

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

NUTRACÈUTICS: IMPLICACIÓ TERAPÈUTICA EN CAQUÈXIA CANCEROSA I DIABETIS

MIREIA OLIVAN RIERA

Barcelona, 2009

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

Memòria presentada per la llicenciada en Biologia Mireia Olivan Riera, per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona, pel programa de Doctorat de Biomedicina del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Bienni 2005-2007).

La present tesi doctoral: "*Nutracèutics: implicació terapèutica en caquèxia cancerosa i diabetis*", ha estat realitzada al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular a la facultat de Biologia (UB) sota la direcció del Dr. Francisco J. López Soriano i la Dra. Sílvia Busquets Rius.

Dr. Francisco J. López Soriano

Prof. titular Bioquímica i Biologia Molecular

Sílvia Busquets Rius

Prof. associada Bioquímica i Biologia Molecular

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat de Barcelona

La doctoranda

Mireia Olivan Riera

Semblava que no arribaria mai aquest dia... però per fi, poc a poc, ha anat agafant forma i aquí ho teniu! Arribat aquest moment miro enrere i me n'adono del llarg camí realitzat, una etapa plena de noves experiències i coneixements, de creixement personal, de bons moments i d'algun que altre disgust però enriquidora a tots nivells. Evidentment en aquest camí m'han acompanyat moltíssimes persones per les quals em costa expressar en paraules tot el que m'han aportat.

Voldria començar donant les gràcies als meus directors. Francesc, no oblidaré mai l'amabilitat i el temps que em vas dedicar en el moment en que, tot i no haver acabat la carrera, vaig picar a la porta del teu despatx buscant una oportunitat en el món de la recerca, gràcies per donar-me-la i deixar-me formar part d'aquest grup tan increïble. I Sílvia... com donar-te les gràcies en poquetes paraules, com agrair-te el teu recolzament, els milers de preguntes, que amb molta paciència, m'has respòs, gràcies per aportar-me calma i sobretot per fer-me sentir que som un equip.

També m'agradaria donar les gràcies al Josep Argilés per la confiança dipositada en mi, per anar-me obrint camí i per aportar-me optimisme i una visió apassionant de la ciència.

Evidentment no m'oblido de la resta de persones que formen el grup o que en aquests anys han anat passant. Cibely, amb tu vaig començar aquest aventura, per tota l'ajuda que m'has donat i per la teva serenitat només et puc dir *muito obrigada*. Gemma gràcies per tots els consells, Inés, Paula, Angèlica gràcies per la vostra ajuda.

També vull agrair a la gent del Departament, en especial al grup de NO (Montse, Mar, Ruth...) i d'LPL (David, Eva...), la seva ajuda sempre que l'he necessitat.

Moltes gràcies al grup de recerca del Dr. Anker (Jochen, Anika...) per acollir-me tan bé a Berlín.

Per sort, també fora del Departament he pogut comptar amb persones sense les quals no ho hagués aconseguit. En primer lloc, donar les gràcies a la meva família per no deixar de confiar en mi ni un segon.

Mil gràcies als meus amics, als que sempre hi són passi el que passi... als "d'units per sempre", gràcies pel vostre suport.

Al Viti, gràcies per tots els valors que m'has donat i per compartir amb mi uns anys que no oblidaré mai, tens molt a veure en que avui sigui qui sóc.

Unes línies pels biòlegs... moltes gràcies per recolzar-me, per fer-me riure, pels cafetons i per dir-me... ànims que això ja és teu!

Keko... em sembla que tu t'has emportat la pitjor part d'aquesta tesi, els meus nervis, els moments de saturació, de creure que no me'n sortiria i, tot i així, has estat al meu costat i no has dubtat de mi ni un moment, moltes gràcies per la confiança i paciència però sobretot per tots els moments increïbles que m'has regalat aquest any... i els que ens queden!

I ja per acabar... vull donar les gràcies a la Maite, que vàrem començar sent companyes de feina i que ara per a mi és una gran amiga. Gràcies per ensenyar-me tantes coses, per escoltar-me, per la teva ajuda incondicional, pels teus consells, per la teva paciència... i per mil coses més, no ho hagués aconseguit sense tu.

Aquesta tesi és una mica de tots.

Moltíssimes gràcies.

AA	àcid araquidònic
AG	àcid gras
AGE	àcids grassos essencials
AMPc	monofosfat d'adenosina cíclica
AMPK	quinasa activada per AMP
AP1	<i>activator protein 1</i>
ATP	trifosfat d'adenosina
COX	ciclooxigenasa
DADS	disulfur d'al·lil
DAS	sulfur d'al·lil
DATS	trisulfur d'al·lil
DEPC	dietil pirocarbonat
2-DOG	2-desoxiglucosa
DHA	àcid docosahexaenoic
DM	diabetis mellitus
DMEM	<i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetil sulfòxid
DMT1	diabetis mellitus de tipus 1
DMT2	diabetis mellitus de tipus 2
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	desoxiribonucleòtids
E1	enzim activador d'ubiquitina
E2	enzim conjugador d'ubiquitina
E3	l·ligasa d'ubiquitina
EDL	<i>extensor digitorum longus</i>
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
EGCG	galat d'epigallocatequina
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EPA	àcid eicosapentaenoic
FAT	translocasa d'àcids grassos
FATP	transportador d'àcids grassos
FBS	sèrum fetal boví
GSK	glicogen sintasa quinasa
GLUT	transportador de glucosa
GSN	gastrocnemius
H	hipertèrmia
HS	sèrum equí
I κ -B α	inhibidor d'NF κ B
IL (1-35)	interleuquina (1-35)
IR	receptor de la insulina

IRS	substrat del receptor de la insulina
LDL	lipoproteïna de baixa densitat
LINO	àcid linoleic
LLC	carcinoma pulmonar de Lewis
LPL	lipoproteïna lipasa
LPS	lipopolisacàrid
MAPK	quinasa de proteïna activada per mitògens
MPOC	malaltia pulmonar obstructiva crònica
NF-κB	factor nuclear κB
OGTT	test oral de tolerància a la glucosa
OSCs	components organosulfurats
PBS	tampó fosfat salí
PC	pes corporal
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDE	fosfodiesterasa
PI3K	fosfoinositol-3-quinasa
PIF	factor inductor de la proteòlisi
PKC	proteïna quinasa C
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PSF	Penicilina-Estreptomicina-Fungizona
RNA	àcid ribonucleic
RNA _m	àcid ribonucleic missatger
ROS	espècies reactives de l'oxigen
SAC	S-al·lil-cisteïna
SAMC	S-al·lilmercaptocisteïna
TAB	teixit adipós blanc
TAB _d	teixit adipós blanc dorsal
TAB _e	teixit adipós blanc epididimal
TAM	teixit adipós marró
TEMED	tetrametilendiamina
TG	triglicèrids
TGI	tracte gastrointestinal
TNF-α	factor de necrosi tumoral alfa
TR	transcripció reversa
Ub	ubiquitina
VLDL	lipoproteïna de molt baixa densitat

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ.....	1
1. DIABETIS MELLITUS.....	1
1.1 Característiques generals	1
1.2 Tipus de diabetis	2
1.2.1 Diabetis mellitus de tipus 1.....	2
1.2.2 Diabetis mellitus de tipus 2.....	2
1.2.3 Diabetis gestacional	4
1.3 Insulina	4
1.3.1 Biosíntesi.....	4
1.3.2 Secreció.....	5
1.3.3 Accions de la insulina.....	5
1.3.3.1 Efectes de la insulina en el metabolisme glucídic.....	6
1.3.3.2 Efectes de la insulina en el metabolisme lipídic.....	7
1.3.4 Transducció de la senyal.....	10
1.4 Resistència a la insulina i diabetis mellitus de tipus 2.....	10
1.4.1 Conseqüències metabòliques i clíniques de la resistència a la insulina.....	10
1.4.2 Paper del teixit adipós en la resistència a la insulina.....	14
1.4.2.1 Leptina.....	14
1.4.2.2 TNF- α	14
1.4.2.3 Adiponectina	15
1.5 Síndrome metabòlica.....	16
1.6 Estratègies i possibles dianes terapèutiques per a la diabetis mellitus de tipus 2	18
1.6.1 Estratègies per reduir la producció hepàtica de glucosa i la hiperglucèmia	19
1.6.2 Estratègies per augmentar la secreció d'insulina estimulada per glucosa	20
1.6.3 Estratègies dirigides a la via de senyalització de la insulina.....	22
1.6.4 Estratègies dirigides a l'obesitat, al metabolisme lipídic i la lipotoxicitat.....	23
1.6.5 Estratègies dirigides als PPAR.....	25
1.6.6 Altres estratègies.....	25
2. LA CAQUÈXIA ASSOCIADA AL CÀNCER.....	26
2.1 Malnutrició	27
2.1.1 Alteracions de l'aparell digestiu i malabsorció	28
2.1.2 Anorèxia	28
2.1.2.1 Mecanismes d'inducció de l'anorèxia.....	29
2.1.2.2 Mediadors de l'anorèxia	29
2.2 Alteracions metabòliques	30
2.2.1 Metabolisme energètic	30
2.2.2 Metabolisme glucídic.....	31
2.2.3 Metabolisme lipídic.....	32
2.2.4 Metabolisme proteic	32

2.3 Mediadors de la caquèxia cancerosa.....	34
2.3.1 Factors tumorals.....	35
2.3.1.1 Factors mobilitzadors de lípids.....	35
2.3.1.2 Factor inductor de proteòlisi (PIF).....	36
2.3.2 Factors humorals.....	36
2.3.2.1 Insulina.....	36
2.3.2.2 Hormones tiroïdals.....	37
2.3.2.3 Glucocorticoides.....	37
2.3.2.4 Catecolamines.....	37
2.3.2.5 Citoquines.....	37
2.3.2.5.1 Principals tipus de citoquines.....	39
2.4 Múscul esquelètic.....	42
2.4.1 Recanvi proteic.....	42
2.4.2 Sistemes proteolítics.....	43
2.4.2.1 Sistema lisosomal.....	44
2.4.2.2 Sistema dependent de calci.....	45
2.4.2.3 Sistema dependent d'ATP i ubiquitina.....	45
2.4.2.3.1 Ubiquitina.....	46
2.4.2.3.2 Degradació proteica.....	47
2.4.2.3.3 Enzims del sistema.....	47
2.4.2.4 Proteòlisi muscular durant estats catabòlics.....	50
2.4.3 Vies de transducció de la senyal al múscul esquelètic durant la caquèxia associada al càncer.....	51
2.5 Estratègies terapèutiques.....	53
2.5.1 Estratègies per contrarestar l'anorèxia.....	54
2.5.1.1 Estratègies farmacològiques.....	54
2.5.1.2 Estratègies nutricionals.....	55
2.5.2 Estratègies per contrarestar les alteracions metabòliques.....	56
2.5.2.1 Mediades per citoquines.....	56
2.5.2.1.1 Bloqueig de la síntesi de citoquines.....	56
2.5.2.1.2 Bloqueig de l'acció de les citoquines.....	56
2.5.2.2 Efecte mediat per hormones.....	57
2.5.2.3 Altres aproximacions.....	58
3. NUTRACÈUTICS.....	59
3.1 Conceptes.....	59
3.1.1 Aliments funcionals.....	59
3.1.2 Suplement dietètic.....	60
3.1.3. Nutracèutic.....	60
3.2 Vi.....	62
3.2.1 Resveratrol.....	62
3.3 Soja.....	63
3.3.1 Isoflavones de la soja.....	64

3.3.1.1 Genisteïna	65
3.4 Te verd	66
3.4.1 Catequines del te verd	67
3.4.1.1 Galat d'epigallocatequina.....	68
3.4.2 Alcaloides del te verd	70
3.4.2.1 Teofil·lina	70
3.5 All.....	72
3.5.1 Components organosulfurats de l'all.....	73
3.6 Àcids grassos essencials	75
3.6.1 Àcids grassos ω -6 : àcid linoleic	76
3.6.2 Àcids grassos ω -3: àcid eicosapentaenoic	77
II. OBJECTIUS	80
III. MATERIALS I MÈTODES	82
1. ESTUDIS <i>IN VIVO</i>.....	82
1.1 Animals i condicions d'experimentació.....	82
1.2 Models experimentals.....	82
1.2.1 Model de diabetis: Goto-Kakizaki.....	82
1.2.2 Hepatoma ascític Yoshida AH-130	82
1.2.3 Carcinoma pulmonar de Lewis.....	83
1.2.3.1 Determinació de les metàstasis pulmonars	83
1.3 Tractaments.....	84
1.4 Anestèsia i sacrifici	85
1.5 Extracció de teixits i sang	85
1.6 Mesura de la composició corporal.....	86
1.7 Mesura de l'activitat locomotora	86
2. ESTUDIS <i>EX VIVO</i>.....	86
2.1 Preparació de teixits aïllats	86
3. ESTUDIS <i>IN VITRO</i>	87
3.1 Cultius cel·lulars	87
3.1.1 Normes generals de manipulació.....	87
3.1.2 Línia cel·lular C2C12.....	88
3.1.3 Medis de cultiu, suplementes i antibiòtics	89
3.1.4 Tècniques generals en cultius cel·lulars	89
3.1.4.1 Manteniment de l'estoc	89
3.1.4.2 Subdivisió	90
3.1.4.3 Comptatge	90
3.1.4.4 Sembra	90
3.1.4.5 Congelació.....	90

