–7.
- Silvério R, Laviano A, Fanelli FR, Seelaender M. L-Carnitine induces recovery of liver lipid metabolism in cancer cachexia. *Amino Acids* 2011.
- Fuster G, Busquets S, Ametller E, Olivan M, Almendro V, de Oliveira CC, et al. Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer Res* 2007;67(13):6512–9.
- Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, Baccino FM. Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys* 1993;306(1):52–8.
- Sharifi AM, Zare B, Keshavarz M, Ghaderpanahi M. Effect of short term treatment of L-carnitine on tissue ACE activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pathophysiology* 2009;16(1):53–6.
- Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Branched-chain amino acids: a role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *J Cell Physiol* 2002;191(3):283–9.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230(2):238–41.
- Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med* 1957;50(5):733–6.
- Sinis N, Guntinas-Lichius O, Irinchev A, Skouras E, Kuerten S, Pavlov SP, et al. Manual stimulation of forearm muscles does not improve recovery of motor function after injury to a mixed peripheral nerve. *Exp Brain Res* 2008;185(3):469–83.
- Zangarelli A, Chanseaume E, Morio B, Brugere C, Mosoni L, Rousset P, et al. Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB J* 2006;20(14):2439–50.
- Amin KA, Nagy MA. Effect of carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetol Metab Syndr* 2009;1(1):17.
- Liu Y, Van Der Leij FR. Long-term effects of neonatal treatment with dexamethasone, L-carnitine, and combinations thereof in rats. *Pediatr Res* 2011;69(2):148–53.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Jaswal JS. Targeting intermediary metabolism in the hypothalamus as a mechanism to regulate appetite. *Pharmacol Rev* 2010;62(2):237–64.
- Panjwani U, Thakur L, Anand JP, Singh SN, Amitabh, Singh SB. Effect of L-carnitine supplementation on endurance exercise in normobaric/normoxic and hypobaric/hypoxic conditions. *Wilderness Environ Med* 2007;18(3):169–76.
- Mingorance C, Gonzalez del Pozo M, Dolores Herrera M, Alvarez de Sotomayor M. Oral supplementation of propionyl-L-carnitine reduces body weight and hyperinsulinaemia in obese Zucker rats. *Br J Nutr* 2009;102(8):1145–53.
- Bernard A, Rigault C, Mazue F, Le Borgne F, Demarquoy J. L-Carnitine supplementation and physical exercise restore age-associated decline in some mitochondrial functions in the rat. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008;63(10):1027–33.
- Laviano A, Molfini A, Seelaender M, Frascaria T, Bertini G, Ramaccini C, et al. Carnitine administration reduces cytokine levels, improves food intake, and ameliorates body composition in tumor-bearing rats. *Cancer Invest* 2011;29(10):696–700.
- Winter BK, Fiskum G, Gallo LL. Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. *Br J Cancer* 1995;72(5):1173–9.
- Laviano A, Meguid MM, Renvyle T, Yang ZJ, Beverly JL. Carnitine supplementation accelerates normalization of food intake depressed during TPN. *Physiol Behav* 1996;60(1):317–20.
- Leonhardt M, Langhans W. Fatty acid oxidation and control of food intake. *Physiol Behav* 2004;83(4):645–51.
- Fantino M. Role of lipids in the control of food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14(2):138–44.
- Morley JE, Farr SA. Cachexia and neuropeptide Y. *Nutrition* 2008;24(9):815–9.
- Athanassakis I, Mouratidou M, Sakka P, Evangelou A, Spilioti M, Vassiliadis S. L-Carnitine modifies the humoral immune response in mice after *in vitro* or *in vivo* treatment. *Int Immunopharmacol* 2001;1(9–10):1813–22.
- Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(10):2036–46.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* 2004;64(18):6725–31.
- Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Bellantone R, Pacelli F, Busquets S, et al. Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280(5):R1518–23.
- DeJong CH, Busquets S, Moses AG, Schrauwen P, Ross JA, Argiles JM, et al. Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. *Oncol Rep* 2005;14(1):257–63.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Marzabal M, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett* 1994;338(3):311–8.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer* 1995;61(1):138–41.
- Keller J, Ringseis R, Priebe S, Guthke R, Kluge H, Eder K. Dietary L-carnitine alters gene expression in skeletal muscle of piglets. *Mol Nutr Food Res* 2011;55(3):419–29.
- Keller J, Ringseis R, Koc A, Lukas I, Kluge H, Eder K. Supplementation with L-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal* 2012;6:9.
- van Royen M, Carbo N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ, et al. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: a link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(2):533–7.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Busquets S. Apoptosis signalling is essential and precedes protein degradation in wasting skeletal muscle during catabolic conditions. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(9):1674–8.
- Adams V, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G. Apoptosis in skeletal muscle. *Front Biosci* 2001;6:D1–11.
- Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della Barbera M, et al. L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(3):C802–10.
- Imura O, Shoji T, Yoshida S, Sato R, Nohara K, Kudoh Y, et al. Studies on experimental coronary insufficiency. Effect of L-carnitine on myocardial ischemia produced by sympathetic-nerve stimulation with high plasma fatty acids. *Adv Myocardiol* 1985;6:437–49.
- Busquets S, Carbo N, Almendro V, Figueras M, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia? *FEBS Lett* 2001;505(2):255–8.

60. Grunfeld C, Feingold KR. The role of the cytokines, interferon alpha and tumor necrosis factor in the hypertriglyceridemia and wasting of AIDS. *J Nutr* 1992;122(3 Suppl.):749–53.
61. Laviano A, Meguid MM, Guijarro A, Muscaritoli M, Cascino A, Preziosa I, et al. Antimyopathic effects of carnitine and nicotine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(4):442–8.
62. Zhang H, Jia H, Liu J, Ao N, Yan B, Shen W, et al. Combined R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine exerts efficient preventative effects in a cellular model of Parkinson's disease. *J Cell Mol Med* 2010;14(1–2):215–25.
63. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996;21(3):83–6.
64. Madeddu C, Dessi M, Panzone F, Serpe R, Antoni G, Cau MC, et al. Randomized phase III clinical trial of a combined treatment with carnitine + celecoxib +/- megestrol acetate for patients with cancer-related anorexia/cachexia syndrome. *Clin Nutr*.
65. Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Serpe R, Massa E, Dessi M, et al. Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment in 332 patients with cancer cachexia. *Oncologist* 2010;15(2):200–11.

PUBLICACIÓ 7

Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia

Sílvia Busquets, Roberto Serpe, Sónia Sirisi, Míriam Toledo, Joana Coutinho, Raquel Martínez, Marcel Orpí, Francisco J. López-Soriano and Josep M. Argilés

Clinical Nutrition 29(6):733-7, 2010

L'objectiu d'aquesta investigació va ser avaluar l'efecte de l'acetat de megestrol (AM, 100 mg/kg) en rates caquèctiques portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 analitzant els canvis en la proteòlisi muscular i en els paràmetres relacionats amb la qualitat de vida. L'administració d'AM a rates portadores de tumor va donar lloc a una important reversió del procés de pèrdua de massa muscular, com es reflecteix pels pesos musculars individuals. L'AM també va disminuir la taxa de degradació de proteïnes en els músculs esquelètics incubats *ex vivo*. L'anàlisi de la PCR a temps real va demostrar que el tractament amb AM va resultar en una disminució del contingut de mRNA de la ubiquitina, E2 i atrogina-1 en els músculs, fet que suggereix que la principal acció antiproteolítica de la droga pot estar basada en una inhibició de sistema proteolític dependent d'ATP-ubiquitina. El fàrmac també millora la gana, la pèrdua de pes, l'activitat física total i la força d'agafada. Els resultats suggereixen que l'AM és un bon candidat per al tractament de l'atròfia muscular.



Original Article

Megestrol acetate: Its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia

Sílvia Busquets ^{a,b}, Roberto Serpe ^c, Sónia Sirisi ^a, Míriam Toledo ^a, Joana Coutinho ^a, Raquel Martínez ^a, Marcel Orpí ^a, Francisco J. López-Soriano ^{a,b,*}, Josep M. Argilés ^{a,b}

^a Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^b Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Department of Medical Oncology, University of Cagliari, Cagliari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2010

Accepted 5 June 2010

Keywords:

Megestrol acetate

Cancer cachexia

Skeletal muscle

Physical activity

Muscle force

SUMMARY

Background & aims: Cachexia is a multiorganic syndrome associated with cancer, characterized by body weight loss, muscle and adipose tissue wasting and inflammation, being often associated with anorexia. The aim of the present investigation was to examine the effect of megestrol acetate (MA) in cachectic tumour-bearing animals analyzing changes in muscle proteolysis and in parameters related with quality of life.

Methods: The effects of MA (100 mg/kg) were tested in cachectic tumour-bearing rats (Yoshida AH-130 ascites hepatoma).

Results: Administration of MA to tumour-bearing rats resulted in an important reversal of the muscle wasting process, as reflected by individual muscle weights. MA also decreased the rate of protein degradation in incubated isolated skeletal muscles. Real-time PCR analysis revealed that MA treatment resulted in a decrease in ubiquitin, E2 and atrogin-1 mRNA content in muscles, therefore suggesting that the main anti-proteolytic action of the drug may be based on an inhibition of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system. The drug also improves appetite, weight loss, total physical activity and grip force.

Conclusions: The results indicate that treatment with megestrol acetate increases appetite, weight loss, physical performance and muscle force in tumour-bearing rats suggesting that MA is a good candidate for muscle wasting treatment.

© 2010 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

1. Introduction

Cachexia is a multiorganic syndrome associated with cancer, characterized by body weight loss (at least 5%), muscle and adipose tissue wasting and inflammation, being often associated with anorexia.¹ The abnormalities associated with cachexia include alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism.^{1–3}

Although anorexia represents a very important factor in the development of cachexia, it has to be pointed out that in many cases the use of total parenteral nutrition does not stop the loss of body weight.⁴ It seems, therefore, quite evident that metabolic disturbances present in the host (increased energy inefficiency, insulin resistance and abnormal carbohydrate metabolism, adipose tissue

dissolution and hypertriglyceridemia, and muscle wasting) have a definitive role in the development of cachexia.² Different mediators are involved in the metabolic disturbances, cytokines playing a major role.^{5–7}

Bearing in mind the fact that both anorexia and metabolic disturbances are involved in the cachectic syndrome, the development of different therapeutic strategies has been focused on these two factors. Cachexia occurs in the majority of cancer patients before death, and it is responsible for the deaths of 22% of cancer patients.⁸ In addition, survival of patients affected by different types of neoplasias is clearly dependent on the presence of weight loss.⁹ Therefore, cachexia represents an important factor in the treatment of cancer patients, affecting not only survival, but also the efficacy of anti-cancer treatment, quality of life and, ultimately, sanitary costs. It is thus clear that there is both a medical and a social need for the treatment of cancer cachexia. The ideal candidate for anticachectic drug would be a compound able to increase food intake and also improve muscle weight, which is the main component of the cachectic syndrome.

* Corresponding author. Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034605; fax: +34 934021559.

E-mail address: flopez@ub.edu (F.J. López-Soriano).

Different treatments with progestagen-based drugs have been used because of their capacity to increase food intake therefore preventing anorexia. Megestrol acetate (MA) and medroxyprogesterone (MPA) are synthetic, orally active derivatives of the naturally occurring hormone progesterone. In humans these compounds have been found to improve appetite, caloric intake and nutritional status in several clinical trials.^{10–12} In the case of MA, the reason for the associated weight gain is mostly unknown, although it has been postulated that the effect is partially mediated by neuropeptide Y, a potent central appetite stimulant.¹³ On the other hand, MPA has been shown to reduce the *in vitro* production of serotonin and cytokines (interleukin-1-β (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor-α (TNF)) by peripheral blood mononuclear cells of cancer patients.¹⁴ All of these humoral factors have been implicated in the cachectic-anorexic response. The human trials involving progesterone derivatives have on the whole demonstrated, with few exceptions, a favourable effect on appetite and weight gain, which is no doubt of positive value for the body image; however, this has been mainly attributed to an increased fat mass, not to muscle mass.^{15,16} Weight gain is also due to edema and, therefore, no significant effects are reported using the Karnofsky index – a performance score method used to describe how well a patient can go about their daily activities.¹⁷ If anorexia, nausea and a negative body image are major concerns, and if the patient has a life expectancy of more than three months, progesterone derivatives are a reasonable treatment option. On the other hand, if the central problem is fatigue and a low Karnofsky index, these drugs are not likely to be of significant help. In addition, in experimental animals, megestrol acetate (MA) treatment results simply in a gain of body water rather than a real increase in lean body mass; this weight gain is also associated with the doubling of the tumour mass.¹⁸ Oral suspension of the progestational agent may be particularly useful in patients with far advanced disease, where taking larger amount of pills may lead to the decrease of patient compliance. Tomíška et al. have showed that an oral MA suspension given to patients with far advanced cancer suffering from anorexia and weight loss resulted in an improvement of appetite and quality of life.¹⁹

The aim of the present investigation was to examine the effect of megestrol acetate in cachectic tumour-bearing animals, both at the biochemical and physiological level by analyzing not only changes in muscle proteolysis but also in parameters related with quality of life.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (Interfauna, Barcelona, Spain), of 3 and 5 weeks of age were used in the different experiments. The animals were maintained at 22 ± 2 °C with a regular light–dark cycle (light on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free access to food and water. The food intake was measured daily. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

2.2. Tumour inoculation and treatment

Male rats were divided into two groups, namely controls and tumour hosts. The latter received an intraperitoneal inoculum of 10⁸ AH-130 Yoshida ascites hepatoma cells obtained from exponential tumours.²⁰ Both groups were further divided into treated and untreated, the former being administered a daily intragastrically (i.g.) dose of megestrol acetate (100 mg/kg body weight, dissolved in corn oil) and the latter a corresponding volume of solvent. On day 7 after tumour transplantation, the animals were weighted

and anaesthetized with an i.p. injection of ketamine/xylazine mixture (3:1) (Imalgene® and Rompun® respectively). The tumour was harvested from the peritoneal cavity and its volume and cellularity evaluated. Tissues were rapidly excised, weighted, and frozen in liquid nitrogen.

2.3. Biochemicals

They were all reagent grade and obtained either from Roche S.A. (Barcelona, Spain) or from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.4. RNA isolation

Total RNA from gastrocnemius muscle was extracted by Tri-PureTM kit (Roche, Barcelona, Spain), a commercial modification of the acid guanidinium isothiocyanate/phenol/chloroform method.²¹

2.5. Real-time PCR (polymerase chain reaction)

First-strand cDNA was synthesized from total RNA with oligo dT15 primers and random primers pdN6 by using a cDNA synthesis kit (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche, Barcelona, Spain). Analysis of mRNA levels for the genes from the different proteolytic systems was performed with primers designed to detect the following gene products: ubiquitin (FORWARD 5' GAT CCA GGA CAA GGA GGG C 3', REVERSE 5' CAT CTT CCA GCT GCT TGC CT 3'); E2 (FORWARD: 5' AGG CGA AGA TGG CGG T 3'; REVERSE 5' TCA TGC CTG TCC ACC TTG TA 3'); C8 proteasome subunit (FORWARD 5' CAA CCA TGA CAA CCT TCG TG 3'; REVERSE 5' GCC TCA CAG CCT TCT CTT TG 3'); C2 proteasome subunit (FORWARD: 5' GTTTCCATTGG-GATTGTTGG 3'; REVERSE: 5' TGTTCCATTGGTTCATCAGC 3'); MuRF-1 (FORWARD 5' ATC ACT CAG GAG CAG GAG GA 3'; REVERSE 5' CCT GGC ACT CAA GAG GAA GG 3'); Atrogin-1(FORWARD 5' GTT TCC ATT GGG ATT GTT GG 3'; REVERSE 5' TGT TCC ATT GGT TCA TCA GC 3'); m-calpain (FORWARD 5' TTG AGC TGC AGA CCA TC 3'; REVERSE 5' GCA GCT TGA AAC CTG CTT CT 3'), cathepsin B (FORWARD 5' CTG CTG AGG ACC TGC TTA C 3'; REVERSE 5' CAC AGG GAG GGA TGG TGT A3') and 18S (FORWARD 5' GCGAATGGCTATTAAATCAGTTA 3'; REVERSE 5' TGGTTTGATCTGATAAATGCACG 3'). To avoid the detection of possible contamination by genomic DNA, primers were designed in different exons. The real-time PCR was performed using a commercial kit (LightCycler™ FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, Roche, Barcelona, Spain). The relative amount of all mRNA was calculated using comparative Ct method. 18S mRNA was used as the invariant control for all studies.

2.6. Muscle preparations and incubations

The dissection, isolation and incubation of the *extensor digitorum longus* (EDL) muscles were carried out under ketamine/xylazine mixture anaesthesia as previously described.^{22,23} The muscles were preincubated for 60 min: 30 min in Krebs–Henseleit buffer and 30 min in supplemented medium containing 50, 100 or 200 µM megestrol acetate or none, and then incubated for 120 min in fresh supplemented medium. Such muscles are able to maintain normal ATP concentrations during a 3 h incubation period.²² Total protein degradation by the isolated muscles was calculated as the rate of tyrosine released in the last 2 h of incubation into the medium in the presence of 0.5 mM cycloheximide in order to block the reincorporation of tyrosine into tissue protein. Tyrosine was measured fluorimetrically as previously described.²⁴

2.7. Total physical activity

Total physical activity (IR ACTIMETER System and ACTITRAK software from PANLAB, Barcelona) was determined during the last 24 h before the sacrifice of the animals in control and tumour-bearing animals using activity sensors that translate individual changes in the infrared pattern caused by movements of the animals into arbitrary activity counts. For the measurements, animals remained in their home cage. A frame containing an infrared beam system was placed on the outside of the cage; this minimised stress to the animals.

2.8. Grip force assessment

Skeletal muscular strength in rats was quantified by the grip-strength test.^{25,26} The grip-strength device (Panlab-Harvard Apparatus, Spain) comprised a triangular pull bar connected to an isometric force transducer (dynamometer). Basically, the grip-strength meter was positioned horizontally and the rats are held by the tail and lowered towards the device. The animals are allowed to grasp the triangular pull bar and were then pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the bar just before it lost grip was recorded as the peak tension. At least three measurements were taken per rat on both baseline and test days, and the results were averaged for analysis. This force was measured in grams.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis of the data will be performed by means of the Student's *t*-test.

3. Results

As expected, megestrol acetate treatment (100 mg/kg body weight) resulted in an increase in food intake in the tumour-bearing animals (20%) (Fig. 1) without affecting tumour growth (Table 1). The increase in food intake is associated with an improvement in weight loss (Fig. 1). We next decided to investigate if the observed effects of megestrol acetate on both food intake and weight gain depicted in Fig. 1 were associated with factors other than water and fat accumulation. As can be seen in Fig. 1 administration of megestrol acetate resulted in a significant improvement in muscle weights (10% GSN, 6% tibialis, 13% soleus and 12% heart). We have previously shown that the cachectic syndrome is invariably associated with skeletal muscle loss in different experimental cancer models.²⁷ Therefore, the present results clearly show that megestrol acetate contributes to muscle mass preservation. This is supported by the results present in Table 2. Indeed, treatment with the drug resulted in changes in gene expression of the main components of the muscle proteolytic machinery. It has to be pointed out here that the muscle loss associated with cancer is linked with an important activation of proteolysis both, in experimental animals^{23,27} and humans.^{28,29} Among the proteolytic systems involved in protein degradation in muscle during catabolic conditions, the ubiquitin-proteasome system is considered the main one. Megestrol acetate treatment clearly shows that for the different genes studied the drug decrease the mRNA content. This decrease was also extensive to the calcium-dependent and the lysosomal proteolytic systems (Table 2). Interestingly, the effect of megestrol acetate on skeletal muscle proteolysis seems to be direct since the incubation of individual EDL muscles as previously described³⁰ results in a significant decrease in the rate of tyrosine release (at 200 µM concentration of MA), an indicator of the total proteolytic rate (Table 3). These observations agree with megestrol

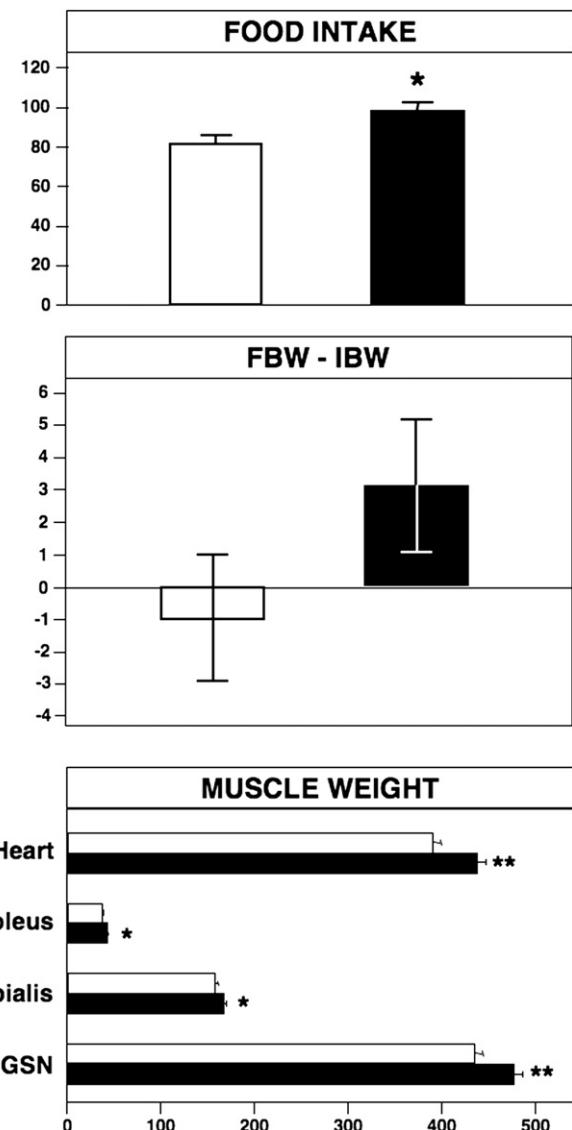


Fig. 1. Food intake, weight gain and muscle weights in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma treated with megestrol acetate. White bars: non-treated tumour-bearing animals; black bars: MA-treated tumour-bearing animals. Results are mean ± S.E.M. for 8–9 animals. Food intake is expressed in g/100 g IBW and refers to the ingestion during the period of the experiment prior to sacrifice, which took place 7 days after tumour inoculation. IBW: Initial body weight, FBW: Final body weight without the tumour volume. FBW- IBW is expressed in g. Muscle weights are expressed in mg/100 g IBW. Values that are significantly different by the Student's *t*-test from the non-treated animals groups are indicated by **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

acetate having an effect on lean body mass rather than simply water or fat.

Finally, we decided to test whether the positive effect of megestrol acetate on muscle weight was associated with an

Table 1

Tumor content in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma treated with megestrol acetate.

	T	T + MA
Volume (mL)	33 ± 1 (8)	30 ± 3 (7)
Total cell number ($\times 10^6$)	2784 ± 224 (8)	2894 ± 241 (7)

Results are mean ± S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. T: tumour-bearing rats; T + MA: tumour-bearing rats treated with megestrol acetate 100 mg/kg day.

Table 2

Effects of megestrol acetate on gastrocnemius muscle mRNA content of the different proteolytic systems in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma.

Treatment:	Tumour-bearing animals	
Proteolytic system	none	MA
Ubiquitin-dependent		
Ubiquitin	100 ± 9 (5)	40 ± 5 (4)***
C2 proteasome subunit	100 ± 25 (6)	39 ± 10 (6)*
C8 proteasome subunit	100 ± 22 (6)	75 ± 19 (5)
MuRF-1	100 ± 30 (5)	17 ± 3 (6)**
Atrogin-1	100 ± 24 (6)	22 ± 4 (6)**
E2	100 ± 26 (6)	18 ± 5 (6)*
Calcium-dependent		
m-calpain	100 ± 22 (6)	32 ± 9 (6)*
Lysosomal		
Cathepsin B	100 ± 26 (6)	38 ± 12 (6)**

For more details see the Material and Methods section. Results are mean ± S.E.M. for the number indicated in parentheses. The results are expressed as a percentage of controls. Values that are significantly different by the Student's *t*-test from the tumour-bearing group are indicated by **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

increase of physical performance of the animals, thus an increase in lean body mass would be expected to result in a better physical performance. Table 4 shows the effects of megestrol acetate treatment on the different parameters related with physical performance. Treatment with the drug resulted in a significant increase in physical activity both at the level of locomotor (movements with displacement) (18%) and stereotyped movements (movements without displacement: eating and cleaning) (51%). In addition, the mean velocity of these movements was also increased (40%) and so was the total traveled distance (45%). When the time involved in physical activity was monitored, a decrease in resting time (−3%), and an increase in slow (18%) and fast (47%) movements were significantly affected (Table 4). These data clearly demonstrate, for the first time, that the drug has a positive effect on physical activity, one of the components of quality of life. Since the drug had such a clear effect on muscle weights, we also assessed the grip force of the animals and, as can be seen in Table 4, treatment with the progestagen drug resulted in an increment in grip force (12%).

4. Discussion

Tumour burden induces an important weight loss both in humans and experimental animals. This pathological process is known as cachexia, a syndrome that has been recently defined as: "a complex metabolic syndrome associated with underlying illness and characterized by loss of muscle with or without loss of fat mass. The prominent clinical feature of cachexia is weight loss in adults (corrected for fluid retention) or growth failure in children (excluding endocrine disorders). Anorexia, inflammation, insulin resistance and increased muscle protein breakdown are frequently associated with cachexia. Cachexia is distinct from starvation, age-related loss of muscle mass, primary depression, malabsorption and hyperthyroidism and is associated with increased morbidity".¹

Table 3

Skeletal muscle proteolytic rate in isolated EDL muscles *in vitro*.

	Tyrosine released into the medium
C	283 ± 5.8 (13)
MA 50 μM	284 ± 13 (6)
MA 100 μM	260 ± 21 (4)
MA 200 μM	255 ± 9.7 (10)*

For more details, see the Material and Methods section. Results are mean ± S.E.M. for the number of animals indicated in parentheses. Proteolytic rates were measured in the presence of cycloheximide (0.5 mM) and are expressed as nanomoles per gram of muscle and 120 min. Values that are significantly different by the Student's *t*-test from the non-treated group are indicated by **p* < 0.05.

Table 4

Last 24 h of physical activity and grip force in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma treated with megestrol acetate.

Treatment:	Tumour-bearing animals	
Parameter	none	MA
Total physical activity		
Stereotyped movements	2924 ± 160 (17)	5991 ± 859 (9) ***
Locomotor movements	25 114 ± 691 (18)	30 589 ± 1731 (9) **
Mean velocity	0.21 ± 0.01 (16)	0.35 ± 0.05 (9) **
Total traveled distance	16 551 ± 813 (18)	30 355 ± 4268 (9) ***
Time		
Resting time	89 ± 0.34 (19)	86 ± 0.49 (9) ***
Slow-movements time	9.7 ± 0.27 (18)	11.6 ± 0.58 (9) ***
Fast-movements time	1.3 ± 0.08 (18)	2.4 ± 0.29 (9) ***
Grip force	3.7 ± 0.13 (7)	4.2 ± 0.12 (5)*

For more details, see the Material and Methods section. Physical activity is expressed in activity units. Stereotyped movements include movements without displacement (eating and cleaning movements); conversely, locomotor movements include movements with displacement. Mean velocity is expressed in cm/s. Traveled distance is expressed in cm. Time is expressed as percentage of total time (24 h). The thresholds of time are the following: time involving resting (sleeping, cleaning and eating time): [0–2] cm/s, time involving slow movements: [2–5] cm/s and time involving fast movements: [≥5] cm/s. Grip force is expressed as g/g initial body weight. Results are mean ± S.E.M. for the number of animals in parenthesis. Values that are significantly different by the Student's *t*-test from the non-treated group are indicated by **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

Previous studies have shown that megestrol acetate administration resulted in an increase in food intake both in rodents^{13,18,31} and humans.^{15,16,32} Although the reason for the increase in food intake is not entirely known, it has been postulated that the effect is partially mediated by neuropeptide Y, a potent central appetite stimulant.¹³ In addition, megestrol acetate is able to reduce the *in vitro* production of serotonin and cytokines (IL-1, IL-6 and TNF-alpha).³³ These humoral factors are certainly involved in anorectic states associated with catabolic conditions.^{34,35}

Concerning the increase in body weight associated with megestrol acetate treatment, previous studies carried out in mice have concluded that weight improvement is based simply on water and fat accumulation.¹⁸ However, clinical trials in AIDS patients have shown that megestrol acetate treatment results also in an increase in lean body mass.^{36,15} Schmoll et al.³⁷ performed a high-dose megestrol acetate intervention in patients with cancer cachexia and concluded that the drug induced a positive effect not just in fat but also in lean body mass. In other studies, while it is clear that megestrol acetate improves appetite and weight gain in cancer patients,³⁸ no clear conclusion has been obtained concerning quality of life, possibly due to the relative small number of patients and their heterogeneity. Other evidences suggest that medroxyprogesterone acetate treatment is able to ameliorate the quality of life of chemotherapy and radiotherapy-treated cancer patients.¹² In fact, the quality of life is strongly affected by fatigue due to the loss of lean body mass and chronic inflammatory status. Some authors consider that the most appropriate clinical outcome parameters are to improve lean body mass, to decrease resting energy expenditure (REE) and fatigue and the correction of chronic inflammatory status instead only to increase body weight and appetite.³⁹ The data obtained suggest that the drug not only acts on appetite and body weight, but that it has a clear effect on muscle mass and performance by influencing positively muscle protein turnover.

From the data presented here and, although megestrol acetate treatment is associated with adverse events such as impotence, hyperglycemia, adrenal suppression, rush, flatulence and dyspepsia,³⁶ it is clear that the treatment improves physical performance and muscle force indicating that megestrol acetate is a candidate for muscle wasting treatment either alone or in

combination with other drugs or nutritional strategies. Therefore, future research is needed to search for the optimal combination.

Conflict of interest

Each author has participated sufficiently, intellectually or practically, in the work to take public responsibility for the content of the article, including the conception, design, and conduction of the experiment and for data interpretation (authorship). SB and RS carried out the studies, sample analysis, data analyses, performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. SB participated in the design and coordination of the study, carried out the studies, and helped to draft the manuscript. SS, MT, MO, RM, JC helped to carry out the studies. JMA and FJLS conceived the study, participated in the design, coordination of the study, drafted the manuscript and revised it critically. All authors have read and approved the final manuscript. All authors of this research have not conflict of interest related with employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-02284-2008) and from the Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060907).

References

- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008;27:793–9.
- Argiles JM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev* 1997;17:477–98.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med Hypotheses* 1990;32:151–5.
- Ng EH, Lowry SF. Nutritional support and cancer cachexia. Evolving concepts of mechanisms and adjunctive therapies. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991;5:161–84.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Garcia I, et al. Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett* 1998;130:19–27.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Carbo N, Agell N, Lopez-Soriano FJ, et al. Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 1998;142:183–9.
- Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Metabolic interrelationships between liver and skeletal muscle in pathological states. *Life Sci* 2001;69:1345–61.
- Warren S. The immediate cause of death in cancer. *Am J Med Sci* 1932;184:610–3.
- Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med* 1980;69:491–7.
- Loprinzi CL, Michalak JC, Schaid DJ, Mailliard JA, Athmann LM, Goldberg RM, et al. Phase III evaluation of four doses of megestrol acetate as therapy for patients with cancer anorexia and/or cachexia. *J Clin Oncol* 1993;11:762–7.
- Bruera E, Macmillan K, Kuehn N, Hanson J, MacDonald RN. A controlled trial of megestrol acetate on appetite, caloric intake, nutritional status, and other symptoms in patients with advanced cancer. *Cancer* 1990;66:1279–82.
- Neri B, Garosi VL, Intini C. Effect of medroxyprogesterone acetate on the quality of life of the oncologic patient: a multicentric cooperative study. *Anticancer Drugs* 1997;8:459–65.
- McCarthy HD, Crowder RE, Dryden S, Williams G. Megestrol acetate stimulates food and water intake in the rat: effects on regional hypothalamic neuropeptide Y concentrations. *Eur J Pharmacol* 1994;265:99–102.
- Mantovani G, Maccio A, Esu S, Lai P, Santona MC, Massa E, et al. Medroxyprogesterone acetate reduces the in vitro production of cytokines and serotonin involved in anorexia/cachexia and emesis by peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Eur J Cancer* 1997;33:602–7.
- Von Roenn JH, Armstrong D, Kotler DP, Cohn DL, Klimas NG, Tchekmedyan NS, et al. Megestrol acetate in patients with AIDS-related cachexia. *Ann Intern Med* 1994;121:393–9.
- Loprinzi CL, Schaid DJ, Dose AM, Burnham NL, Jensen MD. Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate. *J Clin Oncol* 1993;11:152–4.
- Strang P. The effect of megestrol acetate on anorexia, weight loss and cachexia in cancer and AIDS patients (review). *Anticancer Res* 1997;17:657–62.
- Beck SA, Tisdale MJ. Effect of megestrol acetate on weight loss induced by tumour necrosis factor alpha and a cachexia-inducing tumour (MAC16) in NMRI mice. *Br J Cancer* 1990;62:420–4.
- Tomiska M, Tomiskova M, Salajka F, Adam Z, Vorlicek J. Palliative treatment of cancer anorexia with oral suspension of megestrol acetate. *Neoplasma* 2003;50:227–33.
- Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, Baccino FM. Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys* 1993;306:52–8.
- Chomczynski P, NS. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem* 1987;162:156–9.
- Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Branched-chain amino acids: a role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *J Cell Physiol* 2002;191:283–9.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;230:238–41.
- Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorimetric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med* 1957;50:733–6.
- Sinis N, Guntinas-Lichius O, Irinchev A, Skouras E, Kuerten S, Pavlov SP, et al. Manual stimulation of forearm muscles does not improve recovery of motor function after injury to a mixed peripheral nerve. *Exp Brain Res* 2008;185:469–83.
- Zangarelli A, Chanseaume E, Morio B, Brugere C, Mosoni L, Rousset P, et al. Synergistic effects of caloric restriction with maintained protein intake on skeletal muscle performance in 21-month-old rats: a mitochondria-mediated pathway. *FASEB J* 2006;20:2439–50.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* 2004;64:6725–31.
- Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Bellantone R, Pacelli F, Busquets S, et al. Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;280:R1518–23.
- Dejong CH, Busquets S, Moses AG, Schrauwen P, Ross JA, Argiles JM, et al. Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. *Oncol Rep* 2005;14:257–63.
- Gras F, Brunmair B, Quarre L, Szocs Z, Waldhausen W, Furnsinn C. Progesterone impairs cell respiration and suppresses a compensatory increase in glucose transport in isolated rat skeletal muscle: a non-genomic mechanism contributing to metabolic adaptation to late pregnancy? *Diabetologia* 2007;50:2544–52.
- Browning JD, MacDonald RS, Thornton WH, O'Dell BL. Reduced food intake in zinc deficient rats is normalized by megestrol acetate but not by insulin-like growth factor-I. *J Nutr* 1998;128:136–42.
- Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Gramignano G, Serpe R, Massa E, et al. Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment for patients with cancer cachexia: interim results. *Nutrition* 2008;24:305–13.
- Mantovani G, Maccio A, Lai P, Massa E, Ghiani M, Santona MC. Cytokine involvement in cancer anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate on cytokine downregulation and improvement of clinical symptoms. *Crit Rev Oncog* 1998;9:99–106.
- Argiles JM, Busquets S, Toledo M, Lopez-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 2009;3:263–8.
- Stephens NA, Skipworth RJ, Fearon KC. Cachexia, survival and the acute phase response. *Curr Opin Support Palliat Care* 2008;2:267–74.
- Oster MH, Enders SR, Samuels SJ, Cone LA, Hooton TM, Browder HP, et al. Megestrol acetate in patients with AIDS and cachexia. *Ann Intern Med* 1994;121:400–8.
- Schmoll E, Wilke H, Thole R, Preusser P, Wildfang I, Schmoll HJ. Megestrol acetate in cancer cachexia. *Semin Oncol* 1991;18:32–4.
- Berenstein EG, Ortiz Z. Megestrol acetate for the treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*; 2005 [CD004310].
- Madeddu C, Maccio A, Panzone F, Tanca FM, Mantovani G. Medroxyprogesterone acetate in the management of cancer cachexia. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:1359–66.