3.1.4.6 Descongelació.....	91
3.2 Estudis en cultius de C2C12 diferenciades.....	91
3.2.1 Model proteolític d'hipertèrmia puntual.....	91
3.2.2 Tractaments.....	91
3.2.3 Taxa de degradació proteica.....	92
4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.....	93
4.1 Extracció de l'RNA.....	93
4.2 Transcripció reversa i PCR a temps real (PCR-RT).....	94
4.3 Anàlisi de l'activitat de factors de transcripció: estudis de retard en gel.....	97
4.3.1 Obtenció dels extractes nuclears.....	97
4.3.2 Estudis de retard en gel o EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>).....	97
4.3.2.1 Marcatge de la sonda i preparació de les mostres.....	97
4.3.2.2 Electroforesi.....	98
5. ANÀLISI DEL CONTINGUT PROTEIC.....	99
5.1 Extracció de proteïna total.....	99
5.2 Determinació de la proteïna total.....	99
5.3 Western blot.....	99
6. MESURES PLASMÀTIQUES.....	101
6.1 Metabòlits.....	101
6.2 Nivells plasmàtics d'hormones.....	102
6.3 Citoquines inflamatòries.....	102
7. VALORACIONS DEL METABOLISME GLUCÍDIC.....	103
7.1 Test oral de tolerància a la glucosa.....	103
7.2 Nivells de glicogen en múscul.....	103
7.3 Captació de 2-desoxi-[¹⁴ C]glucosa en C2C12.....	104
7.4 Captació de 2-desoxi-[¹⁴ C]glucosa en músculs EDL aïllats.....	104
8. VALORACIONS DEL METABOLISME LIPÍDIC.....	105
8.1 Destí metabòlic del palmitat.....	105
8.1.1 Oxidació.....	105
8.1.2 Destí del palmitat.....	106
8.2 Destí metabòlic de la trioleïna.....	107
8.2.1 Oxidació.....	107
8.2.2 Absorció intestinal.....	108
8.2.3 Incorporació a teixits.....	108
8.3 Activitat de lipoproteïna lipasa.....	109
9. ANÀLISI ESTADÍSTICA.....	110

IV. RESULTATS	111
1. EFECTE DE L'EPA SOBRE LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 2	111
1.1 Estudi del metabolisme glucídic	113
1.1.1 Test oral de tolerància a la glucosa (OGTT)	113
1.1.2 Nivells de glicogen en múscul	115
1.1.3 Nivells plasmàtics d'adiponectina	115
1.1.4 Nivells plasmàtics d'insulina	116
1.1.5 Nivells d'AMPK	116
1.1.6 Captació de 2-desoxiglucosa en cèl·lules C2C12	117
1.1.7 Captació de 2-desoxiglucosa en músculs aïllats	118
1.1.8 Expressió gènica de GLUT4 en el múscul esquelètic	119
1.2 Estudi del metabolisme lipídic	119
1.2.1 Activitat LPL	119
1.2.2 Destí metabòlic del palmitat <i>ex vivo</i>	120
1.2.3 Destí metabòlic de la trioleïna <i>in vivo</i>	121
1.2.4 Expressió dels transportadors FAT i FATP	123
1.2.5 Expressió dels factors de transcripció PPAR α , δ , i γ	124
1.3 Estudi de la inflamació	126
1.3.1 Nivells plasmàtics de citocines proinflamatòries	126
1.3.2 Expressió gènica de citocines proinflamatòries	126
1.3.3 Nivells d'NF- κ B	127
1.3.4 Nivells d'I κ -B α	128
2. EFECTE DELS NUTRACÈUTICS SOBRE LA CAQUÈXIA CANCEROSA	129
2.1 Estudi del potencial terapèutic del resveratrol	130
2.1.1 Aproximació <i>in vitro</i> : efecte del resveratrol sobre la degradació proteica en miotubs C2C12... 130	
2.1.2 Aproximació <i>in vivo</i> : efecte del resveratrol en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis	131
2.2 Estudi del potencial terapèutic de la genisteïna	134
2.2.1 Aproximació <i>in vitro</i> : efecte de la genisteïna sobre la degradació proteica en miotubs C2C12 135	
2.2.2 Aproximació <i>in vivo</i> : efecte de la genisteïna en animals portadors del tumor ascític Yoshida.. 135	
2.2.3 Aproximació <i>in vivo</i> : efecte de la genisteïna en animals control	137
2.3 Estudi del potencial terapèutic de l'EGCG	139
2.3.1 Aproximació <i>in vitro</i> : efecte de l'EGCG sobre la degradació proteica en miotubs C2C12	139
2.3.2 Aproximació <i>in vivo</i> : efecte de l'EGCG en animals portadors del tumor ascític Yoshida	140
2.4 Estudi del potencial terapèutic de la teofil·lina	142
2.4.1 Aproximació <i>in vitro</i> : efecte de la teofil·lina sobre la degradació proteica en miotubs C2C12 . 142	
2.4.2 Aproximació <i>in vivo</i> : efecte de la teofil·lina en animals portadors del tumor ascític Yoshida ... 143	
2.4.2.1 Activitat locomotora i composició corporal	145
2.4.2.2 Nivells d'expressió dels gens dels sistemes proteolítics	147
2.4.2.3 Nivells plasmàtics de citocines: TNF- α i IL-10	148

2.5 Estudi del potencial terapèutic del DAS	149
2.5.1 Aproximació <i>in vitro</i> : efecte del DAS sobre la degradació proteica en miotubs C2C12	149
2.5.2 Aproximació <i>in vivo</i> : efecte del DAS en rates portadores del tumor ascític Yoshida	150
2.5.2.1 Nivells d'expressió dels gens dels sistemes proteolítics.....	154
2.5.2.2 Nivells plasmàtics de citoquines: TNF- α i IL-10	155
2.5.3 Aproximació <i>in vivo</i> : efecte del DAS en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis .	156
V. DISCUSSIÓ.....	159
1. EFECTE DE L'EPA SOBRE LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 2	159
1.1 Efecte de l'EPA en el pes i la ingesta de rates amb DMT2.....	159
1.2 Efecte de l'EPA en el metabolisme glucídic.....	160
1.3 Efecte de l'EPA en el metabolisme lipídic.....	161
1.4 Efecte de l'EPA en la inflamació	164
2. EFECTE DELS NUTRACÈUTICS SOBRE LA CAQUÈXIA CANCEROSA.....	165
2.1 Estudi del potencial terapèutic del resveratrol	166
2.2 Estudi del potencial terapèutic de la genisteïna.....	168
2.3 Estudi del potencial terapèutic de l'EGCG	171
2.4 Estudi del potencial terapèutic de la teofil·lina	174
2.5 Estudi del potencial terapèutic del DAS	177
VI. CONCLUSIONS	181
VII. BIBLIOGRAFIA.....	182

I. INTRODUCCIÓ

1. DIABETIS MELLITUS

1.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS

La diabetis mellitus (DM) és una síndrome orgànica multisistèmica crònica (trastorn endocrí-metabòlic) que es caracteritza per un augment dels nivells de glucosa en sang (hiperglucèmia) com a resultat d'una defectuosa secreció d'insulina i/o acció de l'hormona sobre els teixits. Aquesta situació conduirà a alteracions en el metabolisme dels carbohidrats, dels lípids i de les proteïnes. Els seus símptomes més destacables són la poliúria (producció excessiva d'orina), polidípsia (set intensa), pèrdua de pes, visió borrosa, astènia (debilitat provocada per la mala utilització de glucosa en els músculs) i en alguns casos polifàgia (increment de la gana).

Les causes que donen lloc a l'aparició de la diabetis mellitus poden ser diverses, ja que hi poden intervenir diferents factors: factors hereditaris, hàbits alimentaris, alteracions pancreàtiques (inflamacions o intervencions quirúrgiques), processos infecciosos o autoimmunes, estrès i obesitat.

Els pacients amb diabetis poden desenvolupar complicacions a diferents nivells, com ara complicacions agudes, generalment com a conseqüència d'un control inadequat de la malaltia o complicacions de tipus crònic, degudes al propi desenvolupament d'aquesta. Algunes d'aquestes complicacions poden ser:

- Hipoglucèmia: disminució dels nivells de glucosa en sang per sota de 50 mg/dl, que pot ser provocada per un exercici físic no habitual, sobredosis d'insulina, ingesta insuficient d'hidrats de carboni o diarrees. Pot provocar tremolors, marejos, suor freda, mals de cap i canvis en l'estat d'ànim entre d'altres.
- Cetoacidosi: la deficiència d'insulina provoca alteracions en els adipòcits, amb la conseqüent alliberació d'àcids grassos lliures, que s'oxiden en el fetge i donen lloc als cossos cetònics. Aquest fet pot provocar deshidratació severa, risc d'entrar en coma, insuficiència renal, xoc hipovolèmic i afectació multiorgànica.
- Esteatosi hepàtica: fetge gras per l'acumulació de triacilglicèrids al citoplasma i als mitocondris de les cèl·lules hepàtiques.
- Coma diabètic: provocat per l'excés de glucosa en sang.
- Coma insulínic: provocat pel dèficit de glucosa en sang.
- Trastorns neurològics: dolors neuràlgics, encefalopatia diabètica, impotència sexual, etc.
- Trastorns renals: glomeruloesclerosi diabètica i infeccions urinàries.
- Trastorns oculars: glaucoma i retinopatia diabètica deguda a l'obstrucció dels capil·lars sanguinis del globus ocular, que provoca el 25% de les cegueres en pacients diabètics.
- Afectacions cutànies: infeccions de la pell, ulceracions, sequedat, ampolles, etc.

- Trastorns cardiovasculars: gran tendència a desenvolupar aterosclerosi, i això pot provocar angines de pit, insuficiència cardíaca i infarts.

1.2 TIPUS DE DIABETIS

Segons el comitè d'experts de l'ADA (Associació Americana de Diabetes) i la OMS (Organització Mundial de la Salut) la classificació de la diabetis mellitus es basa en l'etiologia de la malaltia, i en distingeixen 4 categories: DM tipus 1 (DMT1), DM tipus 2 (DMT2), DM gestacional i altres tipus específics, entre els quals hi trobem els MODY (*maturity-onset diabetes of the young*), malalties del pàncrees exocrí o endocrinopaties.

1.2.1 DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 1

Aquest tipus de diabetis correspon a la també anomenada diabetis dependent d'insulina. Es presenta majoritàriament en individus joves i es caracteritza per una nul·la producció d'insulina a causa de la destrucció autoimmune, per l'acció de les cèl·lules T, de les cèl·lules β dels illots de Langerhans del pàncrees. S'acostuma a diagnosticar abans dels 30 anys d'edat i afecta a 4,9 milions de persones, de les quals 1,27 milions són europees. Això equival a un 0,19% de la població mundial, encara que la prevalença més elevada (d'un 0,25%) es troba a Amèrica del Nord, variacions que reflexen l'existència d'una determinada predisposició genètica entre poblacions.

Algunes de les complicacions que acompanyen a aquest tipus de diabetis són problemes oculars, renals, cardiovasculars i del sistema nerviós, com s'ha esmentat anteriorment. Les persones que viuen amb aquesta malaltia és important que segueixin un pla d'alimentació adequat, realitzin exercici i controlin la pressió arterial així com els nivells de colesterol. És necessari mantenir els nivells de glucosa en sang el més pròxims possible als nivells normals, i per aconseguir-ho se segueixen dietes, s'administra diàriament insulina al pacient de forma controlada, o fins i tot pot ser necessari realitzar un transplantament.

1.2.2 DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 2

La diabetis mellitus de tipus 2, també coneguda com la diabetis no dependent d'insulina, constitueix el 90% dels casos de diabetis en els països occidentals i tot i que el diagnòstic es dona habitualment en adults, també afecta (cada vegada més) a persones joves. L'any 2000 es va estimar que al voltant de 170 milions de persones eren diabètiques (DMT2) i que aquest nombre es podria incrementar fins a 370 milions al 2030 (Wild *et al.*, 2004).

Aquesta malaltia es basa en un complex mecanisme fisiopatològic que té com a característica principal el dèficit relatiu en la producció d'insulina i una deficient utilització de la glucosa per part dels teixits perifèrics, especialment al múscul i al teixit adipós,

manifestant així una resistència a la insulina. La malaltia s'inicia amb una fase de tolerància a la glucosa alterada i amb una secreció d'insulina retardada en el temps. En aquests estadis inicials es produeix un augment en la secreció d'insulina per a compensar la resistència a l'hormona en els teixits perifèrics, i l'inici de la malaltia es produeix quan aquesta compensació no és suficient. En resum, la DMT2 representa l'etapa final d'un trastorn crònic progressiu causat per una combinació entre la resistència a l'acció de la insulina i la disminució de la funció de les cèl·lules β pancreàtiques, determinada per factors genètics o anormalitats adquirides. Precisament, donat que la DMT2 a l'inici del seu desenvolupament és poc simptomàtica, es creu que entre el 30 i el 50 % dels malalts dels països occidentals no estan diagnosticats.

En la majoria dels casos, la DMT2 és una malaltia poligènica, amb patrons d'herència complexos (Kahn *et al.*, 1996). El fort component genètic de la malaltia queda evidenciat per l'elevada incidència entre familiars i l'alta prevalença en certs grups ètnics. De tota manera, fins ara només uns pocs gens han estat directament relacionats com a causants de la malaltia. Entre els gens descrits, trobem mutacions en enzims claus en algunes síndromes de diabetis familiar, mutacions en el DNA mitocondrial o mutacions en factors de transcripció com de l'HNF-1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 α*), l'HNF-1 β (*hepatocyte nuclear factor 1 β*), HNF-4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*) o PDX-1 (*pancreatic duodenal homeobox 1*) causants de la forma MODY (*maturity-onset diabetes of the young*).

Una gran varietat de factors ambientals han estat identificats com a factors de risc per al desenvolupament de la DMT2; d'entre aquests hi destaca notablement l'obesitat, sent aquest trastorn present aproximadament en un 80% dels diabètics de tipus 2. Els estudis de població demostren que els individus obesos tenen una major incidència de diabetis; aquesta relació recau en la reducció a la sensibilitat a la insulina dels teixits perifèrics, el que provoca un augment dels nivells plasmàtics d'insulina. Altres factors de risc són la manca d'activitat física, l'edat o l'administració perllongada d'alguns fàrmacs com els corticosteroides.

A llarg termini, aquesta malaltia pot presentar les complicacions descrites en el punt 1.1. Sovint, els nens amb DMT2 tenen una elevada probabilitat de presentar hipertensió i nivells alts de colesterol i triglicèrids. També poden presentar àrees de la pell engruixida i com de "vellut" al voltant del coll, aixelles, dits del peu, colzes i genolls (*acantosis nigricans*). Hi ha nenes que també poden presentar la síndrome d'ovaris poliquístics, relacionada amb la resistència a la insulina.

Per a conivir amb aquesta malaltia els pacients han de seguir dietes saludables, realitzar alguna activitat física i intentar mantenir un pes corporal adequat. En alguns casos és necessària l'administració d'insulina i hauran de rebre fàrmacs que ajudin a combatre la resistència a l'hormona. Aquest últim punt és diana de molts dels estudis que es duen a terme a la comunitat científica.

1.2.3 DIABETIS GESTACIONAL

Aquest tipus de diabetis afecta a dones embarassades que mai han manifestat diabetis però que, durant l'embaràs, han tingut nivells elevats de glucosa en sang. Pot ser deguda a la producció d'hormones per la placenta durant el desenvolupament fetal, donat que aquestes hormones poden afectar o bloquejar la producció d'insulina en el cos de la mare, generant una resistència a aquesta i provocant una situació d'hiperglucèmia. A partir del moment en que la mare pateix una diabetis gestacional, augmenta la probabilitat que la torni a manifestar en els següents embarassos, i fins i tot podria arribar a desenvolupar una DMT2. A més, s'haurà de portar un control del creixement del fetus, ja que podria patir macrosomia (pes superior al normal).

1.3 INSULINA

1.3.1 BIOSÍNTESI

La insulina (del llatí *insula*: illa), descoberta al 1922, és una hormona polipeptídica formada per 51 aminoàcids. És secretada per les cèl·lules β del pàncrees en forma de precursor inactiu (preproinsulina), format per una única cadena de 86 aminoàcids, la qual passa per l'aparell de Golgi on és modificada, en primer lloc eliminant el pèptid senyal amino terminal (preinsulina) i finalment amb l'escissió d'un fragment intern de 31 aminoàcids (pèptid C); els dos fragments restants queden units mitjançant ponts disulfur (Figura 1). La molècula d'insulina madura i el pèptid C s'emmagatzemen junts i es segreguen simultàniament des dels grànuls secretors de les cèl·lules β . Com que el pèptid C és menys sensible a la degradació hepàtica que la insulina, constitueix un marcador útil de la secreció d'insulina i permet diferenciar l'hormona d'origen endogen i exogen.

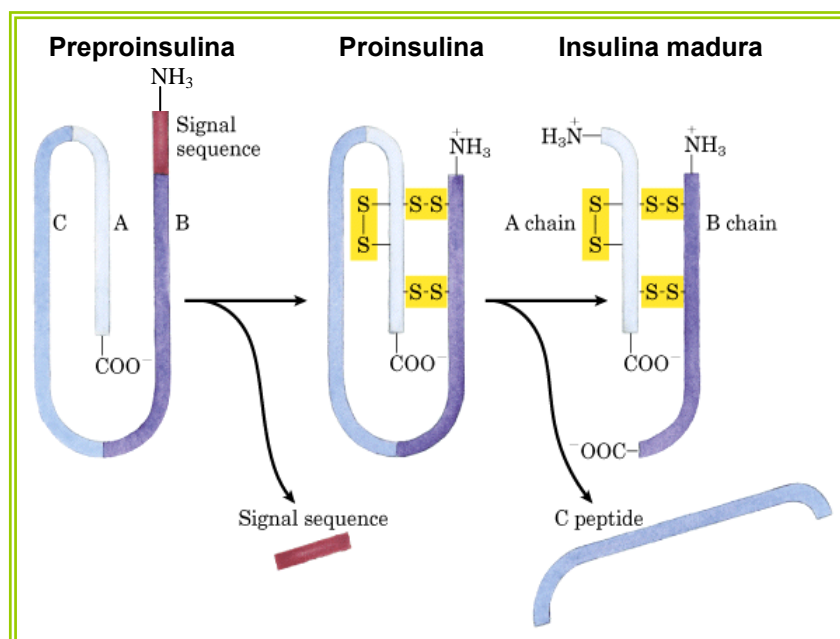


Figura 1. Processament de la cadena polipeptídica de la insulina

1.3.2 SECRECIÓ

El pàncrees juga un paper primordial en el metabolisme, segregant diferents hormones a la vena pancreàtica-duodenal que drena a la vena porta, constituint un òrgan de vital importància en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa. La majoria de les cèl·lules endocrines (al voltant del 90%) estan agrupades formant estructures esfèriques, disperses en el teixit exocrí, anomenades illots de Langerhans. En mamífers adults, els illots representen entre un 1 i un 2 % de la massa pancreàtica total, i són una barreja complexa de cèl·lules i funcions, separades com a microòrgans o en coordinació com a teixit.

Existeixen quatre tipus de cèl·lules endocrines: les cèl·lules β (que segreguen insulina i en menor grau amilina) conformen la major part de l'illot (entre un 80 i un 90% de l'illot), les cèl·lules α (secretores del glucagó), les cèl·lules δ (secretores de la somatostatina) i les cèl·lules PP (que segreguen el polipèptid pancreàtic). La insulina i el glucagó són les dues hormones principals en el control del balanç entre l'emmagatzematge i consum de glucosa. La somatostatina sembla tenir un efecte indirecte en l'homeòstasi de la glucosa, inhibint tant la secreció del glucagó com la d'insulina.

La glucosa és la reguladora essencial de la secreció d'insulina, tot i que també es veu influenciada per aminoàcids, cossos cetònics, pèptids gastrointestinals i neurotransmissors. Les concentracions de glucosa superiors a 3,9 mmols/L estimulen la síntesi d'insulina, principalment a l'intensificar la traducció i el processament de la proteïna. La glucosa comença a estimular la secreció d'insulina al ser introduïda a les cèl·lules β del pàncrees pel transportador de glucosa GLUT2. La fosforilació de la glucosa per la glucoquinasa és el pas limitant que controla la velocitat de la secreció d'insulina. La metabolització posterior de la glucosa-6-fosfat per la via de la glucòlisi genera ATP que inhibeix l'activitat d'un canal de potassi sensible a l'ATP. Aquesta inhibició provoca la despolarització de la membrana de la cèl·lula β , fet que provoca l'obertura de canals de calci dependents de voltatge amb la conseqüent entrada de calci a la cèl·lula i la secreció d'insulina. Les característiques de la secreció de la insulina mostren un patró pulsatiu de descàrrega de l'hormona, amb ràfegues secretòries petites aproximadament cada 10 minuts, sobreposades a oscil·lacions de major amplitud de 80 a 150 minuts. Els àpats indueixen grans descàrregues de secreció d'insulina (increment entre 4 i 5 vegades del valor basal) que acostumen a durar 2 o 3 hores abans de retornar als valors de referència. Els trastorns d'aquests patrons secretoris normals constitueixen un dels signes més prematurs de la disfunció de la cèl·lula β en la DM.

1.3.3 ACCIONS DE LA INSULINA

La insulina és l'hormona anabòlica per excel·lència, és a dir, permet disposar a les cèl·lules de l'aport necessari de glucosa pels processos de síntesi amb despesa d'energia.

Un cop la insulina és secretada cap a la sang venosa portal, el 50% és degradada pel fetge i la que arriba a la circulació general es fixa als receptors dels seus teixits diana. L'hormona unida estimula l'activitat tirosina quinasa intrínseca del receptor, fet que provoca l'autofosforilació del receptor i el reclutament de molècules de senyalització intracel·lular, com els substrats del receptor de la insulina (IRS). Aquestes proteïnes adaptadores inicien una cascada complexa de fosforilació i desfosforilació que, en última instància, provoquen l'ampli ventall d'efectes metabòlics i mitògens de la insulina.

Els efectes de la insulina es poden classificar en dos grans grups: els aguts o a curt termini, que fan referència a tots aquells efectes metabòlics directes, i els d'efecte a llarg termini (tròfics). Dins d'aquests hi podríem incloure els efectes de la insulina sobre la captació i retenció d'ions i el metabolisme hidroelèctric, l'efecte vasodilatador, l'estimulació de la síntesi i degradació de proteïnes via mTOR (membre de la família de proteïnes PI3K), l'efecte sobre l'expressió gènica d'enzims metabòlics, efectes sobre el recanvi del RNA missatger, i l'estímul del creixement, proliferació i diferenciació cel·lular (Flakoll *et al.*, 2003; Pirola *et al.*, 2004).

1.3.3.1 EFECTES DE LA INSULINA EN EL METABOLISME GLUCÍDIC

Tot i que en els períodes d'ingesta i dejuni la concentració de glucosa plasmàtica ha d'oscil·lar entre 4 i 7 mM en individus normals, aquests valors estan regulats per un balanç entre la glucosa absorbida a l'intestí, la producció de glucosa hepàtica i el consum de glucosa pel metabolisme als teixits perifèrics.

La insulina estimula la captació de glucosa mitjançant l'activació de la translocació dels transportadors de glucosa GLUT4 a la membrana plasmàtica en el múscul i el teixit adipós, així com la síntesi de glicogen activant la glicogen sintasa. La insulina promou la desfosforilació d'aquest enzim a través de la inhibició de quinases com la proteïna quinasa A (PKA) i la glicogen sintasa quinasa (GSK) (Cross *et al.*, 1995) i l'activació de fosfatases (PP1). El mecanisme pel qual activa aquestes fosfatases no és clar, però sembla ser que hi està involucrat la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

Un altre dels papers d'aquesta hormona anabòlica és el d'inhibir la gluconeogènesi hepàtica i l'alliberament de glucosa pel fetge. En aquest teixit actua de forma directa, però la insulina també pot influenciar el metabolisme glucídic a nivell indirecte, promovent canvis en la generació d'àcids grassos (AG) ja que inhibeix la lipòlisi (Figura 2). El flux d'AG procedent del teixit adipós és capaç d'estimular la producció de glucosa. Aquest fet potencia l'acció de la insulina alhora que afavoreix l'aparició de resistència a l'hormona.