PUBLICACIÓ 8

Megestrol acetate treatment influences tissue amino acid uptake and incorporation during cancer cachexia

Míriam Toledo, Enrica Marmonti, David Massa, Marina Mola, Francisco J. López-Soriano, Sílvia Busquets, Josep M. Argilés

e-SPEN Journal 7(4):e135–e138, 2012

L'objectiu d'aquesta investigació va ser estudiar els efectes de l'acetat de megestrol (AM, 100 mg/kg) en la taxa d'incorporació de leucina en el teixit muscular i en la captació d'alanina α -amino- 3 H-isobutirat (AIB). (un anàleg no metabolitzable de l'alanina), tant en el múscul esquelètic com en el teixit hepàtic en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130. Concretament es va valorar l'absorció d'aminoàcids pels teixits (amb l'AIB) i l'oxidació i incorporació a proteïna tissular de 14 C-leucina. L'administració d'AM a rates portadores de tumor va resultar en una reversió important del procés de pèrdua de massa muscular com es reflecteix pels pesos dels músculs individuals. El tractament amb el progestagen es va traduir en un augment de la captació d'AIB juntament amb un augment de la incorporació de leucina en el múscul esquelètic, va disminuir significativament la captació d'AIB pel fetge i va donar lloc a un augment de la captació significativa d'aminoàcids neutres (AIB) pel múscul esquelètic així com a una incorporació significativa de l'aminoàcid de cadena ramificada leucina en la proteïna muscular. Tots aquests resultats apunten a una clara acció anabòlica del fàrmac en el teixit muscular.



Original article

Megestrol acetate treatment influences tissue amino acid uptake and incorporation during cancer cachexia

Míriam Toledo ^{a,c}, Enrica Marmonti ^{a,c}, David Massa ^a, Marina Mola ^a, Francisco J. López-Soriano ^{a,b}, Sílvia Busquets ^{a,b,*}, Josep M. Argilés ^{a,b}

^a Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2011

Accepted 16 April 2012

Keywords:

Megestrol acetate

Cancer cachexia

Skeletal muscle

BCAA

Liver

Therapy

SUMMARY

Background & aims: Cachexia is a multi-organic syndrome associated with cancer, characterized by body weight loss, muscle and adipose tissue wasting and inflammation, being often associated with anorexia. The aim of the present investigation was to study the effects of megestrol acetate (MA) on the rate of leucine incorporation into muscle tissue and on the uptake of AIB (a non-metabolizable analogue of alanine) in both skeletal muscle and liver tissue.

Methods: The effects of MA (100 mg/kg) were tested in cachectic tumour-bearing rats (Yoshida AH-130 ascites hepatoma). Tissue amino acid uptake was assessed by means of the alanine analogue α -amino- 3 H-isobutyrate (AIB). 14 C-leucine oxidation and tissue protein incorporation were also determined.

Results: Administration of MA to tumour-bearing rats resulted in an important reversal of the muscle wasting process, as reflected by individual muscle weights. Treatment with the progestogen resulted in an increased AIB uptake together with an increased leucine incorporation in skeletal muscle. MA treatment significantly decreased AIB uptake by the liver.

Conclusions: MA treatment results in both a significant increased uptake of neutral amino acids (AIB) by skeletal muscle and a significant incorporation of the branched-chain amino acid leucine into muscle protein, indicating a clear anabolic action of the drug on muscle tissue.

© 2012 European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

An international consensus concluded that cachexia is a multi-organic syndrome associated with cancer, characterized by body weight loss (at least 5%), muscle and adipose tissue wasting and inflammation, being often associated with anorexia.¹ The abnormalities associated with cachexia include alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism.^{1–3} Bearing in mind the fact that both anorexia and metabolic disturbances are involved in the cachectic syndrome, the development of different therapeutic strategies has been focused on these two factors. Cachexia occurs in the majority of terminal cancer patients, and it is responsible for

the deaths of 22% of cancer patients.⁴ In addition, survival of patients affected by different types of neoplasias is clearly dependent on the presence of weight loss.⁵ Therefore, cachexia represents an important factor in the treatment of the cancer patient, affecting not only survival, but also the efficacy of anti-cancer treatment, quality of life and, ultimately, sanitary costs.

Different treatments with progestogen based drugs have been used because of their capacity to increase food intake, in other words: preventing anorexia. Megestrol acetate (MA) and medroxyprogesterone (MPA) are synthetic, orally active derivatives of the naturally occurring hormone progesterone. In humans these compounds have been found to improve appetite, caloric intake and nutritional status in several clinical trials.^{6–8} In the case of MA, the reason for the associated weight gain is mostly unknown, although it has been postulated that the effect is partially mediated by the neuropeptide Y, a potent central appetite stimulant.⁹ On the other hand, MPA has been shown to reduce the *in vitro* production of serotonin and cytokines (interleukin-1 β (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- α (TNF)) by peripheral blood

* Corresponding author. Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028-Barcelona, Spain. Tel.: +34 934034609; fax: +34 934021559.

E-mail address: silviabusquets@ub.edu (S. Busquets).

^c These authors contributed equally to this work.

mononuclear cells of cancer patients.¹⁰ Human trials involving progesterone derivatives have mostly demonstrated, with few exceptions, a favourable effect on appetite and weight gain, which is no doubt of positive value for the body image. The Cochrane database review confirms, in cancer patients with anorexia–cachexia syndrome, the favourable effects of MA on appetite and weight gain, but failed to conclude about the effect on quality of life and the optimal dose.¹¹ However, this weight gain has been mainly attributed to an increased fat mass, not to muscle mass.^{12,13}

In a previous study, we have concluded that, at least in experimental animals, treatment with MA leads to an increase in muscle mass and physical performance in cachectic tumour-bearing animals. This seems to be associated with a decrease in muscle proteolysis which results in an improvement in muscle wasting during cachexia.¹⁴ However, no data are available concerning the effects of MA on muscle synthesis.

Bearing all these in mind, the aim of the present investigation was to study the effects of MA on the rate of leucine incorporation into muscle tissue. In addition, the tissue uptake of AIB (a non-metabolizable analogue of alanine) has been studied both in skeletal muscle and liver.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (Interfauna, Barcelona, Spain) of 5 weeks of age were used in the different experiments. The animals were maintained at 22 ± 2 °C with a regular light–dark cycle (light on from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and had free access to food and water. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

2.2. Tumour inoculation and treatment

Rats were divided into two groups, namely tumour hosts and tumour-treated hosts. Both received an intraperitoneal inoculum of 10^8 AH-130 Yoshida ascites hepatoma cells obtained from exponential tumours.¹⁵ The treated group was administered a daily intragastrically (i.g.) dose of megestrol acetate (100 mg/kg body weight, dissolved in corn oil) and the control group (tumour hosts) a corresponding volume of solvent. On day 7 after tumour transplantation, the animals were weighted and anaesthetized with an i.p. injection of ketamine/xylazine mixture (3:1) (Imalgene® and Rompun®, respectively). The tumour was harvested from the peritoneal cavity and its volume and cellularity evaluated. Tissues were rapidly excised, weighted, and frozen in liquid nitrogen.

2.3. Administration of α -amino- ${}^3\text{H}$] isobutyrate (AIB)

α -amino- ${}^3\text{H}$] isobutyrate (AIB) (ITISA Biotec, Spain) is a non-metabolizable analogue of alanine (a neutral amino acid). For determining the effects of MA on both intestinal absorption and tissue uptake of neutral amino acids coming from diet proteins, a dose of 15 $\mu\text{Ci}/\text{rat}$ AIB was administered intragastrically, immediately after the intravenous injection of L-[1- ${}^{14}\text{C}$]leucine in the same animal.

2.4. Determination of the intestinal absorption of AIB

In order to determine the amount of α -amino- ${}^3\text{H}$] isobutyrate (AIB) absorbed, we measured the radioactivity present in the gastrointestinal tract 2 h after the administration of the tracer. The gastrointestinal tracts were homogenized in a volume of 3%

HClO₄ in an electric mixer. 5 mL of homogenate were neutralized adding 30% KOH and then centrifuged at 1000 g for 5 min. Finally, 5 mL of the neutralized supernatant were added to 10 mL of scintillation fluid for measurement of radioactivity. The results obtained indicated the radioactivity (dpm) present in the gastrointestinal tract (non-absorbed AIB); AIB absorption was calculated by subtracting total gastrointestinal radioactivity from that administered.

2.5. Determination of incorporated AIB

Gastrocnemius (GSN), tibialis, soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles were triturated in a mortar with a small amount of liquid nitrogen. The mash obtained were deproteinized with 1 mL of 6% HClO₄ and centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatants were extracted and neutralized with 30% KOH. Finally, it was added 0.5 mL of each neutralized sample in 10 mL of scintillation fluid for measurement of radioactivity. Tissue AIB uptake was expressed as percentage of the absorbed dose/g of tissue referred to the absorbed dose present per mL of plasma.

2.6. Administration of [1- ${}^{14}\text{C}$]Leucine

At day 7 after tumour transplantation, a 3 $\mu\text{Ci}/\text{rat}$ dose of L-[1- ${}^{14}\text{C}$]leucine (ITISA Biotec, Spain) in physiological saline was administered via one of the lateral tail veins under light anaesthesia with Isofluoran (Veterinaria ESTEVE, Spain).

2.7. L-[1- ${}^{14}\text{C}$]leucine oxidation in vivo

In order to determine the *in vivo* L-[1- ${}^{14}\text{C}$]leucine oxidation and its incorporation into tissues, we chose five rats of each experimental group (both treated and no-treated) and used the Oller do Nascimento and Williamson method.¹⁶ Briefly, it consists in the measurement of the CO₂ exhaled by the animal after the preliminary administration by means of Lumasorb (Lumac, Landgraaf, The Netherlands), a basic compound that is able to chemically fix CO₂. As rapidly as possible after the radioactive tracer administration, the animals were placed in a 10 L glass desiccator. It was connected to a wash bottle fitted with a sintered-glass tube and containing about 30 mL of Lumasorb (Lumac) in order to absorb the expired CO₂. Air was drawn through the system by means of an electrical pump at about 2 L/min. The content of the wash bottle was changed every 30 min, and 5 ml of the Lumasorb were added directly to 10 mL of scintillation fluid for measurement of radioactivity. ${}^{14}\text{CO}_2$ production was calculated as the sum of the percentage of the administered dose of L-[1- ${}^{14}\text{C}$]leucine over the experimental period (120 min).

2.8. L-[1- ${}^{14}\text{C}$]leucine incorporation

In order to measure the amount of radioactivity incorporated into the tissues, pellets obtained by homogenization and centrifugation (20,000 g for 20 min at 4 °C) of muscles (GSN, tibialis, soleus and EDL muscles) and liver were used. The pellets were centrifuged twice at 2000 g for 20 min at 4 °C in 1 mL of 6% HClO₄ and treated adding 2 mL of 0.3 N NaOH and 0.4% sodium deoxycholate, being incubated at 90 °C for 1 h. When the pellets were completely homogenized, they were directly transferred into 12 mL of scintillation fluid for measurement of radioactivity. L-[1- ${}^{14}\text{C}$]leucine incorporation into proteins was calculated as the percentage of the total injected radioactivity present as protein per gram of tissue.

2.9. Statistical analysis

Mann–Whitney *U* (non-parametric test, independent samples) test was used for assessing differences among the two groups (tumour-bearing and MA treated-tumour-bearing animals).

3. Results

As expected, MA treatment (100 mg/kg body weight) resulted in an increase in food intake in the tumour-bearing animals (28%) without affecting tumour growth (Table 1). As can be seen in Table 2, administration of MA resulted in an improvement in muscle weights (GSN 8%, tibialis 9%, soleus 13% and EDL 12%).

Concerning amino acid uptake, Table 3 shows the tissue accumulation of AIB in tumour-bearing rats. As can be seen, MA treatment did not influence the intestinal absorption of the tracer, which was around 72% (Table 3). Very interestingly, administration of MA resulted in an increase in the uptake of AIB in GSN (15%), tibialis (20%) and soleus muscles (25%). Conversely, MA treatment significantly decreased the hepatic uptake of the tracer (25%). No differences were observed in the plasma content of AIB (Table 3).

Table 4 shows the *in vivo* oxidation of leucine to CO₂. As can be seen, MA treatment did not result in any changes in leucine oxidation two hours after the administration of the tracer. The total CO₂ formed was about 10% of the administered dose. Finally, Table 4 shows the incorporation of ¹⁴C-leucine into muscle and liver protein. As can be seen, MA treatment significantly increased the incorporation of label into GSN (43%), tibialis (50%) and EDL (23%) muscle protein. No effects were observed in relation with leucine incorporation into liver protein (Table 4).

4. Discussion

Cancer induces an important weight loss both in humans and experimental animals. This pathological process is known as cachexia, a syndrome that has been recently defined as: “a complex metabolic syndrome associated with underlying illness and characterized by loss of muscle with or without loss of fat mass. The prominent clinical feature of cachexia is weight loss in adults (corrected for fluid retention) or growth failure in children (excluding endocrine disorders). Anorexia, inflammation, insulin resistance and increased muscle protein breakdown are frequently associated with cachexia. Cachexia is distinct from starvation, age-

Table 1

Body weight, food intake and tumour content of AH-130 tumour-bearing rats treated with megestrol acetate.

	TUMOUR	TUMOUR + MA	Mann–Whitney <i>U</i> test
Initial body weight	164 ± 3	166 ± 3	
Final body weight	161 ± 3	164 ± 2	
Carcass	56 ± 1	58 ± 1	
Total food intake	35 ± 0.4	45 ± 0.5***	<i>p</i> = 0.000
Total tumour cell number ($\times 10^6$)	3019 ± 183	3261 ± 129	
Tumour volume	38 ± 3	33 ± 2	

Results are mean ± SEM (*n* = 7). Initial and final body weights are expressed in g. Final body weight excludes the tumour weight. Carcass weight (body weight without organs or tumour) is expressed as g per 100 g of initial body weight. Food intake is expressed as g per 100 g of initial body weight and refers to the ingestion during the period of the experiment prior to sacrifice which took place seven days after tumour inoculation. Total tumour cell number is expressed as millions of cells/mL and the tumour volume is expressed as mL. TUMOUR: untreated-tumour-bearing rats; TUMOUR + MA: tumour-bearers treated with megestrol acetate. Statistical significance by Mann–Whitney *U* test. ****p* ≤ 0.001.

Table 2

Skeletal muscle, liver and gastrointestinal tract weights of AH-130 tumour-bearing rats treated with megestrol acetate.

	TUMOUR	TUMOUR + MA	Mann–Whitney <i>U</i> test
GSN	426 ± 8	458 ± 10*	<i>p</i> = 0.041
Tibialis	142 ± 2	155 ± 5	
Soleus	30 ± 0.4	34 ± 1.3**	<i>p</i> = 0.008
EDL	32 ± 0.6	36 ± 1.1*	<i>p</i> = 0.014
Liver	3.8 ± 0.8	4.4 ± 0.2*	<i>p</i> = 0.022
GI tract	7 ± 0.3	8.5 ± 0.2**	<i>p</i> = 0.002

Results are mean ± SEM (*n* = 7). Muscle weights are expressed as mg per 100 g of initial body weight. GSN: gastrocnemius; EDL: extensor digitorum longus; Liver and GI tract (gastrointestinal tract) weights are expressed as g per 100 g of initial body weight. TUMOUR: untreated-tumour-bearing rats; TUMOUR + MA: tumour-bearers treated with megestrol acetate. Statistical significance by Mann–Whitney *U* test. **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01.

related loss of muscle mass, primary depression, malabsorption and hyperthyroidism and is associated with increased morbidity”¹.

Previous studies have shown that MA administration resulted in an increase in food intake both in rodents^{9,14,17,18} and humans^{12,13,19}. Previous results clearly agree with this.¹⁴ We have previously shown that the cachectic syndrome is invariably associated with skeletal muscle loss in different experimental cancer models.²⁰ Therefore, the present results clearly show that MA contributes to muscle mass preservation. In a previous publication we clearly demonstrated that, at least in cancer cachectic rats, MA treatment resulted in a beneficial effect not only in body weight loss but also in the preservation of muscle wasting.¹⁴ The mechanism for this effect seems to be, at least, partially explained by the ability of MA to block the enhanced proteolysis associated with muscle wasting during cancer cachexia. In fact, MA treatment in tumour-bearing rats, in addition to preserving muscle mass, results in an increased physical performance and muscle strength.¹⁴ Interestingly the effects of MA are direct upon skeletal muscle, since incubation of isolated muscles in the presence of MA showed a reduced proteolytic rate.¹⁴

Taking all this into consideration, we decided to see if MA treatment influenced the rate of amino acid incorporation into muscle protein. In order to clarify this point, we administered tumour-bearing rats with 1-¹⁴C-leucine and examined the rate of oxidation and tissue protein incorporation of this branched-chain amino acid. The results presented clearly showed that MA treatment significantly increases the rate of the amino acid incorporation into muscle protein (Table 4), without altering the *in vivo* rate of the amino acid oxidation (Table 4). It may thus be suggested that

Table 3

Tissue accumulation of AIB in Yoshida-bearing rats treated with megestrol acetate.

	TUMOUR	TUMOUR + MA	Mann–Whitney <i>U</i> test
Intestinal absorption	72.4 ± 1.7	72.6 ± 3.2	
Tissue uptake			
GSN	0.318 ± 0.03	0.422 ± 0.03	<i>p</i> = 0.082
Tibialis	0.324 ± 0.02	0.402 ± 0.02*	<i>p</i> = 0.026
Soleus	0.560 ± 0.06	0.784 ± 0.06	<i>p</i> = 0.052
EDL	0.536 ± 0.04	0.551 ± 0.04	
Liver	2.831 ± 0.13	1.972 ± 0.18**	<i>p</i> = 0.004
Plasma	0.915 ± 0.1	0.895 ± 0.06	

The results are mean values ± S.E.M (*n* = 6). Tissue AIB uptake is expressed as percentage of the absorbed dose/g of tissue referred to the absorbed dose present per mL of plasma. Intestinal absorption is expressed as a percentage of the administered dose. Plasma ratio is expressed as a percentage of the absorbed dose present per mL of plasma. GSN: gastrocnemius; EDL: extensor digitorum longus. TUMOUR: untreated-tumour-bearing rats; TUMOUR + MA: tumour-bearers treated with megestrol acetate. Statistical significance by Mann–Whitney *U* test. **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01.

Table 4

in vivo $^{14}\text{CO}_2$ production and ^{14}C -leucine incorporation into protein in AH-130 tumour-bearing rats treated with megestrol acetate.

	TUMOUR	TUMOUR + MA	Mann–Whitney U test
Leu incorporation			
GSN	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.01*	$p = 0.015$
Tibialis	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.02*	$p = 0.016$
Soleus	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.02	
EDL	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.01**	$p = 0.009$
Liver	0.66 ± 0.04	0.64 ± 0.06	
$^{14}\text{CO}_2$ production (120 min)	9.50 ± 1.65	9.47 ± 1.07	

Results are mean ± SEM ($n = 6$). %L-[$1-^{14}\text{C}$]leucine incorporated into protein was calculated as the percentage of the total injected radioactivity present as protein per gram of tissue. L-[$1-^{14}\text{C}$]leucine oxidation to $^{14}\text{CO}_2$ is expressed as the sum of the percentage of the administered dose of L-[$1-^{14}\text{C}$]leucine over the experimental period. GSN: gastrocnemius; EDL: extensor digitorum longus. TUMOUR: untreated-tumour-bearing rats; TUMOUR + MA: tumour-bearers treated with megestrol acetate. Statistical significance by Mann–Whitney U test. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

MA treatment is able to increase protein synthesis during cancer cachexia.

In addition to amino acid utilization, we decided to see if MA treatment was also able to influence tissue uptake. For this purpose we used the non-metabolizable amino acid AIB, an analogue of alanine, which is mainly transported by system A. Previous data from our laboratory clearly indicated that AIB uptake in skeletal muscle is decreased by cancer cachexia, while the hepatic uptake of the amino acid analogue is increased.²¹ Indeed, a massive release of muscle nitrogen (in the form of amino acids) is observed during cancer cachexia. The liver is involved in the removal of a great amount of muscle-derived amino acids for both gluconeogenesis and acute-phase protein synthesis.^{22,23} The results presented here show that MA treatment is able to significantly increase muscle AIB uptake while decreases the hepatic uptake of the amino acid analogue (Table 3). Altogether, the data clearly show that MA treatment is able to influence tissue inter-organic amino acid uptake by increasing these parameters in muscle and decreasing them in the liver, normalizing the pattern of amino acid uptake found in non-tumour-bearing rats.^{21,24}

In summary, the results presented here clearly support those previously described by our research group¹⁴ indicating the mechanisms involved in the anabolic action of the synthetic progestogen drug upon muscle tissue during cachexia.

Conflict of interest statement & statement of authorship

Each author has participated sufficiently, intellectually or practically, in the work to take public responsibility for the content of the article, including the conception, design, and conduction of the experiment and for data interpretation (authorship). MT and EM carried out the studies, sample analysis, data analyses, performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. SB participated in the design and coordination of the study, carried out the studies, and helped to draft the manuscript. DM and MM helped to carry out the studies. JMA and FJLS conceived the study, participated in the design, coordination of the study, drafted the manuscript and revised critically it. All authors have read and approved the final manuscript. All authors of this research have no conflict of interest related with employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-02284-2008).

References

- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008;27(6):793–9.
- Argiles JM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev* 1997;17(5):477–98.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med Hypotheses* 1990;33(2):151–5.
- Warren S. The immediate cause of death in cancer. *Am J Med Sci* 1932;184:610–3.
- Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med* 1980;69(4):491–7.
- Loprinzi CL, Michalak JC, Schaid DJ, Mailliard JA, Athmann LM, Goldberg RM, et al. Phase III evaluation of four doses of megestrol acetate as therapy for patients with cancer anorexia and/or cachexia. *J Clin Oncol* 1993;11(4):762–7.
- Bruera E, Macmillan K, Kuehn N, Hanson J, MacDonald RN. A controlled trial of megestrol acetate on appetite, caloric intake, nutritional status, and other symptoms in patients with advanced cancer. *Cancer* 1990;66(6):1279–82.
- Neri B, Garosi VL, Intini C. Effect of medroxyprogesterone acetate on the quality of life of the oncologic patient: a multicentric cooperative study. *Anticancer Drugs* 1997;8(5):459–65.
- McCarthy HD, Crowder RE, Dryden S, Williams G. Megestrol acetate stimulates food and water intake in the rat: effects on regional hypothalamic neuropeptide Y concentrations. *Eur J Pharmacol* 1994;265(1–2):99–102.
- Mantovani G, Maccio A, Esu S, Lai P, Santona MC, Massa E, et al. Medroxyprogesterone acetate reduces the in vitro production of cytokines and serotonin involved in anorexia/cachexia and emesis by peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Eur J Cancer* 1997;33(4):602–7.
- Berenstein EG, Ortiz Z. Megestrol acetate for the treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;2:CD004310.
- Von Roenn JH, Armstrong D, Kotler DP, Cohn DL, Klimas NG, Tchekmedyian NS, et al. Megestrol acetate in patients with AIDS-related cachexia. *Ann Intern Med* 1994;121(6):393–9.
- Loprinzi CL, Schaid DJ, Dose AM, Burnham NL, Jensen MD, et al. Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate. *J Clin Oncol* 1993;11(1):152–4.
- Busquets S, Serpe R, Sirisi S, Toledo M, Coutinho J, Martinez R, et al. Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia. *Clin Nutr* 2010;29(6):733–7.
- Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, Baccino FM. Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys* 1993;306(1):52–8.
- Oller do Nascimento CM, Williamson DH. Evidence for conservation of dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. Decreased oxidation of oral [$1-^{14}\text{C}$]triolein. *Biochem J* 1986;239(1):233–6.
- Browning JD, MacDonald RS, Thornton WH, O'Dell BL, et al. Reduced food intake in zinc deficient rats is normalized by megestrol acetate but not by insulin-like growth factor-I. *J Nutr* 1998;128(1):136–42.
- Beck SA, Tisdale MJ. Effect of megestrol acetate on weight loss induced by tumour necrosis factor alpha and a cachexia-inducing tumour (MAC16) in NMRI mice. *Br J Cancer* 1990;62(3):420–4.
- Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Gramignano G, Serpe R, Massa E, et al. Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment for patients with cancer cachexia: interim results. *Nutrition* 2008;24(4):305–13.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* 2004;64(18):6725–31.
- Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Amino acid uptake in skeletal muscle of rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Mol Cell Biochem* 1995;148(1):17–23.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Busquets S. Mechanisms to explain wasting of muscle and fat in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 2007;1(4):293–8.
- Argiles JM, Lopez-Soriano J, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, et al. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev* 2005;25(1):49–65.
- Costelli P, Llorente M, Garcia-Martinez C, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer Lett* 1995;91(1):73–8.

PUBLICACIÓ 9

Distinct behaviour of sorafenib in experimental cachexia-inducing tumours: the role of STAT3

Míriam Toledo*, Fabio Penna*, Sílvia Busquets, Francisco J. López-Soriano and Josep M. Argilés.

PlosONE 1;9(12):e113931, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0113931.

* Contributed equally

En el present estudi es va utilitzar sorafenib, un inhibidor multi-quinasa amb activitat antitumoral, per investigar els efectes de la quimioteràpia sobre la caquèxia. Es van incloure tres models diferents de tumor de ratolí experimental: carcinoma de còlon C26, melanoma B16 i carcinoma de pulmó de Lewis (LLC). Els resultats obtinguts mostraven clarament que el sorafenib és eficaç per reduir el creixement del tumor en els models de LLC i B16, mentre que no va tenir efecte en el C26. Curiosament, el tractament amb sorafenib va reduir els signes de pèrdua de massa muscular i va produir una millora de l'activitat física en el model de LLC i també al C26, malgrat l'absència d'acció antineoplàstica en el segon. Els nostres resultats descarten un paper de la IL-6 en l'acció del sorafenib, ja que el fàrmac no va afectar els nivells d'aquesta citoquina. Per contra, el sorafenib sembla actuar a nivell muscular influint en l'activitat de STAT3 i ERK, fet que conduceix a la reducció de l'acumulació de Pax7 i atrofina-1. Així doncs, el sorafenib sembla interferir amb la pèrdua de massa muscular per la disminució de l'activació d'aquestes vies de transducció de senyal.

RESEARCH ARTICLE

Distinct Behaviour of Sorafenib in Experimental Cachexia-Inducing Tumours: The Role of STAT3

Míriam Toledo^{1,3}, Fabio Penna^{1,3*}, Sílvia Busquets^{1,2*}, Francisco J. López-Soriano^{1,2}, Josep M. Argilés^{1,2}

1. Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2.** Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **3.** Department of Clinical and Biological Sciences, University of Torino, Turin, Italy

*silviabusquets@ub.edu

These authors contributed equally to this work.



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Toledo M, Penna F, Busquets S, López-Soriano FJ, Argilés JM (2014) Distinct Behaviour of Sorafenib in Experimental Cachexia-Inducing Tumours: The Role of STAT3. PLoS ONE 9(12): e113931. doi:10.1371/journal.pone.0113931

Editor: Mike Chen, City of Hope, United States of America

Received: March 11, 2014

Accepted: November 3, 2014

Published: December 1, 2014

Copyright: © 2014 Toledo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by a grant for the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-26091-2011). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The presence of a tumour is very often associated with wasting in the host, affecting both skeletal muscle and adipose tissue. In the present study we used sorafenib, a multi-kinase inhibitor with anti-tumour activity, in order to investigate the effects of chemotherapy on wasting. Three different experimental mouse tumour models were included: C26 colon carcinoma, B16 melanoma and Lewis lung carcinoma (LLC). The results obtained clearly show that sorafenib was effective in reducing tumour growth in LLC and B16 models, while it had no effect on C26. Interestingly, sorafenib treatment reduced the signs of muscle wasting and improved the physical activity in the LLC model and also in the C26, despite the absence of antineoplastic action in the latter. Our results discard a role for IL-6 in the action of sorafenib since the drug did not affect the levels of this cytokine. Conversely, sorafenib seems to act by influencing both STAT3 and ERK activity at muscle level, leading to reduced accumulation of Pax7 and atrogin-1. Sorafenib may interfere with muscle wasting by decreasing the activation of these signal transduction pathways.

Introduction

Development of cachexia is often found in cancer patients. It occurs in 50 to 80% of these patients [1], and is considered as a predictor of reduced survival accounting for more than 20% of cancer patients deaths [2]. It reduces physical activity [3] and quality of life and diminishes the tolerance to anticancer therapy [4,5]. Cachexia is defined, according to an international consensus [6], as a

“complex metabolic syndrome associated with underlying illness and characterized by loss of muscle with or without loss of fat mass. The prominent clinical feature of cachexia is weight loss in adults (corrected for fluid retention) or growth failure in children (excluding endocrine disorders). Anorexia, inflammation, insulin resistance and increased muscle protein breakdown are frequently associated with cachexia. Cachexia is distinct from starvation, age-related loss of muscle mass, primary depression, malabsorption and hyperthyroidism and is associated with increased morbidity”. The metabolic disturbances found in the cancer patient include an increased energy inefficiency, insulin resistance and altered carbohydrate metabolism, adipose tissue dissolution and hypertriglyceridemia and muscle wasting. All of these alterations have a causative role in the development of the cachexia syndrome [7,8].

The loss of body weight results from both decreased adipose tissue and muscle; however, muscle wasting should be regarded as the most important since it plays a key role in recovery from cancer cachexia. Thus, it is an important determinant of survival and muscle strength and function, central to the recovery process [9]. Muscle wasting occurs when synthesis is decreased, breakdown is increased, or a combination of events leads to a net negative balance. The regulation of skeletal muscle is managed by several transcription factors and intracellular signalling pathways (anabolic or catabolic), and a chronic imbalance in the activation of these different pathways leads to muscle wasting [10–12]. Although there are several mediators involved in the metabolic alterations linked to muscle wasting, pro-inflammatory cytokines seem to play a major role [13].

Many efforts have been involved in designing a treatment for the cachectic syndrome, but unfortunately there is not a single one fully satisfactory in reversing weight loss. The development of different therapeutic strategies has focused on two targets: counteracting anorexia and neutralizing metabolic disturbances [14]. However, providing complete nutritional requirements by way of total parenteral nutrition does not abrogate weight loss [8]. Instead, many drugs have been proposed and used in clinical trials [15,16], while others are still under investigation using experimental animals in order to revert metabolic alterations [17,18]. However, there are no effective treatments actually adopted in the clinical practice.

During the last decades several experimental models were established to study cancer cachexia [19]. However, tumour-injected animals as substitute for cancer patients have a major drawback in the omission of anti-tumour treatments that frequently complicate patient management. Such treatments might improve, do not affect, or even worsen cachexia, according to their effectiveness in getting rid of the tumour or to secondary adverse effects.

New focused cancer treatments are less toxic than traditional chemotherapy. Such therapies ought to make tumour cells more susceptible, without increasing host toxicity. From this point of view, sorafenib is a multikinase inhibitor that has shown efficacy against a wide variety of tumours in preclinical models [20] and it has been approved in humans for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma [21] and advanced renal cell carcinoma[22]. Nevertheless, Antoun

et al. [23] reported that long term administration of sorafenib is associated with muscle wasting in patients with advanced renal cell carcinoma. Recent studies showed that it inhibits cell proliferation by targeting the Raf/MEK/ERK signalling pathways and exerts an anti-angiogenic effect by inhibition of tumour angiogenesis through VEGFR and PDGFR [24,25]. Recently Yang et al. [26] reported that sorafenib treatment blocked the IL-6-dependent STAT3 phosphorylation in cancer cells. Such effect is mediated by the inhibition of STAT3 upstream kinases JAK1 and JAK2 [27]. IL-6 is a critical cytokine secreted in several cancer types, and circulating levels of this cytokine have been shown to correlate with weight loss in cancer patients and reduced survival [28,29].

The aim of the present study was to characterize the cachectic phenotype of three commonly used experimental tumours in mice treated with sorafenib, in order to provide a reliable tool for translational research.

Materials and Methods

Experimental tumour models

C57BL/6 (for LLC and B16 tumour models) or Balb/C (for C26 tumour model) mice weighing about 20 g (Harlan, Barcelona, Spain) were maintained on a regular dark-light cycle (light from 08:00 to 20:00), with free access to food and water during the whole experimental period. They were cared for in compliance with the *Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals* (ILAR 2011). The Bioethical Committee of the University of Barcelona approved the experimental protocol. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

The mice were randomized and divided into two groups, namely controls (C, n=6) and tumour bearers (TB). TB mice were inoculated alternatively subcutaneously in the back with 5×10^5 B16 or C26 cells or i.m. (hind leg) with 5×10^5 LLC cells (see below for cell expansion). TB animals were divided into two sub-groups: untreated (n=8) and treated (intragastric administration) every day with sorafenib (90 mg/kg of initial body weight; n=8). Mice were sacrificed under anaesthesia 14 days after tumour implantation. The day of sacrifice, the animals were weighed and anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine mixture (3:1; Imalgene® and Rompun® respectively). Several tissues and the tumour were rapidly excised, weighed, and frozen in liquid nitrogen.

Colon26 carcinoma (C26) and B16 melanoma (B16) cells were maintained *in vitro* in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 100 µg/mL sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The day of tumour implantation the cells were trypsinized, re-suspended in sterile saline and rapidly injected in the mice. Lewis lung carcinoma (LLC) cells were obtained from previous tumour hosts harvesting the cells in the exponential growth phase. The LLC is a cachexia-inducing, rapidly growing murine metastatic tumour composed by poorly differentiated cells, with a relatively short doubling

time. The number of lung metastases was evaluated by light microscopy after necropsy. The metastases weight was evaluated according the methodology used by Donati et al [30].

Haematocrit

Total blood was withdrawn from anaesthetized mice by cardiac puncture and collected in heparinized tubes. A drop was used to fill haematocrit capillary tubes that were centrifuged in a haematocrit centrifuge for 5 min at 800 x g.

Haematocrit was calculated as percentage of packed cell volume of the total blood.

Total physical activity

Total physical activity (IR ACTIMETER System and ACTITRAK software from Panlab, Barcelona) was determined during the last 24 hours before the sacrifice of the animals in control mice and tumour-bearing mice (both non-treated and treated with sorafenib), using activity sensors which translate individual changes in the infrared pattern caused by movements of the animals into arbitrary activity counts. For the measurements, animals remained in their home cage. A frame containing an infrared beam system was placed on the outside of the cage; this minimised the stress of the animals.

ELISA

IL-6 serum levels were detected by a commercially available mouse ELISA kit, used according to the manufacturer instructions (Diacclone, bioNova, Spain). Serum from each animal (50 µL) was assayed in duplicate. Quantitative calibration was obtained performing a standard curve with recombinant mouse IL-6.

Western Blotting

50 mg of gastrocnemius muscle were homogenized in 10 mM HEPES, pH 7.5, containing 10 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% Triton X-100, with freshly added protease and phosphatase inhibitors. Samples were then centrifuged (5 min, 3000 g), the supernatant collected as the cytosolic fraction and the pellet resuspended in 20 mM HEPES, pH 7.9, containing 25% glycerol, 500 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, pH 8.0, protease and phosphatase inhibitor and incubated on ice for 30 min. Cell debris were removed by centrifugation (5 min, 3000 g) and the supernatant (nuclear fraction) collected. Protein concentration was assayed using BSA as working standard. Equal amounts of protein (30 µg) were heat-denaturised in sample-loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol), resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The filters were blocked with Tris-buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween and 5% non-fat dry milk and then incubated overnight with antibodies directed against:

p-ERK (Tyr204), total-ERK, total-STAT3 and GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, USA), FoxO3a and p-STAT3 (Tyr705; Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), Atrogin-1 (ECM Biosciences, Versailles, KY) and the monoclonal antibody against Pax7 developed by Atsushi Kawakami, obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa). Peroxidase-conjugated IgG (Bio-Rad, Hercules, USA) was used as secondary antibody. Membrane-bound immune complexes were detected by an enhanced chemiluminescence system (Santa Cruz Biotechnology, USA) on a photon-sensitive film (Hyperfilm ECL, GE Healthcare). Protein loading was normalized according to GAPDH expression. Quantification of the bands was performed by densitometric analysis using the ImageJ software.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed by means of one-way analysis of variance (ANOVA). Statistically significant differences was analysed by post hoc Duncan test. All statistical tests were performed using SPSS version 21.

Results and Discussion

In order to ascertain the effects of sorafenib on tumour-bearing animals we used three distinct experimental models: C26 colon carcinoma, B16 melanoma and Lewis lung carcinoma (LLC). All of them are associated with a clear cachectic response. From this point of view, as can be seen in [Figure 1](#), body weight was reduced in all models as a consequence of tumour burden (23% C26, 12% B16, 24% LLC). Similar to the human condition, the reduction of body weight was associated with hypophagia in all the experimental models ([Figure 1](#)).