La insulina controla directament un conjunt d'enzims metabòlics per mecanismes de fosforilació i desfosforilació, i també és capaç de regular l'expressió de gens que codifiquen per enzims hepàtics relacionats amb la gluconeogènesi i la glucòlisi (Pilkis i Granner, 1992). Així, inhibeix l'expressió de la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (pas limitant de la

gluconeogènesi), disminueix la transcripció dels gens de la fructosa-1,6-bifosfatasa i la glucosa-6-fosfatasa, i augmenta la transcripció de gens glucolítics com la glucoquinasa i la piruvat quinasa.

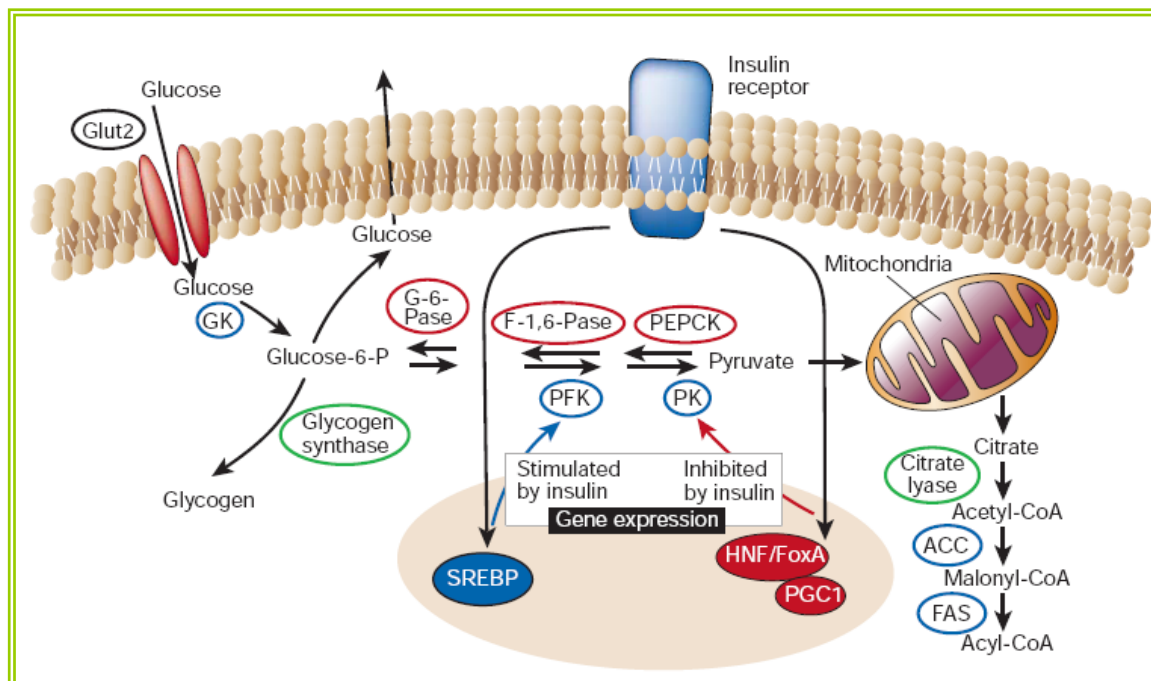


Figura 2. Regulació del metabolisme de la glucosa al fetge. Enzims estimulats per la insulina (blau) i enzims inhibits (vermell). Altres enzims regulats per la insulina (verd). GK, glucoquinasa; G-6-Pase, glucosa-6-fosfatasa; F-1,6-Pase, fructosa-1,6-bifosfatasa; PEPCCK, fosfoenolpiruvat carboxiquinasa; PFK, fosfofructoquinasa; PK, piruvat quinasa; ACC, acetil CoA carboxilasa; FAS, àcid gras sintasa.

1.3.3.2 EFECTES DE LA INSULINA EN EL METABOLISME LIPÍDIC

Com en el cas dels carbohidrats, la insulina també promou la síntesi de lípids i inhibeix la seva degradació. En els adipòcits, la glucosa és emmagatzemada sobretot en forma de lípids degut a un augment en la captació de glucosa i l'activació d'enzims lipogènics com l'àcid gras sintasa o l'acetilCoA carboxilasa. La insulina també inhibeix la lipòlisi en els adipòcits, principalment a través de la inhibició de la lipasa sensible a les hormones (Anthonsen *et al.*, 1998), l'activitat de la qual depèn de mecanismes de fosforilació en els que s'hi troba involucrada la proteïna quinasa A (PKA). La insulina inhibeix la lipasa al disminuir els nivells d'AMPc degut a l'activació de fosfodiesterases específiques en els adipòcits. A més, estimula la captació i emmagatzematge de greixos en el teixit adipós estimulando la lipoproteïna lipasa (LPL) i la triglicèrid sintasa.

1.3.4 TRANSDUCCIÓ DE LA SENYAL

El receptor de la insulina (IR) és una proteïna heterotetramèrica amb dues subunitats α extracel·lulars i dues subunitats β que tenen una petita porció extracel·lular, una porció transmembrana i una porció intracel·lular que presenta activitat tirosina quinasa (Ullrich *et*

al., 1985). Aquest receptor es pot considerar un enzim al·lostèric amb dues subunitats reguladores (α) que tenen inhibides a les dues subunitats catalítiques (β). Quan s'hi uneix la insulina, aquesta inhibició desapareix i les subunitats β s'activen transfosforilant-se entre elles i fosforilant a un grup de proteïnes conegudes com substrats del receptor de la insulina (IRS) i a diferents isoformes de Shc i Cbl (Shoelson *et al.*, 1988). Els IRSs més extensament estudiats són IRS-1 i IRS-2, que són ubicus, mentre que IRS-3 es troba només al teixit adipós i IRS-4 al ronyó i a l'encèfal (Giovannone *et al.*, 2000). No s'ha pogut aclarir del tot la importància relativa i les funcions d'IRS-1 i IRS-2, però estudis realitzats en *knock-out* genètics d'ambdós gens han mostrat que, en termes generals, els animals sense IRS-1 pateixen retard en el creixement, resistència a la insulina en teixits perifèrics i disminució de la tolerància a la glucosa (Araki *et al.*, 1994), mentre que els animals sense IRS-2 presenten resistència a la insulina en teixits perifèrics i fetge, i una disminuïda massa de cèl·lules β , donant lloc al desenvolupament de la DMT2. Els IRS són unes proteïnes riques en regions d'unió a tirosines fosforilades (regions PTB, *PhosphoTyrosine Binding*) que li permeten unir-se al receptor (Giovannone *et al.*, 2000). Un cop IRS ha estat fosforilat, recluta a la membrana cel·lular a dues molècules de gran importància en la resposta biològica a la insulina: PI3K (fosfoinositol-3-quinasa) i Grb-2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) (Le Roith *et al.*, 2001; Ueki *et al.*, 2002).

PI3K és probablement l'enzim de la via de senyalització de la insulina més estudiat, amb un doble paper tant en els efectes metabòlics com mitògens de la insulina. És una proteïna dimèrica amb una subunitat catalítica i una reguladora. Aquesta última s'uneix als IRS fosforilats (Taniguchi *et al.*, 2006) i provoca la fosforilació de diversos fosfolípids de membrana, fet que genera la formació de fosfatidilinositol trifosfat (PIP3). El PIP3 és l'encarregat d'unir-se i activar a PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) i Akt (també coneguda com PKB, proteïna quinasa B), dos enzims que intervenen en la majoria dels efectes metabòlics de la insulina (Currie *et al.*, 1999; Le Roith *et al.*, 2001). En estudis realitzats amb inhibidors de PI3K o amb construccions dominant negatiu de l'enzim, s'ha observat el bloqueig d'algunes de les accions metabòliques de la insulina com el transport de glucosa i la síntesi de glucosa i lípids.

Després de que PDK1 i Akt s'hagin activat, aquest últim fosforila diferents proteïnes que indueixen processos metabòlics com: la translocació de GLUT4 a la membrana i, per tant, la captació de glucosa (Van Dam *et al.*, 2005). Akt també inactiva GSK-3, provocant l'activació de la glicogen sintasa i la inactivació de la glicogen fosforilasa i, per tant, donant lloc a una major síntesi de glicogen i una menor degradació d'aquest (Wojtaszewski *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2003). Un altre dels efectes d'Akt és la fosforilació d'algunes proteïnes ribosomals com p70S6K i la E4-BI, que són factors d'inici de la traducció i que, per tant, estimulen la síntesi de proteïnes (Bhandari *et al.*, 2001).

D'altra banda, encara queda molt per esbrinar sobre els factors de transcripció relacionats amb l'augment d'expressió d'alguns enzims promogut per la insulina, però hi ha estudis que han destacat un paper important dels factors de transcripció relacionats amb mecanismes de fosforilació realitzats per la família de proteïnes d'Akt i del co-activador de PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α*) (Yoon *et al.*, 2001).

PDK1 també interactua amb formes atípiques de la proteïna quinasa C (PKC λ i PKC ζ), les quals han estat relacionades amb el transport de glucosa (Bandyopadhyay *et al.*, 1997). PKC ζ és la forma predominant en múscul esquelètic i teixit adipós en humans, i s'ha vist que potencia el transport de glucosa estimulat per la insulina en múscul esquelètic de rates (Etgen *et al.*, 1999).

A més de la PI3K o la PKC atípica, s'han descrit d'altres proteïnes relacionades amb la captació de glucosa estimulada per la insulina com el producte del protooncogen Cbl, que és fosforilat pel receptor de la insulina (Ribon *et al.*, 1997). Cbl s'associa amb la proteïna adaptadora CAP, la qual s'expressa en teixits sensibles a la insulina i està marcadament induïda durant la diferenciació adipocitària per agonistes de PPAR γ (Ribon *et al.*, 1998). Aquesta via conclou amb l'activació de la proteïna TC10, important per a la translocació a la membrana de les vesícules que contenen GLUT4 (Chiang *et al.*, 2001).

Els IRS fosforilats també s'uneixen a la proteïna Grb-2, que alhora interactua amb Shc provocant la dimerització d'aquesta amb la proteïna mSOS (Skolnik *et al.*, 1993a). El complex Grb-2/mSOS actua sobre una proteïna GTPasa de membrana (Ras) i dóna lloc a l'activació de la via de les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), essencials en la regulació del creixement i la proliferació cel·lulars així com en l'expressió gènica (Skolnik *et al.*, 1993b).

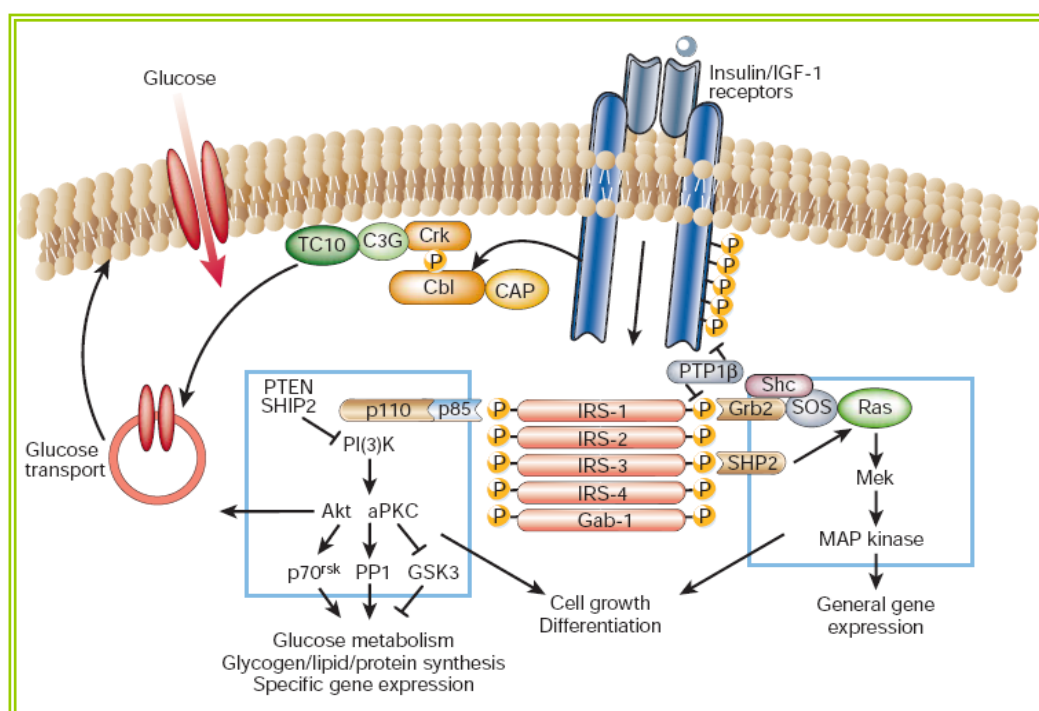


Figura 3. Transducció de la senyal del receptor de la insulina. El receptor de la insulina s'autofosforila i catalitza la fosforilació de diverses proteïnes cel·lulars com els IRS, Shc i Cbl. Aquestes proteïnes interactuen a través dels seus dominis SH2, obrint diferents vies de senyalització entre les quals hi trobem l'activació de PI3K, de la proteïna Ras i la via de les MAPK i de Cbl/CAP, amb la posterior activació de TC10. Aquestes vies regulades de forma coordinada provoquen el tràfic de vesícules, la síntesi de proteïnes i l'activació/inactivació d'enzims, regulant el metabolisme glucídic, lipídic i proteic (Saltiel *et al.*, 2001).