Treatment with the anti-tumour sorafenib-inhibitor of the MAPK cascade resulted in a huge reduction in tumour mass in the B16-bearing mice (94%) while it exerted only a small effect in the LLC (20% reduction of primary tumour mass and 98% fall of metastases number) ([Figure 2](#)). Remarkably, sorafenib had no effect on C26 tumour growth ([Figure 2](#)). The anti-tumoural treatment was able to markedly recover body weight in B16-bearing animals and also resulted in significant increases in body weight in C26 and LLC models although at a lesser extent than in the B16 model ([Figure 1](#)).

In the B16 model, sorafenib treatment increased food intake in comparison with the non-treated B16-bearing mice ([Figure 1](#)). Conversely, sorafenib treatment did not affect food intake in both the C26 and LLC models ([Figure 1](#)), suggesting that feeding behaviour mainly depends on the tumour burden rather than sorafenib administration.

Tumour growth led to a decrease in haematocrit in all the models tested, being especially marked in the B16 (56%) and the LLC (56%) mice, where the tumour mass was bigger ([Figure 1](#)). It is important to note that sorafenib administration was effective in increasing the haematocrit (as compared with the non-treated

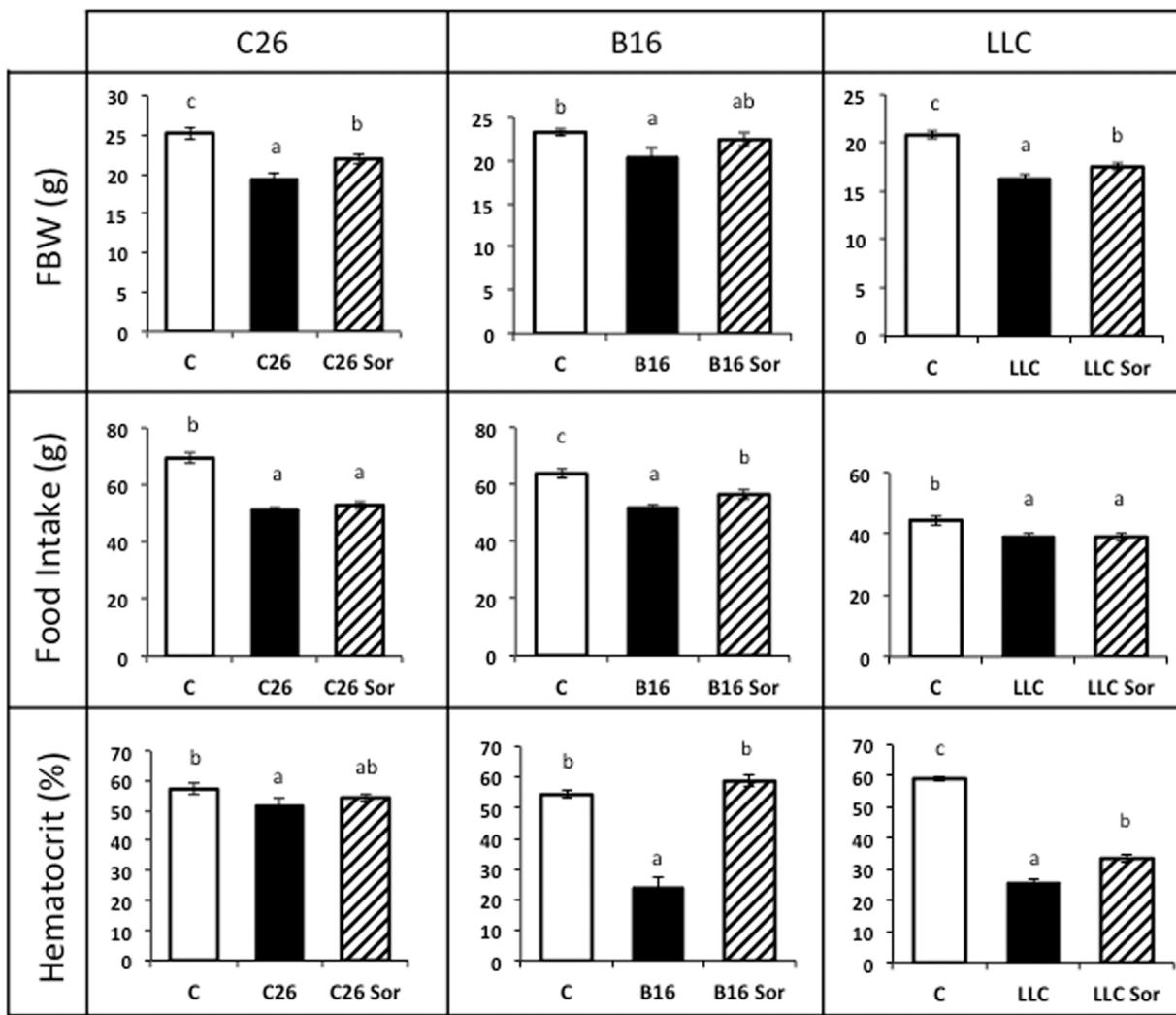


Figure 1. Body weight, food intake and haematocrit content in sorafenib-treated tumour-bearing mice. Results are mean \pm S.E.M. for 6–8 animals. Food intake represents the total ingestion (g) during the period of the experiment prior to sacrifice, which took place 14 days after tumour inoculation. Final body weight excludes the tumour weight. The haematocrit is expressed in percentage. C: animals without tumour (n=6); C26: C26 adenocarcinoma-bearing mice (n=8); C26 Sor: C26 adenocarcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); B16: B16 melanoma-bearing mice (n=8); B16 Sor: B16 melanoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); LLC: Lewis lung carcinoma-bearing mice (n=8); LLC Sor: Lewis lung carcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8). Values that are significantly different of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.g001

animals) in both the B16 and LLC models, proportionally to the reduction of tumour mass, thus linking directly the onset of anaemia with tumour burden. (Figure S1)

The decreased body weight was associated with a concomitant loss of muscle mass. As can be seen in Table 1, tumour growth promoted decreases in individual muscle weights in the three different models tested. In the case of C26, gastrocnemius (21%), tibialis (22%) and heart (13%) were decreased as a consequence of tumour growth. In the other models gastrocnemius and tibialis

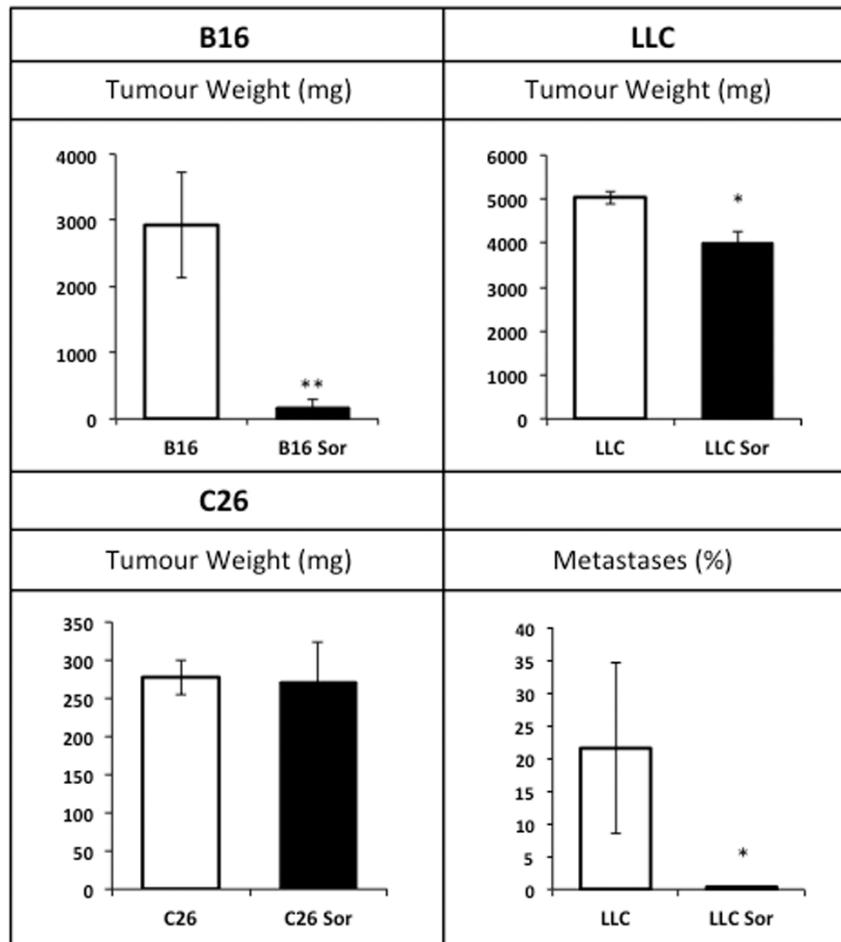


Figure 2. Tumour weights in sorafenib-treated mice. Results are mean \pm S.E.M. for 6–8 animals. Tumour weights are expressed in g. In the LLC model metastatic content is represented as % of invaded lung surface. C26: C26 adenocarcinoma-bearing mice (n=8); C26 Sor: C26 adenocarcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); B16: B16 melanoma-bearing mice (n=8); B16 Sor: B16 melanoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); LLC: Lewis lung carcinoma-bearing mice (n=8); LLC Sor: Lewis lung carcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8). Values that are significantly different of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), * p<0.05; ** p<0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.g002

were significantly reduced (18% GSN, 14% tibialis for B16; 29% GSN, 27% tibialis for LLC). No effects of tumour growth were observed in the heart neither in the B16 nor in the LLC tumour models. Sorafenib treatment had significant effects in the rescue of both gastrocnemius and tibialis mass in the C26 animal model ([Table 1](#)), despite the ineffectiveness against tumour growth. Similarly, the treatment caused a recovery of the gastrocnemius muscle in the LLC model; however it did not have any statistical effects on the tibialis muscle. Concerning the muscle, in contrast with the prevention of body weight loss, no statistically significant effects were observed in the B16 animals after sorafenib administration.

As can be seen in [Table 2](#), in addition to skeletal muscle, tumour growth determined a very important decrease in white adipose tissue mass. Indeed,

Table 1. Muscle and heart weights in sorafenib-treated tumour-bearing mice.

Tumour model	Muscle	Experimental groups			ANOVA
		C	T	T Sor	
C26	GSN	562±9 ^c	445±17 ^a	500±15 ^b	0,000
	Tibialis	192±3 ^c	149±7 ^a	168±6 ^b	0,000
	Heart	502±15 ^b	439±14 ^a	477±16 ^{ab}	0,025
B16	GSN	634±21 ^b	522±24 ^a	565±17 ^a	0,010
	Tibialis	193±8 ^b	166±8 ^a	178±8 ^{ab}	0,073
	Heart	586±31	514±21	512±25	ns
LLC	GSN	551±16 ^c	390±18 ^a	468±7 ^b	0,000
	Tibialis	189±9 ^b	138±6 ^a	157±11 ^a	0,005
	Heart	550±35	536±27	551±11	ns

Results are mean ± S.E.M. Muscle weights are expressed as mg/100 g of initial body weight. GSN: gastrocnemius muscle. C: animals without tumour (n=6); T: tumour-bearing animals (n=8); T Sor: tumour-bearing animals treated with sorafenib (n=8). Values significantly different of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.t001

cachexia is linked with muscle wasting and adipose tissue loss [6, 31]. A recent report suggests that muscle wasting is linked to the loss of adipose tissue; if fat mobilization is prevented, muscle wasting does not take place, at least in experimental animals [32]. The largest reduction is observed in the LLC-bearing animals, with losses over 90% of total tissue. Sorafenib treatment induced a rescue of adipose tissues in all the cachexia models tested, the amelioration being especially marked in the case of B16 where almost total recovery is accomplished, explaining partially the above reported discrepancy between body and muscle wasting. This observation is particularly interesting since sorafenib, despite inducing an almost complete adipose tissue recovery, exerted only negligible effects on skeletal muscle. From this point of view, the present data do not support the conclusions of Das et al. [32], since the complete recovery of adipose tissue is not sufficient to promote muscle sparing.

Table 2. White adipose weights in sorafenib-treated tumour-bearing mice.

Tumour model	Adipose	Experimental groups			ANOVA
		C	T	T Sor	
C26	WATd	684±71 ^b	29±18 ^a	285±56 ^b	0,000
	WATE	2043±172 ^b	460±129 ^a	1410±149 ^b	0,000
B16	WATd	374±38 ^b	140±29 ^a	290±13 ^b	0,000
	WATE	1554±103 ^b	811±73 ^a	1425±24 ^b	0,000
LLC	WATd	315±47 ^b	16±3 ^a	35±4 ^a	0,000
	WATE	1298±9 ^b	171±36 ^a	259±14 ^a	0,000

Results are mean ± S.E.M. Adipose weights are expressed as mg/100 g of initial body weight. WATd: White adipose tissue dorsal; WATE: White adipose tissue epididymal. C: animals without tumour (n=6); T: tumour-bearing animals (n=8); T Sor: tumour-bearing animals treated with sorafenib (n=8). Values significantly different of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.t002

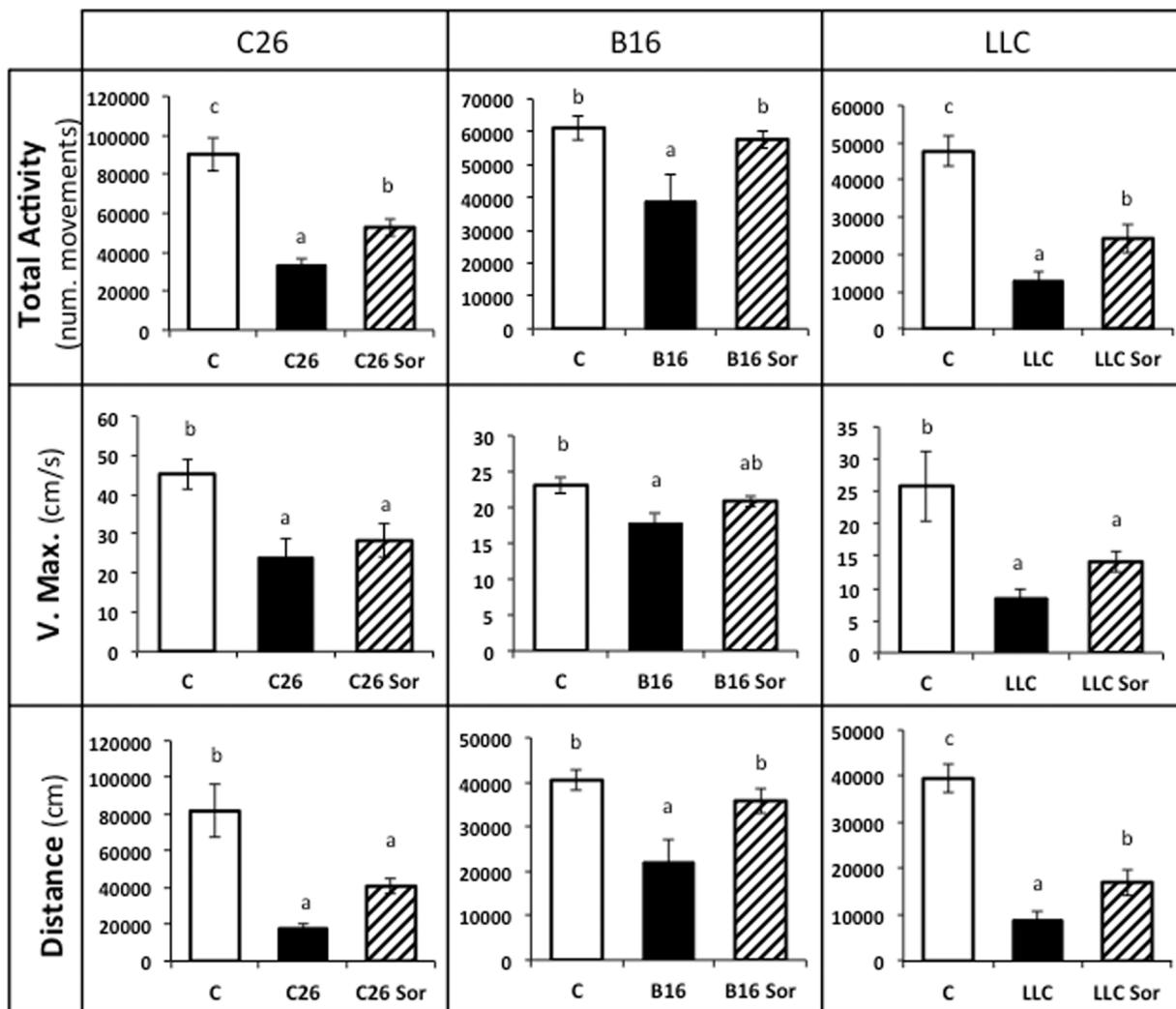


Figure 3. Kinetic parameters in sorafenib-treated tumour-bearing mice. Results are mean \pm S.E.M. for 6–8 animals. Physical activity is expressed in number of movements. Maximum velocity is expressed in cm/s. Travelled distance is expressed in cm. C: animals without tumour (n=6); C26: C26 adenocarcinoma-bearing mice (n=8); C26 Sor: C26 adenocarcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); B16: B16 melanoma-bearing mice (n=8); B16 Sor: B16 melanoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); LLC: Lewis lung carcinoma-bearing mice (n=8); LLC Sor: Lewis lung carcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8). Values that are significantly different of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.g003

Taking into consideration the fact that the rescue of muscle mass does not necessarily mean a concomitant recovery of muscle function [33], we decided to measure total physical activity as a surrogate for muscle function and behavioural adaptation. Figure 3 depicts total activity, maximum speed and distance travelled by the animals. As it can be seen, tumour burden resulted in a considerably decrease in all these parameters. The most affected animals were the LLC mice, where total activity (78%), maximum velocity (65%), and distance (82%) were reduced. Sorafenib treatment improved total physical activity in the three models studied. It is interesting to remark that the largest improvement was observed in

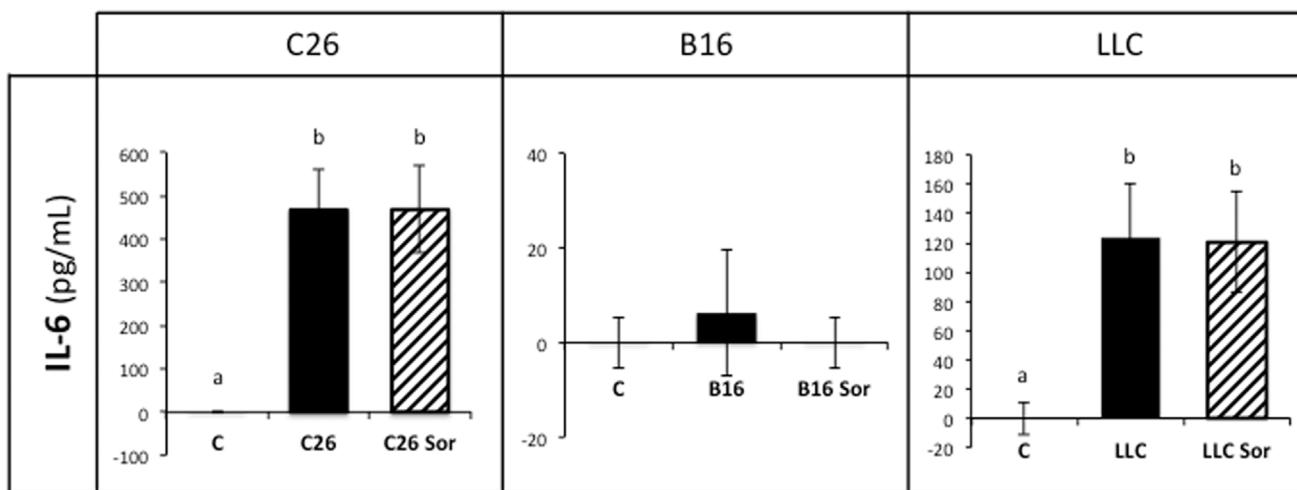


Figure 4. Circulating IL-6 levels in sorafenib-treated tumour-bearing mice. Results are mean \pm S.E.M. for 6–8 animals. IL-6 levels are expressed in pg/mL. C: animals without tumour (n=6); C26: C26 adenocarcinoma-bearing mice (n=8); C26 Sor: C26 adenocarcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); B16: B16 melanoma-bearing mice (n=8); B16 Sor: B16 melanoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8); LLC: Lewis lung carcinoma-bearing mice (n=8); LLC Sor: Lewis lung carcinoma-bearing mice treated with sorafenib (n=8). Values that are significantly different of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), statistically significant differences by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.g004

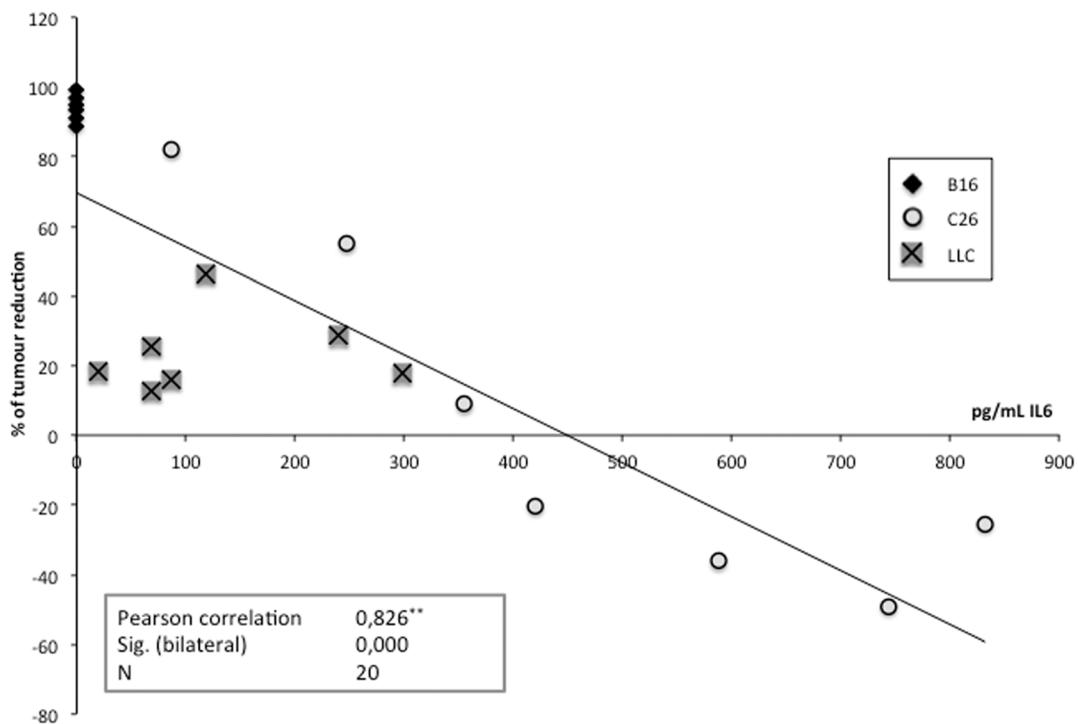


Figure 5. Correlation between the tumour reduction induced by sorafenib and the circulating IL-6 levels. N=20 (B16, n=6; C26, n=7; LLC, n=7). Pearson Correlation. ** Correlation is statistically significant at 0,01 level (bilateral).

doi:10.1371/journal.pone.0113931.g005

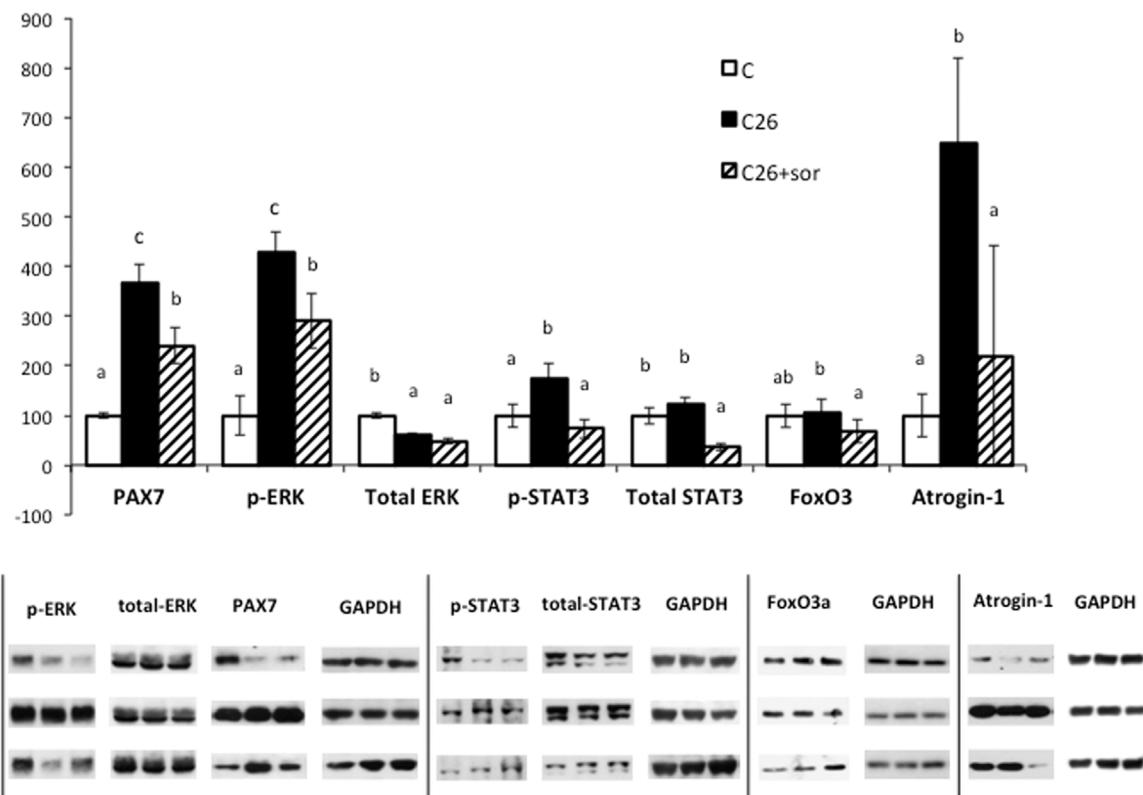


Figure 6. Intracellular signals of skeletal muscle (gastrocnemius) in sorafenib-treated mice bearing the C26 adenocarcinoma. Results are mean \pm S.E.M. C: animals without tumour; C26: C26 carcinoma-bearing mice; C26+sor: C26 adenocarcinoma-bearing mice treated with sorafenib. Values that are significantly different of the results by one-way analysis of variance (ANOVA), statistically significant difference by post hoc Duncan test. Different letters in superscript indicate significant differences between groups.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.g006

the B16 model, precisely where sorafenib treatment was not able to fully revert muscle wasting. Therefore, some other factors must be taken into consideration for explaining the improvement in total activity, including the reduction of the tumour mass. It is possible to speculate that animal activity does not rely on the muscle mass alone, rather depending also on the energy availability (fat included) and the presence of anaemia, a clear limiting factor for physical activity. Sorafenib treatment also improved maximum velocity in the LLC model ([Figure 3](#)). Concerning the distance travelled, the treatment improved this parameter in all the models tested, independently from the distinct effect exerted on tumour burden.

In order to explain the mechanisms accounting for the tumour-independent sorafenib effects, we determined the circulating concentrations of IL-6, a cytokine that has been reported to be affected by sorafenib, which reduces its release [26]. Interestingly, in both C26 and LLC-bearing mice, where the levels of IL-6 are high as a consequence of tumour growth, sorafenib did not lower the cytokine concentration, suggesting that sorafenib effects do not directly rely on IL-6

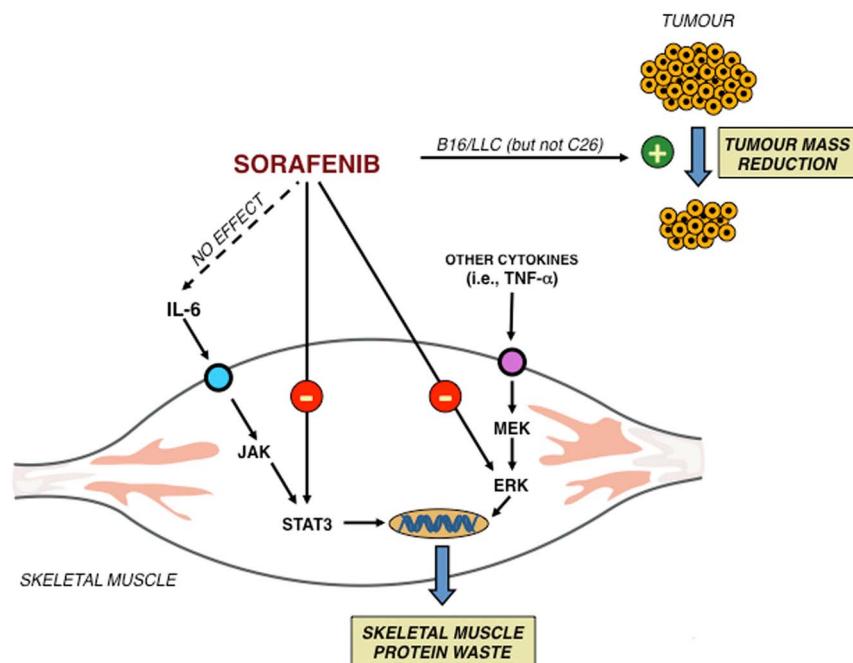


Figure 7. Possible intracellular pathways linked with sorafenib action in skeletal muscle.

doi:10.1371/journal.pone.0113931.g007

inhibition (Figure 4). It has to be pointed out that muscle IL-6 concentration could be altered by the treatment; differences in receptor content are another possibility. Unfortunately, we have not assessed these possibilities. However, it is interesting to point out that the anti-tumour effect of sorafenib was stronger when IL-6 circulating levels were low, as in the B16-bearing mice, existing a good correlation between the degree of tumour reduction and the concentration of IL-6 (Figure 5) in the different models tested. It seems, therefore, that sorafenib anti-tumour action is more effective in low IL-6 conditions.

In order to further investigate the mechanisms by which sorafenib exerts its effects, we determined the intramuscular concentration and activation state of several proteins that might be involved in the sorafenib action. As far as we are concerned, there are no reports suggesting a direct kinase-inhibiting action of sorafenib in the skeletal muscle. For this part of the study we only used the C26 model, since in this setting, despite the absence of drug effects on tumour burden, sorafenib improved both muscle weight and activity parameters. The results depicted in Figure 6 show that tumour growth resulted in a significant nuclear accumulation of Pax7, a protein involved in muscle regeneration [34,35], concomitant with the hyperactivation of the kinases ERK and STAT3, that were reported to be critical for the onset of muscle wasting in C26 mice [34–36]. Surprisingly, sorafenib significantly decreased the concentration of Pax7 and the activation of the above-mentioned kinases. Consistent with previous observations showing that ERK inhibition prevented the activation of the ubiquitin ligase

atrogin-1 [34], sorafenib administration was able to reduce the atrogin-1 protein accumulation in C26 mice (Figure 6), likely limiting the catabolic stimulus. Such effect seems independent from the activation of the transcription factor FoxO3a, as the nuclear (i.e. active) levels of the protein did not change in C26 mice and slightly decreased in sorafenib-treated C26 animals, confirming that the Akt/FoxO pathway is not involved in the onset of muscle wasting [37], at least in this experimental setting. These results suggest that sorafenib exerts its anti-cachectic action directly on the muscle by inhibiting either the STAT3 or ERK pathways, independently from IL-6 serum levels (Figure 7). Recent observations point out the suppressive role played by STAT3 in satellite cell-mediated muscle regeneration [38,39] and, consistently, the anti-cachectic action exerted by sorafenib is stronger in the experimental model of cachexia where muscle regeneration is more affected.

In conclusion, the results presented here reinforce the idea that sorafenib is an efficient drug for the treatment of tumours in addition to being a candidate for anti-cachectic therapy. This is based on the fact that any reduction in tumour mass results in a reduction in cachexia and also in the fact that, even without affecting the tumour, it does behave as an anti-cachectic molecule, as observed in the C26 tumour model. Yet, previous studies actually conclude that sorafenib *per se* induces wasting [23,40]; therefore further studies in this field are needed and might lead to a new promising drug combination for the treatment of cachexia.

Supporting Information

Figure S1. Correlation between tumour mass (expressed as % of the mean) and haematocrit in the three tumour models. Pearson analysis shows a significant correlation of tumour versus haematocrit in B16 (Pearson $r=0.789$; $p=0.004$, $n=12$) and a tendency in LLC (Pearson $r=0.526$; $p=0.065$, $n=13$). No correlation is present in C26 (Pearson $r=0.120$; $p=0.6$, $n=14$).

[doi:10.1371/journal.pone.0113931.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113931.s001) (TIF)

Acknowledgments

FP was an AIRC/Marie Curie fellow when the study was performed. We are very thankful to both Bayer and Dr. Carrera for the generous supply of sorafenib.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MT FP SB FJLS JMA. Performed the experiments: MT FP SB. Analyzed the data: MT FP SB FJLS JMA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MT FP SB FJLS JMA. Wrote the paper: MT FP SB FJLS JMA.

References

1. Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, Bellantone R, Rossi Fanelli F (2006) Prevention and treatment of cancer cachexia: new insights into an old problem. *Eur J Cancer* 42: 31–41. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314085>.
2. Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ (n.d.) The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. *CA Cancer J Clin* 57: 225–241. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626119>. Accessed: 2013 Dec 15.
3. Moses AWG, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KCH (2004) Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer* 90: 996–1002. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409623&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2013 Dec 15.
4. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, et al. (1980) Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med* 69: 491–497.
5. Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, et al. (2010) Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clinical nutrition* (Edinburgh, Scotland). Vol. 29. pp. 154–159. doi:10.1016/j.clnu.2009.12.004
6. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, et al. (2008) Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 27: 793–799. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718696>. Accessed: 2013 Nov 11.
7. Argilés JM, Alvarez B, López-Soriano FJ (1997) The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev* 17: 477–498. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276862>.
8. Ng EH, Lowry SF (1991) Nutritional support and cancer cachexia. Evolving concepts of mechanisms and adjunctive therapies. *Hematol Oncol Clin North Am* 5: 161–184. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902829>. Accessed: 2013 Dec 15.
9. Wolfe RR (2006) The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 84: 475–482. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960159>.
10. Hasselgren PO, Fischer JE (2001) Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg* 233: 9–17. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1421177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2014 Mar 13.
11. Skipworth RJE, Stewart GD, Ross JA, Guttridge DC, Fearon KCH (2006) The molecular mechanisms of skeletal muscle wasting: implications for therapy. *Surgeon* 4: 273–283. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009546>. Accessed: 2013 Dec 15.
12. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M (2013) Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 280: 4294–4314. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517348>. Accessed: 2014 May 2.
13. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ (2009) The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 3: 263–268. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713854>. Accessed: 2013 Nov 27.
14. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S (2012) Mechanisms and treatment of cancer cachexia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*: 1–6. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749678>. Accessed: 2013 Nov 20.
15. Macciò A, Madeddu C, Gramignano G, Mulas C, Floris C, et al. (2012) A randomized phase III clinical trial of a combined treatment for cachexia in patients with gynecological cancers: evaluating the impact on metabolic and inflammatory profiles and quality of life. *Gynecol Oncol* 124: 417–425. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198049>. Accessed: 2014 May 22.
16. Greig CA, Johns N, Gray C, Macdonald A, Stephens NA, et al. (2014) Phase I/II trial of formoterol fumarate combined with megestrol acetate in cachectic patients with advanced malignancy. *Support Care Cancer*. doi:10.1007/s00520-013-2081-3.
17. Busquets S, Toledo M, Orpí M, Massa D, Porta M, et al. (2012) Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 3: 37–43. Available: <http://www.pubmedcentral>.

- nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3302990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract. Accessed: 2013 Nov 22.
- 18. Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, et al. (2010) Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 142: 531–543. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723755>.
 - 19. Murphy KT, Chee A, Trieu J, Naim T, Lynch GS (2012) Importance of functional and metabolic impairments in the characterization of the C-26 murine model of cancer cachexia. *Dis Model Mech* 5: 533–545. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3380716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2014 May 22.
 - 20. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, et al. (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64: 7099–7109. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466206>. Accessed: 2013 Dec 15.
 - 21. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, et al. (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359: 378–390. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650514>. Accessed: 2014 Jan 22.
 - 22. Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, Williams G, et al. (2006) Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 7271–7278. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189398>. Accessed: 2014 Jan 22.
 - 23. Antoun S, Birdsell L, Sawyer MB, Venner P, Escudier B, et al. (2010) Association of skeletal muscle wasting with treatment with sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma: results from a placebo-controlled study. *J Clin Oncol* 28: 1054–1060. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085939>. Accessed: 2013 Nov 11.
 - 24. Chai H, Luo AZ, Weerasinghe P, Brown RE (2010) Sorafenib downregulates ERK/Akt and STAT3 survival pathways and induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line. *Int J Clin Exp Pathol* 3: 408–415. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2872747&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2013 Dec 15.
 - 25. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, et al. (2006) Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 66: 11851–11858. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178882>. Accessed: 2013 Dec 13.
 - 26. Yang F, Jove V, Buettner R, Xin H, Wu J, et al. (2012) Sorafenib inhibits endogenous and IL-6/S1P induced JAK2-STAT3 signaling in human neuroblastoma, associated with growth suppression and apoptosis: 534–541.
 - 27. Yang F, Brown C, Buettner R, Hedvat M, Starr R, et al. (2010) Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3. *Mol Cancer Ther* 9: 953–962. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2852467&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2014 Oct 21.
 - 28. Scott HR, McMillan DC, Crilly A, McArdle CS, Milroy R (1996) The relationship between weight loss and interleukin 6 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 73: 1560–1562. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2074552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2013 Dec 15.
 - 29. Moses AGW, Maingay J, Sangster K, Fearon KCH, Ross JA (2009) Pro-inflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced pancreatic cancer: relationship to acute phase response and survival. *Oncol Rep* 21: 1091–1095. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19288013>. Accessed: 2013 Dec 15.
 - 30. Donati MB, Mussoni L, Poggi A, De Gaetano G, Garattini S (1978) Growth and metastasis of the Lewis lung carcinoma in mice defibrinated with batroxobin. *Eur J Cancer* 14: 343–347. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/633037>. Accessed: 2014 Jan 9.
 - 31. Fouladioun M, Körner U, Bosaeus I, Daneryd P, Hyltander A, et al. (2005) Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care—correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer* 103: 2189–2198. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822132>. Accessed: 2013 Dec 18.
 - 32. Das SK, Eder S, Schauer S, Diwoky C, Temmel H, et al. (2011) Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science* 333: 233–238. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680814>. Accessed: 2013 Nov 14.

33. Hulmi JJ, Oliveira BM, Silvennoinen M, Hoogaars WMH, Pasternack A, et al. (2013) Exercise restores decreased physical activity levels and increases markers of autophagy and oxidative capacity in myostatin/activin-blocked mdx mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 305: E171–82. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23695214>. Accessed: 2014 Jan 28.
34. Penna F, Costamagna D, Fanzani A, Bonelli G, Baccino FM, et al. (2010) Muscle wasting and impaired myogenesis in tumor bearing mice are prevented by ERK inhibition. PLoS One 5: e13604. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2965098&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2014 Jan 9.
35. He WA, Berardi E, Cardillo VM, Acharyya S, Aulino P, et al. (2013) NF- κ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. J Clin Invest 123: 4821–4835. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3809785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2014 Feb 5.
36. Bonetto A, Aydogdu T, Kunzevitzky N, Guttridge DC, Khuri S, et al. (2011) STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. PLoS One 6: e22538. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3140523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed: 2014 Jan 14.
37. Penna F, Bonetto A, Muscaritoli M, Costamagna D, Minero VG, et al. (2010) Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? Int J Cancer 127: 1706–1717. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20039316>. Accessed: 2014 May 28.
38. Tierney MT, Aydogdu T, Sala D, Malecova B, Gatto S, et al. (2014) STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. Nat Med 20: 1182–1186. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25194572>. Accessed: 2014 Sep 8.
39. Price FD, von Maltzahn J, Bentzinger CF, Dumont NA, Yin H, et al. (2014) Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. Nat Med 20: 1174–1181. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25194569>. Accessed: 2014 Sep 8.
40. Prado CMM, Antoun S, Sawyer MB, Baracos VE (2011) Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 14: 250–254. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415735>. Accessed: 2013 Dec 5.

PUBLICACIÓ 10

A multifactorial anticachectic approach for cancer cachexia in a rat model undergoing chemotherapy

Míriam Toledo, Fabio Penna, Francesc Oliva, Melania Luque, Angelica Betancourt, Enrica Marmonti, Francisco J. López-Soriano, Josep M. Argilés and Sílvia Busquets

Acceptat a la revista Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle

L'eficàcia dels fàrmacs destinats a contrarestar la caquèxia cancerosa generalment són testats en models experimentals preclínics, on es tenen en compte només les alteracions induïdes pel tumor, amb exclusió de la co-presència de molècules antitumorals que podrien empitjorar i/o interferir amb el tractament. L'objectiu d'aquesta investigació ha estat avaluar l'eficàcia d'un tractament multifactorial, incloent formoterol i acetat de megestrol (AM), en rates caquèctiques portadores del tumor Yoshida AH-130 les quals reben també un tractament de quimioteràpia (sorafenib). El tractament amb sorafenib (90 mg/kg) de rates portadores de tumor caquètic provoca una important disminució en el contingut de les cèl·lules tumorals a causa d'una reducció de la proliferació cel·lular i augment de l'apoptosi. Com a conseqüència d'això, la supervivència dels animals millora significativament, mentre la presència de caquèxia persisteix. El tractament multifactorial utilitzant formoterol i AM va ser altament eficaç en la prevenció de la pèrdua de massa muscular, i va tenir efectes més potents que l'administració simple només de formoterol. A més, tant l'activitat física com la força d'agafada van millorar significativament en comparació amb els animals portadors de tumor no tractats. Els efectes del tractament multifactorial inclouen l'augment de la ingestió d'aliments (probablement a causa l'AM) i la disminució de la degradació de proteïnes, com es mostra per la reducció de l'expressió de gens associats als sistemes proteolítics del proteasoma i de la calpaïna. La combinació dels dos fàrmacs doncs, apunta a ser una estratègia prometedora per al tractament de la caquèxia cancerosa en un entorn preclínic que millor s'assembla a la situació clínica, fet que proporciona una sòlida

justificació per a l'ús d'aquesta combinació en assaigs clínics amb pacients caquèctics amb càncer.

A MULTIFACTORIAL ANTICACHECTIC APPROACH FOR CANCER CACHEXIA IN A RAT MODEL UNDERGOING CHEMOTHERAPY

Míriam Toledo¹, Fabio Penna¹, Francesc Oliva³, Melania Luque¹, Angelica Betancourt¹, Enrica Marmonti¹, Francisco J. López-Soriano^{1,2}, Josep M. Argilés^{1,2} and Sílvia Busquets^{1,2}

¹Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,
Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

³Departament d'Estadística, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Background: The effectiveness of drugs aimed at counteracting cancer cachexia is generally tested in preclinical rodent models where only the tumour-induced alterations are taken into account, excluding the co-presence of anti-tumour molecules that could worsen the scenario and/or interfere with the treatment.

Methods: The aim of the present investigation has been to assess the efficacy of a multifactorial treatment, including formoterol and megestrol acetate, in cachectic tumour-bearing rats (Yoshida AH-130, a highly cachectic tumour) undergoing chemotherapy (sorafenib).

Results: Treatment of cachectic tumour-bearing rats with sorafenib (90 mg/kg) causes an important decrease in tumour cell content due to both reduced cell proliferation and increased apoptosis. As a consequence, animal survival significantly improves, while cachexia occurrence persists. Multifactorial treatment using both formoterol and megestrol acetate is highly effective in preventing muscle wasting and has more powerful effects than the single formoterol administration. In addition, both

physical activity and grip strength are significantly improved as compared with the untreated tumour-bearing animals. The effects of the multifactorial treatment include increased food intake (likely due to megestrol acetate) and decreased protein degradation, as shown by the reduced expression of genes associated with both proteasome and calpain proteolytic systems.

Conclusions: The combination of the two drugs proved to be a promising strategy for treating cancer cachexia in a preclinical setting that better resembles the human condition, thus providing a strong rationale for the use of such combination in clinical trials involving cachectic cancer patients.

Address for correspondence:

Dr. Sílvia Busquets, Cancer Research Group,
Departament de Bioquímica i Biología
Molecular, Facultad de Biología, Universitat de
Barcelona, Diagonal 645, 08028-Barcelona,
Spain. Telephone: 34-934034609 / telefax: 34-
934021559 / e-mail: silviabusquets@ub.edu

Keywords: cancer cachexia, skeletal muscle, sorafenib, tumour and chemotherapy

INTRODUCTION

The percentage of cachexia in cancer patients is quite high: 50 to 80% [1], and is a useful tool for survival prediction, being held responsible for more than 20% of the deaths of cancer patients [1]. It is directly responsible for a reduction in physical activity [2] and quality of life and decreases the efficacy and outcome of anticancer therapy [3,4]. In an international consensus [5], cachexia was defined as a “complex metabolic syndrome associated with underlying illness and characterized by loss of muscle with or without loss of fat mass”. The prominent clinical feature of cachexia is weight loss in adults (corrected for fluid retention) or growth failure in children (excluding endocrine disorders). Anorexia, inflammation, insulin resistance and increased muscle protein breakdown are frequently associated with cachexia. Cachexia is distinct from starvation, age-related loss of muscle mass, primary depression, malabsorption and hyperthyroidism and is associated with increased morbidity”[5].

The loss of weight is due to a reduction of adipose tissue and muscle, but muscle wasting is the key factor in the cancer cachexia outcome. Therefore it determines the survival and muscle strength and function, the pillar of the recovery process [6].

There have been many approaches and strategies to treat the cachexia syndrome, but none of them totally reverses the weight loss. Those strategies have basically two targets: counteracting anorexia and neutralizing metabolic disturbances [7,8]. Many drugs are being developed and tested in clinical trials, but none of these treatments are efficient enough to be applied in clinical practice [9].

The study of cancer cachexia is mainly based on experimental models (tumour injected

animals) not undergoing the same antitumoural treatments as in humans, therefore it is difficult to translate the experimental results to humans: on one hand, anticancer treatments have side effects that can worsen cachexia, while on the other hand the reduction of tumour mass can mask or delay the appearance of cachexia. Indeed, in experimental conditions, cachexia occurs within days or few weeks after tumour injection, while cancer cachexia in humans is often a chronic process.

Regarding antitumoural therapy, many significant advances have been made in cancer management with the development and introduction of new targeted-agents, replacing non-targeted highly toxic chemotherapies. Such therapies make tumour cells more susceptible, without substantially increasing toxicity. However, several studies in humans demonstrated that weight loss associated to cancer was related to toxicity from treatment, anaemia and shorter survival [10,11]. Prado et al. [10] focused on body composition as a potential determinant of toxicity in response to commonly used antineoplastic agents. They emphasised the importance to establish an adjustment of the antitumoural treatment for lean body mass, due the relationship between severe skeletal muscle depletion and excess toxicity during chemotherapy. Indeed, Antoun et al. [12] reported that muscle loss was specifically exacerbated by sorafenib treatment and described it as an adverse effect of the drug related to asthenia, fatigue, and physical disability. Sorafenib is a multikinase inhibitor that showed efficacy against a wide variety of tumours in preclinical models [13]; it inhibits cell proliferation by targeting the Raf/MEK/ERK signalling pathways and exerts an anti-angiogenic effect by inhibition of tumour angiogenesis through VEGFR and PDGFR

[14,15]. It is already approved in humans for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma [16] and advanced renal cell carcinoma [17]. Common side effects of sorafenib are cutaneous like hand-foot syndrome or rash and gastrointestinal like diarrhoea or nausea as well as alopecia and fatigue. These side effects limit patient's ability to receive full-dose sorafenib treatment [18,19].

Patient's ability to tolerate anticancer therapy will, in turn, be affected by their nutritional status preceding treatment, and it will determine the success of the therapy. So, nutritional support has to be considered rather as part of the oncological treatment than as a separated action [20]. In spite of this, several studies demonstrated that nutritional strategies are not sufficient to reverse the cachectic syndrome. The use of total parenteral nutrition does not abolish weight loss (8). This points out the need that, any therapeutic approach based on increasing food intake has to be combined with a pharmacological strategy to counteract metabolic changes.

One of the drugs most commonly used in cachexia is megestrol acetate due to its high efficacy and safety profile, as confirmed in multiple clinical trials [21,22]. Megestrol acetate is a synthetic derivative of progesterone and has been described as a potent appetite stimulant as well as promoting weight gain. However, this gain had been mainly attributed to an increased fat mass, not to muscle mass and had no evidences of benefit in terms of quality of life or survival [23,24]. The mechanisms of megestrol acetate responsible for contributing to increase body weight in cachectic patients are not completely clear, but some studies showed that, in addition to stimulating appetite, it also had effect on both metabolic and inflammatory mechanisms [25,26]. Concerning skeletal

muscle, previous studies performed in our laboratory in experimental animals, showed a clear anabolic effect of megestrol acetate in skeletal muscle. Thereby, Busquets et al. [27] demonstrated that administration of megestrol acetate to tumour-bearing rats resulted in an important reversal of the muscle wasting process, as reflected by individual muscle weights. The mechanism for this effect seems to be, at least, partially explained by the ability of the drug to block the enhanced proteolysis associated with muscle wasting during cancer cachexia. In fact, the drug also acted improving appetite as well as enhancing physical performance and muscle strength. In another study Toledo et al. [28] observed that administration of megestrol acetate to cachectic tumour-bearing rats caused increased incorporation of orally administered labelled ¹⁴C-leucine into muscle protein, without altering the *in vivo* rate of the amino acid oxidation, suggesting that MA treatment is able to increase protein synthesis during cancer cachexia.

With regard to finding a pharmacological strategy to counteract metabolic changes, our laboratory introduced the use of formoterol -- a highly potent β_2 -adrenoceptor-selective agonist -- as possible drug for the treatment of cachexia [29]. The administration of beta-adrenergic agonists had been related with hypertrophy of skeletal muscles [30–33]. Formoterol combines the clinical advantages of the rapid onset with the duration of the action and it is currently in use in humans for the treatment of bronchospasm associated with asthma [34]. In animal models, data from our laboratory demonstrated that formoterol had important anti-cachectic effects [29]. The mode of action of this drug is based on its ability to prevent muscle wasting by inhibiting proteolysis and apoptosis in skeletal muscle. Thereby, formoterol decreased

the activation of the ubiquitin-dependent proteolytic system, the main mechanism activated in muscle wasting conditions, as well as decreased muscle apoptosis in tumour bearing animals [29,35]. The anti-wasting effects of the drug were also observed in terms of total physical activity and grip force, thus resulting in an improvement in physical performance in cachectic tumour-bearing rats [36].

Bearing all this in mind, the aim of the present investigation was to assess the efficacy of a multifactorial treatment, including formoterol and megestrol acetate, in cachectic tumour-bearing rats undergoing chemotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Animals

5 weeks old male Wistar rats (Harlan, Barcelona, Spain) were housed in individual cages and maintained at a constant temperature of 22 ± 2 °C with a regular light-dark cycle (light from 08:00 a.m. to 08:00 p.m.) and free access to food and water. Experimental cachexia was obtained through i.p. injection of 10^8 AH-130 Yoshida ascites hepatoma cells obtained from exponential tumours as described previously [37]. The food intake was measured daily. The Bioethical Committee of the University of Barcelona approved the experimental protocol. All animal manipulations were made in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals [38].

Experimental Design

Four distinct experiments were performed in order to: (I) test the action of anti-tumour drug (sorafenib, Sor) on Yoshida AH-130 ascites hepatoma cells (II) test the effectiveness of the anti-cachectic agent formoterol (F) in tumour-bearing (TB) rats either receiving chemotherapy

(Sor) or not; (III) compare the survival of untreated with Sor-treated TB rats; (IV) test the effectiveness of combined chronic (20 days) administration of F and megestrol acetate (MA) against cachexia in Sor-treated TB rats.

Experiment I: TB animals were divided into two groups, untreated and treated daily with Sor (90 mg/kg body weight, intragastrically (i.g.), from day 2 after tumour injection). On days 3, 5, 7, 9 and 11, 100 µl of ascites was extracted from each animal and cells were analysed by flow cytometry (see below).

Experiment II: the animals were divided into two groups, namely controls (C) and TB. Both groups were further divided into four subgroups: untreated (vehicle administered), treated with F (0,3 mg/kg body weight, subcutaneous (s.c.), daily), treated with Sor (90 mg/kg body weight, intragastrically (i.g.), daily from day 2 after tumour injection) and treated with both drugs. 10 days after tumour transplantation, the animals were weighted and anaesthetized with an i.p. injection of ketamine/xylazine mixture (3:1) (Imalgene® and Rompun® respectively). Tumour volume and total cell number were assessed at the day of sacrifice. Tissues were rapidly excised, weighted, and frozen in liquid nitrogen.

Experiment III: TB animals were divided into two groups, untreated and treated with Sor (see above). The untreated group was administered with the corresponding volume of solvent. The treatment was stopped at day 20 after tumour inoculation in order to observe tumour relapse.

Experiment IV: the animals were divided into four groups, one C group (untreated and non-TB) and three TB groups. The latter three groups were treated from day 2 after tumour inoculation with Sor (see above). As for the anti-cachectic treatments, one TB group was administered the vehicle, one treated with F (see above) and the last TB group was treated with F and MA (100

mg/Kg body weight, i.g., daily). The animals were sacrificed 20 days after tumour injection as previously stated.

Flow cytometry

The DNA distribution/cell cycle analysis was performed in AH-130 cells obtained from alternate day paracentesis in TB rats. Briefly, cells were washed in phosphate buffer solution (PBS), fixed in ice-cold 70% ethanol for at least 30 min, incubated at room temperature in PBS containing DNase-free RNase and propidium iodide at the final concentrations of 0.4 mg/mL and 10 µg/mL, respectively. Cells were then analysed using a Beckman Coulter Epics XL flow cytometer. Data were then analysed with the WinCycle software (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). The percentage of apoptotic cells was assessed by evaluating the accumulation of cells having a <2n DNA content.

Blood haematochemical assays

Plasma albumin, triacylglycerides, glucose and lactate were analysed by METROLAB 2300 (RAL S.A., Barcelona, Spain), a chemistry analyser that is based on the analysis of colorimetric reactions.

Biochemicals

Sorafenib was obtained from GENTAUR (Kampenhout, Belgium), formoterol was kindly provided by Industriale Chimica s.r.l. (Saronno, Italy) and megestrol acetate was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA from gastrocnemius muscle was extracted by TriPureTM kit (Roche, Barcelona, Spain), a commercial modification of the acid guanidinium isothiocyanate/phenol/chloroform method [39]. Reverse transcription (RT) reactions

were prepared using by First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche, Barcelona, Spain) following the manufacturer's instructions. Analysis of mRNA levels for the genes from the different proteolytic systems was performed with primers designed to detect the following gene products: ubiquitin (FORWARD 5' GAT CCA GGA CAA GGA GGG C 3', REVERSE 5' CAT CTT CCA GCT GCT TGC CT3'); E2 (FORWARD: 5' AGG CGA AGA TGG CGG T 3'; REVERSE 5' TCA TGC CTG TCC ACC TTG TA 3'); C8 proteasome subunit (FORWARD 5' AGA CCC CAA CAT GAA ACT GC 3'; REVERSE 5' AGG TTT GTT GGC AGA TGC TC 3'); C2 proteasome subunit (FORWARD: 5' GTTCCATTGGGATTGTTGG 3'; REVERSE: 5' TGTTCCATTGGTTCATCAGC 3'); MuRF-1 (FORWARD 5' TGT CTG GAG GTC GTT TCC G 3'; REVERSE 5' ATG CCG GTC CAT GAT CAC TT 3'); Atrogin-1 (FORWARD 5' CCA TCA GGA GAA GTG GAT CTA TGT T 3'; REVERSE 5' GCT TCC CCC AAA GTG CAG TA 3'); m-calpain (FORWARD 5' TTG AGC TGC AGA CCA TC 3'; REVERSE 5' GCA GCT TGA AAC CTG CTT CT 3'), cathepsin B (FORWARD 5' CTG CTG AGG ACC TGC TTA C 3'; REVERSE 5' CAC AGG GAG GGA TGG TGT A 3') and hmbs (FORWARD 5' TGC CAG AGA AAA GTG CCG TGG G 3'; REVERSE 5' TGC AGC TCA TCC AGC TTC CGT 3'). To avoid the detection of possible contamination by genomic DNA, primers were designed in different exons. The real-time PCR was performed using a commercial kit (LightCycler™ 480 SYBR Green I Master, Roche, Barcelona, Spain). The relative amount of all mRNA was calculated using comparative C_T method. Hmbs (Hydroxymethylbilane synthase) mRNA was used as the invariant control for all studies.

Total physical activity

Total physical activity (IR ACTIMETER System and ACTITRAK software from Panlab, Barcelona) was assessed during the last 24 hours prior sacrifice of the animals in different experimental groups, using activity sensors that translate individual changes in the infrared pattern caused by movements of the animals into arbitrary activity counts [40]. For the measurements, animals remained in their home cage. A frame containing an infrared beam system was placed on the outside of the cage; this minimised stress to the animals.

Grip force assessment

Skeletal muscular strength in rats was quantified by the grip-strength test [40]. The grip-strength device (Panlab-Harvard Apparatus, Spain) comprised a pull bar connected to an isometric force transducer (dynamometer). Basically, the grip strength meter was positioned horizontally and the rats are held by the tail and lowered towards the device. The animals are allowed to grasp the bar and were then pulled backwards in the horizontal plane. The force applied to the bar just before it lost grip was recorded as the peak tension. At least three measurements were taken per rat and the results were averaged for analysis. The data are presented as g/g initial body weight.

Statistical analysis

Average (arithmetic mean) and standard error (SE) were calculated for each studied variable. In Experiment I a mixed model with repeated measures (longitudinal design) was performed. In Experiment II and IV, intergroup differences were evaluated statistically using analysis of variance (ANOVA); Experiment II: three-way ANOVA (fixed factors: tumour, sorafenib treatment and formoterol treatment) and

Experiment IV: one-way ANOVA with four levels. *Post hoc* pairwise comparisons (Duncan test) were performed when appropriated. In Experiment III Survival curves were computed with the Kaplan-Meier method, and differences in survival were validated with Log-rank test (Mantel-Cox). All statistical tests were performed using SPSS version 21.

RESULTS AND DISCUSSION

The majority of studies involving anticachectic therapies are performed in tumour-bearing animals not subjected to any antitumoral treatment. This fact may interfere with the translation of the results to human subjects since in the clinical practice antitumoral treatment is given as soon as cancer is diagnosed. For this reason in the present study we adopted a well-established cachexia model (rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma) and added the administration of a new generation antitumour drug, sorafenib [17].

The flow cytometry analysis of cell cycle phases in alternate-day tumour samples (Figure 1) showed that sorafenib has a bimodal action; a rapid (3 days after the first administration) exit from the cell cycle (reduced S and increased G0/G1 phase) was followed by a strong increase of G2/M arrest and apoptosis, suggesting that sorafenib is both an inhibitor of cell proliferation and an inducer of cell death.

10 days after tumour inoculation the cellularity in sorafenib-treated animals was reduced by 63% (Figure 1B). Formoterol treatment did not result in any changes of tumour cell content, as previously described [29]. Bearing in mind the strong antitumoral action of sorafenib, one would expect a consequent and consistent reduction of cachexia appearance. This was not the case, since sorafenib treatment was not free from side

effects, such as hypophagia, even detectable in control (non tumour-bearing) animals (Table 1).

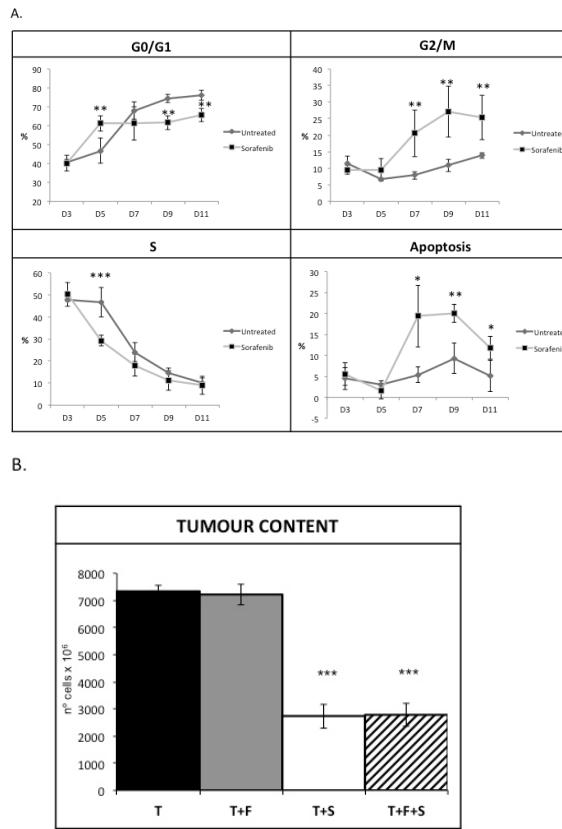


Figure 1. Effects of sorafenib on tumour cell cycle status and content in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. A) Cytometric analysis of the cell cycle distribution of AH-130 cells harvested every other day in both untreated and sorafenib-treated TB rats. A mixed-model with repeated measures (factor days) was used to test the differences between sorafenib-treated and untreated rats over time. A first order autoregressive covariance structure AR(1) was chosen, according to AIC (Akaike Information Criterion) and BIC (Bayesian Information Criterion). Significant differences detected between treatments along the days in all phases (G_0/G_1 , S, G_2/M and apoptosis, results in the supplemental data, table 2). The average values of population percentages at G_0/G_1 , S, G_2/M and apoptosis phases are shown as mean \pm SE from five animals per group. Pairwise comparisons for each day, significant differences noted as: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. B) Tumour cell content was assessed on day 10 after tumour inoculation. Results are mean \pm SE for 8 animals per group. T: tumour-bearing rats; T+S: treated with sorafenib; T+F: treated with formoterol; T+F+S: treated with both formoterol and sorafenib. Statistical significance of the results by two-way ANOVA: sorafenib treatment ($p < 0.001$), formoterol treatment ($p = 0.86$), non-significant interaction between factors ($p = 0.64$).

However, sorafenib administration did not further reduce the food intake observed in tumour-bearing animals, likely resulting from the

combination of an attenuated tumour action and the drug-induced hypophagia. In the control group the decreased food intake was associated with a reduction of body weight (Table 1). Again, similarly to the food intake, sorafenib treatment in tumour-bearing animals did not worsen the body weight, possibly because of the decrease of tumour cell content induced by sorafenib. The effects of formoterol on body weight were also distinct in control and tumour-bearing animals: while formoterol treatment increased the body weight significantly in the former ones, it did not produce any changes in the latter ones. Finally, the combination of formoterol with sorafenib resulted in a decreased body weight in the control group while an increase in the tumour-bearing animals was observed. Again, this distinct behaviour may rely on the decreased cell content promoted by sorafenib, which possibly compensate the anorexigenic effects of sorafenib.

In non-tumour-bearing rats, sorafenib induced a significant decrease in gastrocnemius (6%) and heart (7%) mass (Table 1). Actually, Antoun et al. [12] described skeletal muscle wasting as an adverse effect of sorafenib treatment. However, it is interesting to remark that sorafenib treatment did not significantly affect white adipose tissue mass. Therefore, it may be suggested that sorafenib side effects are more severe on skeletal muscle rather than on adipose tissue. As can be observed in Table 1 formoterol treatment completely reversed the effects of sorafenib on skeletal muscle without affecting adipose tissue. Sorafenib treatment in tumour-bearing rats attenuated skeletal muscle and heart weight loss (Table 1), probably as a consequence of the reduction in tumour cell content induced by sorafenib. The other way round, bearing in mind the two third reduction of

Table 1. Effects of formoterol treatment on food intake, body weight, muscle and adipose weight in sorafenib-treated tumour-bearing rats at day 10 after tumour inoculation.

Parameters	Experimental groups							
	C (6)	C+S (7)	C+F (7)	C+F+S (7)	T (8)	T+S (8)	T+F (8)	T+F+S (8)
Food intake	128± 2 ^c	119± 3 ^b	141± 3 ^d	122± 2 ^b	88± 3 ^a	87± 3 ^a	95± 4 ^a	91± 3 ^a
FBW	137±1 ^d	129±2 ^c	141±1 ^e	128±1 ^c	89±2 ^a	103±3 ^b	91±2 ^a	105±2 ^b
Muscle Weight								
GSN	739±12 ^{de}	696±11 ^c	841±10 ^f	758±14 ^e	519± 18 ^a	624± 9 ^b	604± 19 ^b	701± 13 ^{cd}
Soleus	53±2 ^c	49±1 ^c	59±3 ^d	50±2 ^c	39±1 ^a	44±2 ^b	44±1 ^b	50±1 ^c
Tibialis	236±3 ^c	228±5 ^c	279±7 ^d	266±9 ^d	174±7 ^a	200±3 ^b	202±5 ^b	228±3 ^c
EDL	56±1 ^c	56±1 ^c	67±1 ^d	65±2 ^d	41±2 ^a	50±1 ^b	49±1 ^b	58± 1 ^c
Heart	376±7 ^d	348±8 ^c	429±11 ^e	413± 12 ^e	263± 3 ^a	292± 6 ^b	284± 5 ^{ab}	330± 8 ^c
Adipose Weight								
dWAT	1390±91 ^d	1292±84 ^{cd}	1277±99 ^{cd}	1135±113 ^c	320± 72 ^{ab}	535±65 ^b	211± 51 ^a	373±53 ^{ab}
eWAT	1332±82 ^c	1208±107 ^c	1115±58 ^d	935±71 ^{bc}	542±106 ^a	926±49 ^{bc}	401±89 ^a	822±59 ^b
BAT	266±16 ^{bc}	241±22 ^b	283±14 ^c	238±17 ^b	110±7 ^a	125±4 ^a	117±6 ^a	118±8 ^a

Results are mean ± SE for the number of animals indicated in parentheses. Food intake is expressed as g/100g IBW and refers to the cumulative intake (10 days). FBW: final body weight (without tumour) is expressed as g. Tissue weight is expressed as mg/100 g of initial body weight. GSN: gastrocnemius muscle. EDL: extensor digitorum longus. dWAT: dorsal white adipose tissue, eWAT: epididymal white adipose tissue; BAT: brown adipose tissue. C: rats without tumour; T: tumour-bearing rats; C+S and T+S: treated with sorafenib; C+F and T+F: treated with formoterol; C+F+S and T+F+S: treated with both formoterol and sorafenib. Statistical significance of the results by full factorial three-way ANOVA (fixed factors: tumour, sorafenib treatment and formoterol treatment). p-values of all the parameters detailed in the supplemental data, table 1. Statistically significant differences by *post hoc* Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

tumour content, the animals were frankly cachectic, probably due to the combination of both residual tumour and sorafenib action. Consistently, formoterol administration was able to ameliorate muscle mass in tumour-bearing animals, either untreated (as previously reported [36]) or sorafenib-treated.

The different effects on food intake, body and muscle weights were compared with physiological parameters such as physical activity and muscle strength. In Figure 2 tumour-bearing animals clearly showed a decrease in both parameters: total physical activity and grip strength. Treatment with sorafenib in healthy rats caused a reduction in physical activity (16%) and grip strength (17%). These changes agree with the previous effects of sorafenib on muscle weight (Table 1). Notably, sorafenib

treatment, while prominently reducing the tumour burden, did not affect total physical activity and actually increased grip strength in tumour-bearing animals (Figure 2). On the other hand, formoterol increased both parameters in the control and tumour-bearing animals. Remarkably, formoterol administration to sorafenib-treated animals induced an even higher increase in physical activity 29% and grip strength 33% as compared with the tumour-bearing animals only receiving the antitumoral treatment.

In summary, the use of formoterol in sorafenib-treated animals seems to be highly effective in preventing muscle wasting and, thus facilitating physical activity and, therefore, quality of life even in the presence of a chemotherapy regimen.

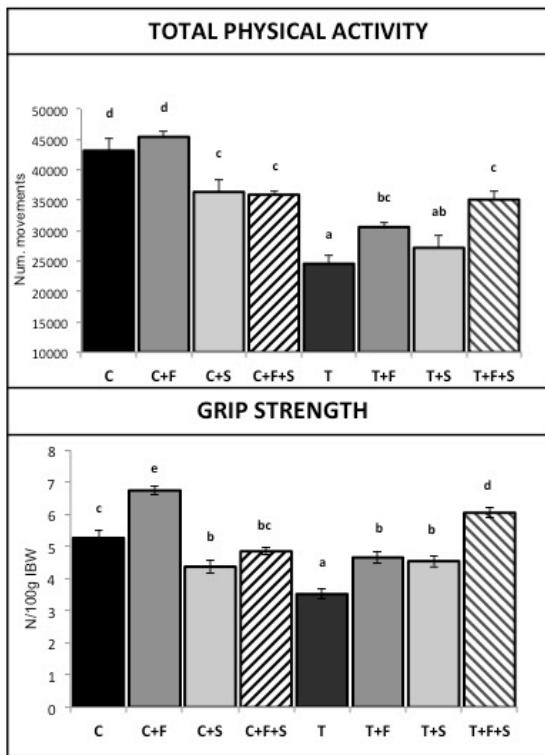


Figure 2. Effects of formoterol on total physical activity and grip force in sorafenib-treated tumour bearing rats. Results are mean \pm SE for 7 animals per group in control groups (without tumour) and 8 animals per group in tumour-hosts groups. C: rats without tumour; T: tumour-bearing rats; C+S and T+S: treated with sorafenib; C+F and T+F: treated with formoterol; C+F+S and T+F+S: treated with both formoterol and sorafenib. Statistical significance of the results by full factorial three-way ANOVA (fixed factors: tumour, sorafenib treatment and formoterol treatment). p-values of all the parameters detailed in the supplemental data, table 3. Statistically significant differences between all groups were assessed by pairwise comparisons *post hoc* Duncan test, different superscripts indicate significant differences between groups.

Taking into consideration that sorafenib treatment was able to strongly decrease tumour growth, a survival curve was performed (Figure 3). It can be seen that sorafenib was able to considerably increase survival (Log-rank test, $p<0.001$). After 20 days (approximately the double survival time of untreated TB rats) we stopped sorafenib treatment and observed tumour relapse, eventually leading to animal death around day 30.

Bearing this in mind we decided to perform another series of experiments lasting 20 days following tumour inoculation in order to establish a potential chronic anti-cachectic protocol able to extend healthy lifespan. This experimental

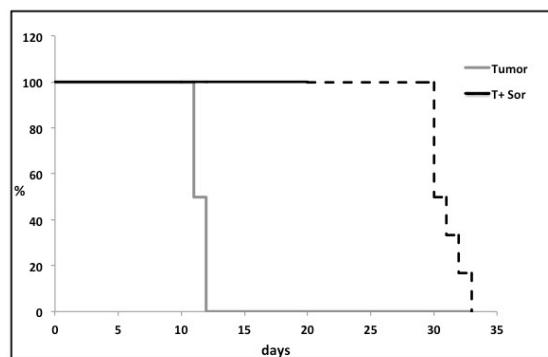


Figure 3. Survival. Kaplan-Meier survival analysis between untreated tumour-bearing rats and sorafenib-treated tumour bearing rats (T+Sor). Sorafenib administration was stopped at day 20 after tumour inoculation (dotted line) in order to observe tumour relapse. Comparison of Survival curves were analysed by Log-rank test (Mantel-Cox). The global comparison for the treatments has a p value<0.001.

setting better resembles the human condition, where, after tumour diagnosis, an anticancer treatment is given and, despite the arrest of tumour growth, cachexia appears. At this time point, sorafenib-treated TB animals have only a very low residual tumour cell count, which cannot be assessed easily. We also incorporated a multifactorial anticachectic treatment by combining formoterol with megestrol acetate. The rationale behind this was to provide a drug to compensate hypophagia induced by sorafenib. Indeed, megestrol acetate has been described as an orexigenic drug and its use in cancer patients is widely used [23]. In addition, our laboratory described the anabolic effects of the drug in skeletal muscle [27].

As shown in Figure 4, no effects were observed of either formoterol or megestrol acetate treatment on tumour cell content. The orexigenic action of megestrol acetate can be observed in Figure 5; indeed, while no effects of formoterol were seen, the combination increased food intake by 18%, despite being far from a complete recovery. In sorafenib-treated tumour-bearing rats, formoterol administration caused once again a positive effect on the majority of skeletal muscles studied (Table 2). Interestingly, the combination of formoterol and

megestrol acetate was even more effective in the mainly oxidative muscles soleus and diaphragm, promoting an additional significant increase (13% for soleus and 50% for diaphragm) as compared with the animals that were treated only with formoterol.

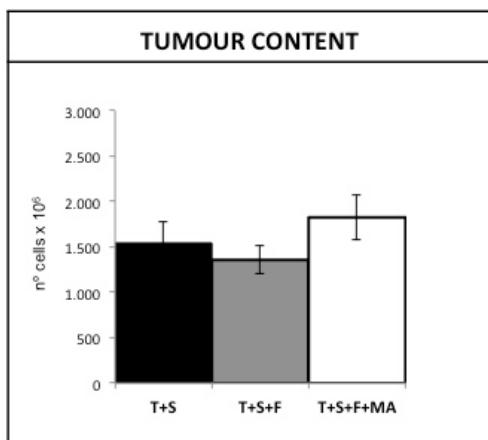


Figure 4. Effects of formoterol and formoterol + megestrol acetate on tumour cell content in sorafenib-treated tumour-bearing animals. Tumour cell content was assessed on day 20 after tumour inoculation. Results are mean \pm SE for 8 animals per group. T+S: tumour-bearing rats treated with sorafenib; T+S+F: tumour-bearing rats treated with sorafenib and formoterol; T+S+F+MA: tumour-bearing rats treated with sorafenib, formoterol and megestrol acetate. Statistical analysis of the results by one-way ANOVA showed non-significant differences ($p=0.31$).

Table 2. Effects of the combination of formoterol and megestrol acetate treatment in sorafenib-treated tumour-bearing rats on muscle weight at day 20 after tumour inoculation.

Parameters	Experimental groups				ANOVA
	C (7)	T+S (8)	T+S+F (8)	T+S+F+MA (9)	
Muscle Weight					
GSN	1005 \pm 24 ^c	630 \pm 19 ^a	723 \pm 33 ^b	762 \pm 28 ^b	p<0.001
Tibialis	314 \pm 6 ^c	208 \pm 5 ^a	247 \pm 12 ^b	251 \pm 8 ^b	p<0.001
Soleus	73 \pm 1 ^d	50 \pm 1 ^a	55 \pm 2 ^b	62 \pm 2 ^c	p<0.001
EDL	76 \pm 2 ^c	53 \pm 1 ^a	60 \pm 3 ^b	62 \pm 1 ^b	p<0.001
Diaphragm	474 \pm 16 ^b	371 \pm 12 ^a	342 \pm 18 ^a	513 \pm 23 ^b	p<0.001
Heart	549 \pm 23 ^c	376 \pm 16 ^a	401 \pm 14 ^{ab}	429 \pm 14 ^b	p<0.001

Results are mean \pm SE for the number of animals indicated in parentheses. Muscle weight is expressed as mg/100 g of initial body weight. GSN: gastrocnemius muscle. EDL: *extensor digitorum longus*. C: animals without tumour; T+S: tumour-bearing rats treated with sorafenib; T+S+F: tumour-bearing rats treated with sorafenib and formoterol; T+S+F+MA: tumour-bearing rats treated with sorafenib, formoterol and megestrol acetate. Statistical significance of the results by one-way ANOVA. Statistically significant differences by *post hoc* Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

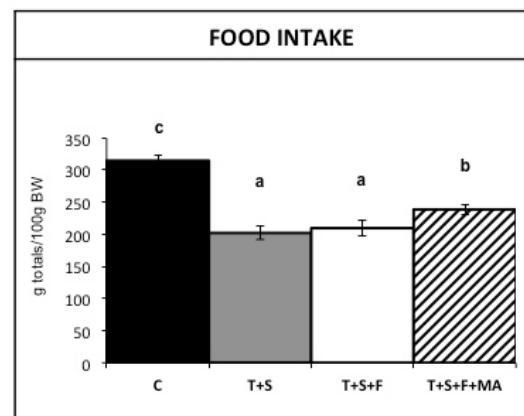


Figure 5. Effects of formoterol and formoterol + megestrol acetate on food intake in sorafenib-treated tumour-bearing animals. Food intake is expressed in g/100g IBW and refers to the ingestion during the period of the experiment prior to sacrifice, which took place 20 days after tumour inoculation. Results are mean \pm SE for 7-9 animals per group. C: animals without tumour; T+S: tumour-bearing rats treated with sorafenib; T+S+F: tumour-bearing rats treated with sorafenib and formoterol; T+S+F+MA: tumour-bearing rats treated with sorafenib, formoterol and megestrol acetate. Statistical significance differences between groups were detected by one-way ANOVA ($p<0.001$). Pairwise comparisons were performed by *post hoc* Duncan test, different superscripts indicate significant differences between groups.

In relation to physical activity and muscle force, 20 days of tumour growth (18 of sorafenib administration) induced a significant decrease in both parameters (Figure 6). The combination of formoterol and megestrol acetate treatments was successful in significantly increasing both physical activity and grip strength, especially for the latter, consistently with the rescue of muscle mass. Formoterol treatment alone was only able to induce an improvement in grip strength.

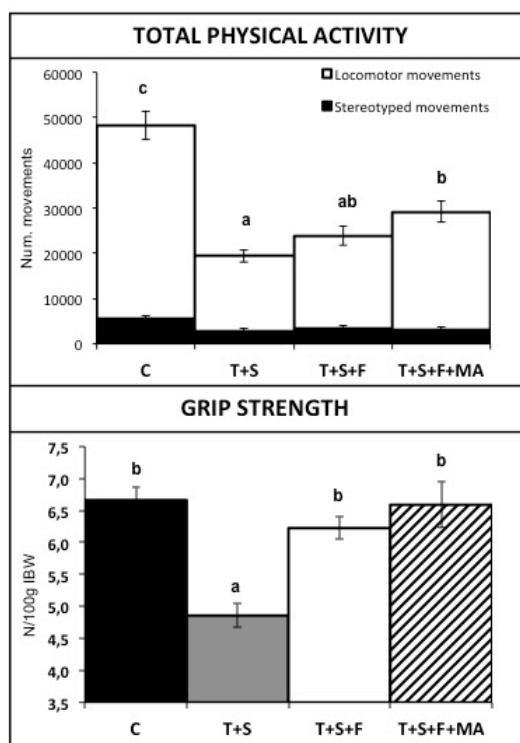


Figure 6. Effects of formoterol and formoterol + megestrol acetate on total physical activity and grip force in sorafenib-treated tumour-bearing animals. Total physical activity was assessed during the last 24 hours prior sacrifice of the animals on day 20 after tumour inoculation and was expressed as number of movements and grip force was assessed before the sacrifice. Results are mean \pm SE for 7-9 animals per group. C: animals without tumour; T+S: tumour-bearing rats treated with sorafenib; T+S+F: tumour-bearing rats treated with sorafenib and formoterol; T+S+F+MA: tumour-bearing rats treated with sorafenib, formoterol and megestrol acetate. Statistical significance between groups detected by one-way ANOVA (Total physical activity; $p<0.001$; Grip strength, $p<0.001$). Post hoc Duncan tests were performed; different superscripts indicate significant differences between groups.

The presence of a tumour induces important metabolic changes which affect carbohydrate, lipid and protein metabolism [41]. As readout of such alterations, tumour burden is associated

with an increase in circulating lactate and a decreased glycaemia. The combined treatment was able to partially improve glycaemia and hyperlactemia in sorafenib-treated TB animals while had no effects on either circulating albumin or triglycerides (Figure 7).

Since one of the most deleterious events taking place in skeletal muscle during tumour growth is the increased protein breakdown, we also examined the effects of either formoterol or formoterol with megestrol acetate treatments on gene expression of muscle proteolytic systems.

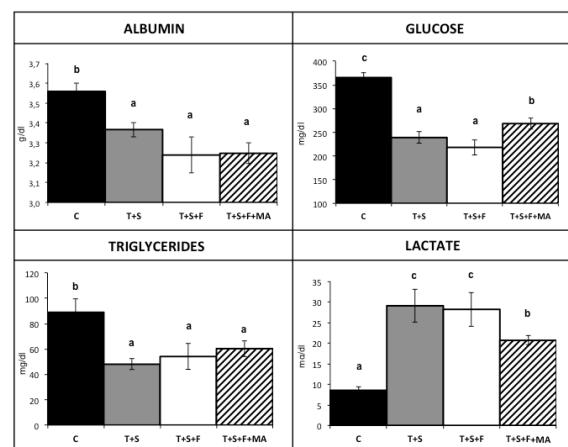


Figure 7. Effects of formoterol and formoterol + megestrol acetate on albumin and circulating metabolites in sorafenib-treated tumour-bearing animals on day 20 after tumour inoculation. Results are mean \pm SE for 7-9 animals per group. C: animals without tumour; T+S: tumour-bearing rats treated with sorafenib; T+S+F: tumour-bearing rats treated with sorafenib and formoterol; T+S+F+MA: tumour-bearing rats treated with sorafenib, formoterol and megestrol acetate. One-way ANOVA denoted statistically significant differences between treatments (Albumin, $p=0.003$; Glucose, $p=0.008$; Triglycerides, $p<0.001$; Lactate, $p<0.001$). Post hoc pairwise comparisons (Duncan test) were performed; different superscripts indicate significant differences between groups.

As shown in Table 3, the combined treatment formoterol + megestrol acetate significantly reduced both Murf-1 and Atrogin-1 gene expression in GSN muscle, two Ub-ligases that represent the limiting step of proteasome-dependent degradation [42]. Interestingly, the double treatment also decreased m-calpain gene expression, known to play a role in muscle proteolysis in cancer cachexia [43,44]. Indeed, it

was suggested that calcium-dependent proteases participate in the release of myofilaments from the sarcomere and these myofilaments would be later degraded by the ubiquitin-dependent proteolytic system [45]. Sandri et al. reported the role for lysosome activity in muscle degradation during cancer cachexia. Actually, activation of FoxO3

stimulates lysosomal proteolysis in muscle by inducing the expression of autophagy-related genes [46]. It has been recently shown that autophagy play a relevant role even in cancer cachexia [47]. Consistently, both formoterol alone or in combination with megestrol acetate effectively prevented the increase of Cathepsin B transcript observed in TB rats.

Table 3. Effects of the combination of formoterol and megestrol acetate treatment on gastrocnemius gene expression in sorafenib-treated tumour-bearing rats at day 20 after tumour inoculation.

Proteolytic system	Experimental groups				ANOVA p-value
	C (6)	T + S (7)	T + S + F (7)	T + S + MA + F (8)	
Ubiquitin-dependent					
Ubiquitin	100 ± 22	117 ± 21	102 ± 10	106 ± 28	p=0.95
E2	100 ± 23 ^a	269 ± 53 ^b	190 ± 42 ^{ab}	194 ± 49 ^{ab}	p=0.11
C8 proteasome subunit	100 ± 23 ^a	224 ± 20 ^b	280 ± 58 ^b	235 ± 49 ^b	p=0.035
C2 proteasome subunit	100 ± 11 ^a	220 ± 44 ^b	160 ± 26 ^b	220 ± 32 ^b	p=0.036
Murf-1	100 ± 15 ^a	410 ± 77 ^b	342 ± 58 ^b	144 ± 34 ^a	p=0.001
Atrogin-1	100 ± 18 ^a	323 ± 69 ^b	263 ± 65 ^b	127 ± 30 ^a	p=0.007
Lysosomal					
Cathepsin B	100 ± 12	129 ± 61	71 ± 15	72 ± 18	p=0.54
Calcium-dependent					
m-calpain	100 ± 12 ^a	167 ± 22 ^b	110 ± 12 ^a	90 ± 24 ^a	p=0.052

Results are mean ± SE for the number of animals indicated in parentheses. C: animals without tumour; T+S: tumour-bearing rats treated with sorafenib; T+S+F: tumour-bearing rats treated with sorafenib and formoterol; T+S+F+MA: tumour-bearing rats treated with sorafenib, formoterol and megestrol acetate. Statistical significance of the results by one-way ANOVA, following a *post hoc* Duncan test. Different superscripts indicate significant differences between groups.

In summary, it is important to point out that this is one of the few studies that incorporates antitumour together with anticachectic treatments, since the majority of the data available from preclinical studies usually take into consideration only the cachectic effect induced in a short interval by tumour growth or by single antineoplastic drugs, not the combination. Such experimental settings,

however, are far from the clinical practice, where an antitumour intervention is adopted as soon as the cancer is diagnosed and chronic cachexia occurs. The other way round, the study of drug toxicity and pharmacokinetic in the absence of the tumour might hide important aspects [48]. As a consequence, the use of inappropriate preclinical models complicates and limits the transfer of basic discoveries from the bench to

the bedside. On the contrary, in the present study, sorafenib administration effectively reduced tumour burden and prolonged survival at the cost of a dramatic cachectic state, reflecting the clinical conditions of cancer patients. Testing the effectiveness of candidate drugs in these experimental conditions offers a valid and reliable approach for translational research in the cancer cachexia field. Very recent data obtained in cancer patients using a similar combination strengthen this hypothesis [22]. In conclusion, the present results reinforce the idea that a successful cachexia treatment has to be multifactorial. From this point of view, the combination of an orexigenic drug (megestrol acetate) with an anticatabolic one (formoterol) resulted in clearly beneficial effects in tumour-bearing animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the ‘Ministerio de Ciencia y Tecnología’ (SAF-26091-2011). FP was an AIRC/Marie Curie fellow when the study was performed. The authors certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing of the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle (von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2010;1:7-8.).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT & STATEMENT OF AUTHORSHIP

Each author has participated sufficiently, intellectually or practically, in the work to take public responsibility for the content of the article, including the conception, design, and for data

interpretation. All authors have read and approved the final manuscript. All authors of this research have not conflict of interest related with employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding: Míriam Toledo, Fabio Penna, Francesc Oliva, Melania Luque, Angelica Betancourt, Enrica Marmonti, Francisco J. López-Soriano, Josep M Argilés and Silvia Busquets declares that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. CA. Cancer J. Clin. 2007;57:225–41.
2. Moses AWG, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KCH. Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. Br. J. Cancer. 2004;90:996–1002.
3. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. Am. J. Med. 1980;69:491–7.
4. Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. Clin. Nutr. 2010. p. 154–9.
5. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. Clin. Nutr. 2008;27:793–9.
6. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. Am. J. Clin. Nutr. 2006;84:475–82.
7. Macciò A, Madeddu C, Gramignano G, Mulas C, Floris C, Sanna E, et al. A randomized phase

- III clinical trial of a combined treatment for cachexia in patients with gynecological cancers: evaluating the impact on metabolic and inflammatory profiles and quality of life. *Gynecol Oncol.* 2012;124:417–25.
8. Rogers ES, MacLeod RD, Stewart J, Bird SP, Keogh JW. A randomised feasibility study of EPA and Cox-2 inhibitor (Celebrex) versus EPA, Cox-2 inhibitor (Celebrex), resistance training followed by ingestion of essential amino acids high in leucine in NSCLC cachectic patients--ACCeRT study. *BMC Cancer.* 2011;11:493.
 9. Morley JE, von Haehling S, Anker SD. Are we closer to having drugs to treat muscle wasting disease? *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2014;5:83–7.
 10. Prado CMM, Baracos VE, McCargar LJ, Reiman T, Mourtzakis M, Tonkin K, et al. Sarcopenia as a determinant of chemotherapy toxicity and time to tumor progression in metastatic breast cancer patients receiving capecitabine treatment. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:2920–6.
 11. Prado CMM, Baracos VE, McCargar LJ, Mourtzakis M, Mulder KE, Reiman T, et al. Body composition as an independent determinant of 5-fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:3264–8.
 12. Antoun S, Birdsall L, Sawyer MB, Venner P, Escudier B, Baracos VE. Association of skeletal muscle wasting with treatment with sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma: results from a placebo-controlled study. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:1054–60.
 13. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64:7099–109.
 14. Chai H, Luo AZ, Weerasinghe P, Brown RE. Sorafenib downregulates ERK/Akt and STAT3 survival pathways and induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2010;3:408–15.
 15. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006;66:11851–8.
 16. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:378–90.
 17. Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, Williams G, Jee JM, et al. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2006;12:7271–8.
 18. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2007;356:125–34.
 19. Antoun S, Baracos VE, Birdsall L, Escudier B, Sawyer MB. Low body mass index and sarcopenia associated with dose-limiting toxicity of sorafenib in patients with renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 2010;21:1594–8.
 20. Jacquelin-Ravel N, Pichard C. Clinical nutrition, body composition and oncology: a critical literature review of the synergies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* Elsevier Ireland Ltd; 2012;84:37–46.
 21. Cuvelier GDE, Baker TJ, Peddie EF, Casey LM, Lambert PJ, Distefano DS, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of megestrol acetate as an appetite stimulant in children with weight loss due to cancer and/or cancer therapy. *Pediatr. Blood Cancer.* 2014;61:672–9.
 22. Greig CA, Johns N, Gray C, MacDonald A, Stephens NA, Skipworth RJE, et al. Phase I/II trial of formoterol fumarate combined with megestrol acetate in cachectic patients with advanced malignancy. *Support. Care Cancer.* 2014;22:1269–75.
 23. Berenstein EG, Ortiz Z. Megestrol acetate for the treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane database Syst. Rev.* 2005;CD004310.
 24. Leśniak W, Bała M, Jaeschke R, Krzakowski M. Effects of megestrol acetate in patients with cancer anorexia-cachexia syndrome - A systematic review and meta-analysis. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2008;118:636–44.
 25. Mantovani G, Macciò A, Lai P, Massa E, Ghiani M, Santona MC. Cytokine involvement in cancer anorexia/cachexia: Role of megestrol

- acetate and medroxyprogesterone acetate on cytokine downregulation and improvement of clinical symptoms. *Crit. Rev. Oncog.* 1998;9:99–106.
26. Argilés JM, Anguera A, Stemmler B. A new look at an old drug for the treatment of cancer cachexia: megestrol acetate. *Clin Nutr. Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028-Barcelona, Spain.* jargiles@ub.edu; 2013;32:319–24.
27. Busquets S, Serpe R, Sirisi S, Toledo M, Coutinho J, Martínez R, et al. Megestrol acetate: Its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia. *Clin. Nutr.* 2010;29:733–7.
28. Toledo M, Marmonti E, Massa D, Mola M, López-Soriano FJ, Busquets S, et al. Megestrol acetate treatment influences tissue amino acid uptake and incorporation during cancer cachexia. *ESPEN. J.* 2012;7:e135–8.
29. Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res.* 2004;64:6725–31.
30. Agbenyega ET, Wareham AC. Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol. Department of Physiological Sciences, School of Biological Sciences, Medical School, University of Manchester, U.K.*; 1992;102:141–5.
31. Rajab P, Fox J, Riaz S, Tomlinson D, Ball D, Greenhaff PL. Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279:R1076–81.
32. Hinkle RT, Hodge KMB, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve.* 2002;25:729–34.
33. Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Pitts SA, Potter DE, Paulsen DF. Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature male rats. *Cells. Tissues. Organs.* 2002;171:188–98.
34. Moore RH, Khan A, Dickey BF. Long-acting inhaled beta2-agonists in asthma therapy. *Chest.* 1998;113:1095–108.
35. Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscul. Disord.* 2007;17:47–55.
36. Busquets S, Toledo M, Sirisi S, Orpí M, Serpe R, Coutinho J, et al. Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity. *Exp. Ther. Med.* 2011;2:731–5.
37. Busquets S, Serpe R, Toledo M, Betancourt A, Marmonti E, Orpí M, et al. L-Carnitine: An adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer. *Clin. Nutr.* 2012;31:889–95.
38. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Internet]. [cited 2014 Jun 18]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>
39. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156–9.
40. Toledo M, Busquets S, Sirisi S, Serpe R, Orpí M, Coutinho J, et al. Cancer cachexia: physical activity and muscle force in tumour-bearing rats. *Oncol. Rep.* 2011;25:189–93.
41. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Mechanisms and treatment of cancer cachexia. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2012;1–6.
42. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117:399–412.
43. Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FM. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005;37:2134–46.
44. Costelli P, De Tullio R, Baccino FM, Melloni E. Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in

- skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br. J. Cancer.* 2001;84:946–50.
45. Hasselgren PO, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann. Surg.* 2001;233:9–17.
46. 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.* 2007;6:472–83.
47. Penna F, Costamagna D, Pin F, Camperi A, Fanzani A, Chiarpotto EM, et al. Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *Am. J. Pathol.* 2013;182:1367–78.
48. Trobec K, Kerec Kos M, von Haehling S, Springer J, Anker SD, Lainscak M. Pharmacokinetics of drugs in cachectic patients: a systematic review. *PLoS One.* 2013;8:e79603.

RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

La caquèxia en pacients amb càncer s'associa amb una reduïda supervivència [366]. Això es deu en part a una disminució de la tolerància als tractaments contra el càncer, a una major susceptibilitat a les infeccions i altres complicacions [367]. La caquèxia pot tenir efectes adversos molt perjudicials per al benestar del pacient, i a mesura que el procés caquètic avança, l'activitat física es veu afectada per la pèrdua de teixit muscular, la concentració i l'estat d'alerta es veuen disminuïts per la fatiga i l'estat d'ànim està dominat per la letargia i l'augment de la indiferència [14,368,369].

La caquèxia és clínicament evident en la seva fase avançada (amb pèrdua substancial de greix i múscul esquelètic), fet que representa, en aquesta última etapa, una reduïda probabilitat d'èxit de rehabilitació dels pacients [366]. El reconeixement que la caquèxia passa a través de diferents fases (precaquèxia, caquèxia i caquèxia refractària [2]), i el fet que les últimes fases siguin menys susceptibles a la reversió, ens fa prendre consciència de la importància d'aplicar una teràpia anticaquèctica des del moment del diagnòstic del càncer [1]. Hi ha una necessitat urgent d'establir una millor atenció de suport multimodal per a la caquèxia: més enllà d'una bona atenció clínica o oncològica, han de ser tractades les alteracions nutricionals, la disminució en l'activitat física i la inflamació sistèmica. En aquest sentit, la línia de recerca futura és el disseny d'estratègies terapèutiques multimodals combinant diferents fàrmacs que actuïn sobre les diferents vies fisiopatològiques, ja que tenint en compte que la caquèxia és una síndrome multifactorial, és gairebé impossible trobar un medicament que sigui capaç de contrarestar-la per si sol.

1. Avaluació dels efectes del tractament amb formoterol sobre la funció cardíaca en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130.

El nostre laboratori té àmplia experiència en l'estudi de l'ús d'agonistes β_2 -adrenèrgics, com a possibles fàrmacs per al tractament de la caquèxia [370]. Són molècules potencialment interessants, conegeudes com a potents promotores del creixement muscular en moltes espècies animals, ja que causen hipertròfia del múscul esquelètic [311–313]. De fet, el nostre grup de recerca va patentar l'ús del formoterol per al tractament de la caquèxia cancerosa [371]. Els estudis previs del grup van demostrar que el tractament amb formoterol en animals portadors de tumors bloqueja parcialment el procés de pèrdua de massa muscular associat amb l'estat caquètic reduint tant l'increment de la degradació de proteïnes musculars com l'augment de l'apoptosis [330] i activant el procés de regeneració muscular [332]. El formoterol també redueix l'estrés oxidatiu associat a l'atròfia muscular [372]. Un estudi clínic recent de fase II que implica formoterol també ha mostrat resultats positius en pacients amb càncer avançat [373]. Per tant, el formoterol és un bon candidat per formar part d'una teràpia multifactorial per al tractament de la caquèxia. No obstant això, atès que alguns β_2 -agonistes han estat involucrats en certa cardiotoxicitat [333,334,374], l'objectiu de la primera contribució d'aquesta tesi va ser analitzar els efectes del tractament amb formoterol sobre la funció cardíaca en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130.

Aquest experiment es va desenvolupar al laboratori de Recerca Aplicada en Caquèxia del Departament de Cardiologia de la Facultat de Medicina Charité a Berlín, Alemanya, dirigit pel Professor Stefan D. Anker. En aquest laboratori disposen d'un

sistema d'ecocardiografia d'alta resolució per avaluar la funció cardíaca en animals experimentals, així com d'un dispositiu d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear per analitzar la composició corporal dels animals.

El tumor provoca una disminució important de la massa muscular i el greix corporal en els animals. El tractament amb formoterol va produir una significativa reducció de la pèrdua de massa muscular en els animals portadors de tumors (Figura 2, Publicació 1), tal com havia estat descrit prèviament [330]. Aquesta reversió es va observar a partir d'un increment dels pesos dels músculs individuals així com un augment significatiu en la massa corporal magra, mesurada mitjançant un dispositiu d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear, en els animals tractats amb formoterol (Figura 1, Publicació 1).

No obstant això, un factor a considerar és la presència de β -adrenoceptors en teixits diferents al múscul esquelètic, particularment en el cor i, a més a més, que l'administració crònica d'agonistes β_2 -adrenèrgics pot alterar negativament la funció cardíaca [336]. Diversos estudis també han informat d'importants canvis ultraestructurals, que es caracteritzen per un augment en la proporció de miofibril·les/mitocondris i alteracions sarcomèriques, observades també durant la insuficiència cardíaca [375]. D'altra banda, ha estat descrit que més d'un 11% de les morts en càncer es donen per problemes cardíacs [376]. En ratolins el creixement tumoral s'associa amb una clara disfunció sistòlica [377]. Pel que fa als efectes del tumor sobre els paràmetres cardíacs en el model experimental de rata utilitzat en el nostre estudi, vam obtenir resultats similars als descrits anteriorment per Springer et al. [378,379]. Així, els animals portadors de tumors van presentar un deteriorament general de la funció cardíaca: les rates portadores de tumor no tractades mostraven

una disminució significativa de la fracció d'ejecció del ventricle esquerre i de la fracció d'escurçament, la qual cosa està associada amb una pitjor contractilitat del cor. També vam observar una reducció en el volum sistòlic d'ejecció (LVSV) i el volum telediastòlic (LV vol dia) en el grup tumoral en comparació amb les rates control, mentre que el volum telesistòlic (LV vol sys) no va augmentar significativament. Aquests paràmetres són signes d'una disfunció miocardíaca induïda després de la inoculació del tumor [377]. A més, la reducció del gruix de la paret posterior (PWT) suggereix atròfia del miocardi, com es mostra amb una reducció de la massa del ventricle esquerre i del pes del cor en les rates portadores de tumor (Taula 1, Publicació 1).

L'administració de formoterol va prevenir la pèrdua del diàmetre ventricular esquerre (LVD) (en diàstole i sístole); de fet, la pèrdua de massa del ventricle esquerre es correlaciona amb la supervivència, ja que la seva prevenció després del tractament amb fàrmacs comunament utilitzats per tractar la insuficiència cardíaca en millora la supervivència [378]. A més, el formoterol augmenta el volum sistòlic d'ejecció (LVSV) i els volums telediastòlic i telesistòlic (vol LV). Aquests resultats suggereixen la possibilitat que el formoterol inhibeixi en petita mesura alguns mecanismes d'atròfia cardíaca, millorant per tant la funció del cor. L'efecte beneficiós del formoterol podria explicar-se pel fet que l'activació dels receptors β_2 -adrenèrgics induceix una activació de la senyalització antiapoptòtica [330,380,381]. Tanmateix, alguns autors han suggerit que l'administració de formoterol inhalat no mostra efectes negatius en subjectes sans [382].

D'aquesta manera, els resultats suggereixen que el tractament amb formoterol, a més de reduir la pèrdua de massa muscular, no altera negativament la

funció cardíaca en animals afectats per la caquèxia cancerosa; fins i tot, alguns paràmetres cardíacs milloren amb el tractament. Per tant, es podria introduir l'ús del formoterol com a part de futurs tractaments multifactorials de la caquèxia cancerosa.

2. Determinació de la possible correlació entre desgast muscular i pèrdua de funcionalitat del múscul esquelètic.

Com ja s'ha descrit, els animals portadors d'un tumor caquèctic experimenten desgast muscular (mesurat a partir de la disminució en els pesos dels músculs) [383] i és molt probable que aquesta pèrdua de pes es tradueixi en una manca de funcionalitat muscular. Per tant, el que ens vam plantejar en la segona contribució va ser quantificar la força muscular i l'activitat física dels animals, tant controls com en situacions de creixement tumoral, per evidenciar-ne les diferències i proposar-les com a mesures que poden ser de gran utilitat per avaluar l'efectivitat dels tractaments testats.

Per monitoritzar l'activitat física vam utilitzar un actímetre d'infraroig (IR) i el software *Acti-Track*, el qual permet l'estudi de l'activitat locomotora en animals d'experimentació. Es basa en un sistema de detecció mitjançant feixos d'infraroig que permeten mesurar la magnitud de l'activitat motora, utilitzant l'anàlisi de la posició i de la freqüència amb la que l'animal talla els raigs infraroigs. Durant la mesura, cada animal té el seu espai independent i accés lliure a menjar i aigua, fet que minimitza l'estrès de l'animal. El software ens proporciona diferents paràmetres, com són l'activitat total dividida en moviments estereotipats (moviments sense desplaçament com menjar, beure, netejar-se) i moviments locomotores (moviments

amb desplaçament), les velocitats màxima i mitjana, la distància recorreguda i el percentatge de temps invertit en: períodes de temps sense desplaçament (netejant-se, menjant, dormint), períodes amb moviments lents i períodes amb moviments ràpids.

La força muscular en les rates es va mesurar amb l'aparell *grip-strength*, que consta d'una barra unida a un dinamòmetre. La rata s'agafa per la cua i s'apropa a la barra fins que s'agafa amb les potes del davant, llavors s'estira de la cua fins a que es deixa anar. L'aparell enregistra la màxima força realitzada per la rata abans de deixar-se anar.

Els resultats presentats van mostrar clarament que la presència del tumor induceix una ràpida reducció de la condició física, que afecta tant a l'activitat física com la força muscular. A partir de dia 4 de creixement tumoral, que coincideix amb el moment en que el contingut tumoral ja comença a ser evident de manera visual en els animals i a partir de quan els animals comencen a presentar anorèxia, els moviments totals dels animals comencen a disminuir significativament (Figura 2, Publicació 2). De manera similar, comencen a disminuir la velocitat mitjana, la distància recorreguda i el temps que dediquen a realitzar moviments ràpids i lents, passant a estar més temps en repòs (Figures 4, 5 i 6, Publicació 2). L'activitat física de les rates portadores de tumor va disminuint a mesura que avancen els dies, fins a dia 11 de creixement tumoral on les rates comencen a morir degut a l'estat avançat de caquèxia. Aquestes diferències entre animals portadors de tumor i animals control són molt més evidents durant els períodes nocturns que en els diürns, la qual cosa no és d'estranyar ja que aquests animals són més actius durant la nit [384]. Pel que fa a la força muscular, també observem una reducció en les rates portadores de tumor,

tot i que apareix més tard en el temps, sent evident a dia 7 de creixement tumoral i molt marcada a dia 11 (Figura 2, Publicació 2).

Per tant, aquestes mesures ens permeten valorar, en certa manera, la qualitat de vida dels animals, fet que ens serà molt útil d'ara endavant per avaluar l'efectivitat dels tractaments testats, no només a nivell morfològic amb el pes dels teixits musculars i adiposos, sinó des de la vessant funcional, que ens permet valorar una mica més a la qualitat de vida dels animals.

3. Avaluació de diferents estratègies terapèutiques unimodals per al tractament de la caquèxia cancerosa.

En els últims anys, la creixent comprensió dels mecanismes implicats en la caquèxia està portant a la investigació a centrar-se en possibles teràpies dirigides a mediadors de l'hipoanabolisme i de l'hipercatabolisme, així com en l'estat nutricional del pacient. D'altra banda, la necessitat que la teràpia sigui multimodal està prenent força. Recentment s'han realitzat alguns estudis on s'han establert tractaments multimodals que inclouen suport nutricional i tractament antiinflamatori, i s'ha demostrat que alteren parcialment la trajectòria caquèctica, millorant la capacitat funcional, la qualitat de vida i la supervivència prolongada dels pacients amb càncer avançat [294,385,386].

Per dissenyar una bona teràpia multimodal per al tractament de la caquèxia cancerosa, ens vam plantejar primer testar de manera individual diferents fàrmacs anabòlics i anticatabòlics, com són l'agonista β_2 -adrenèrgic formoterol o el receptor soluble d'activines sActRIIB, per contrarestar la pèrdua de massa muscular, i per altra

banda agents estimulants de la gana com l'acetat de megestrol o la carnitina, per contrarestar l'anorèxia.

Així doncs, en la tercera contribució vam voler comprovar si el potencial anticaquèctic del **formoterol** que havíem demostrat en experiments anteriors [330] es traduïa en una millora en la condició física de les rates portadores de tumor, mesurant la força muscular d'agafada i l'activitat física. De fet, en pacients amb atròfia muscular després d'una lesió de medul·la espinal, el tractament amb un agonista β_2 -adrenèrgic va donar lloc a una millora en la força muscular d'aquests pacients [387]. No obstant això, altres autors asseguren que no hi ha evidències significatives de que els β_2 -agonistes millorin la força o el rendiment físic [388]. En el nostre cas els resultats van demostrar que el tractament amb formoterol, a més a més de revertir la pèrdua de massa muscular en les rates portadores de l'hapatoma ascític Yoshida AH-130, va revertir la reducció en la força muscular que produeix la presència del tumor [389] i va exercir una millora en l'activitat física, la qual es troba molt afectada en els animals portadors de tumor [389], incrementant de forma significativa el nombre total de moviments, la distància recorreguda i el temps invertit en realitzar moviments ràpids i lents (Figures 2, 3 i 4, Publicació 3). Aquests resultats ens indiquen que el formoterol sembla ser un bon candidat per a la teràpia anticaquètica, ja que el fet d'incrementar la massa muscular es tradueix en una millora de la funcionalitat física, fet que suposa una millora en la qualitat de vida dels animals.

Un altre agent anabòlic que vam voler testar en aquesta tesi (Publicació 4) va ser el **receptor soluble d'activines, sActRIIB**, el qual ha estat descrit que recupera completament la massa muscular en ratolins portadors de l'adenocarcinoma C26 i

allarga la supervivència d'aquests animals [129]. Aquest agent el vam testar en un model experimental de ratolí, el carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). Aquest tumor es caracteritza per una tendència hemorràgica marcada, que produeix metàstasis pulmonars múltiples i és extremadament resistant a la majoria dels agents quimioterapèutics [390]. El creixement d'aquest carcinoma causa una ràpida i progressiva pèrdua de pes, particularment de massa muscular [391]. El tractament amb sActRIIB va donar lloc a una millora en el pes final acompanyat d'un increment en la massa muscular (Taula 1 i 2, Publicació 4), el qual es va traduir en una lleugera millora de l'activitat física i la completa recuperació de la força muscular (Taula 4 i 5, Publicació 4). Cal assenyalar que la pèrdua de massa muscular associada al càncer està relacionada amb una activació important de la proteòlisi, tant en animals d'experimentació com en humans [181,182,392,393]. Entre els sistemes proteolítics implicats en la degradació de proteïnes musculars durant condicions catabòliques, el sistema ubiquitina-proteasoma es considera el principal [163,180]. A l'avaluar l'expressió de mRNA dels diferents sistemes proteolítics, vam observar que el tractament amb sActRIIB no va ser capaç de reduir els nivells de mRNA dels components del sistema proteolític ubiquitina-proteasoma que es trobaven incrementats pel creixement tumoral. En canvi, el tractament va exercir el seu efecte sobre els sistemes lisosomal i dependent de calci (Taula 6, Publicació 4). Últimament el paper del sistema lisosomal en la degradació muscular durant la caquèxia està agafant força importància. L'activació de FoxO3 estimula la proteòlisi lisosomal al múscul a través de l'activació de gens relacionats amb l'autofàgia [394], i FoxO3 és un dels principals factors de transcripció implicats en l'activació dels atrogens [150]. D'altra

banda, el sistema de les calpaïnes té també un paper important en la degradació de proteïnes musculars durant el càncer [195,196].

A partir dels bons resultats obtinguts amb els tractaments de formoterol i del sActRIIB, ens vam plantejar combinar tots dos tractaments per avaluar si hi havia un efecte sinèrgic o additiu d'aquest tractament en ratolins portadors del LLC. En aquests experiments vam observar que el **doble tractament (formoterol + sActRIIB)** era extremadament efectiu, revertint el desgast muscular associat al model de caquèxia experimental en ratolí. Amb el tractament es recuperava completament la pèrdua de pes corporal, els pesos dels músculs (Taula 1, Publicació 5), així com la força muscular en animals portadors de tumor (Figura 2, Publicació 5). El doble tractament també va incrementar la ingestà tant en animals control com en animals portadors de tumor (Taula 1, Publicació 5). Per altra banda, vam observar que la combinació dels dos tractaments reduïa el nombre de metàstasis sense afectar la massa del tumor (Figura 1, Publicació 5), fet que es va traduir amb un augment substancial de la supervivència (Figura 3, Publicació 5). Tenint en compte que la causa de mort d'aquest model tumoral s'associa amb la incapacitat respiratòria provocada per la invasió dels pulmons [390], aquest efecte pot estar relacionat amb el bloqueig de les activines provocat pel tractament amb sActRIIB. Nivells elevats d'activines han estat associats amb la patogènesi de les metàstasis en diferents tumors [133,395,396], i Zhou et al. ja van descriure que el tractament amb el receptor soluble d'activines segrestava la miostatina i l'activina reduint la disponibilitat d'aquests lligands per activar el receptor ActRIIB i reduint per tant la senyalització d'activines [129].