1.4 RESISTÈNCIA A LA INSULINA I DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 2

La resistència a la insulina és un estat metabòlic que es defineix com un defecte per respondre correctament a concentracions normals d'insulina circulant, especialment al fetge i als teixits perifèrics com el múscul i el teixit adipós. Per tal de compensar aquest problema, es produeix una sobresecreció d'insulina pel pàncrees, donant lloc a una situació d'hiperinsulinèmia (Reaven, 2005). S'han observat casos de resistència a la insulina en diferents situacions patològiques, com són obesitat, caquèxia, hipertensió, càncer i infecció. Tot i així, l'aparició de resistència a la insulina és el factor clau que desencadena dues de les malalties metabòliques més prevalents, com són la diabetis de tipus 2 i la síndrome metabòlica (veure apartat 1.5). Tots els pacients amb DMT2 presenten resistència a la insulina, i diversos estudis de prevenció han observat com la resistència a la insulina pot manifestar-se una o dues dècades abans d'aparèixer la simptomatologia completa de la diabetis (Lillioja *et al.*, 1988; DeFronzo *et al.*, 1992). De fet, la resistència a la insulina és la característica més fiable per a la predicció del desenvolupament de la DMT2 (Warram *et al.*, 1990). Les causes poden ser d'origen genètic o factors adquirits, com per exemple l'obesitat, sent aquesta una de les causes més prevalents. En els individus que presenten resistència a la insulina hi podem trobar, entre d'altres, defectes en el receptor d'insulina, en l'oxidació de glucosa, en la síntesi de glicogen, en la via de transducció de senyal de l'IR, en el transport i fosforilació del seu receptor. Aquestes anormalitats donaran lloc a una disminució de la resposta a la insulina o a una menor sensibilitat dels receptors a la seva acció i, per tant, parlarem de resistència a la insulina.

1.4.1 CONSEQÜÈNCIES METABÒLIQUES I CLÍNiques DE LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA

La combinació de la resistència a la insulina i d'un estat d'hiperinsulinèmia incapaç de contrarestar-ho, pot desencadenar una sèrie d'alteracions metabòliques que comprenen, entre d'altres, una disminució del metabolisme oxidatiu de la glucosa a nivell hepàtic, un augment dels àcids grassos no esterificats i una major oxidació d'aquests, afavorint la producció hepàtica de glucosa (Taula 1). Alhora, aquestes alteracions poden desembocar en manifestacions clíniques, com ara l'augment del risc de malalties cardiovasculars, l'aparició

de diabetis de tipus 2, la síndrome d'ovaris poliquístics, alguns tipus de càncer, esteatosi hepàtica, retinopaties i nefropaties (Reaven, 2005).

Defectes en la utilització i emmagatzematge de la glucosa estimulada per la insulina apareixen com la primera característica detectable en els estadis inicials de la resistència a la insulina. La insulina, juntament amb el glucagó, manté l'equilibri entre la utilització i la producció de glucosa. Aquest balanç és d'extrema importància, donat que és necessària una contínua aportació de glucosa per al correcte funcionament dels diferents òrgans. Així, una situació d'hipoglucèmia pot conduir a mort cel·lular mentre que una situació d'hiperglucèmia, també pot generar danys tissulars. Per això, els nivells de glucosa en plasma es mantenen en un rang de 5 mM, que és considerada la concentració fisiològica normal. L'homeòstasi glucídica és regulada primàriament pel fetge i pel teixit muscular esquelètic. Després d'un àpat, el múscul s'encarrega de captar fins a un 80% de la glucosa circulant (DeFronzo *et al.*, 1981), mentre que durant períodes de dejuni és el fetge qui, produint glucosa, s'encarrega de que les concentracions de glucosa en sang no baixin en cap moment del rang fisiològic normal. La musculatura esquelètica és aproximadament el 55% de tota la massa corporal en individus no obesos, i donada la seva funció generant força motriu i calor, és el major teixit influenciat per l'acció global de la insulina en la regulació del metabolisme glucídic i lipídic. Així, el teixit muscular és clau per a la correcta acció de la insulina. Malgrat dècades d'estudi, encara se sap relativament poc al voltant de què determina la generació de resistència a la insulina al múscul, però es coneix que no es deu a una disminució en el contingut de transportadors de glucosa GLUT4, sinó a una incapacitat de translocar-los a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina perquè hi exerceixin la seva funció. El que sí se sap és que un defecte en la capacitat oxidativa muscular, combinat amb un excés lipídic, pot contribuir a l'acumulació intramuscular de greixos, que avui en dia és el millor marcador associat a resistència a la insulina en el múscul.

Per a fer una descripció de quines conseqüències deriven d'una resistència a la insulina sostinguda en el temps, s'ha de fer referència a les funcions que aquesta hormona exerceix en l'organisme. Tenint en compte que la insulina estimula la captació de glucosa al múscul o inhibeix l'alliberació d'àcids grassos del teixit adipós, durant la resistència a la insulina ens trobarem en una situació en la que es veurà augmentada la glucèmia i la concentració d'àcids grassos circulants. Això, acompanyat d'un possible estat d'hiperinsulinèmia, farà que el fetge hagi de fer front a una major disponibilitat d'energia i donarà lloc a una sobreproducció de VLDL, a una disminució de les HDL, i a la formació de LDL més denses; per tant, hi haurà una tendència a augmentar el contingut de lípids al fetge, incrementant el risc de desenvolupar esteatosi hepàtica (Reaven, 2005).

D'altra banda, degut a aquestes alteracions, es presenten anormalitats en el flux sanguini i en la permeabilitat vascular. La resistència a la insulina fa que disminueixi l'activitat de vasodilatadors com l'òxid nítric i augmenti la activitat de vasoconstrictors com

l'angiotensina II i l'endotelina-1, i potencia la formació de factors permeabilitzadors com el VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Brownlee, 2001). Tots aquests canvis poden acabar generant hipertensió, edemes, isquèmia i hipòxia induïda per una neovascularització en la retina, glomeruloesclerosi en el ronyó, o degeneració axonal de nervis perifèrics (Ginsberg, 2000). La patogènia de l'aterosclerosi en individus no diabètics ha estat extensament descrita, i té els seus inicis en una disfunció endotelial (Lusis, 2000). En les artèries de pacients diabètics, la disfunció endotelial sembla estar relacionada amb la resistència a la insulina (Hsueh i Law, 1998; Jiang *et al.*, 1999) i la hiperglucèmia, ja que aquesta és capaç d'inhibir la producció d'òxid nítric en les cèl·lules endotelials (Hsueh i Law, 1998).

S'ha descrit que individus amb resistència a la insulina tenen augmentats alguns factors de coagulació, com el fibrinogen, el factor VII i el PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*). La causa de l'augment de fibrinogen no és clara, però sembla estar relacionada amb l'obesitat. L'augment del factor VII es relaciona amb l'hiperlipidèmia (Miller, 1995). En el cas del PAI-1, s'ha observat que tant els hepatòcits com les cèl·lules endotelials responen a una situació d'hiperinsulinèmia augmentant la secreció de PAI-1. Altres estudis han demostrat que la incubació de cèl·lules endotelials amb VLDL augmenten la producció de PAI-1 mediat per la via de les MAPK (Eriksson *et al.*, 1998).

A nivell de ronyó podríem donar un altre exemple d'aquesta relació entre la resistència a la insulina, la hiperinsulinèmia i l'aparició de manifestacions clíniques, ja que en aquest òrgan s'hi dona una retenció de sodi i una disminució en l'eliminació d'àcid úric, contribuint a l'aparició d'hipertensió i a un augment d'àcid úric en sang (Nordestgaard *et al.*, 1997).

Un darrer exemple és l'acció que exerceix l'excés d'insulina en els ovaris, augmentant la producció de testosterona i facilitant l'aparició d'ovaris poliquístics (Dunaif *et al.*, 1989).

Per tant, la hiperinsulinèmia que té com a objectiu contrarestar la defectuosa acció de la insulina pot ser, alhora, responsable d'algunes de les complicacions clíniques que poden presentar els pacients amb DMT2.

Alteracions en el metabolisme glucídic:

- Hiperglucèmia
- Augment de la gluconeogènesi hepàtica
- Intolerància a la glucosa (disminució de la captació, emmagatzematge i utilització de glucosa)
- Formació d'hemoglobina glicosilada (HbA_{1C})

Alteracions en el metabolisme lipídic:

- Augment de la lipòlisi
- Augment de l'oxidació d'AG
- Augment d'AG circulants
- Augment de LDL (menys diàmetre però més denses)
- Augment de TG
- Disminució de HDL-C

Disfunció endotelial:

- Augmenta l'adhesió de cèl·lules mononucleades
- Augmenta la concentració plasmàtica de dimetilarginines asimètriques
- Disminueix la vasodilatació depenent de l'endoteli

Factors procoagulants:

- Augment de PAI-1
- Augment del Fibrinogen

Canvis hemodinàmics:

- Augmenta l'activitat del sistema nerviós simpàtic
- Augmenta la retenció renal de sodi

Marcadors d'inflamació:

- Augmenta la proteïna C reactiva
- Augmenta el nombre de leucòcits

Alteracions en el metabolisme de l'àcid úric:

- Augmenta la concentració d'àcid úric en plasma
- Disminueix l'eliminació renal d'àcid úric

Alteracions als ovaris:

- Augmenta la producció de testosterona

Desordres respiratoris durant el son:

- Síndrome de l'apnea

Taula 1. Esquema de les alteracions associades a la resistència a la insulina i a la hiperinsulinèmia (Reaven, 2005).

1.4.2 PAPER DEL TEIXIT ADIPÓS EN LA RESISTÈNCIA A LA INSULINA

Com ja s'ha esmentat anteriorment, l'obesitat és un dels factors de risc davant l'aparició de DMT2 facilitant el desenvolupament de resistència a la insulina.

Un individu amb certa predisposició genètica i exposat a un estil de vida que ho afavoreixi, tendirà a guanyar pes i adipositat. El teixit adipós, més enllà de ser un teixit inert que acumula triglicèrids (TG), és un teixit endocrí, el correcte funcionament del qual depèn de l'equilibri metabòlic de tot l'organisme. Quan un individu té un balanç energètic positiu sostingut en el temps, aquest excedent calòric s'emmagatzema inicialment com a TG en el teixit adipós. Els adipòcits, més que dividir-se, emmagatzemen més TG per cèl·lula, fet que genera adipòcits de mida més gran (Kersten, 2001). La hipertròfia del teixit adipós fa que els adipòcits tinguin característiques funcionals particulars. Així, presenten una menor concentració de receptors per a la insulina i, per tant, una menor sensibilitat a l'hormona (Hotamisligil, 2003). En aquest teixit, una de les accions de la insulina és la d'inhibir la lipasa, i una davallada de l'activitat d'aquest enzim augmentarà la producció d'AG, que posteriorment s'alliberaran a la circulació (Kersten, 2001). Alhora el teixit adipós també canvia el seu patró de secreció endocrina, produint una major quantitat de leptina i de TNF- α , i una menor quantitat d'adiponectina (Hotamisligil, 2000; Fusshaue *et al.*, 2003).

1.4.2.1 LEPTINA

La leptina és una hormona peptídica estructuralment similar a les citoquines i que es produeix en proporció a la massa de teixit adipós, sent aquesta secreció major al teixit subcutani que en el visceral (Wada *et al.*, 2001). A l'hipotàlem hi ha receptors per aquesta hormona encarregats de regular la gana (senyal de sacietat) i la despesa energètica, però també hi trobem aquests receptors al múscul i a les cèl·lules β del pàncrees (Wada *et al.*, 2001). En aquestes cèl·lules, la unió de la leptina als seus receptors provoca l'augment de la producció d'un grup de proteïnes anomenades SOCS (*supressors of cytokine signaling*), especialment la SOCS3, la qual s'uneix a IRS-2 provocant la seva ubiquitinització i posterior degradació, quedant-se així la cèl·lula β sense un dels seus factors de supervivència més importants (Yang *et al.*, 2000). Aquest, per tant, és un dels mecanismes pels quals l'adipositat afavoreix el desenvolupament de la diabetis. Així doncs, el principal efecte de la leptina sobre l'acció de la insulina és reduir-la però no generant resistència, sinó afectant la seva producció pancreàtica.

1.4.2.2 TNF- α

El TNF- α és un citoquina proinflamatòria (detallat a l'apartat 2.3.2.5.1) de la que s'ha suggerit que podria tenir un paper important en el desenvolupament de la resistència a la insulina i, de fet, hi ha certes evidències que ho demostren. S'ha vist que la infusió crònica

de TNF- α disminueix l'acció de la insulina en la captació perifèrica de glucosa i en la producció de glucosa hepàtica (Lang *et al.*, 1992). El TNF- α pot induir la disminució del nombre de transportadors de glucosa GLUT4, especialment al teixit adipós i al múscul esquelètic (Stephens *et al.*, 1991). A més, s'ha observat que el TNF- α es sobreexpressa als adipòcits dels animals obesos resistents a la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993). L'administració de TNF- α en humans, indueix un estat hiperglucèmic sense disminuir els nivells d'insulina, el qual confirma la inducció d'un estat de resistència a la hormona (Hofmann *et al.*, 1994). Les accions pleiotròpiques del TNF- α poden contribuir a la resistència a la insulina a través de diferents mecanismes moleculars: mitjançant la disminució de l'expressió dels RNA missatgers del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT4) (Hotamisligil *et al.*, 1993) i mitjançant la mobilització d'àcids grassos (Maasen, 2008); en aquest sentit, s'ha descrit que el TNF- α estimula la lipòlisi i l'alliberament d'àcids grassos dels adipòcits (Hotamisligil, 2003). També és possible que el TNF- α interfereixi directament en la via de senyalització de la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1993). A més, s'ha observat que en un model d'obesitat associat a un estat de DMT2 té lloc una sobreexpressió del TNF- α i dels seus receptors al teixit adipós i al múscul; això podria donar lloc a una producció elevada de TNF- α al teixit adipós, on produiria directament els seus efectes i, a més, el TNF- α circularia sistèmicament fins al múscul, on induiria l'estat de resistència a la insulina (Hofmann *et al.*, 1994; Ruan *et al.*, 2003; Hotamisligil, 2003).

1.4.2.3 ADIPONECTINA

L'adiponectina és una hormona produïda específicament pel teixit adipós i que, a diferència del TNF- α , la major part de la seva producció arriba a la circulació sistèmica (Tsao *et al.*, 2002; Matsuzawa *et al.*, 2004). S'expressa més en teixit subcutani que en visceral i la seva concentració augmenta quan la sensibilitat a la insulina millora. Per tal de que tingui una adequada activitat biològica, l'adiponectina ha d'estar hidroxilada i glicosilada (Chandran *et al.*, 2003; Matsuzawa *et al.*, 2004).

S'han identificat dos receptors diferents per l'adiponectina: l'AdipoR1, que s'expressa majoritàriament en múscul, i l'AdipoR2, que generalment trobem al fetge (Yamauchi *et al.*, 2003a). L'adiponectina es caracteritza per a generar efectes biològics protectors o antiaterogènics (Tsao *et al.*, 2002; Chandran *et al.*, 2003; Diez *et al.*, 2003; Matsuzawa *et al.*, 2004) (Taula 2).

- Reducció de la producció hepàtica de glucosa
- Estimulació de la β -oxidació dels àcids grassos en el fetge
- Inhibició de l'adhesió de monòcits a l'endoteli vascular
- Inhibició de l'expressió dels receptors "scavenger" de les LDL en el macròfags
- Inhibició de la proliferació i migració de cèl·lules musculars llises en la paret arterial
- Increment de la fosforilació del receptor de la insulina i, per tant, està implicada en part, en la resta d'accions insulíniques.

Taula 2. Efectes protectors de l'adiponectina (Chandran *et al.*, 2003)

Per tant, tot allò que provoqui una menor secreció d'adiponectina estarà afavorint l'aparició de la resistència a la insulina. Alguns dels factors que poden determinar la variació en els nivell plasmàtics d'adiponectina es troben enumerats a la taula 3:

<u>ASSOCIAT A NIVELLS ALTS</u>	<u>ASSOCIAT A NIVELLS BAIXOS</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Sexe masculí • Poc pes o normal • Adequada maduració adiposa • Insulinosensibilitat • Tractament amb agonistes de PPAR-γ • Absència de malalties cardiovasculars • Diabetis mellitus de tipus 1 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexe femení • Sobrepès o obesitat • Lipodistròfia • Insulinore resistència • Estímuls inflamatoris • Presència de malalties cardiovasculars • Diabetis mellitus de tipus 2

Taula 3. Factors que determinen la variació dels nivell plasmàtics d'adiponectina.

1.5 SÍNDROME METABÒLICA

S'anomena síndrome metabòlica (SM) a la coexistència de diferents alteracions metabòliques en un mateix individu que augmenten el risc de patir malalties cardiovasculars o diabetis mellitus. Les primeres associacions existents entre diferents situacions clíniques com la diabetis, hipertensió i dislipèmies es van realitzar al voltant dels anys 20, encara que el terme síndrome metabòlica no va ser utilitzat fins els anys 70 per designar factors de risc associats a la diabetis (revisat per Demacker, 2007). Va ser Gerald Reaven al 1988 qui va suggerir que aquests factors havien de coexistir en un mateix individu en la forma d'una síndrome "X" en la que la resistència a la insulina constituïa el mecanisme fisiopatològic bàsic. Al llarg dels anys s'han anat afegint més components a la definició de la síndrome metabòlica.

Al 1998 un grup consultor de la Organització Mundial de la Salut (OMS) va determinar el nom de SM i va proposar un conjunt de criteris unificats: presència de diabetis, intolerància a la glucosa, glucèmia anormal durant el dejuni, resistència a la insulina, més dues de les alteracions següents: pressió arterial elevada, dislipidèmia (augment de TG i disminució de HDL), obesitat central o excreció d'albumina alterada (Demacker, 2007).

En l'actualitat hi ha dues grans definicions proporcionades per la Federació internacional de la diabetis (IDF) i la revisió del *National Cholesterol Education Program* (NCED) (Alberti *et al.*, 2005). Les dues definicions coincideixen en components essencials com són la intolerància a la glucosa, obesitat, hipertensió i dislipidèmia però difereixen en el fet que la primera exclou qualsevol individu sense un increment en el diàmetre de la cintura.

La prevalença de la SM varia en funció de la definició utilitzada per determinar-la, així com l'edat, el sexe, l'origen ètnic i l'estil de vida. Quan s'utilitzen criteris semblants als de l'OMS, la prevalença del SM varia del 1,6 al 15 % depenent de la població estudiada i del rang d'edat (Aschner *et al.*, 2002). La prevalença estimada al EEUU és del 22% i varia del 6,7 % en les edats de 20 a 43,5 anys a 43,5 % en els majors de 60, sense apreciar diferències pel que fa al sexe (Ford *et al.*, 2002). En poblacions d'alt risc, com la de familiars de persones amb diabetis, la prevalença augmenta considerablement fins quasi el 50 %, arribant a més del 80 % en persones diabètiques i al 40 % en persones amb intolerància a la glucosa (Ford *et al.*, 2002).

L'etiologia de la SM es desconeix al ser la seva fisiopatologia extremadament complexa. La majoria dels pacients tenen una edat considerablement avançada, són obesos, sedentaris i tenen cert grau d'intolerància a la insulina. Els factors més importants en la seva aparició són: l'edat, factors genètics i l'estil de vida (poca activitat física i consum excessiu de calories). Actualment, la insulinoresistència es considera com la principal responsable de la major part de les alteracions que pateixen aquests pacients, fonamentalment de la hiperglucèmia, la hipertensió arterial, de l'augment de la producció hepàtica de VLDL i TG, i de l'estimulació de la proliferació endotelial causant de l'inici del procés d'aterosclerosi (Anderson *et al.*, 2001). Així doncs, diverses hipòtesis s'han postular en referència a l'etiologia de la SM. La participació genètica ha estat avalada en diversos estudis epidemiològics (Lusis *et al.*, 2008). Alguns estudis clínics relacionen la SM amb patrons anormals del creixement fetal i neonatal, mentre que la seva base molecular s'ha investigat en assajos sobre les propietats del teixit adipós (Slawik *et al.*, 2007). Una situació inflamatòria lleu també sembla que influeix en totes les alteracions metabòliques presents en els pacients amb aquesta síndrome. Així, un gran nombre de marcadors inflamatoris s'incrementen durant el desenvolupament d'aquesta síndrome, com són la proteïna C reactiva, el fibrinogen, la interleuquina-6 (IL-6) i el TNF- α , entre d'altres (Sutherland *et al.*, 2004). Experiments en ratolins suggereixen que la disminució de l'adiponectina circulant també estaria afavorint l'aparició d'aquesta síndrome (Yamauchi *et al.*, 2003b) ja que entre

les seves accions hi trobem la d'augmentar la sensibilitat a la insulina i inhibir alguns dels passos del procés d'inflamació (Nawrocki *et al.*, 2004). Altres autors donen més importància a l'estrès oxidatiu que té una gran varietat de causes com l'augment de l'àcid úric resultant de dietes riques en fructosa (Nakagawa *et al.*, 2006).

1.6 ESTRATÈGIES I POSSIBLES DIANES TERAPÈUTIQUES PER A LA DIABETES MELLITUS DE TIPUS 2

La majoria de les teràpies actuals per a la DMT2 es van desenvolupar en absència d'una definició clara de dianes moleculars o de la patogènesi d'aquesta malaltia. Inicialment, com a teràpia sempre es recomanava un canvi en l'estil de vida, és a dir, seguir dietes adequades i realitzar alguna activitat física, hàbits que en general promouran una pèrdua de pes, així com una disminució del risc de patir malalties cardiovasculars, hipertensió, dislipèmies, disfunció endotelial, etc.

Nous coneixements dels mecanismes patogènics claus, com la defectuosa estimulació per part de la glucosa de la secreció d'insulina o el paper de la lipotoxicitat com a causa probable de la resistència a la insulina i, per tant, de les alteracions en el metabolisme glucídic que genera en el teixit hepàtic i muscular, han donat lloc a una sèrie de noves dianes farmacològiques.

La DMT2 representa, aproximadament el 90% dels casos de diabetis. S'ha estimat que afecta a un 6% de la població adulta de la societat occidental, i s'espera que aquests valors incrementin un 6% cada any a la població mundial, assolint d'entre 200 i 300 milions de casos al 2010 (Moller, 2001). El principal potenciador d'aquest fet és l'increïble augment en la incidència de l'obesitat, amb un paper protagonista en la patogènesi de la DMT2. S'ha vist amb claredat que un bon control de la hiperglucèmia en aquests pacients, pot atenuar el desenvolupament d'altres complicacions com la retinopatia o la nefropatia. És per aquest motiu que gran part de les teràpies per a la DMT2 es basen en diferents estratègies per a combatre aquesta hiperglucèmia. Aquestes teràpies tenen un efecte i tolerància limitada, ja que moltes d'elles tenen certa tendència a provocar un augment de pes. Altres aproximacions terapèutiques estan enfocades als episodis d'hipoglucèmia. Per aquest motiu, s'ha de centrar l'atenció en la cerca i utilització de mecanismes dependents de les respostes fisiològiques i que alhora provoquin pèrdua de pes o el seu manteniment.