Considerant que el creixement tumoral està associat amb una important resposta inflamatòria, vam avaluar els nivells circulants de les citoquines TNF- α , IL-1 β i IL-6, les quals ja han estat associades anteriorment amb increments dramàtics en situacions de creixement tumoral [18,397,398]. Així, la combinació de formoterol i sActRIIB va provocar una disminució significativa en TNF- α i IL-6 (Figura 4, Publicació 5). Atès que aquestes citoquines semblen tenir un paper molt important en diferents models de caquèxia associada a càncer [102,295], els efectes observats sobre els pesos musculars, la força i l'activitat podrien explicar-se en part per la prevenció d'alts nivells de citoquines. El doble tractament també va produir una millora en l'hemoglobina, l'hematòcrit i el recompte de plaquetes (Figura 4, Publicació 5).

Amb l'objectiu d'esbrinar els mecanismes implicats en l'efecte del tractament combinat sobre el guany de massa muscular, ens vam plantejar un nou experiment que ens permetés l'avaluació de la síntesi proteica *in vivo* i la degradació proteica *ex vivo*. Per analitzar la síntesi proteica, tres hores abans del sacrifici, els animals van rebre una dosi intragàstrica de fenilalanina tritiada ($500\mu\text{Ci}/\text{Kg}$ $^3\text{H-Phe}$) que posteriorment s'incorporaria a la proteïna sintetitzada per l'organisme. D'aquesta manera, permetria fer un seguiment de l'anabolisme proteic en els diferents teixits analitzats [399,400]. Els resultats van mostrar en tots els músculs estudiats (GSN, *tibialis* i *vastus lateralis*) que el tumor produeix una disminució molt important en la taxa de síntesi de proteïnes, d'acord amb estudis previs on s'associava la caquèxia amb una disminució de l'anabolisme [159,160]. El tractament amb formoterol va resultar en un increment en la síntesi de proteïnes només en el múscul *vastus lateralis*, mentre que sActRIIB va promoure augmentos en la taxa de síntesi de proteïnes en *tibialis* i *vastus lateralis* (Figura 5, Publicació 5). El tractament combinat

va produir una millora d'aquest paràmetre en tots els músculs esquelètics estudiats. Per mesurar la proteòlisis, vam realitzar incubacions *ex vivo* de músculs aïllats (*extensor digitorum longus* (EDL)) on es va quantificar la tirosina alliberada al medi d'incubació [235,392]. Els resultats van mostrar clarament que el formoterol va ser capaç de disminuir la degradació de proteïnes tant en els ratolins control com en els portadors de tumor (Figura 6, Publicació 5). Per contra, sActRIIB no va afectar la taxa de degradació de proteïnes *ex vivo*.

Per tant, pel que fa als mecanismes implicats amb la preservació de la massa muscular durant la caquèxia, sembla que el formoterol i l'antagonista del receptor soluble de la miostatina tenen un efecte additiu, on el formoterol actua principalment reduint els nivells de degradació proteica en el múscul (mesurant l'alliberament de tirosina en músculs aïllats incubats *ex vivo*) mentre que sActRIIB només actua sobre la síntesi proteica (mesurada *in vivo* utilitzant fenilalanina tritiada). El formoterol també incrementa la síntesi proteica en algun múscul, i això sembla que s'afavoreixen en presència del tractament antimiostatina.

Per acabar de confirmar el paper dels tractaments sobre la degradació de proteïnes, ens vam plantejar fer l'anàlisi dels nivells de transcripció dels gens que pertanyen a diferents sistemes proteolítics. Els resultats confirmen indirectament la capacitat del formoterol sobre la proteòlisi muscular reduint l'expressió de diversos components del sistema proteolític dependent d'ubiquitina, incloent atrogina-1 i MuRF1, i d'altres sistemes proteolítics, com ara m-calpaïna i catepsina B (Taula 3, Publicació 5).

A tall de resum, podem proposar el model d'acció del tractament multifactorial de la següent forma: en primer lloc, el tractament combinat actua reduint la resposta

inflamatòria; i en segon lloc, preservant la massa muscular degut a l'augment de la síntesi de proteïnes i a la reducció de la degradació proteica, fet que s'associa amb la recuperació de l'activitat física i la força muscular, resultant en una millora de la qualitat de vida. I per últim, el tractament va disminuir el nombre de metàstasis, fet que clarament es pot associar amb la millora de la supervivència (Figura 7, Publicació 5). Els resultats obtinguts en aquest estudi preclínic generen fonaments sòlids per al disseny d'una teràpia eficaç per al tractament de la caquèxia en pacients amb càncer. Una estratègia combinada permetrà fer front als tractaments antitumorals en la millora de les condicions de salut, millorant així la seva eficàcia general. D'altra banda, l'acció antimetastàtica reforçarà l'efecte dels fàrmacs antitumorals.

A més a més de combatre el desgast muscular que pateixen els pacients amb càncer, un altre aspecte molt important de l'etiopatogènia de la caquèxia és l'anorèxia que sovint experimenten els pacient amb càncer, ja sigui pel propi tumor o degut als tractaments antitumorals. Per dissenyar una millor teràpia multimodal, aquesta hauria de contrarestar tant l'atròfia muscular com l'anorèxia i, per això, ens vam plantejar testar alguns agents estimulants de la gana com són la L-carnitina [220,401] o l'acetat de megestrol [253–255] en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, ja que en aquest model tumoral és molt evident aquesta disminució de la ingestió respecte als animals control [402].

Com es mostra a la sisena contribució d'aquesta tesi, l'administració de **L-carnitina** a rates portadores de tumor va produir un increment en la ingestió d'aliments (Taula 1, Publicació 6). Alguns dels possibles mecanismes implicats en l'increment de la ingestió poden ser, en part, per l'efecte de la L-carnitina sobre els nivells de citoquines

en sang. De fet, alguns autors han descrit que la L-carnitina disminueix la producció de citoquines com TNF- α , IL-6 i IL-1 β [401,403], les quals és ben sabut que es troben implicades la inducció de l'anorèxia [18,22]. D'altra banda, els efectes de la L-carnitina en la ingestió de menjar podria ser parcialment el resultat de la disminució dels nivells d'àcids grassos lliures en la circulació degut a l'augment de la seva oxidació d'àcids grassos [403,404]. Nivells elevats de malonil-CoA hipotalàmic han estan relacionats en una disminució de la gana en caquèxia [405,406]. Per tant, l'augment de l'oxidació d'àcids grassos pot donar lloc a una disminució del contingut de malonil-CoA hipotalàmic, i d'aquesta manera disminuir l'anorèxia.

Els resultats també van mostrar un increment significatiu de la massa muscular dels animals portadors de tumors tractats amb L-carnitina (Taula 1, Publicació 6), que es va traduir en una millora en tots els paràmetres d'activitat física monitoritzats (Taula 2, Publicació 6). Com s'ha anat reiterant al llarg d'aquesta tesi, la pèrdua muscular associada amb el càncer està relacionada amb una activació important de la proteòlisi, i entre els sistemes proteolítics implicats, el sistema ubiquitina-proteasoma es considera un dels principals [178,181,383,392]. Per avaluar els mecanismes que influeixen en l'efecte beneficiós de la L-carnitina en la pèrdua de massa muscular, vam decidir mesurar l'activitat dels principals sistemes proteolítics en el múscul esquelètic. De fet, el tractament amb L-carnitina va donar lloc a una disminució significativa en l'activitat del proteasoma, i aquesta observació anava també acompañada d'una disminució significativa en el contingut muscular de mRNA d'ubiquitina, subunitat C8 del proteasoma i MuRF-1 (Taula 3, Publicació 6). Per tant, es pot suggerir que la L-carnitina és capaç de modular l'activitat proteolítica en el múscul esquelètic. De fet, altres investigacions també han demostrat que la L-carnitina és capaç d'inhibir el

sistema ubiquitina-proteasoma en garris [407,408]. D'altra banda, tenint en compte que el desgast muscular va acompañat d'un augment de l'apoptosi [203], o fins i tot que l'apoptosi podria precedir la proteòlisi [409], vam examinar l'expressió d'un gen implicat en apoptosis: la caspasa 3. L'activació seqüencial de les caspases té un paper central en l'apoptosi cel·lular, i la caspasa 3 és una proteïna que interactua amb la caspasa 8 i caspasa 9 [410]. El tractament amb L-carnitina va reduir l'expressió de mRNA de la caspasa 3, d'acord amb una publicació anterior on mostraven que el tractament de L-carnitina bloquejava l'apoptosi en la miopatia del múscul esquelètic associada amb insuficiència cardíaca [411].

Considerant tots aquests resultats, podem suggerir que la L-carnitina, a més dels efectes beneficiosos sobre l'anorèxia, és també un compost antiproteolític i antiapoptòtic amb efectes beneficiosos sobre la massa muscular. No obstant això, els efectes de la L-carnitina podrien ser resultat d'un efecte indirecte a través de la disminució de la producció de citoquines [401,403], ja que les citoquines són capaces d'activar el sistema proteolític ubiquitina-proteasoma i la cascada apoptòtica [330,391,409]. Per determinar si la L-carnitina tenia algun efecte directe sobre el múscul esquelètic, vam incubar músculs EDL aïllats de rates sanes en presència de diferents concentracions de L-carnitina. Els resultats van mostrar una disminució en la proteòlisi en els músculs aïllats (Taula 4, Publicació 6), fet que ens suggereix que, a més dels possibles efectes sobre els nivells de citoquines, la L-carnitina també és capaç de modular directament la proteòlisi del múscul esquelètic.

Es podria hipotetitzar, per tant, que la L-carnitina actua sobre l'anorèxia a través de dues vies (Figura 1, Publicació 6). En primer lloc, estimulant l'oxidació d'àcids grisos [404], fet que produeix la disminució dels nivells circulants dels àcids grisos i

triglicèrids. Cal destacar que, en situacions de càncer, s'observa hipertrigliceridèmia i nivells elevats d'àcids grassos circulants [412,413], els quals estan relacionats amb l'anorèxia [412]. En segon lloc, un altre mecanisme d'acció de la L-carnitina sobre la ingestió pot ser mitjançant la disminució de les citoquines, que indueixen anorèxia [18,22]. De fet, diversos estudis suggereixen que la L-carnitina afecta l'activitat i proliferació dels macròfags [414]. Pel que fa als efectes que exerceix sobre la integritat muscular, la L-carnitina pot actuar de forma directa modulant l'activitat proteolítica, reduint la degradació de proteïnes musculars i per tant contribuint a disminuir el desgast muscular (Figura 1, Publicació 6). D'altra banda, ha estat àmpliament descrit que la L-carnitina té capacitat antioxidant [415,416], i per tant disminueix la peroxidació de lípids i la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), provocant una disminució de la taxa d'apoptosi [417]. A més, ha estat descrit que la L-carnitina augmenta la biogènesi i la integritat de les mitocòndries [416], fenomen que podria estar relacionat amb l'apoptosi (Figura 1, Publicació 6).

En conclusió, els resultats presentats demostren clarament que la suplementació amb L-carnitina augmenta la ingestió d'aliments i pot prevenir el desgast muscular en animals amb caquèxia per càncer, fet que suggereix que aquest compost podria ser un component essencial d'una estratègia multimodal d'intervenció nutricional en la caquèxia cancerosa. De fet, la suplementació amb L-carnitina ha estat recentment inclosa en els assaigs clínics amb resultats encoratjadors. Gramignano *et al.*, van informar d'una millora significativa de la fatiga i la qualitat de vida amb l'administració de 6 g/dia de L-carnitina, així com un augment significatiu de les variables nutricionals com la massa corporal magra i la gana [221]. De manera similar, un parell d'estudis de fase III van posar de manifest que l'estratègia terapèutica multimodal que incorporava

L-carnitina va ser la més eficaç per combatre els símptomes clínics de la caquèxia [418,419].

L'altra aproximació terapèutica, objecte d'estudi en aquesta tesi, per combatre l'anorèxia va ser **l'acetat de megestrol** (AM). Estudis anteriors van demostrar que l'administració d'AM provoca un augment en la ingestió d'aliments, tant en animals com en humans [253,257,418,420]. Sembla que el mecanisme d'acció sobre l'augment de la ingestió recau parcialment en l'estimulació del neuropèptid Y [257]. A més, l'AM és capaç de reduir la producció *in vitro* de serotoninines i citoquines (IL-1, IL-6 i TNF- α) en plasma de pacients amb càncer [418]. D'altra banda, el tractament amb AM ha estat relacionat en diferents estudis amb un augment del pes corporal [248,259,260], tot i que aquest increment ha estat atribuït principalment a un augment de la massa grassa i no a la massa muscular [262]. Tot i les millores que exerceix sobre la ingestió i el guany de pes, fins ara no hi ha estudis que confirmin els efectes beneficiosos de l'AM sobre la massa magra, qualitat de vida i supervivència de pacients amb càncer [262,263]. Malgrat això, assaigs clínics en pacients amb SIDA han demostrat que els resultats del tractament AM també mostren un augment de la massa corporal magra. [421,422]. Així mateix, l'objectiu de la setena contribució d'aquesta tesi va ser estudiar, a més a més de l'efecte sobre la ingestió, el possible potencial anticaquèctic de l'AM (100 mg/kg de pes inicial) en rates portadores de l'hapatoma ascític Yoshida AH-130.

El tractament amb AM va donar lloc a un increment en la ingestió en els animals portadors de tumors (Figura 1, Publicació 7) sense afectar el creixement del tumor (Taula 1, Publicació 7). A més a més, els resultats van mostrar clarament que l'administració d'AM contribueix a un increment de pes corporal i a la preservació de la

massa muscular, amb un increment significatiu dels pesos de tots els músculs analitzats (Figura 1, Publicació 7). De fet, el tractament amb el fàrmac va donar lloc a canvis en l'expressió gènica dels principals components dels sistemes proteolítics musculars, disminuint-ne el contingut de mRNA (Taula 2, Publicació 7). A més, l'efecte de l'AM sobre la proteòlisi del múscul esquelètic sembla ser directe, ja que la incubació músculs EDL aïllats en un medi suplementat amb AM a una concentració 200 mM, va donar lloc a una disminució significativa en l'alliberament de tirosina, un indicador de la taxa proteolítica total (Taula 3, Publicació 7). Aquestes observacions ens confirmen que l'AM té un efecte destacable sobre la massa corporal magra.

Per avaluar si aquest augment en el pes dels músculs millorava la condició física dels animals, vam mesurar l'activitat física i la força muscular d'agafada. Varem observar que tots els paràmetres estudiats van millorar significativament en les rates tractades amb AM (Taula 4, Publicació 7), fet que ens suggereix que el fàrmac millora la qualitat de vida dels animals. De fet, la qualitat de vida està fortament afectada per la fatiga a causa de la pèrdua de massa corporal magra i l'estat inflamatori crònic. Alguns autors consideren que els paràmetres clínics a millorar per a un bon pronòstic no són només augmentar el pes corporal i la gana, sinó preservar la massa corporal magra, disminuir la despesa energètica en repòs i la fatiga, i la correcció de l'estat d'inflamació crònic [423]. En el nostre cas, les dades obtingudes suggereixen que el fàrmac no només actua sobre la gana i el pes corporal, sinó que té un clar efecte sobre la massa muscular i el rendiment físic influint positivament en el recanvi de proteïnes musculars.

Per aprofundir una mica més sobre aquest efecte a nivell muscular, en la contribució 8 ens vam plantejar estudiar si l'administració d'AM influïa en la taxa

d'incorporació d'aminoàcids en el teixit muscular, i d'altra banda avaluar l'efecte del fàrmac sobre l'absorció intestinal i posterior captació tissular d'aminoàcids neutres provinents de la dieta. Per aclarir el primer punt, es va administrar ^{14}C -leucina a rates portadores de tumor i es va examinar la taxa d'oxidació i la incorporació d'aquest aminoàcid de cadena ramificada a proteïnes de diferents teixits. Els resultats van mostrar clarament que el tractament amb AM augmenta significativament la taxa de la incorporació d'aquest aminoàcid marcat a la proteïna muscular dels diferents músculs analitzats (Taula 4, Publicació 8), sense alterar la taxa d'oxidació d'aminoàcids *in vivo* (Taula 4, Publicació 8). Per tant, podríem suggerir que el tractament amb AM és capaç d'augmentar la síntesi de proteïnes durant la caquèxia associada al càncer.

Per al segon propòsit d'avaluar l'efecte del fàrmac sobre l'absorció intestinal i posterior captació tissular d'aminoàcids neutres provinents de la dieta, es va utilitzar l'aminoàcid no metabolitzable α -amino- ^3H -isobutirat (AIB), un anàleg de alanina, que es transporta principalment pel sistema A. Estudis previs al nostre laboratori indicaven que la captació d'AIB pel múscul esquelètic disminueix en la caquèxia cancerosa, mentre que la captació hepàtica d'aquest anàleg augmenta [424]. Els resultats van mostrar que l'administració d'AM és capaç d'augmentar significativament la captació muscular d'AIB mentre que disminueix la captació hepàtica (Taula 3, Publicació 8). De fet, durant la caquèxia cancerosa, s'observa un alliberament massiu de nitrogen del múscul en forma d'aminoàcids i el fetge està implicat en l'eliminació d'una gran quantitat d'aminoàcids derivats del múscul, tant per a la gluconeogènesi com per a la síntesi de proteïnes de fase aguda [66,68]. En conjunt, les dades demostren que el tractament amb AM és capaç d'influir en la distribució interorgànica d'aminoàcids

mitjançant l'augment en el múscul esquelètic i la disminució en el fetge, normalitzant d'aquesta manera el patró d'absorció d'aminoàcids trobat en rates control [424,425].

En resum, les dades presentades en aquestes dues contribucions donen suport a que el tractament amb AM, a més d'incrementar la ingestió i el pes corporal tal com havia estat descrit fins ara [248,259,260], és capaç de disminuir el desgast muscular associat a la síndrome caquèctica i millorar la qualitat de vida, donant lloc a una millora del rendiment físic i la força muscular. En aquest sentit, els resultats ens suggereixen que l'AM és un bon candidat per al tractament de pèrdua de massa muscular, ja sigui sol o en combinació amb altres fàrmacs o estratègies nutricionals. Tanmateix, hem de tenir en compte que el l'AM està associat amb efectes secundaris com impotència, hiperglucèmia, supressió adrenal, febre, flatulència i dispèpsia [426]. Per tant, es necessita investigació futura per buscar la combinació òptima.

4. Aplicació d'una teràpia multimodal per al tractament de la caquèxia i anàlisi de la interacció amb la quimioteràpia.

El primer que ens varem plantejar en aquest punt va ser que, per poder avaluar l'efectivitat d'una teràpia multimodal, hauríem de treballar amb un model experimental el més proper possible als pacients amb càncer. Així doncs, ens vam plantejar buscar un agent quimioterapèutic per tractar els nostres models tumorals, ja que la situació real en humans avui en dia és, en primer lloc, el tractament antitumoral, i en segon lloc, en el millor dels casos, complementar-ho amb el tractament anticaquètic.

Per tant, el nostre objectiu en les contribucions 9 i 10 va ser, en primer lloc, trobar un tractament antitumoral efectiu per als nostres models experimentals, i posteriorment avaluar si una teràpia multimodal anticaquèctica redueix també els efectes secundaris produïts per la quimioteràpia i, per tant, millora la qualitat de vida dels animals.

Els models tumorals testats van ser el carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) i el melanoma B-16 (en ratolí de la soca C57BL/6), l'adenocarcinoma de colon C-26 (en ratolí de la soca Balb) i l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 (en rata de la soca Wistar). Tots quatre es caracteritzen per ser tumors de creixement ràpid i que indueixen la síndrome de la caquèxia.

El fàrmac quimioterapèutic utilitzat va ser el **sorafenib** (90 mg/kg), un inhibidor de les tirosina quinases, que actua com a antiangiogènic i com a inhibidor del factor de creixement endotelial vascular (VEGF) [427]. Aquest fàrmac està aprovat per al seu ús en clínica des del 2007 en el tractament del càncer renal metastàtic [428] i l'hepatocarcinoma [429]. El sorafenib ha estat relacionat amb astènia, fatiga i incapacitat física en pacients. Antoun et al. van observar que la pèrdua de múscul es va agreujar específicament pel tractament amb sorafenib, independent de la resposta a la malaltia [206].

L'efecte del sorafenib sobre el creixement tumoral va ser molt divers entre els diferents models tumorals. En el model de rata, l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, l'agent quimioterapèutic va provocar una reducció del 63% del contingut tumoral (Figura 1B, Publicació 10). Aquesta disminució es va deure per una banda a una reducció de la proliferació tumoral, i per altra banda a una activació dels mecanismes de mort cel·lular (bloqueig a G2/M i apoptosis) (Figura 1A, Publicació 10). Pel que fa al

model de ratolí B-16, el fàrmac antitumoral va ser molt efectiu, reduint fins a un 94% el tumor respecte els no tractats (Figura 2, Publicació 9), mentre que en el LLC la reducció va ser molt menor (20%), tot i que el tractament va reduir pràcticament la totalitat de les metàstasis (98%) (Figura 2, Publicació 9). En quant al C26, el sorafenib no va exercir cap efecte sobre el tumor.

Pel que fa als efectes del sorafenib sobre el propi individu, també vam observar resultats molt diversos entre models tumorals. En el model de rata, la reducció del tumor provocada pel fàrmac es va traduir en una reducció dels paràmetres associats amb la caquèxia. Les rates van presentar una major massa muscular respecte els no tractades i una recuperació d'alguns dels teixits adiposos (Taula 1, Publicació 10). Els animals també van mostrar una millor condició física respecte els no tractats (Figura 2, Publicació 10). Referent al LLC vam observar una lleugera recuperació del pes corporal i muscular, sense cap efecte sobre els teixits adiposos (Taula 1 i 2, Publicació 9); també es va mostrar una petita recuperació de l'hematòcrit i de l'activitat física (Figura 1 i 3, Publicació 9). En quant al model de B16, tot i la dràstica reducció del tumor, no vam observar cap increment a nivell de pesos musculars, comparable amb el que passa amb els pacients [206]. No obstant això, el fàrmac va provocar la completa restauració dels teixits adiposos (Taula 2, Publicació 9), de l'hematòcrit (Figura 1, Publicació 9) i de l'activitat física dels animals (Figura 3, Publicació 9), fet que ens permet especular que l'activitat física dels animals no depèn únicament de la massa muscular sinó també de la disponibilitat energètica i de la presència d'anèmia.

Fins a aquest punt, els models tumorals comentats sembla que més o menys responen com esperaríem. Aquests models tumorals provoquen una profunda caquèxia en molt poc temps, de manera que al reduir el volum tumoral no permet

arribar a un grau tan elevat de caquèxia i això ens podria emmascarar els efectes tòxics del sorafenib pel que fa a l'atròfia muscular. No obstant això, el que ens va sobtar va ser l'efecte del sorafenib sobre el model tumoral C26. Tenint en compte que el fàrmac no va exercir cap efecte sobre el tumor, sorprendentment va ser capaç de induir una recuperació de la massa muscular i adiposa (Taula 1 i 2, Publicació 9), fet que es va traduir en un lleuger increment de l'activitat física (Figura 3, Publicació 9).

Per entendre els mecanismes implicats en l'acció directa del sorafenib sobre l'individu vam avaluar els nivells d'IL6 circulants dels tres models de ratolí, ja que ha estat descrit que aquesta citoquina es troba afectada pel sorafenib [430]. A més a més, el model experimental de caquèxia C26 en ratolí es caracteritza per uns nivells molt elevats d'IL-6, i alguns autors han demostrat que la inhibició d'aquesta citoquina en aquest model tumoral és capaç de revertir la caquèxia d'aquests animals [431]. Els resultats ens van mostrar que tant en C26 com en LLC, on els nivells d'IL6 estan elevats a conseqüència del tumor, el sorafenib en cap cas va disminuir la concentració circulant d'aquesta citoquina (Figura 4, Publicació 9), fet que ens suggereix que l'efecte del fàrmac no recau directament en la inhibició de la IL-6. No obstant això, cal destacar que l'efecte antitumoral del sorafenib va ser molt més potent quan més baixos eren els nivells circulants d'IL6, mostrant una bona correlació entre el grau de reducció tumoral i la concentració d'IL6. En el cas del B16, on la presència del tumor no produeix un increment dels nivells circulants d'aquesta citoquina, és on el sorafenib va exercir un efecte més fort eliminant gairebé del tot el tumor; en canvi, en C26, on el tumor provoca una elevada alliberació d'IL6, el fàrmac antitumoral no produeix cap efecte en el tumor (Figura 5, Publicació 9).

Per tant, per poder determinar quins són els mecanismes implicats en la prevenció de la síndrome caquèctica en el model de C26, tot i no tenir cap efecte a nivell tumoral, vam determinar la concentració intramuscular de diverses proteïnes que podrien estar implicades amb l'acció del sorafenib. Els nostres resultats (Figura 6, Publicació 9) suggereixen que el sorafenib actua inhibint l'activitat de STAT3 i ERK a nivell muscular, unes quinases que es troben hiperactivades degut al creixement tumoral en el model de caquèxia C26 [84,432], i amb aquesta inhibició, donant lloc a una reducció en l'acumulació de Pax7 (proteïna implicada en la regeneració muscular) i atrogina-1 (lligasa E3 associada a l'atròfia muscular) [84,432,433]. De fet, estudis previs ja havien mostrat que la inhibició de ERK prevenia l'activació d'atrogina-1 [432].

Dels quatre models testats vam considerar el model de rata per tal d'establir el nostre model preclínic, ja que respon al tractament del sorafenib reduint força el tumor i, a més a més, és el model tumoral més estudiat pel grup i on han estat testades la majoria de les teràpies anticaquèctiques.

Per avaluar millor si el sorafenib tenia algun efecte tòxic sobre l'individu, vam testar el fàrmac en animals control i en portadors de tumor. En tots dos casos vam analitzar si el **sorafenib combinat amb formoterol**, un dels fàrmacs amb potents efectes sobre la caquèxia cancerosa segons experiments previs [330,434], millorava l'estat dels animals. En els animals control el fàrmac antitumoral va provocar una pèrdua de massa muscular, una reducció de la ingestió i una reducció de l'activitat física i força muscular (Taula 1 i Figura 2, Publicació 10) evidenciant doncs els efectes tòxics del fàrmac en aquests animals control. Pel que fa als animals portadors de tumor, els tractats amb sorafenib no van assolir una pèrdua de pes tan marcada, si ho comparem amb els portadors de tumor no tractats, i no es van observar canvis en la ingestió (Taula

1, Publicació 10). No obstant això, cal destacar que en humans no existeix la situació d'un tumor diagnosticat i no tractat; llavors, probablement aquest efecte es deu a la reducció de més del 60% del contingut tumoral, la qual no permet arribar a un grau de caquèxia tan forta, i això pot emmascarar els efectes tòxics del sorafenib. Al combinar el tractament antitumoral amb el formoterol, observem una recuperació de l'efecte negatiu del sorafenib en els animals control. En el cas dels animals portadors de tumor, la combinació dels dos tractaments té un efecte additiu, on observem una recuperació de la massa muscular que assoleix nivells d'animals control (Taula 1, Publicació 10), la qual és tradueix en una recuperació total de la força muscular i una recuperació parcial de l'activitat física (Figura 2, Publicació 10).

Els experiments realitzats fins al moment ens verificaven la necessitat d'una teràpia combinada en els pacients amb càncer, no només dirigida al tractament del tumor sinó també a l'estat nutricional del pacient, fet que es tradueix amb una millora de la qualitat de vida dels malalts.

En un segon experiment, ens vam plantejar analitzar si el tractament antitumoral *per se* allargava la supervivència dels animals, per poder així plantejar nous experiments a més llarg termini. En aquest experiment, les rates no tractades van morir entre dia 11 i 12 de creixement tumoral, mentre que les rates que van rebre el tractament amb sorafenib (90 mg/kg) a partir de dia 2 de creixement tumoral fins a dia 20, a dia 20 de creixement tumoral semblava que ja no tenien tumor (Figura 3, Publicació 10). Tot i així, es veien malaltes, tenien piloerecció i no augmentaven de pes com s'esperaria d'uns animals controls de la mateixa edat. Al deixar d'administrar el tractament, el tumor va començar a créixer i les rates van morir a dia 30.

Considerant que podíem allargar més del doble la vida dels animals només amb el tractament antitumoral, ens vam plantejar un tercer experiment de més durada per estudiar millor els mecanismes moleculars implicats en la prevenció del desgast muscular associat al tractament anticaquèctic, comparant animals portadors de tumor només amb una teràpia antitumoral amb animals portadors de tumor tractats amb una combinació de teràpia antitumoral i anticaquèctica. Pel que fa a la teràpia anticaquèctica, també ens vam plantejar la necessitat de combinar el tractament de formoterol amb un altre fàrmac, en aquest cas dirigit a reduir l'anorèxia. Varem escollir l'acetat de megestrol (AM) ja que estudis previs duts a terme durant aquesta tesi han demostrat que aquest millora l'anorèxia i la pèrdua de massa muscular en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 [435].

Per tant, aquest nou experiment va tenir una durada 20 dies amb un grup de 7 animals control i 25 animals portadors de tumor (hepatoma ascític Yoshida AH-130), els quals rebien una teràpia antitumoral (sorafenib) a partir del segon dia de creixement tumoral. D'aquesta manera podríem testar els tractaments anticaquèctics en un model preclínic més semblant a la situació que té lloc en pacients amb càncer. Aquests animals portadors de tumor i tractats amb sorafenib es van separar en 3 subgrups: sense tractament anticaquèctic, tractament amb formoterol i **tractament combinat de formoterol i acetat de megestrol**. Vam observar que l'administració del tractament multimodal, format per formoterol i AM, incrementava significativament la ingestió dels animals portadors de tumor respecte als animals tractats únicament amb sorafenib o amb sorafenib i formoterol (Figura 5, Publicació 10). Pel que fa als pesos dels músculs, vam observar que l'administració d'una teràpia antitumoral no preserva el desgast de la massa muscular associat a la presència del tumor tal i com ha

estat descrit en pacients [206,210]. Al combinar aquesta teràpia antitumoral amb un tractament anticaquèctic, es va produir una recuperació de la massa muscular (Taula 2, Publicació 10). L'addició d'AM a la teràpia anticaquèctica resultava en un increment significatiu dels pesos del múscul sòleus, diafragma i cor respecte als animals que no havien rebut aquest tractament. Aquesta recuperació de la massa muscular en els animals que van rebre la teràpia anticaquèctica, també es va traduir en una recuperació de la força muscular, assolint una força igual a la dels animals control (Figura 6, Publicació 10).

Les alteracions metabòliques que pateixen els pacients amb caquèxia impliquen també canvis sobre els nivells plasmàtics de diferents molècules, entre les quals es troben l'albúmina, el lactat, la glucosa i els triglicèrids [15]. La hipoalbuminèmia observada en els pacients amb caquèxia cancerosa ha estat relacionada amb la gravetat i el mal pronòstic dels diferents estats caquèctics [436]; i sembla que està relacionada amb la resposta inflamatòria associada a l'estat caquètic, així com amb la distribució i increment de la degradació de l'albúmina plasmàtica [437]. En el cas del lactat, increments en aquest metabòlit són freqüents en els pacients amb càncer [61]. Experiments previs realitzats pel nostre grup han mostrat un increment de lactat produït per l'efecte del tumor en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 [438]. Aquests increments es troben associats a una elevada producció de lactat per part de les cèl·lules tumorals (efecte Warburg [439]), i es troba correlacionada amb l'acidosi làctica que caracteritza els pacients amb càncer, així com amb el grau de malignitat del tumor. Per altra banda, la hipoglucèmia observada en els animals portadors de tumor es podria explicar per un major consum de glucosa associat a la presència del tumor en l'hoste [438]. Com s'ha esmentat anteriorment, el metabolisme

anaeròbic del tumor sobre la glucosa estaria relacionat amb l'increment de lactat. Finalment, l'increment de triglicèrids plasmàtics és un tret associat amb les condicions catabòliques que caracteritzen la síndrome caquèctica [61]. No obstant, la caquèxia en un estat avançat implica no només la pèrdua de massa muscular, sinó també el consum de triglicèrids [440]. És interessant destacar com la teràpia anticaquèctica formada per formoterol i AM va ser capaç de millorar parcialment la glucèmia i hiperlactèmia en animals amb tumor tractats amb sorafenib, mentre que no va tenir efectes sobre l'albúmina o els triglicèrids circulants (Figura 7, Publicació 10).

Atès que un dels esdeveniments més perjudicials que es desenvolupen en el múscul esquelètic durant el creixement del tumor és l'augment de la degradació de proteïnes, vam examinar els efectes del tractament sobre l'expressió gènica dels diferents sistemes proteolítics musculars (Taula 3, Publicació 10). El tractament multimodal format per formoterol i AM va reduir significativament l'expressió gènica de MuRF-1 i atrofina-1 en el múscul GSN, dues Ub-lligasses que representen el pas limitant de la degradació proteica dependent del proteasoma [150]. El doble tractament també va disminuir l'expressió de m-calpaïna, també coneguda per tenir un paper en la proteòlisi muscular en la caquèxia cancerosa [195,196].

En resum, és important assenyalar que aquest és un dels pocs estudis que incorpora el tractament antitumoral juntament amb tractaments anticaquèctics, ja que la majoria d'estudis preclínics estan basats només amb l'efecte caquèctic induït en un curt interval de temps de creixement tumoral o amb fàrmacs antineoplàstics individuals, no amb una teràpia combinada. Aquests paràmetres experimentals, però, estan lluny de la pràctica clínica, on s'adopta una intervenció antitumoral tan aviat com es diagnostica el càncer, però no es té en compte la caquèxia fins que aquesta ja

està avançada. Per altra banda, l'estudi de la toxicitat del fàrmac i la farmacocinètica en absència de tumor podria ocultar aspectes importants [441]. Com a conseqüència, l'ús de models preclínics inapropiats complica i limita la transferència dels descobriments bàsics. Per contra, en el present estudi, l'administració de sorafenib redueix eficaçment la càrrega tumoral al mateix temps que allarga la supervivència a expenses d'un estat caquèctic dramàtic, reflectint les condicions clíiques dels pacients amb càncer. Testar l'eficàcia dels fàrmacs candidats en aquestes condicions experimentals ofereix un enfocament vàlid i fiable per a la investigació translacional en el camp de la caquèxia associada al càncer. Dades molt recents obtingudes en pacients amb càncer utilitzant una combinació similar enforteix aquesta hipòtesi [373]. En conclusió, els resultats presentats reforcen la idea que un tractament anticaquèctic exitós ha de ser multifactorial. Des d'aquest punt de vista, la combinació d'un fàrmac orexigènic (acetat de megestrol) amb un anticatabòlic (formoterol) comporta efectes clarament beneficiosos en la millora de la caquèxia en animals portadors de tumors.

CONCLUSIONS

Conclusions

1. El desgast muscular associat a la síndrome caquètica en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 esdevé en una reducció substancial de la condició física. Aquesta reducció es reflexa en la disminució de la força muscular i de l'activitat física total.
2. El tractament amb l'agonista del receptor β_2 -adrenèrgic, formoterol, a part de reduir el desgast muscular, no afecta negativament la funció cardíaca de les rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 i, a més a més, incrementa la força muscular i l'activitat física, indicant una millora de la qualitat de vida.
3. La inhibició de la senyalització de la miostatina mitjançant el receptor soluble d'activines tipus IIB (sActRIIB) reverteix la pèrdua de massa muscular en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), fet que es tradueix en una menor pèrdua del pes corporal i en un increment en la força muscular.
4. El doble tractament compost per formoterol i sActRIIB reverteix el desgast muscular associat al model de caquèxia experimental de ratolí LLC, aturant completament les pèrdues tant de pes corporal com dels pesos dels músculs, així com mantenint la força muscular. Aquest efecte ve donat per una activació de la síntesi proteica i una reducció de la degradació de proteïnes. La combinació dels dos tractaments redueix la resposta inflamatòria i el nombre de metàstasis, fet que es tradueix amb un augment substancial de la supervivència.
5. L'administració de L-carnitina a rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 incrementa la ingestió i evita parcialment el desgast muscular modulant el metabolisme proteic de forma directa, donant lloc a una reducció de la degradació de proteïnes musculars, a un augment de la força muscular i de l'activitat física, tot això conduint a una millora de la condició física del animals.