Tant la síndrome metabòlica com la DMT2 estan associades a un notable augment en la incidència de malalties arterioscleròtiques i cardiovasculars, sent aquestes les causants d'un 80% de les morts i més d'un 75% de les hospitalitzacions per complicacions en pacients amb diabetis. De fet, la DMT2 actualment representa una malaltia coronària, tenint aquests pacients aproximadament la mateixa probabilitat de patir un infart cardíac que una persona no diabètica amb una malaltia coronària coneguda (Haffner *et al.*, 1998). Per

tant, seran necessàries teràpies no només amb l'objectiu de disminuir la glucosa en sang, sinó també direccionades cap a la dislipèmia diabètica.

En els darrers anys s'han ampliat els coneixements i comprensió de les vies metabòliques relacionades amb el desenvolupament de la DMT2 així com els defectes en la participació de diversos òrgans i sistemes, obrint-se un ventall de possibles dianes terapèutiques adreçades a reduir l'excessiva producció de glucosa hepàtica o a potenciar la secreció d'insulina estimulada per la glucosa. Per altra banda, també s'han considerat dianes moleculars específiques de la via de senyalització de la insulina i finalment enfocades cap a la obesitat i l'alteració del metabolisme lipídic mitjançant agents que redueixen la gana o augmenten la despesa energètica, pretenent oferir una millora en l'acció (i secreció) de la insulina.

1.6.1 ESTRATÈGIES PER REDUIR LA PRODUCCIÓ HEPÀTICA DE GLUCOSA I LA HIPERGLUCÈMIA

El fetge té un paper fonamental en la regulació de la glucosa d'origen endogen mitjançant la síntesi *de novo* (gluconeogènesi) o el catabolisme del glicogen (glicogenolisi). L'augment de la taxa de producció de la glucosa hepàtica és, en gran mesura, responsable del desenvolupament d'hiperglucèmia, sobretot en dejuni, en pacients amb DMT2 (DeFronzo *et al.*, 1992). Una disminució relativa dels nivells d'insulina o la reducció de la resposta hepàtica a l'hormona pot conduir a un augment de la producció de glucosa en aquest òrgan.

El glucagó és una hormona que contribueix a la hiperglucèmia mitjançant l'estimulació d'ambdós processos (glicogenòlisi i gluconeogènesi) (Shah *et al.*, 2000). Anticossos anti-glucagó (Brand *et al.*, 1994) i antagonistes peptídics del receptor del glucagó (Unson *et al.*, 1987) s'ha vist que són efectius *in vivo*. Més enllà del control del glucagó, els enzims que regulen la velocitat en determinats passos de les dues vies són bones dianes terapèutiques.

S'ha pogut observar l'efectivitat d'una molècula anomenada cloroindol-carboxamida en models de diabetis en rosegadors, que actua inhibint la glicogen fosforilasa hepàtica, un enzim que catalitza l'alliberació de monòmers de glucosa del glicogen emmagatzemat (Treadway *et al.*, 2001), tot i que això representi només una petita fracció de la producció de glucosa hepàtica en la DMT2 (Magnusson *et al.*, 1992). Però alhora s'ha de tenir en compte que aquest inhibidor també pot alterar el catabolisme del glicogen al múscul durant l'exercici.

Altres dianes hepàtiques han estat la fructosa-1,6-bifosfatasa i la glucosa-6-fosfatasa. La inhibició del primer enzim bloquejaria la gluconeogènesi evitant la conversió de fructosa-1,6-bifosfat a fructosa-6-fosfat, mentre que inhibint el segon enzim, s'atenuaria l'últim pas de la producció hepàtica de glucosa comú en ambdues vies (Zhang i Moller *et al.*, 2000).

Tot i que la inhibició de la producció hepàtica de glucosa és de gran interès com a tractament, hi ha determinades complicacions inherents a aquests tipus d'aproximacions terapèutiques, com són la hipoglucèmia, l'acumulació hepàtica de triglicèrids o l'augment plasmàtic de lactat.

Moltes teràpies són eficients disminuint la hiperglucèmia inicial, però no prevenen la progressió de la malaltia; així doncs, en última instància molts pacients requereixen insulina (Horton, 2008). A més de la medicació oral, la insulina és el més potent i versàtil tractament per combatre la hiperglucèmia, però és utilitzada de forma limitada ja que pot provocar hipoglucèmia. S'utilitzen anàlegs de la insulina com la glargina, que és d'acció perllongada i que, un cop és injectada subcutàniament, precipita i es va alliberant a poc a poc a la circulació, o la insulina detemir, que s'uneix a l'albumina i es distribueix lentament pels teixits fet que fa que hi hagi menys probabilitat a presentar hipoglucèmia. També s'utilitza la insulina NHP que, igual que les anteriors, és d'acció perllongada però que al tenir mecanismes d'acció variables dificulta l'obtenció dels objectius a llarg termini (Tibaldi, 2008). El desenvolupament de nous dispositius d'insulina com el llapis, bombes, o en un futur, la insulina inhalada, proporcionen al pacient una opció indolora per millorar la hiperglucèmia crònica. Poc després de l'inici de la teràpia amb insulina, els pacients solen sentir millora en els símptomes principals de la hiperglucèmia. Però a diferència del tractament de la DMT1, en la que el tractament es basa essencialment en l'administració d'insulina, encara no s'ha assolit un consens en relació al règim idoni d'insulina per pacients amb DMT2, i existeixen estudis que recolzen la idea de combinar l'administració d'un tractament basal amb insulina i agents orals (Unger, 2008).

A més de la utilització de la insulina o anàlegs com a tractament, cal fer referència a estudis realitzats en base a la utilització d'una altra hormona amb el mateix objectiu. En aquest cas, s'ha vist que l'ús d'amilina, hormona secretada també a les cèl·lules β pancreàtiques, redueix la secreció de glucagó, inhibeix el buidat gàstric, i en determinats models animals disminueix la ingesta i exerceix un control de la sacietat (Unger, 2008).

Finalment esmentar que una altra estratègia seria reduir l'absorció intestinal de glucosa, i per a dur-ho a terme s'han fet estudis amb inhibidors de la α -glucosidasa (acarbose), que és eficaç però pot provocar alteracions gastrointestinals (Moller, 2001).

1.6.2 ESTRATÈGIES PER AUGMENTAR LA SECRECIÓ D'INSULINA ESTIMULADA PER GLUCOSA

Un component clau de la fisiopatologia de la DMT2 són les alteracions en la capacitat de la glucosa per a induir la secreció d'insulina per les cèl·lules β i, per tant, la incapacitat d'aquestes cèl·lules per a compensar la resistència a la insulina i provocar, en última instància, l'aparició d'hiperglucèmia.

Les sulfonilurees són substàncies que estimulen la secreció de l'hormona des dels illots pancreàtics en absència d'alts nivells de glucosa plasmàtics. Actuen bloquejant canals de potassi en la cèl·lula β , els quals normalment es tanquen per influència de l'ATP. Aquesta acció condueix a un augment de calci lliure intracel·lular, que estimularà la secreció d'insulina a partir dels grànuls d'emmagatzematge (Moller, 2001). A més, les sulfonilurees augmenten els nivells d'insulina portal, inhibeixen la producció de glucosa hepàtica, disminueixen la glucosa en dejuni i disminueixen l'hemoglobina glicosilada (HbA_{1C}), la qual es forma en presència d'alts nivells de glucosa i quan aquesta es fixa a l'hemoglobina; aquesta HbA_{1C} si es manté en el temps pot donar lloc a algunes de les complicacions clíniques anteriorment esmentades (Zacharay *et al.*, 2008). Tot i així, el grup de recerca de DeFronzo (Triplitt *et al.*, 2006) va observar que l' HbA_{1C} tendia a augmentar després del tractament amb sulfonilurees durant 6-12 mesos. Aquests compostos presenten toxicitat general i d'hipoglucèmia sobretot en pacients amb trastorns hepàtics o renals. Els diabètics que presenten un major grau d'hiperglucèmia en dejuni obtenen un major benefici de l'ús de les sulfonilurees. El tractament amb aquests fàrmacs també ha estat relacionat amb el guany de pes i, per tant, no es recomana aquest tractament en pacients obesos (Pi-Sunyer, 2008).

A diferència de les sulfonilurees i de compostos derivats, hi ha altres alternatives terapèutiques que intenten potenciar la secreció d'insulina dependent de la glucosa. En aquest sentit, dues hormones peptídiques com GLP-1 (*glucagon-like-peptide*) i GIP (*intra gastric inhibitory peptide*), a través dels seus receptors presents a les cèl·lules β , potencien la secreció d'insulina estimulada per la glucosa (Drucker, 2001). Assajos clínics han demostrat que l'administració de GLP-1 o anàlegs millora la glucèmia estimulants la secreció d'insulina per la glucosa i la inhibició de la secreció de glucagó. A més, a elevades concentracions el GLP-1 inhibeix el buidat gàstric i augmenta la sacietat, fet que promou la pèrdua de pes (Horton, 2008). D'altra banda, estudis realitzats tant en cultius cel·lulars com en animals experimentals, suggereixen que GLP-1 és capaç de promoure el creixement de nous illots i provocar hiperplàsia de les cèl·lules β (Drucker, 2001). L'administració exògena de GLP-1 o d'agonistes d'aquest, s'ha vist que redueix la ingesta energètica en humans (Drucker, 2001). Encara que tant el GLP-1 com el GIP tenen un gran potencial com a teràpies cròniques per a la diabetis, estan condicionades a una ràpida degradació amino-terminal per l'acció de la DPP-4 (dipeptidilpeptidasa-4), fet que provoca la seva inactivació. Una possible solució per aquest problema ha estat la utilització d'agonistes de GLP-1 modificats (resistents a DPP-4) com la exendin-4, de la qual es van obtenir resultats prometedors després de la seva administració en rates T2D (DMT2 induïda per estreptozotocina) que suggerien que un dels seus òrgans diana era el fetge donat que es van observar augments tant a nivell de mRNA com de proteïna del transportador de glucosa GLUT2 i una normalització dels nivells de glicogen. En rates normals es va veure un

increment de l'expressió de GLUT4 a nivell de múscul (Arnés *et al.*, 2008). En alguns casos va provocar efectes adversos, com nàusees i diarrea (Unger, 2008).

S'ha descrit que l'ús d'inhibidors de DPP-4 (sitagliptin, vildagliptin) augmenta els nivells de GLP-1 circulants en rosegadors i en humans. En el cas dels rosegadors, això es va poder confirmar amb la utilització de ratolins *knock-out* per DPP-4, en els que s'observà l'augment dels nivells de GLP-1 actiu així com un augment de la secreció d'insulina (Marguet *et al.*, 2000).

Tant els anàlegs de GLP-1 com els inhibidors de la DPP-4 disminueixen l'HbA_{1c}, tot i que aquests darrers no sembla que provoquin ni el buidat gàstric ni una reducció del pes (Unger, 2008; Penfornis *et al.*, 2008).

1.6.3 ESTRATÈGIES DIRIGIDES A LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE LA INSULINA

La importància que recau en la resistència a la insulina perifèrica i hepàtica en el desenvolupament de la diabetis és indiscutible. Com van dir Saltiel i Kahn (2001) aquest fenomen es pot deure a múltiples defectes en la via de transducció de senyal a nivell d'activació del receptor d'insulina (IR) o d'activació de la PI3K entre d'altres. Un gran nombre de molècules diana han estat i estan essent estudiades amb l'objectiu de potenciar la transducció de senyal produïda per la insulina.

S'ha vist l'efecte de petites molècules no peptídiques d'origen natural com la DMAQ-B1 (*demethylasterriquinone B-1*) aïllada d'un fong. Aquest compost indueix l'activitat tirosina quinasa del IR incloent la fosforilació dels seus substrats (IRS), l'activació de la PI3K i de l'Akt, i a més és relativament selectiu davant la possible interacció amb receptors de IGF-I. Després de realitzar assajos en dos models de diabetis en ratolins als que se'ls hi va administrar oralment aquest compost, es va observar una disminució en els nivells de glucosa plasmàtica (Salituro *et al.*, 2001).

Una segona estratègia dirigida al IR seria la utilització d'inhibidors d'enzims encarregats de la desactivació del receptor; per això s'han identificat una sèrie de tirosina fosfatases (PTPs) com a possibles dianes terapèutiques (Goldstein *et al.*, 1998). El vanadi, peroxovanadi i els seus derivats no són inhibidors específics de les PTPs; no obstant, s'ha observat que l'administració en humans de vanadil sulfat afavoreix la sensibilitat a la insulina i que, per tant, una o més PTPs podrien ser un dels seus punts d'acció (Cohen *et al.*, 1995). PTP-1B és un enzim intracel·lular específicament relacionat amb un control negatiu de la senyalització de la insulina. Els ratolins que els hi mancava aquest enzim no només continuaven essent sans, sinó que mostraven una millor sensibilitat a la insulina, i sorprenentment també es veia una menor resistència a la insulina induïda per l'obesitat, resultat difícil d'explicar ja que la insulina actua com una de les principals hormones anabolitzants en el teixit adipós (Elchebly *et al.*, 1999).