6. El tractament amb acetat de megestrol (AM) incrementa la gana, el pes corporal, i millora tant el desgast muscular com l'activitat física i la força muscular. El tractament incrementa significativament la captació d'aminoàcids neutres (AIB) al múscul esquelètic i la incorporació de l'aminoàcid de cadena ramificada leucina en la proteïna muscular, fet que indica una clara acció anabòlica de la droga en el teixit muscular.
7. L'agent antitumoral sorafenib és eficaç per reduir el creixement del tumor en els models de Yoshida AH-130, LLC i B16, mentre que no mostra cap efecte en el C26. El sorafenib té un efecte anticaquèctic en el model C26 que no està vinculat a una disminució dels nivells circulants d'IL-6 sinó que a una reducció de l'expressió de ERK i STAT3 a nivell muscular.
8. La teràpia multimodal anticaquèctica formada per formoterol i AM és una estratègia prometedora per al tractament de la caquèxia associada al càncer en l'entorn preclínic que millor s'aproxima a la situació clínica, com és el model experimental Yoshida AH-130 tractat amb una teràpia antitumoral (sorafenib). El tractament multimodal incrementa la gana i reverteix el desgast muscular, provocant també una recuperació total de la força muscular i un augment de l'activitat física.

BIBLIOGRAFIA

1. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin. Nutr.* 2008;27:793–9.
2. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* 2011;12:489–95.
3. Argilés JM, Anker SD, Evans WJ, Morley JE, Fearon KCH, Strasser F, et al. Consensus on cachexia definitions. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 2010;11:229–30.
4. Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clin. Nutr.* 2010. p. 154–9.
5. Penna F, Bonelli G, Baccino FM, Costelli P. Mechanism-based therapeutic approaches to cachexia. *Vitam. Horm.* 2013;92:271–99.
6. Teunissen SCCM, Wesker W, Kruitwagen C, de Haes HCJM, Voest EE, de Graeff A. Symptom prevalence in patients with incurable cancer: a systematic review. *J. Pain Symptom Manage.* 2007;34:94–104.
7. Vaughan VC, Martin P, Lewandowski PA. Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2013;4:95–109.
8. Argilés JM, Busquets S, Moore-Carrasco R, Figueras M, Almendro V, López-Soriano FJ. Targets in clinical oncology: the metabolic environment of the patient. *Front. Biosci.* 2007;12:3024–51.
9. Tuca A, Jimenez-Fonseca P, Gascón P. Clinical evaluation and optimal management of cancer cachexia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* Elsevier Ireland Ltd; 2013;88:625–36.
10. 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.* 2014;25:1635–42.
11. Blum D, Omlin A, Fearon K, Baracos V, Radbruch L, Kaasa S, et al. Evolving classification systems for cancer cachexia: ready for clinical practice? *Support. Care Cancer.* 2010;18:273–9.
12. Bozzetti F, Mariani L. Defining and classifying cancer cachexia: a proposal by the SCRINIO Working Group. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* 33:361–7.
13. Vigano AL, di Tomasso J, Kilgour RD, Trutschnigg B, Lucar E, Morais JA, et al. The abridged patient-generated subjective global assessment is a useful tool for early detection and characterization of cancer cachexia. *J. Acad. Nutr. Diet.* 2014;114:1088–98.
14. Martin L, Senesse P, Gioulbasanis I, Antoun S, Bozzetti F, Deans C, et al. Diagnostic Criteria for the Classification of Cancer-Associated Weight Loss. *J. Clin. Oncol.* 2014;
15. Argilés JM, López-Soriano FJ, Toledo M, Betancourt A, Serpe R, Busquets S. The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2011;2:87–93.
16. Abstracts of the 7th cachexia conference, kobe/osaka, Japan, december 9-11, 2013. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2013;4:295–343.
17. Tisdale MJ. Catabolic mediators of cancer cachexia. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* 2008;2:256–61.

Bibliografia

18. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* 2009;3:263–8.
19. Scheede-Bergdahl C, Watt HL, Trutschnigg B, Kilgour RD, Haggarty A, Lucar E, et al. Is IL-6 the best pro-inflammatory biomarker of clinical outcomes of cancer cachexia? *Clin. Nutr.* 2012;31:85–8.
20. Punzi T, Fabris A, Morucci G, Biagioni P, Gulisano M, Ruggiero M, et al. C-reactive protein levels and vitamin d receptor polymorphisms as markers in predicting cachectic syndrome in cancer patients. *Mol. Diagn. Ther.* 2012;16:115–24.
21. Weber M-A, Kinscherf R, Krakowski-Roosen H, Aulmann M, Renk H, Künkele A, et al. Myoglobin plasma level related to muscle mass and fiber composition: a clinical marker of muscle wasting? *J. Mol. Med. (Berl).* 2007;85:887–96.
22. Grossberg AJ, Scarlett JM, Marks DL. Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiol. Behav.* 2010;100:478–89.
23. Oberholzer R, Hopkinson JB, Baumann K, Omlin A, Kaasa S, Fearon KC, et al. Psychosocial effects of cancer cachexia: a systematic literature search and qualitative analysis. *J. Pain Symptom Manage.* 2013;46:77–95.
24. Argilés JM, Costelli P, Carbó N, Pallarés-Trujillo J, López-Soriano FJ. Tumour growth and nitrogen metabolism in the host (Review). *Int. J. Oncol.* Spandidos Publications; 1999;14:479–565.
25. Bossola M, Scribano D, Colacicco L, Tavazzi B, Giungi S, Zuppi C, et al. Anorexia and plasma levels of free tryptophan, branched chain amino acids, and ghrelin in hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr.* 2009;19:248–55.
26. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat. Rev. Cancer.* 2014;
27. Andicoberry B, Padillo FJ, Gómez-Alvarez M, Gómez-Barbadillo J, Cruz A, Daza JJ, et al. [Evaluation of anorexia in patients with bile duct obstruction]. *Nutr. Hosp.* 1999;14:38–43.
28. Barber MD, Ross JA, Fearon KCH. Cancer cachexia. *Surg. Oncol.* 1999;8:133–41.
29. Argilés JM, Lopez-Soriano FJ, Evans RD, Williamson DH. Interleukin-1 and lipid metabolism in the rat. *Biochem. J.* 1989;259:673–8.
30. Argilés JM, López-Soriano FJ, Wiggins D, Williamson DH. Comparative effects of tumour necrosis factor-alpha (cachectin), interleukin-1-beta and tumour growth on amino acid metabolism in the rat in vivo. Absorption and tissue uptake of alpha-amino[1-14C]isobutyrate. *Biochem. J.* 1989;261:357–62.
31. Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003;35:405–9.
32. Laviano A, Meguid MM, Rossi-fanelli F. Cancer anorexia : clinical implications , pathogenesis , and therapeutic strategies. 2003;4:686–94.
33. Laviano A, Meguid MM, Rossi-Fanelli F. Improving food intake in anorectic cancer patients. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2003;6:421–6.
34. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group; 2002;2:862–71.

35. Evans WK, Makuch R, Clamon GH, Feld R, Weiner RS, Moran E, et al. Limited impact of total parenteral nutrition on nutritional status during treatment for small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1985;45:3347–53.
36. Ng EH, Lowry SF. Nutritional support and cancer cachexia. Evolving concepts of mechanisms and adjunctive therapies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1991;5:161–84.
37. Bozzetti F, Gavazzi C, Mariani L, Crippa F. Artificial nutrition in cancer patients: which route, what composition? *World J. Surg.* 1999;23:577–83.
38. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Vidal PM, Camilo ME. Dietary counseling improves patient outcomes: a prospective, randomized, controlled trial in colorectal cancer patients undergoing radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:1431–8.
39. Muscaritoli M, Molfino A, Gioia G, Laviano A, Rossi Fanelli F. The “parallel pathway”: a novel nutritional and metabolic approach to cancer patients. *Intern. Emerg. Med.* 2011;6:105–12.
40. Lis CG, Gupta D, Lammersfeld CA, Markman M, Vashi PG. Role of nutritional status in predicting quality of life outcomes in cancer--a systematic review of the epidemiological literature. *Nutr. J.* 2012;11:27.
41. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol. Rev.* 2009;89:381–410.
42. Fine EJ, Feinman RD. Thermodynamics of weight loss diets. *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2004;1:15.
43. Argilés JM, Fontes-Oliveira CC, Toledo M, López-Soriano FJ, Busquets S. Cachexia: a problem of energetic inefficiency. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2014;
44. Schiff M, Bénit P, Coulibaly A, Loublier S, El-Khoury R, Rustin P. Mitochondrial response to controlled nutrition in health and disease. *Nutr. Rev.* 2011;69:65–75.
45. Constantinou C, Fontes de Oliveira CC, Mintzopoulos D, Busquets S, He J, Kesarwani M, et al. Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. *Int. J. Mol. Med.* 2011;27:15–24.
46. Sandri M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 2010;584:1411–6.
47. Cardoso CM, Custódio JB, Almeida LM, Moreno AJ. Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001;176:145–52.
48. Sanders PM, Tisdale MJ. Effect of zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG) on expression of uncoupling proteins in skeletal muscle and adipose tissue. *Cancer Lett.* 2004;212:71–81.
49. Busquets S, Almendro V, Barreiro E, Figueras M, Argilés JM, López-Soriano FJ. Activation of UCPs gene expression in skeletal muscle can be independent on both circulating fatty acids and food intake. Involvement of ROS in a model of mouse cancer cachexia. *FEBS Lett.* 2005;579:717–22.
50. Tzika AA, Fontes-Oliveira CC, Shestov AA, Constantinou C, Psychogios N, Righi V, et al. Skeletal muscle mitochondrial uncoupling in a murine cancer cachexia model. *Int. J. Oncol.* 2013;43:886–94.
51. Antunes D, Padrão AI, Maciel E, Santinha D, Oliveira P, Vitorino R, et al. Molecular insights into mitochondrial dysfunction in cancer-related muscle wasting. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1841:896–905.

Bibliografia

52. Fermoselle C, García-Arumí E, Puig-Vilanova E, Andreu AL, Urtreger AJ, de Kier Joffé EDB, et al. Mitochondrial dysfunction and therapeutic approaches in respiratory and limb muscles of cancer cachectic mice. *Exp. Physiol.* 2013;98:1349–65.
53. Shum AMY, Mahendradatta T, Taylor RJ, Painter AB, Moore MM, Tsoli M, et al. Disruption of MEF2C signaling and loss of sarcomeric and mitochondrial integrity in cancer-induced skeletal muscle wasting. *Aging (Albany. NY)*. 2012;4:133–43.
54. Padrão AI, Oliveira P, Vitorino R, Colaço B, Pires MJ, Márquez M, et al. Bladder cancer-induced skeletal muscle wasting: disclosing the role of mitochondria plasticity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:1399–409.
55. Fontes-Oliveira CC, Busquets S, Toledo M, Penna F, Aylwin MP, Sirisi S, et al. Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: Altered energetic efficiency? *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2013;1830:2770–8.
56. Fuster G, Busquets S, Ametller E, Olivan M, Almendro V, de Oliveira CCF, et al. Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer Res.* 2007;67:6512–9.
57. Kang C, Chung E, Diffee G, Ji LL. Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: role of PGC-1α. *Exp. Gerontol.* 2013;48:1343–50.
58. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol. Cell.* 2001;8:971–82.
59. Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, Yamazaki T, Kai Y, Tamura M, et al. Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator-1alpha leads to muscle atrophy with depletion of ATP. *Am. J. Pathol.* 2006;169:1129–39.
60. Cao D, Wu G, Zhang B, Quan Y, Wei J, Jin H, et al. Resting energy expenditure and body composition in patients with newly detected cancer. *Clin. Nutr.* 2010;29:72–7.
61. Argiles JM, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev.* 1997/09/01 ed. Department de Bioquímica i Biología Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Spain. argiles@porthos.bio.ub.es; 1997;17:477–98.
62. Norton JA, Maher M, Wesley R, White D, Brennan MF. Glucose intolerance in sarcoma patients. *Cancer.* 1984;54:3022–7.
63. Honors MA, Kinzig KP. The role of insulin resistance in the development of muscle wasting during cancer cachexia. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2012;3:5–11.
64. Tsoli M, Robertson G. Cancer cachexia: malignant inflammation, tumorkines, and metabolic mayhem. *Trends Endocrinol. Metab.* 2013;24:174–83.
65. Winter A, MacAdams J, Chevalier S. Normal protein anabolic response to hyperaminoacidemia in insulin-resistant patients with lung cancer cachexia. *Clin. Nutr.* 2012;31:765–73.
66. Argilés JM, López-Soriano J, Almendro V, Busquets S, López-Soriano FJ. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med. Res. Rev.* 2005;25:49–65.
67. Dalamaga M. Interplay of adipokines and myokines in cancer pathophysiology: Emerging therapeutic implications. *World J. Exp. Med.* 2013;3:26–33.

68. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Mechanisms to explain wasting of muscle and fat in cancer cachexia. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* 2007;1:293–8.
69. Das SK, Eder S, Schauer S, Diwoky C, Temmel H, Guertl B, et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science.* 2011;333:233–8.
70. Stephens NA, Skipworth RJE, Macdonald AJ, Greig CA, Ross JA, Fearon KCH. Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2011;2:111–7.
71. Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, et al. A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell Metab.* 2014;20:433–47.
72. Kir S, White JP, Kleiner S, Kazak L, Cohen P, Baracos VE, et al. Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature.* 2014;513:100–4.
73. Lee P, Greenfield JR, Ho KKY, Fulham MJ. A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010;299:E601–6.
74. Nedergaard J, Cannon B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab.* 2010;11:268–72.
75. Tsoli M, Moore M, Burg D, Painter A, Taylor R, Lockie SH, et al. Activation of thermogenesis in brown adipose tissue and dysregulated lipid metabolism associated with cancer cachexia in mice. *Cancer Res.* 2012;72:4372–82.
76. Bing C, Brown M, King P, Collins P, Tisdale MJ, Williams G. Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. *Cancer Res.* 2000;60:2405–10.
77. Arruda AP, Milanski M, Romanatto T, Solon C, Coope A, Alberici LC, et al. Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. *Endocrinology.* 2010;151:683–94.
78. Li G, Klein RL, Matheny M, King MA, Meyer EM, Scarpace PJ. Induction of uncoupling protein 1 by central interleukin-6 gene delivery is dependent on sympathetic innervation of brown adipose tissue and underlies one mechanism of body weight reduction in rats. *Neuroscience.* 2002;115:879–89.
79. Cosper PF, Leinwand LA. Myosin heavy chain is not selectively decreased in murine cancer cachexia. *Int. J. Cancer.* 2012;130:2722–7.
80. Martin L, Birdsell L, Macdonald N, Reiman T, Clandinin MT, McCargar LJ, et al. Cancer cachexia in the age of obesity: skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index. *J. Clin. Oncol.* 2013;31:1539–47.
81. Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2013;10:90–9.
82. Argilés JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biología, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08071, Barcelona, Spain.* argiles@porthos.bio.ub.es; 2003;35:405–9.

Bibliografia

83. Le Bricon T, Gugins S, Cynober L, Baracos VE. Negative impact of cancer chemotherapy on protein metabolism in healthy and tumor-bearing rats. *Metabolism*. 1995;44:1340–8.
84. Bonetto A, Aydogdu T, Kunzevitzky N, Guttridge DC, Khuri S, Koniaris LG, et al. STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. *PLoS One*. 2011;6:e22538.
85. Tisdale MJ. Biology of cachexia. *J. Natl. Cancer Inst.* 1997;89:1763–73.
86. Roxburgh CSD, McMillan DC. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol*. 2010;6:149–63.
87. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140:883–99.
88. Argilés JM, Busquets S, Toledo M, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*. 2009;3:263–8.
89. Gehr G, Braun T, Lesslauer W. Cytokines, receptors, and inhibitors. *Clin. Investigig.* 1992;70:64–9.
90. Argilés JM, López-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Med. Res. Rev.* 1999;19:223–48.
91. Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E, et al. Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mech. Ageing Dev.* 2003;124:495–502.
92. Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. *Eur. J. Pharmacol.* 2011;668 Suppl :S81–6.
93. Michalaki V, Syrigos K, Odontiadis M, Waxman J. The prognostic significance of serum levels of tumour necrosis factor- alpha and interleukin-6 and their association with cachexia in patients with prostate cancer. *ASCO Meet. Abstr.* 2004;22:4743.
94. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res.* 21:1355–8.
95. Suh S-Y, Choi YS, Yeom CH, Kwak SM, Yoon HM, Kim DG, et al. Interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts survival in patients with advanced cancer. *Support. Care Cancer*. 2013;21:3071–7.
96. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir. Res.* 2001;2:269–72.
97. Nicolas N, Marazzi G, Kelley K, Sasoon D. Embryonic deregulation of muscle stress signaling pathways leads to altered postnatal stem cell behavior and a failure in postnatal muscle growth. *Dev. Biol.* 2005;281:171–83.
98. Moresi V, Pristerà A, Scicchitano BM, Molinaro M, Teodori L, Sasoon D, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response. *Stem Cells*. 2008;26:997–1008.
99. Van de Woestijne AP, Monajemi H, Kalkhoven E, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction and hypertriglyceridemia: mechanisms and management. *Obes. Rev.* 2011;12:829–40.

100. Kuroda K, Nakashima J, Kanao K, Kikuchi E, Miyajima A, Horiguchi Y, et al. Interleukin 6 is associated with cachexia in patients with prostate cancer. *Urology*. 2007;69:113–7.
101. Moses AGW, Maingay J, Sangster K, Fearon KCH, Ross JA. Pro-inflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced pancreatic cancer: relationship to acute phase response and survival. *Oncol. Rep.* 2009;21:1091–5.
102. Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J. Clin. Invest.* 1992;89:1681–4.
103. Zaki MH, Nemeth JA, Trikha M. CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice. *Int. J. Cancer*. 2004;111:592–5.
104. Fujimoto-Ouchi K, Tamura S, Mori K, Tanaka Y, Ishitsuka H. Establishment and characterization of cachexia-inducing and -non-inducing clones of murine colon 26 carcinoma. *Int. J. Cancer*. 1995;61:522–8.
105. Baltgalvis KA, Berger FG, Pena MMO, Davis JM, Muga SJ, Carson JA. Interleukin-6 and cachexia in ApcMin/+ mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008;294:R393–401.
106. Bodell PW, Kodesh E, Haddad F, Zaldivar FP, Cooper DM, Adams GR. Skeletal muscle growth in young rats is inhibited by chronic exposure to IL-6 but preserved by concurrent voluntary endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* 2009;106:443–53.
107. White JP, Baynes JW, Welle SL, Kostek MC, Matesic LE, Sato S, et al. The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in the Apc(Min/+) mouse. *PLoS One*. 2011;6:e24650.
108. Fearon KCH, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab.* Elsevier; 2012;16:153–66.
109. Bayliss TJ, Smith JT, Schuster M, Dragnev KH, Rigas JR. A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011;11:1663–8.
110. Costelli P, Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, López-Sorianoq FJ, Argilés JM. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is unable to reverse cachexia in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Cancer Lett.* 1995;95:33–8.
111. Quinn LS, Haugk KL, Grabstein KH. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology*. 1995;136:3669–72.
112. Figueras M, Busquets S, Carbó N, Barreiro E, Almendro V, Argilés JM, et al. Interleukin-15 is able to suppress the increased DNA fragmentation associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* 2004;569:201–6.
113. Tisdale MJ. Are tumoral factors responsible for host tissue wasting in cancer cachexia? *Future Oncol.* 2010;6:503–13.
114. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 2007;3:e79.
115. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2682–8.

Bibliografia

116. Matsakas A, Macharia R, Otto A, Elashry MI, Mouisel E, Romanello V, et al. Exercise training attenuates the hypermuscular phenotype and restores skeletal muscle function in the myostatin null mouse. *Exp. Physiol.* 2012;97:125–40.
117. Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, et al. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007;104:1835–40.
118. Mendias CL, Marcin JE, Calerdon DR, Faulkner JA. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *J. Appl. Physiol.* 2006;101:898–905.
119. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009;296:C1258–70.
120. Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009;296:C1248–57.
121. Zimmers TA, Davies M V, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science.* 2002;296:1486–8.
122. Bogdanovich S, Krag TOB, Barton ER, Morris LD, Whittemore L-A, Ahima RS, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* 2002;420:418–21.
123. Whittemore L-A, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;300:965–71.
124. Lokireddy S, McFarlane C, Ge X, Zhang H, Sze SK, Sharma M, et al. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Mol. Endocrinol.* 2011;25:1936–49.
125. Lokireddy S, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R, et al. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011;301:C1316–24.
126. Aversa Z, Bonetto A, Penna F, Costelli P, Di Renzo G, Lacitignola A, et al. Changes in myostatin signaling in non-weight-losing cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.* 2012;19:1350–6.
127. Han HQ, Zhou X, Mitch WE, Goldberg AL. Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:2333–47.
128. Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, et al. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur. J. Clin. Invest.* 2008;38:531–8.
129. Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell.* Departments of Metabolic Disorders and Protein Science, Amgen Research, Thousand Oaks, CA 91320, USA.; 2010;142:531–43.
130. Hedger MP, Winnall WR, Phillips DJ, de Kretser DM. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitam. Horm.* 2011;85:255–97.
131. Gold E, Risbridger G. Activins and activin antagonists in the prostate and prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;359:107–12.

132. Trendelenburg AU, Meyer A, Jacobi C, Feige JN, Glass DJ. TAK-1/p38/nNF_kB signaling inhibits myoblast differentiation by increasing levels of Activin A. *Skelet. Muscle.* BioMed Central Ltd; 2012;2:3.
133. Leto G, Incorvaia L, Badalamenti G, Tumminello FM, Gebbia N, Flandina C, et al. Activin A circulating levels in patients with bone metastasis from breast or prostate cancer. *Clin. Exp. Metastasis.* 2006;23:117–22.
134. Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;391:1548–54.
135. Schakman O, Kalista S, Barbé C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:2163–72.
136. Menconi MJ, Arany ZP, Alamdari N, Aversa Z, Gonnella P, O’Neal P, et al. Sepsis and glucocorticoids downregulate the expression of the nuclear cofactor PGC-1beta in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010;299:E533–43.
137. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol. Rev.* 2009;89:381–410.
138. Russell ST, Tisdale MJ. The role of glucocorticoids in the induction of zinc-alpha2-glycoprotein expression in adipose tissue in cancer cachexia. *Br. J. Cancer.* Nature Publishing Group; 2005;92:876–81.
139. Drott C, Svaninger G, Lundholm K. Increased urinary excretion of cortisol and catecholami-NES in malnourished cancer patients. *Ann. Surg.* 1988;208:645–50.
140. Dev R, Hui D, Dalal S, Nooruddin ZI, Yennurajalingam S, Del Fabbro E, et al. Association between serum cortisol and testosterone levels, opioid therapy, and symptom distress in patients with advanced cancer. *J. Pain Symptom Manage.* 2011;41:788–95.
141. Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, et al. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *Eur. Heart J.* 2014;35:932–41.
142. Dev R, Hui D, Del Fabbro E, Delgado-Guay MO, Sobti N, Dalal S, et al. Association between hypogonadism, symptom burden, and survival in male patients with advanced cancer. *Cancer.* 2014;120:1586–93.
143. Kovacheva EL, Hikim APS, Shen R, Sinha I, Sinha-Hikim I. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH₂-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology.* 2010;151:628–38.
144. Ibebunjo C, Eash JK, Li C, Ma Q, Glass DJ. Voluntary running, skeletal muscle gene expression, and signaling inversely regulated by orchidectomy and testosterone replacement. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011;300:E327–40.
145. Chen S-Z, Qiu Z-G. Combined treatment with GH, insulin, and indomethacin alleviates cancer cachexia in a mouse model. *J. Endocrinol.* 2011;208:131–6.
146. Lundholm K, Körner U, Gunnebo L, Sixt-Ammilon P, Fouladiun M, Daneryd P, et al. Insulin treatment in cancer cachexia: effects on survival, metabolism, and physical functioning. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:2699–706.
147. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet. Muscle.* BioMed Central Ltd; 2011;1:4.

Bibliografia

148. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280:4294–314.
149. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:1009–13.
150. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. FoxO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 2004;117:399–412.
151. Reed SA, Sandesara PB, Senf SM, Judge AR. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *FASEB J.* 2012;26:987–1000.
152. Johns N, Stephens NA, Fearon KCH. Muscle wasting in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:2215–29.
153. Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Penna F, Reffo P, Bonetto A, et al. IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006;291:R674–83.
154. Penna F, Bonetto A, Muscaritoli M, Costamagna D, Minero VG, Bonelli G, et al. Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? *Int. J. Cancer.* 2010;127:1706–17.
155. Lee S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20:61–86.
156. Smith KL, Tisdale MJ. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. *Br. J. Cancer.* 1993;67:680–5.
157. Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J. Clin. Invest.* 2004;114:370–8.
158. Baracos VE, DeVivo C, Hoyle DH, Goldberg AL. Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am. J. Physiol.* 1995;268:E996–1006.
159. Beck SA, Smith KL, Tisdale MJ. Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. *Cancer Res.* 1991;51:6089–93.
160. Fontes-Oliveira CC, Busquets S, Fuster G, Ametller E, Figueras M, Olivan M, et al. A differential pattern of gene expression in skeletal muscle of tumor-bearing rats reveals a dysregulation of excitation-contraction coupling together with additional muscle alterations. *Muscle Nerve.* 2013;
161. Schmitt TL, Martignoni ME, Bachmann J, Fechtner K, Friess H, Kinscherf R, et al. Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia. *J. Mol. Med. (Berl).* 2007;85:647–54.
162. Sacheck JM, Hyatt J-PK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 2007;21:140–55.
163. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001;294:1704–8.

164. Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004;15:1537–45.
165. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:14440–5.
166. Kedar V, McDonough H, Arya R, Li H-H, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101:18135–40.
167. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 2007;6:376–85.
168. Polge C, Heng A-E, Jarzaguet M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, et al. Muscle actin is polyubiquitylated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J.* 2011;25:3790–802.
169. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J. Cell Biol.* 2009;185:1083–95.
170. Csibi A, Cornille K, Leibovitch M-P, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AMJ, et al. The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. Blagosklonny M V., editor. PLoS One. Public Library of Science; 2010;5:e8994.
171. Li H-H, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang D-Z, et al. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1058–71.
172. Shi J, Luo L, Eash J, Ibebungo C, Glass DJ. The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *Dev. Cell.* Elsevier; 2011;21:835–47.
173. Llovera M, García-Martínez C, Agell N, Marzábal M, López-Soriano FJ, Argilés JM. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* 1994;338:311–8.
174. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004;18:39–51.
175. Lagirand-Cantaloube J, Cornille K, Csibi A, Batonnet-Pichon S, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Inhibition of atrogin-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS One.* 2009;4:e4973.
176. Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2010;13:225–9.
177. Moore-Carrasco R, Busquets S, Almendro V, Palanki M, López-Soriano FJ, Argilés JM. The AP-1/NF-kappaB double inhibitor SP100030 can revert muscle wasting during experimental cancer cachexia. *Int. J. Oncol.* 2007;30:1239–45.
178. Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Grieco G, Bonelli G, Pacelli F, et al. Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Ann. Surg.* 2003;237:384–9.

Bibliografia

179. Williams A, Sun X, Fischer JE, Hasselgren PO. The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery*. 1999;126:744–9; discussion 749–50.
180. Khal J, Wyke SM, Russell ST, Hine A V, Tisdale MJ. Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia. *Br. J. Cancer*. 2005;93:774–80.
181. Khal J, Hine A V, Fearon KCH, Dejong CHC, Tisdale MJ. Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005;37:2196–206.
182. Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Bellantone R, Pacelli F, Busquets S, et al. Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001;280:R1518–23.
183. Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*. 2005;120:159–62.
184. Penna F, Baccino FM, Costelli P. Coming back: autophagy in cachexia. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2014;17:241–6.
185. Attaix D, Bechet D. FoxO3 controls dangerous proteolytic liaisons. *Cell Metab.* 2007;6:425–7.
186. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech. Company of Biologists*; 2013;6:25–39.
187. Penna F, Costamagna D, Pin F, Camperi A, Fanzani A, Chiarpotto EM, et al. Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *Am. J. Pathol.* 2013;182:1367–78.
188. 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.* 2007;6:458–71.
189. Op den Kamp CM, Langen RC, Snepvangers FJ, de Theije CC, Schellekens JM, Laugs F, et al. Nuclear transcription factor κ B activation and protein turnover adaptations in skeletal muscle of patients with progressive stages of lung cancer cachexia. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013;98:738–48.
190. Tardif N, Klaude M, Lundell L, Thorell A, Rooyackers O. Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013;98:1485–92.
191. Bertipaglia I, Carafoli E. Calpains and human disease. *Subcell. Biochem.* 2007;45:29–53.
192. Barta J, Tóth A, Edes I, Vaszily M, Papp JG, Varró A, et al. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol. Cell. Biochem.* 2005;278:1–8.
193. Tidball JG, Spencer MJ. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *J. Physiol.* 2002;545:819–28.
194. Purintrapiban J, Wang M, Forsberg NE. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2003;136:393–401.
195. Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FM. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005;37:2134–46.

196. Costelli P, De Tullio R, Baccino FM, Melloni E. Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br. J. Cancer.* 2001;84:946–50.
197. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J. Anim. Sci.* 2008;86:E19–35.
198. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol. Rev.* 2003;83:731–801.
199. Lamb GD. Mechanisms of excitation-contraction uncoupling relevant to activity-induced muscle fatigue. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2009;34:368–72.
200. Smith IJ, Aversa Z, Hasselgren P-O, Pacelli F, Rosa F, Doglietto GB, et al. Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. *Muscle Nerve.* 2011;43:410–4.
201. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigure R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J. Clin. Invest.* 2004;113:115–23.
202. Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, López-Soriano FJ, Fearon KCH, et al. Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clin. Nutr.* 2007;26:614–8.
203. Van Royen M, Carbó N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, López-Soriano FJ, et al. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;270:533–7.
204. Warr DG. Chemotherapy-and cancer-related nausea and vomiting. *Curr. Oncol.* 2008;15:S4–9.
205. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:1014–9.
206. Antoun S, Birdsell L, Sawyer MB, Venner P, Escudier B, Baracos VE. Association of skeletal muscle wasting with treatment with sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma: results from a placebo-controlled study. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:1054–60.
207. Prado CMM, Baracos VE, McCargar LJ, Reiman T, Mourtzakis M, Tonkin K, et al. Sarcopenia as a determinant of chemotherapy toxicity and time to tumor progression in metastatic breast cancer patients receiving capecitabine treatment. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:2920–6.
208. Prado CMM, Baracos VE, McCargar LJ, Mourtzakis M, Mulder KE, Reiman T, et al. Body composition as an independent determinant of 5-fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:3264–8.
209. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J. Med.* 1980;69:491–7.
210. Prado CMM, Antoun S, Sawyer MB, Baracos VE. Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2011;14:250–4.
211. Ross PJ, Ashley S, Norton A, Priest K, Waters JS, Eisen T, et al. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? *Br. J. Cancer.* Cancer Research UK; 2004;90:1905–11.

Bibliografia

212. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Marques Vidal P, Camilo ME. Impact of nutrition on outcome: a prospective randomized controlled trial in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. *Head Neck.* 2005;27:659–68.
213. Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Camilo M. Individualized nutrition intervention is of major benefit to colorectal cancer patients: long-term follow-up of a randomized controlled trial of nutritional therapy. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012;96:1346–53.
214. Isenring EA, Capra S, Bauer JD. Nutrition intervention is beneficial in oncology outpatients receiving radiotherapy to the gastrointestinal or head and neck area. *Br. J. Cancer.* 2004;91:447–52.
215. Bozzetti F, Braga M, Gianotti L, Gavazzi C, Mariani L. Postoperative enteral versus parenteral nutrition in malnourished patients with gastrointestinal cancer: a randomised multicentre trial. *Lancet.* 2001;358:1487–92.
216. Elia M, Van Bokhorst-de van der Schueren MAE, Garvey J, Goedhart A, Lundholm K, Nitenberg G, et al. Enteral (oral or tube administration) nutritional support and eicosapentaenoic acid in patients with cancer: a systematic review. *Int. J. Oncol.* 2006;28:5–23.
217. Schattner MA, Willis HJ, Raykher A, Brown P, Quesada O, Scott B, et al. Long-term enteral nutrition facilitates optimization of body weight. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* 29:198–203.
218. Bozzetti F, Gavazzi C, Miceli R, Rossi N, Mariani L, Cozzaglio L, et al. Perioperative total parenteral nutrition in malnourished, gastrointestinal cancer patients: a randomized, clinical trial. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* 24:7–14.
219. Hagen TM, Ingersoll RT, Wehr CM, Lykkesfeldt J, Vinarsky V, Bartholomew JC, et al. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:9562–6.
220. Kelly GS. L-Carnitine: therapeutic applications of a conditionally-essential amino acid. *Altern. Med. Rev.* 1998;3:345–60.
221. Gramignano G, Lusso MR, Madeddu C, Massa E, Serpe R, Deiana L, et al. Efficacy of L-carnitine administration on fatigue, nutritional status, oxidative stress, and related quality of life in 12 advanced cancer patients undergoing anticancer therapy. *Nutrition.* 2006;22:136–45.
222. Kraft M, Kraft K, Gärtner S, Mayerle J, Simon P, Weber E, et al. L-Carnitine-supplementation in advanced pancreatic cancer (CARPAN)--a randomized multicentre trial. *Nutr. J.* 2012;11:52.
223. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996;63:116–22.
224. Rose DP, Connolly JM. Effects of dietary omega-3 fatty acids on human breast cancer growth and metastases in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993;85:1743–7.
225. Fearon KCH, Von Meyenfeldt MF, Moses AGW, Van Geenen R, Roy A, Gouma DJ, et al. Effect of a protein and energy dense N-3 fatty acid enriched oral supplement on loss of weight and lean tissue in cancer cachexia: a randomised double blind trial. *Gut.* 2003;52:1479–86.
226. Fearon KCH, Barber MD, Moses AG, Ahmedzai SH, Taylor GS, Tisdale MJ, et al. Double-blind, placebo-controlled, randomized study of eicosapentaenoic acid diester in patients with cancer cachexia. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:3401–7.

227. Dewey A, Baughan C, Dean T, Higgins B, Johnson I. Eicosapentaenoic acid (EPA, an omega-3 fatty acid from fish oils) for the treatment of cancer cachexia. Cochrane database Syst. Rev. 2007;CD004597.
228. Ryan AM, Reynolds J V, Healy L, Byrne M, Moore J, Brannelly N, et al. Enteral nutrition enriched with eicosapentaenoic acid (EPA) preserves lean body mass following esophageal cancer surgery: results of a double-blinded randomized controlled trial. Ann. Surg. 2009;249:355–63.
229. GUARCELLO M, RISO S, BUOSI R, D'ANDREA F. EPA-enriched oral nutritional support in patients with lung cancer: effects on nutritional status and quality of life. Nutr. Ther. Metab. NTM; 2012. p. 25–30.
230. Read JA, Beale PJ, Volker DH, Smith N, Childs A, Clarke SJ. Nutrition intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. Support. Care Cancer. 2007;15:301–7.
231. Van der Meij BS, Langius JAE, Smit EF, Spreeuwenberg MD, von Blomberg BME, Heijboer AC, et al. Oral nutritional supplements containing (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the nutritional status of patients with stage III non-small cell lung cancer during multimodality treatment. J. Nutr. 2010;140:1774–80.
232. Van der Meij BS, Langius JAE, Spreeuwenberg MD, Slootmaker SM, Paul MA, Smit EF, et al. Oral nutritional supplements containing n-3 polyunsaturated fatty acids affect quality of life and functional status in lung cancer patients during multimodality treatment: an RCT. Eur. J. Clin. Nutr. 2012;66:399–404.
233. Mehra MR, Lavie CJ, Ventura HO, Milani R V. Fish oils produce anti-inflammatory effects and improve body weight in severe heart failure. J. Heart Lung Transplant. 2006;25:834–8.
234. Busquets S, Alvarez B, Llovera M, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM. Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. J. Cell. Physiol. 2000;184:380–4.
235. Busquets S, Alvarez B, López-Soriano FJ, Argilés JM. Branched-chain amino acids: a role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? J. Cell. Physiol. 2002;191:283–9.
236. Laviano A, Muscaritoli M, Cascino A, Preziosa I, Inui A, Mantovani G, et al. Branched-chain amino acids: the best compromise to achieve anabolism? Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2005;8:408–14.
237. Kim J-S, Khamoui A V, Jo E, Park B-S, Lee WJ. β -Hydroxy- β -methylbutyrate as a countermeasure for cancer cachexia: a cellular and molecular rationale. Anticancer. Agents Med. Chem. 2013;13:1188–96.
238. May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. Am. J. Surg. 2002;183:471–9.
239. Berk L, James J, Schwartz A, Hug E, Mahadevan A, Samuels M, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a beta-hydroxyl beta-methyl butyrate, glutamine, and arginine mixture for the treatment of cancer cachexia (RTOG 0122). Support. Care Cancer. 2008;16:1179–88.
240. Buijs N, van Bokhorst-de van der Schueren MAE, Langius JAE, Leemans CR, Kuik DJ, Vermeulen MAR, et al. Perioperative arginine-supplemented nutrition in malnourished patients with head and neck cancer improves long-term survival. Am. J. Clin. Nutr. 2010;92:1151–6.
241. Tozer RG, Tai P, Falconer W, Ducruet T, Karabadjian A, Bounous G, et al. Cysteine-rich protein reverses weight loss in lung cancer patients receiving chemotherapy or radiotherapy. Antioxid. Redox Signal. 2008;10:395–402.

Bibliografia

242. Mitchelson F. Pharmacological agents affecting emesis. A review (Part I). *Drugs.* 1992;43:295–315.
243. Srivastava MD, Srivastava BI, Brouhard B. Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology.* 1998;40:179–85.
244. Facchinetto F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. Cannabinoids ablate release of TNF α in rat microglial cells stimulated with lypopolysaccharide. *Glia.* 2003;41:161–8.
245. Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, et al. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J. Pain Symptom Manage.* 1995;10:89–97.
246. Nelson K, Walsh D, Deeter P, Sheehan F. A phase II study of delta-9-tetrahydrocannabinol for appetite stimulation in cancer-associated anorexia. *J. Palliat. Care.* 1994;10:14–8.
247. Brisbois TD, de Kock IH, Watanabe SM, Mirhosseini M, Lamoureux DC, Chasen M, et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol may palliate altered chemosensory perception in cancer patients: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Ann. Oncol.* 2011;22:2086–93.
248. Jatoi A, Windschitl HE, Loprinzi CL, Sloan JA, Dakhil SR, Mailliard JA, et al. Dronabinol versus megestrol acetate versus combination therapy for cancer-associated anorexia: a North Central Cancer Treatment Group study. *J. Clin. Oncol.* 2002;20:567–73.
249. Loprinzi CL, Kugler JW, Sloan JA, Mailliard JA, Krook JE, Wilwerding MB, et al. Randomized comparison of megestrol acetate versus dexamethasone versus fluoxymesterone for the treatment of cancer anorexia/cachexia. *J. Clin. Oncol.* 1999;17:3299–306.
250. Vigano A, Watanabe S, Bruera E. Anorexia and cachexia in advanced cancer patients. *Cancer Surv.* 1994;21:99–115.
251. Han J, Thompson P, Beutler B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J. Exp. Med.* 1990;172:391–4.
252. Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D, Grizard J. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J. Clin. Invest.* 1995;96:2113–9.
253. Loprinzi CL, Michalak JC, Schaid DJ, Mailliard JA, Athmann LM, Goldberg RM, et al. Phase III evaluation of four doses of megestrol acetate as therapy for patients with cancer anorexia and/or cachexia. *J. Clin. Oncol.* 1993;11:762–7.
254. Bruera E, Macmillan K, Kuehn N, Hanson J, MacDonald RN. A controlled trial of megestrol acetate on appetite, caloric intake, nutritional status, and other symptoms in patients with advanced cancer. *Cancer.* 1990;66:1279–82.
255. Neri B, Garosi VL, Intini C. Effect of medroxyprogesterone acetate on the quality of life of the oncologic patient: a multicentric cooperative study. *Anticancer. Drugs.* 1997;8:459–65.
256. Mantovani G, Macciò A, Massa E, Madeddu C. Managing cancer-related anorexia/cachexia. *Drugs.* 2001;61:499–514.
257. McCarthy HD, Crowder RE, Dryden S, Williams G. Megestrol acetate stimulates food and water intake in the rat: effects on regional hypothalamic neuropeptide Y concentrations. *Eur. J. Pharmacol.* 1994;265:99–102.

258. Mantovani G, Macciò A, Esu S, Lai P, Santona MC, Massa E, et al. Medroxyprogesterone acetate reduces the in vitro production of cytokines and serotonin involved in anorexia/cachexia and emesis by peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Eur. J. Cancer.* 1997;33:602–7.
259. Tomíška M, Tomisková M, Salajka F, Adam Z, Vorlíček J. Palliative treatment of cancer anorexia with oral suspension of megestrol acetate. *Neoplasma.* 2003;50:227–33.
260. Pascual López A, Roqué i Figuls M, Urrútia Cuchi G, Berenstein EG, Almenar Pasies B, Balcells Alegre M, et al. Systematic review of megestrol acetate in the treatment of anorexia-cachexia syndrome. *J. Pain Symptom Manage.* 2004;27:360–9.
261. Macciò A, Madeddu C, Gramignano G, Mulas C, Floris C, Sanna E, et al. A randomized phase III clinical trial of a combined treatment for cachexia in patients with gynecological cancers: evaluating the impact on metabolic and inflammatory profiles and quality of life. *Gynecol. Oncol.* 2012;124:417–25.
262. Leśniak W, Bała M, Jaeschke R, Krzakowski M. Effects of megestrol acetate in patients with cancer anorexia-cachexia syndrome - A systematic review and meta-analysis. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2008;118:636–44.
263. Ruiz Garcia V, López-Briz E, Carbonell Sanchis R, Gonzalvez Perales JL, Bort-Martí S. Megestrol acetate for treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane database Syst. Rev.* 2013;3:CD004310.
264. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402:656–60.
265. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:5992.
266. Hanada T, Toshinai K, Kajimura N, Nara-Ashizawa N, Tsukada T, Hayashi Y, et al. Anti-cachectic effect of ghrelin in nude mice bearing human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;301:275–9.
267. DeBoer MD, Zhu XX, Levasseur P, Meguid MM, Suzuki S, Inui A, et al. Ghrelin treatment causes increased food intake and retention of lean body mass in a rat model of cancer cachexia. *Endocrinology.* 2007;148:3004–12.
268. Fahim MA, Kataya H, El-Kharrag R, Amer DA, al-Ramadi B, Karam SM. Ghrelin attenuates gastrointestinal epithelial damage induced by doxorubicin. *World J. Gastroenterol.* 2011;17:3836–41.
269. Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, et al. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:2832–6.
270. Strasser F, Lutz TA, Maeder MT, Thuerlimann B, Bueche D, Tschöp M, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of intravenous ghrelin for cancer-related anorexia/cachexia: a randomised, placebo-controlled, double-blind, double-crossover study. *Br. J. Cancer.* 2008;98:300–8.
271. Lundholm K, Gunnebo L, Körner U, Iresjö B-M, Engström C, Hyltander A, et al. Effects by daily long term provision of ghrelin to unselected weight-losing cancer patients: a randomized double-blind study. *Cancer.* 2010;116:2044–52.
272. Garcia JM, Polvino WJ. Effect on body weight and safety of RC-1291, a novel, orally available ghrelin mimetic and growth hormone secretagogue: results of a phase I, randomized, placebo-controlled, multiple-dose study in healthy volunteers. *Oncologist. AlphaMed Press;* 2007;12:594–600.

Bibliografia

273. Garcia JM, Polvino WJ. Pharmacodynamic hormonal effects of anamorelin, a novel oral ghrelin mimetic and growth hormone secretagogue in healthy volunteers. *Growth Horm. IGF Res.* 2009;19:267–73.
274. Garcia JM, Friend J, Allen S. Therapeutic potential of anamorelin, a novel, oral ghrelin mimetic, in patients with cancer-related cachexia: a multicenter, randomized, double-blind, crossover, pilot study. *Support. Care Cancer.* 2013;21:129–37.
275. Peuckmann V, Fisch M, Bruera E. Potential novel uses of thalidomide: focus on palliative care. *Drugs.* 2000;60:273–92.
276. Bruera E, Neumann CM, Pituskin E, Calder K, Ball G, Hanson J. Thalidomide in patients with cachexia due to terminal cancer: preliminary report. *Ann. Oncol.* 1999;10:857–9.
277. Khan ZH, Simpson EJ, Cole AT, Holt M, MacDonald I, Pye D, et al. Oesophageal cancer and cachexia: the effect of short-term treatment with thalidomide on weight loss and lean body mass. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2003;17:677–82.
278. Gordon JN, Trebble TM, Ellis RD, Duncan HD, Johns T, Goggin PM. Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut.* 2005;54:540–5.
279. Davis M, Lasheen W, Walsh D, Mahmoud F, Bicanovsky L, Lagman R. A Phase II dose titration study of thalidomide for cancer-associated anorexia. *J. Pain Symptom Manage.* 2012;43:78–86.
280. Reid J, Mills M, Cantwell M, Cardwell CR, Murray LJ, Donnelly M. Thalidomide for managing cancer cachexia. *Cochrane database Syst. Rev.* 2012;4:CD008664.
281. Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Support. Care Cancer.* 2002;10:110–6.
282. Lissoni P, Barni S, Mandalà M, Ardizzoia A, Paolorossi F, Vaghi M, et al. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur. J. Cancer.* 1999;35:1688–92.
283. Lissoni P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol. Biol. (Paris).* 2007;55:201–4.
284. Persson C, Glimelius B, Rönnelid J, Nygren P. Impact of fish oil and melatonin on cachexia in patients with advanced gastrointestinal cancer: a randomized pilot study. *Nutrition.* 2005;21:170–8.
285. Del Fabbro E, Dev R, Hui D, Palmer L, Bruera E. Effects of melatonin on appetite and other symptoms in patients with advanced cancer and cachexia: a double-blind placebo-controlled trial. *J. Clin. Oncol.* 2013;31:1271–6.
286. Preston T, Fearon KC, McMillan DC, Winstanley FP, Slater C, Shenkin A, et al. Effect of ibuprofen on the acute-phase response and protein metabolism in patients with cancer and weight loss. *Br. J. Surg.* 1995;82:229–34.
287. Gelin J, Andersson C, Lundholm K. Effects of indomethacin, cytokines, and cyclosporin A on tumor growth and the subsequent development of cancer cachexia. *Cancer Res.* 1991;51:880–5.
288. Gelin J, Moldawer LL, Lönnroth C, Sherry B, Chizzonite R, Lundholm K. Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res.* 1991;51:415–21.

289. Lundholm K, Gelin J, Hyltander A, Lönnroth C, Sandström R, Svaninger G, et al. Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer Res.* 1994;54:5602–6.
290. McMillan DC, Wigmore SJ, Fearon KC, O'Gorman P, Wright CE, McArdle CS. A prospective randomized study of megestrol acetate and ibuprofen in gastrointestinal cancer patients with weight loss. *Br. J. Cancer.* 1999;79:495–500.
291. Davis TW, Zweifel BS, O'Neal JM, Heuvelman DM, Abegg AL, Hendrich TO, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;308:929–34.
292. Cerchietti LCA, Navigante AH, Castro MA. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic n-3 fatty acids from fish oil and preferential Cox-2 inhibition on systemic syndromes in patients with advanced lung cancer. *Nutr. Cancer.* 2007;59:14–20.
293. Lai V, George J, Richey L, Kim HJ, Cannon T, Shores C, et al. Results of a pilot study of the effects of celecoxib on cancer cachexia in patients with cancer of the head, neck, and gastrointestinal tract. *Head Neck.* 2008;30:67–74.
294. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Serpe R, Antoni G, Massa E, et al. Phase II nonrandomized study of the efficacy and safety of COX-2 inhibitor celecoxib on patients with cancer cachexia. *J. Mol. Med. (Berl).* 2010;88:85–92.
295. Costelli P, Carbó N, Tessitore L, Bagby GJ, Lopez-Soriano FJ, Argilés JM, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J. Clin. Invest.* 1993;92:2783–9.
296. Matthys P, Heremans H, Opdenakker G, Billiau A. Anti-interferon-gamma antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia. *Eur. J. Cancer.* 1991;27:182–7.
297. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.* 1993;151:1548–61.
298. Monk JP, Phillips G, Waite R, Kuhn J, Schaaf LJ, Otterson GA, et al. Assessment of tumor necrosis factor alpha blockade as an intervention to improve tolerability of dose-intensive chemotherapy in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:1852–9.
299. Jatoi A, Dakhil SR, Nguyen PL, Sloan JA, Kugler JW, Rowland KM, et al. A placebo-controlled double blind trial of etanercept for the cancer anorexia/weight loss syndrome: results from N00C1 from the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer.* 2007;110:1396–403.
300. Wiedenmann B, Malfertheiner P, Friess H, Ritch P, Arseneau J, Mantovani G, et al. A multicenter, phase II study of infliximab plus gemcitabine in pancreatic cancer cachexia. *J. Support. Oncol.* 2008;6:18–25.
301. Ando K, Takahashi F, Kato M, Kaneko N, Doi T, Ohe Y, et al. Tocilizumab, a proposed therapy for the cachexia of Interleukin6-expressing lung cancer. *PLoS One.* 2014;9:e102436.
302. Ando K, Takahashi F, Motojima S, Nakashima K, Kaneko N, Hoshi K, et al. Possible role for tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor antibody, in treating cancer cachexia. *J. Clin. Oncol.* 2013;31:e69–72.

Bibliografia

303. Hirata H, Tetsumoto S, Kijima T, Kida H, Kumagai T, Takahashi R, et al. Favorable responses to tocilizumab in two patients with cancer-related cachexia. *J. Pain Symptom Manage.* 2013;46:e9–13.
304. Finet A, Amini-Adle M, Balme B, Colson F, Thomas L. Nodular progression of lentigo malignant melanoma during a treatment with tocilizumab: cause or coincidence? *Clin. Rheumatol.* 2013;32:277–80.
305. Basin S, Calof OM, Storer TW, Lee ML, Mazer NA, Jasuja R, et al. Drug insight: Testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2006;2:146–59.
306. Chlebowski RT, Herrold J, Ali I, Oktay E, Chlebowski JS, Ponce AT, et al. Influence of nandrolone decanoate on weight loss in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer.* 1986;58:183–6.
307. Darnton SJ, Zgainski B, Grenier I, Allister K, Hiller L, McManus KG, et al. The use of an anabolic steroid (nandrolone decanoate) to improve nutritional status after esophageal resection for carcinoma. *Dis. Esophagus.* 1999;12:283–8.
308. Mohler ML, Bohl CE, Jones A, Coss CC, Narayanan R, He Y, et al. Nonsteroidal selective androgen receptor modulators (SARMs): dissociating the anabolic and androgenic activities of the androgen receptor for therapeutic benefit. *J. Med. Chem.* 2009;52:3597–617.
309. Dalton JT, Barnette KG, Bohl CE, Hancock ML, Rodriguez D, Dodson ST, et al. The selective androgen receptor modulator GTx-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2011;2:153–61.
310. Dobs AS, Boccia R V, Croot CC, Gabrall NY, Dalton JT, Hancock ML, et al. Effects of enobosarm on muscle wasting and physical function in patients with cancer: a double-blind, randomised controlled phase 2 trial. *Lancet. Oncol.* 2013;14:335–45.
311. Wineski LE, von Deutsch DA, Abukhalaf IK, Pitts SA, Potter DE, Paulsen DF. Muscle-specific effects of hindlimb suspension and clenbuterol in mature male rats. *Cells. Tissues. Organs.* 2002;171:188–98.
312. Rajab P, Fox J, Riaz S, Tomlinson D, Ball D, Greenhaff PL. Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279:R1076–81.
313. Hinkle RT, Hodge KMB, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta₂-adrenergic receptor. *Muscle Nerve.* 2002;25:729–34.
314. Agbenyega ET, Wareham AC. Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol. Department of Physiological Sciences, School of Biological Sciences, Medical School, University of Manchester, U.K.*; 1992;102:141–5.
315. Yang YT, McElligott MA. Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem. J.* 1989;261:1–10.
316. Mersmann HJ. Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J. Anim. Sci.* 1998;76:160–72.
317. Costelli P, García-Martínez C, Llovera M, Carbó N, López-Soriano FJ, Agell N, et al. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J. Clin. Invest.* 1995;95:2367–72.

318. Harrington D, Chua TP, Coats AJ. The effect of salbutamol on skeletal muscle in chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2000;73:257–65.
319. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001;98:1607–12.
320. Joassard OR, Durieux A-C, Freyssenet DG. β 2-Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:2309–21.
321. Koopman R, Gehrig SM, Léger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, et al. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice. *J. Physiol.* 2010;588:4811–23.
322. Joassard OR, Amirouche A, Gallot YS, Desgeorges MM, Castells J, Durieux A-C, et al. Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013;45:2444–55.
323. Waldeck B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma--100 years of development. *Eur. J. Pharmacol.* 2002;445:1–12.
324. Hoffman RJ, Hoffman RS, Freyberg CL, Poppenga RH, Nelson LS. Clenbuterol ingestion causing prolonged tachycardia, hypokalemia, and hypophosphatemia with confirmation by quantitative levels. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2001;39:339–44.
325. Anderson GP, Lindén A, Rabe KF. Why are long-acting beta-adrenoceptor agonists long-acting? *Eur. Respir. J.* 1994;7:569–78.
326. Anderson GP. Pharmacology of formoterol: an innovative bronchodilator. *Agents Actions. Suppl.* 1991;34:97–115.
327. Decramer ML, Hanania NA, Lötvall JO, Yawn BP. The safety of long-acting β 2-agonists in the treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2013;8:53–64.
328. Brusasco V, Crimi E, Gherson G, Nardelli R, Oldani V, Francucci B, et al. Actions other than smooth muscle relaxation may play a role in the protective effects of formoterol on the allergen-induced late asthmatic reaction. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2002;15:399–406.
329. Lindén A, Bergendal A, Ullman A, Skoogh BE, Löfdahl CG. Salmeterol, formoterol, and salbutamol in the isolated guinea pig trachea: differences in maximum relaxant effect and potency but not in functional antagonism. *Thorax.* 1993;48:547–53.
330. Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res.* 2004;64:6725–31.
331. Ametller E, Busquets S, Fuster G, Figueras MT, De Oliveira CCF, Toledo M, et al. Effects of formoterol on protein metabolism in myotubes during hyperthermia. *Muscle Nerve.* 2011;43:268–73.
332. Ametller E, Busquets S, Fuster G, Figueras MT, Olivan M, de Oliveira CCF, et al. Formoterol May Activate Rat Muscle Regeneration During Cancer Cachexia. *Insciences J.* 2011;1:1–17.
333. Burniston JG, Ng Y, Clark WA, Colyer J, Tan L-B, Goldspink DF. Myotoxic effects of clenbuterol in the rat heart and soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 2002;93:1824–32.

Bibliografia

334. Pack RJ, Alley MR, Dallimore JA, Lapwood KR, Burgess C, Crane J. The myocardial effects of fenoterol, isoprenaline and salbutamol in normoxic and hypoxic sheep. *Int. J. Exp. Pathol.* 1994;75:357–62.
335. Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002;283:R1386–94.
336. Sleeper MM, Kearns CF, McKeever KH. Chronic clenbuterol administration negatively alters cardiac function. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2002;34:643–50.
337. Cartañà J, Segués T, Yebras M, Rothwell NJ, Stock MJ. Anabolic effects of clenbuterol after long-term treatment and withdrawal in the rat. *Metabolism.* 1994;43:1086–92.
338. Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Attenuation of age-related muscle wasting and weakness in rats after formoterol treatment: therapeutic implications for sarcopenia. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2007;62:813–23.
339. Soppa GKR, Smolenski RT, Latif N, Yuen AHY, Malik A, Karbowska J, et al. Effects of chronic administration of clenbuterol on function and metabolism of adult rat cardiac muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;288:H1468–76.
340. Murphy KT, Chee A, Gleeson BG, Naim T, Swiderski K, Koopman R, et al. Antibody-directed myostatin inhibition enhances muscle mass and function in tumor-bearing mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011;301:R716–26.
341. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escobar DM, et al. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 2008;63:561–71.
342. Springer J, Adams V, Anker SD. Myostatin: Regulator of muscle wasting in heart failure and treatment target for cardiac cachexia. *Circulation.* 2010;121:354–6.
343. Attie KM, Borgstein NG, Yang Y, Condon CH, Wilson DM, Pearsall AE, et al. A single ascending-dose study of muscle regulator ACE-031 in healthy volunteers. *Muscle Nerve.* 2013;47:416–23.
344. Clinical Study of BYM338 for the Treatment of Unintentional Weight Loss in Patients With Cancer of the Lung or the Pancreas - No Study Results Posted - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2014 Dec 3]. Available from: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01433263?term=BYM338>
345. McTiernan A. Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2008;8:205–11.
346. Lira FS, Neto JCR, Seelaender M. Exercise training as treatment in cancer cachexia. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2014;39:679–86.
347. Weber M-A, Krakowski-Roosen H, Schröder L, Kinscherf R, Krix M, Kopp-Schneider A, et al. Morphology, metabolism, microcirculation, and strength of skeletal muscles in cancer-related cachexia. *Acta Oncol.* 2009;48:116–24.
348. Aulino P, Berardi E, Cardillo VM, Rizzato E, Perniconi B, Ramina C, et al. Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. *BMC Cancer.* 2010;10:363.
349. Aagaard P. Making muscles “stronger”: exercise, nutrition, drugs. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2004;4:165–74.

350. Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ, Costelli P, Penna F. Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia? *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2012;3:73–6.
351. Bruera E, Sweeney C. Cachexia and asthenia in cancer patients. *Lancet. Oncol.* 2000;1:138–47.
352. Knight K, Wade S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am. J. Med.* 2004;116 Suppl :11S – 26S.
353. Lenk K, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle.* 2010;1:9–21.
354. White JP, Baltgalvis KA, Puppa MJ, Sato S, Baynes JW, Carson JA. Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011;300:R201–11.
355. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2011;11:607–15.
356. Dimeo FC, Stieglitz RD, Novelli-Fischer U, Fetscher S, Keul J. Effects of physical activity on the fatigue and psychologic status of cancer patients during chemotherapy. *Cancer.* 1999;85:2273–7.
357. Nieman DC, Cook VD, Henson DA, Suttles J, Rejeski WJ, Ribisl PM, et al. Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic activity in breast cancer patients. *Int. J. Sports Med.* 1995;16:334–7.
358. Perniconi B, Albertini MC, Teodori L, Belli L, Coletti D, Bo UC. A meta-analysis on a therapeutic dilemma : to exercise or not to exercise in cachexia. *Basic Appl Myol.* 2008;18:105–20.
359. Oldervoll LM, Loge JH, Lydersen S, Paltiel H, Asp MB, Nygaard UV, et al. Physical exercise for cancer patients with advanced disease: a randomized controlled trial. *Oncologist.* 2011;16:1649–57.
360. Karvinen KH, Raedeke TD, Arastu H, Allison RR. Exercise programming and counseling preferences of breast cancer survivors during or after radiation therapy. *Oncol. Nurs. Forum.* 2011;38:E326–34.
361. Jensen W, Oechsle K, Baumann HJ, Mehnert A, Klose H, Bloch W, et al. Effects of exercise training programs on physical performance and quality of life in patients with metastatic lung cancer undergoing palliative chemotherapy--a study protocol. *Contemp. Clin. Trials.* Elsevier; 2014;37:120–8.
362. Livingston PM, Salmon J, Courneya KS, Gaskin CJ, Craike M, Botti M, et al. Efficacy of a referral and physical activity program for survivors of prostate cancer [ENGAGE]: rationale and design for a cluster randomised controlled trial. *BMC Cancer.* 2011;11:237.
363. Vermaete N, Wolter P, Verhoef G, Gosselink R. Physical activity, physical fitness and the effect of exercise training interventions in lymphoma patients: a systematic review. *Ann. Hematol.* 2013;92:1007–21.
364. Spiro A, Baldwin C, Patterson A, Thomas J, Andreyev HJN. The views and practice of oncologists towards nutritional support in patients receiving chemotherapy. *Br. J. Cancer.* 2006;95:431–4.
365. Isenring EA, Teleni L. Nutritional counseling and nutritional supplements: a cornerstone of multidisciplinary cancer care for cachectic patients. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* 2013;7:390–5.
366. Wallengren O, Lundholm K, Bosaeus I. Diagnostic criteria of cancer cachexia: relation to quality of life, exercise capacity and survival in unselected palliative care patients. *Support. Care Cancer.* 2013;21:1569–77.

Bibliografia

367. Bachmann J, Heiligensetzer M, Krakowski-Roosen H, Büchler MW, Friess H, Martignoni ME. Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. *J. Gastrointest. Surg.* 2008;12:1193–201.
368. Moses AWG, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KCH. Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br. J. Cancer.* 2004;90:996–1002.
369. Hopkinson JB, Wright DNM, McDonald JW, Corner JL. The prevalence of concern about weight loss and change in eating habits in people with advanced cancer. *J. Pain Symptom Manage.* 2006;32:322–31.
370. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Novel approaches to the treatment of cachexia. *Drug Discov. Today.* 2008;13:73–8.
371. Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Use of formoterol in the prophylactic and/or therapeutic treatment of muscle wasting and/or cachectic syndrome which are associated with catabolic conditions of certain diseases, such as cancer, aids, infections, diabetes and others. ACACIA PHARMA LTD. 2009;PT1818052 (E) — 2010–02 – 15.
372. Montalbano AM, Anzalone G, Albano GD, Sano C Di, Gagliardo R, Bonanno A, et al. Beclomethasone dipropionate and formoterol reduce oxidative/nitrosative stress generated by cigarette smoke extracts and IL-17A in human bronchial epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2013;718:418–27.
373. Greig CA, Johns N, Gray C, MacDonald A, Stephens NA, Skipworth RJE, et al. Phase I/II trial of formoterol fumarate combined with megestrol acetate in cachectic patients with advanced malignancy. *Support. Care Cancer.* 2014;22:1269–75.
374. Libretto SE. A review of the toxicology of salbutamol (albuterol). *Arch. Toxicol.* 1994;68:213–6.
375. Tian M, Nishijima Y, Asp ML, Stout MB, Reiser PJ, Belury MA. Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. Int J Oncol. Department of Human Nutrition, College of Education and Human Ecology, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA.; 2010;37:347–53.
376. Houten L, Reilley AA. An investigation of the cause of death from cancer. *J. Surg. Oncol.* 1980;13:111–6.
377. Xu H, Crawford D, Hutchinson KR, Youtz DJ, Lucchesi PA, Velten M, et al. Myocardial dysfunction in an animal model of cancer cachexia. *Life Sci.* 2011;88:406–10.
378. Springer J, Tscherner A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, et al. Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure. *Eur. Heart J.* 2013;
379. Springer J, Tscherner A, Hartman K, von Haehling S, Anker SD, Doehner W. The xanthine oxidase inhibitor oxypurinol reduces cancer cachexia-induced cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 2013;168:3527–31.
380. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis: role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation.* 1999;100:2210–2.
381. Shizukuda Y, Buttrick PM. Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002;34:823–31.

382. De Mey C, Nassr N, Lahu G. No relevant cardiac, pharmacokinetic or safety interactions between roflumilast and inhaled formoterol in healthy subjects: an open-label, randomised, actively controlled study. *BMC Clin. Pharmacol.* 2011;11:7.
383. Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ, Argiles JM. Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int. J. Cancer.* 1995;61:138–41.
384. Lane-Petter W. The physical environment of rats and mice. *Animals fo.* London: Academic Press; 1963. p. 1–20.
385. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Serpe R, Massa E, Dessì M, et al. Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment in 332 patients with cancer cachexia. *Oncologist.* 2010;15:200–11.
386. Lundholm K, Daneryd P, Bosaeus I, Körner U, Lindholm E. Palliative nutritional intervention in addition to cyclooxygenase and erythropoietin treatment for patients with malignant disease: Effects on survival, metabolism, and function. *Cancer.* 2004;100:1967–77.
387. Signorile JF, Banovac K, Gomez M, Flipse D, Caruso JF, Lowenstein I. Increased muscle strength in paralyzed patients after spinal cord injury: Effect of beta-2 adrenergic agonist. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1995;76:55–8.
388. Pluim BM, de Hon O, Staal JB, Limpens J, Kuipers H, Overbeek SE, et al. β_2 -Agonists and physical performance: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sports Med.* 2011;41:39–57.
389. Toledo M, Busquets S, Sirisi S, Serpe R, Orpí M, Coutinho J, et al. Cancer cachexia: physical activity and muscle force in tumour-bearing rats. *Oncol. Rep.* 2011;25:189–93.
390. Henry N, van Lamsweerde AL, Vaes G. Collagen degradation by metastatic variants of Lewis lung carcinoma: cooperation between tumor cells and macrophages. *Cancer Res.* 1983;43:5321–7.
391. Llovera M, García-Martínez C, López-Soriano J, Agell N, López-Soriano FJ, Garcia I, et al. Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett.* 1998;130:19–27.
392. Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;230:238–41.
393. Argilés JM, López-Soriano FJ. The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996;17:223–6.
394. 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.* 2007;6:472–83.
395. Antsiferova M, Huber M, Meyer M, Piwko-Czuchra A, Ramadan T, MacLeod AS, et al. Activin enhances skin tumourigenesis and malignant progression by inducing a pro-tumourigenic immune cell response. *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2011;2:576.

Bibliografia

396. Panopoulou E, Murphy C, Rasmussen H, Bagli E, Rofstad EK, Fotsis T. Activin A suppresses neuroblastoma xenograft tumor growth via antimitotic and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* 2005;65:1877–86.
397. Pfitzenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace D, Corey E. Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer.* 2003;97:1211–6.
398. Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ, Fearon KC. Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *Br. J. Surg.* 2000;87:53–8.
399. Davis TA, Reeds PJ. Of flux and flooding: the advantages and problems of different isotopic methods for quantifying protein turnover in vivo : II. Methods based on the incorporation of a tracer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2001;4:51–6.
400. Emery PW, Lovell L, Rennie MJ. Protein synthesis measured in vivo in muscle and liver of cachectic tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 1984;44:2779–84.
401. Laviano A, Molfino A, Seelaender M, Frascaria T, Bertini G, Ramaccini C, et al. Carnitine administration reduces cytokine levels, improves food intake, and ameliorates body composition in tumor-bearing rats. *Cancer Invest.* 2011;29:696–700.
402. López-Soriano J, Carbó N, Tessitore L, López-Soriano FJ, Argilés JM. Leptin and tumor growth in rats. *Int. J. Cancer.* 1999;81:726–9.
403. Winter BK, Fiskum G, Gallo LL. Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. *Br. J. Cancer.* 1995;72:1173–9.
404. Laviano A, Meguid MM, Renvyle T, Yang ZJ, Beverly JL. Carnitine supplementation accelerates normalization of food intake depressed during TPN. *Physiol. Behav.* 1996;60:317–20.
405. Morley JE, Farr SA. Cachexia and neuropeptide Y. *Nutrition.* 2008;24:815–9.
406. Fantino M. Role of lipids in the control of food intake. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2011;14:138–44.
407. Keller J, Ringseis R, Priebe S, Guthke R, Kluge H, Eder K. Dietary L-carnitine alters gene expression in skeletal muscle of piglets. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011;55:419–29.
408. Keller J, Ringseis R, Koc A, Lukas I, Kluge H, Eder K. Supplementation with L-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal.* 2012;6:70–8.
409. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Apoptosis signalling is essential and precedes protein degradation in wasting skeletal muscle during catabolic conditions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008;40:1674–8.
410. Adams V, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G. Apoptosis in skeletal muscle. *Front. Biosci.* 2001;6:D1–11.
411. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della Barbera M, et al. L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002;283:C802–10.
412. Busquets S, Carbó N, Almendro V, Figueras M, López-Soriano FJ, Argilés JM. Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia? *FEBS Lett.* 2001;505:255–8.

413. Grunfeld C, Feingold KR. The role of the cytokines, interferon alpha and tumor necrosis factor in the hypertriglyceridemia and wasting of AIDS. *J. Nutr.* 1992;122:749–53.
414. Athanassakis I, Mouratidou M, Sakka P, Evangelou A, Spilioti M, Vassiliadis S. L-carnitine modifies the humoral immune response in mice after in vitro or in vivo treatment. *Int. Immunopharmacol.* 2001;1:1813–22.
415. Laviano A, Meguid MM, Guijarro A, Muscaritoli M, Cascino A, Preziosa I, et al. Antimyopathic effects of carnitine and nicotine. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2006;9:442–8.
416. Zhang H, Jia H, Liu J, Ao N, Yan B, Shen W, et al. Combined R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine exerts efficient preventative effects in a cellular model of Parkinson's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 2010;14:215–25.
417. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* 1996;21:83–6.
418. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Gramignano G, Serpe R, Massa E, et al. Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment for patients with cancer cachexia: interim results. *Nutrition.* Elsevier; 2008;24:305–13.
419. Madeddu C, Dessì M, Panzone F, Serpe R, Antoni G, Cau MC, et al. Randomized phase III clinical trial of a combined treatment with carnitine + celecoxib ± megestrol acetate for patients with cancer-related anorexia/cachexia syndrome. *Clin. Nutr.* 2012;31:176–82.
420. Browning JD, MacDonald RS, Thornton WH, O'Dell BL. Reduced food intake in zinc deficient rats is normalized by megestrol acetate but not by insulin-like growth factor-I. *J. Nutr.* 1998;128:136–42.
421. Von Roenn JH, Armstrong D, Kotler DP, Cohn DL, Klimas NG, Tchekmedyan NS, et al. Megestrol acetate in patients with AIDS-related cachexia. *Ann. Intern. Med.* 1994;121:393–9.
422. Pérez De Oteyza C, García Cortés A, Menéndez Martínez MA, Torres Léon JM, Pérez Aznar C, Carnicero Bujarrabal M. [Megestrol in the treatment of AIDS associated cachexia. Evaluation by bioelectric impedance analysis of body composition]. *An. Med. Interna.* 1998;15:255–8.
423. Madeddu C, Macciò A, Panzone F, Tanca FM, Mantovani G. Medroxyprogesterone acetate in the management of cancer cachexia. *Expert Opin. Pharmacother.* 2009;10:1359–66.
424. García-Martínez C, López-Soriano FJ, Argilés JM. Amino acid uptake in skeletal muscle of rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Mol. Cell. Biochem.* 1995;148:17–23.
425. Costelli P, Llovera M, García-Martínez C, Carbó N, López-Soriano FJ, Argilés JM. Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer Lett.* 1995;91:73–8.
426. Oster MH, Enders SR, Samuels SJ, Cone LA, Hooton TM, Browder HP, et al. Megestrol acetate in patients with AIDS and cachexia. *Ann. Intern. Med.* 1994;121:400–8.
427. Chang YS, Adnane J, Trail P a, Levy J, Henderson A, Xue D, et al. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007;59:561–74.
428. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylak C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2007;356:125–34.

Bibliografia

429. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:378–90.
430. Yang F, Jove V, Buettner R, Xin H, Wu J, Wang Y, et al. Sorafenib inhibits endogenous and IL-6/S1P induced JAK2-STAT3 signaling in human neuroblastoma, associated with growth suppression and apoptosis. *2012;534–41.*
431. Enomoto A, Rho M-C, Fukami A, Hiraku O, Komiyama K, Hayashi M. Suppression of cancer cachexia by 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-acetate-a novel nonpeptide IL-6 receptor antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;323:1096–102.
432. Penna F, Costamagna D, Fanzani A, Bonelli G, Baccino FM, Costelli P. Muscle wasting and impaired myogenesis in tumor bearing mice are prevented by ERK inhibition. *PLoS One.* 2010;5:e13604.
433. He WA, Berardi E, Cardillo VM, Acharyya S, Aulino P, Thomas-Ahner J, et al. NF-κB-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. *J. Clin. Invest.* 2013;123:4821–35.
434. Busquets S, Toledo M, Sirisi S, Orpí M, Serpe R, Coutinho J, et al. Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity. *Exp Ther Med. Cancer Research Group, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.*; 2011;2:731–5.
435. Busquets S, Serpe R, Sirisi S, Toledo M, Coutinho J, Martínez R, et al. Megestrol acetate: Its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia. *Clin. Nutr.* 2010;29:733–7.
436. Araújo JP, Lourenço P, Rocha-Gonçalves F, Ferreira A, Bettencourt P. Nutritional markers and prognosis in cardiac cachexia. *Int. J. Cardiol.* 2011;146:359–63.
437. Fearon KC, Falconer JS, Slater C, McMillan DC, Ross JA, Preston T. Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response. *Ann. Surg.* 1998;227:249–54.
438. Busquets S, Carbó N, Almendro V, Quiles MT, López-Soriano FJ, Argilés JM. 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;167:33–8.
439. Rietman EA, Friesen DE, Hahnfeldt P, Gatenby R, Hlatky L, Tuszyński JA. An integrated multidisciplinary model describing initiation of cancer and the Warburg hypothesis. *Theor. Biol. Med. Model.* 2013;10:39.
440. López-Soriano J, Argilés JM, López-Soriano FJ. Lipid metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Mol. Cell. Biochem.* 1996;165:17–23.
441. Trobec K, Kerec Kos M, von Haehling S, Springer J, Anker SD, Lainscak M. Pharmacokinetics of drugs in cachectic patients: a systematic review. *PLoS One.* 2013;8:e79603.