Un altre dels reguladors negatius de la senyalització de la insulina i que ha estat identificat com una diana terapèutica independent, és la GSK-3, que inhibeix la glicogen sintasa i la posterior acumulació de glicogen al múscul (Weston *et al.*, 2001). Es van obtenir resultats que suggerien que l'ús d'inhibidors selectius que disminuïen l'activitat de la GSK-3 *in vivo* podien augmentar l'acció de la insulina (Ring *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2007). Tot i això, s'ha vist també que aquest enzim té un paper important en la proliferació cel·lular i l'apoptosi a través de la via del Wnt, involucrada en processos de proliferació i diferenciació cel·lular en teixits especialitzats i en l'establiment de regions diferencials dins la cèl·lula (Weston *et al.*, 2001; Meijer *et al.*, 2001).

Shoelson i col·laboradors van identificar un nou grup de dianes moleculars, la protagonista del qual és la I κ B quinasa (IKK) com a mediador de l'increment de proteïnes serina tirosina fosforilades que tenen com a efecte la regulació negativa de la senyalització de la insulina (Yuan *et al.*, 2001). Ho van poder confirmar amb la utilització de salicilat, un compost que pot potenciar l'acció de la insulina mitjançant la seva unió amb IKK, fet que provocava la seva inhibició (Kim *et al.*, 2001). S'ha vist que el TNF- α , un potencial mediador de la resistència a la insulina associada a la obesitat (Moller, 2000), pot activar el complex IKK, fet que suggereix un paper important d'aquesta quinasa en l'aparició de la resistència a la insulina mediada per TNF- α (Shulman, 2000).

La PKC θ també seria una diana terapèutica a considerar, ja que s'ha vist que la seva activitat augmenta en el múscul dins el context d'una resistència a la insulina induïda per lipotoxicitat (Kim *et al.*, 2004).

1.6.4 ESTRATÈGIES DIRIGIDES A L'OBESITAT, AL METABOLISME LIPÍDIC I LA LIPOTOXICITAT

Tenint en compte el paper fonamental de l'obesitat en el desenvolupament de la resistència a la insulina i d'altres característiques de la síndrome metabòlica, els èxits obtinguts en quan a l'atenuació de la gana o millora de la despesa energètica són beneficiosos en la prevenció i el tractament de la DMT2. Un ampli ventall d'objectius farmacològics per a l'obesitat estan essent estudiats (Spiegelman *et al.*, 2001). Una de les estratègies és modular els sistemes neuroendocrins que controlen el metabolisme energètic, així com la via de la melanocortina, que podria tenir efectes beneficiosos selectius sobre metabolisme perifèric (acció de la insulina al fetge) (Obici *et al.*, 2001). L'ús d'agonistes del receptor de la melanocortina-4 (MRC-4) ofereix bones perspectives terapèutiques, ja que s'ha vist que un augment de l'expressió d'un antagonista natural de MRC-4 (*Agouti*) o els *knock-out* per la mateixa molècula, presenten un fenotip amb múltiples característiques de la síndrome metabòlica (Huszar *et al.*, 1997).

Una altra línia de recerca va dirigida a disminuir la gana a través de la inhibició central de l'àcid gras sintasa (Loftus *et al.*, 2001). Diferents anomalies del metabolisme lipídic són cada vegada més conegudes com a components de la patogènesi de la SM i la DMT2. La ingesta de greixos i l'augment d'àcids grassos circulants són suficients per induir resistència perifèrica i hepàtica a la insulina (Ruderman *et al.*, 1999). L'acumulació de lípids al múscul i, específicament, àcids grassos de cadena llarga que contenen acil CoA, han estat relacionats amb l'aparició de la resistència. A més, s'ha descrit que l'acumulació de lípids dins els illots pancreàtics perjudica la secreció de l'hormona (Unger, 1995). Una molècula que juga un paper important en l'acumulació de lípids al fetge en situació d'hiperinsulinèmia és el factor de transcripció SREBP-1, el qual estimula l'activitat de l'àcid gras sintasa (Shimomura *et al.*, 2000). Totes aquestes observacions, confirmen la hipòtesi de l'existència d'una lipotoxicitat que trobem en la SM i la DMT2 causada per l'acumulació de triglicèrids i AG de cadena llarga en el fetge i múscul (conduint a una reducció del metabolisme mediat per la insulina), i al pàncrees (donant lloc a defectes en la secreció de la insulina).

Diverses dianes terapèutiques han estat estudiades per a prevenir o revertir la lipotoxicitat relacionada amb l'obesitat. Entre aquestes hi tenim l'AMPK (quinasa activada per AMP) i la acetil CoA carboxilasa (ACC), enzim que catalitza la formació de Malonil-CoA, potent inhibidor de l'oxidació d'àcids grassos i de l'inici de la lipogènesi. L'AMPK és activada com a resposta a una davallada de la càrrega energètica cel·lular, i l'ACC és inactivada després de ser fosforilada per l'AMPK. Per tant, l'activació de l'AMPK i la posterior inhibició d'ACC donarà com a resultat una reducció de la síntesi lipídica i un augment de l'oxidació d'AG. L'activació d'AMPK també provoca una reducció de SREBP-1, reprimint l'expressió de gens lipogènics (Winder i Hardie, 1999; Zhou *et al.*, 2001). A més, l'AMPK també està implicada en el mecanisme de captació de glucosa en el múscul mediat per l'exercici (Mu *et al.*, 2001). S'ha vist que l'activació al·lostèrica de l'AMPK amb un anàleg de l'adenosina, l'AICAR (*5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-beta-D-ribofuranòsid*), produeix efectes metabòlics beneficiosos, incloent la inhibició de l'alliberació hepàtica de glucosa i incrementant la captació de glucosa al múscul (Winder i Hardie, 1999; Cuthbertson *et al.*, 2007). Altres resultats mostren que la metformina sembla actuar per la via de l'AMPK (Zhou *et al.*, 2001). Aquest compost disminueix la gluconeogènesi hepàtica i l'esteatosi, i s'ha observat que augmenta lleugerament la captació de glucosa al múscul (millora la sensibilitat a la insulina). Altres estudis van mostrar que era capaç de reduir en un 29% el risc de patir malalties microvasculars. També indueix una disminució de l'HbA_{1c} però aquest efecte no és continuat, i no estabilitza la funció de les cèl·lules β (Zhou *et al.*, 2001; Bloomgarden, 2008).

1.6.5 ESTRATÈGIES DIRIGIDES ALS PPARs

Els PPARs són els factors de transcripció de més importància en el control del metabolisme de la glucosa i dels lípids. Els seus lligands naturals són els àcids grassos i derivats lipídics, permetent l'adaptació a l'ambient nutricional que preval en cada moment (Ferre, 2004). PPAR α està present a fetge, cor i en menys quantitat al múscul esquelètic; quan s'activa, promou l'oxidació dels àcids grassos, la síntesi de cossos cetònics, i el consum de glucosa. PPAR γ s'expressa en teixit adipós, intestí gruixut, múscul esquelètic i cèl·lules del sistema immunitari; la seva activació indueix la diferenciació de preadipòcits a adipòcits, estimula l'emmagatzematge de triglicèrids, i juga un paper important en la sensibilització a la insulina. PPAR δ té un patró d'expressió més ampli en individus adults i també s'expressa durant l'embriogènesi en estadis molt primerencs (Grimaldi, 2005). Aquests últims anys s'ha demostrat que el tractament amb agonistes de PPAR δ normalitza els lípids circulants i també redueix la resistència a la insulina i l'adipositat en rosegadors i primats. La utilització de models animals i cel·lulars revela que aquest receptor nuclear juga un paper important en el control central del consum dels àcids grassos en teixit adipós i múscul esquelètic.

Degut a la seva funció el PPAR γ és una de les dianes més estudiades per tal de potenciar, amb la utilització d'agonistes, la sensibilitat a la insulina. En aquest cas, s'han realitzat molts estudis amb uns compostos anomenats tiazolidinediones (TZDs), inhibidors de PPAR γ . Entre els seus efectes més destacats hi trobem la seva capacitat per inhibir la lipòlisi i disminuir els TG com el cas de la pioglitazona, alhora tenen la capacitat de disminuir les citoquines inflamatòries (augmentades en el context de la diabetis) i de potenciar l'acció perifèrica de la insulina (Bloomgarden, 2008). L'administració de TZDs també té conseqüències no tant satisfactòries, ja que la retenció d'AG al múscul, TAB i fetge presenta efectes adversos, així com el fet de que algunes d'elles com la rosiglitazona, provoquen un augment de les LDL i fins i tot dels TG, per la qual cosa tendeixen a facilitar el guany de pes corporal i que no es puguin administrar a persones amb problemes cardiovasculars.

1.6.6 ALTRES ESTRATÈGIES

Degut a les mancances i propietats de cada un dels fàrmacs amb els quals es tracten els pacients amb DMT2, molts estudis realitzats actualment estan enfocats a la combinació terapèutica de diversos agents per a obtenir uns beneficis majors. Per exemple, s'ha vist que l'efecte dels inhibidors de la DPP-4 es potencien amb l'administració de metformina (Ahrén, 2008); alhora hi ha estudis en els que la combinació d'una TZD amb metformina i agonistes de GLP-1 proporcionen millores clares en els pacients (Zacharay, 2008; Penfornis, 2008). Contràriament, s'ha observat que la combinació d'insulina amb TZD augmenta el risc d'edemes i problemes cardiovasculars (Tibaldi, 2000).

2. LA CAQUÈXIA ASSOCIADA AL CÀNCER

La caquèxia és una síndrome multifactorial, que apareix freqüentment associada a processos neoplàsics, essent els més comuns el càncer de pàncrees, el d'estómac i el de pulmó. Aquesta síndrome està caracteritzada principalment per una important i progressiva pèrdua de pes corporal, una reducció de la ingesta d'aliments i una inflamació sistèmica (Fearon *et al.*, 2006). La pèrdua de pes corporal de l'hoste és deguda a la desaparició dels dipòsits de greix i a la disminució de la massa muscular, i apareix sovint acompanyada de nàusees, anèmia, astènia, debilitat, alteració de l'homeòstasi hormonal i immunodepressió (Argilés *et al.*, 1997).

Aquesta síndrome no només està associada al càncer, sinó que és una resposta comuna de l'organisme davant d'estímuls exògens agressius com ara la infecció, el trauma i la immunodeficiència (Pomposelli *et al.*, 1988). En aquests casos, l'eliminació de l'agent causant pot ser suficient per a la recuperació del pacient.

Una pèrdua de pes superior al 30% es considera irreversible, i per això s'han dedicat molts esforços en l'estudi de l'etiopatogènia de la caquèxia (Argilés *et al.*, 2007a). A més, aquesta síndrome fa que els pacients que la presenten manifestin una resposta pitjor a la quimioteràpia i a la cirurgia (Argilés *et al.*, 2007a). De fet, la caquèxia és una de les principals causes de la mort dels pacients amb càncer, manifestant del 16 al 73% d'aquests pacients, símptomes de la caquèxia (Argilés *et al.*, 2007a). Així doncs, el grau de caquèxia està inversament correlacionat amb el temps de supervivència del pacient, i sempre implica un pronòstic desfavorable.

L'etiopatogènia de la caquèxia cancerosa és 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'etiologia d'aquesta síndrome. Malgrat la complexitat de la caquèxia, es poden diferenciar dos components bàsics entre les causes que condueixen a l'estat caquètic: la disminució de la ingesta experimentada pel pacient amb càncer i les alteracions de caràcter bioquímic i fisiològic que pateix com a conseqüència de la presència del tumor. La disminució de la ingesta s'ha descrit, en alguns casos, com una conseqüència de l'obstrucció mecànica del tracte gastrointestinal i en altres casos, com a conseqüència de l'anorèxia produïda per la presència i creixement del tumor, provocant sempre un estat de malnutrició (Blitzer *et al.*, 1961). A més, la competència pels nutrients entre el tumor i l'hoste provoca un estat d'inanició accelerat que comporta greus perturbacions metabòliques en el pacient (Argilés *et al.*, 1992). Aquestes alteracions són considerades com la causa de la depleció de les reserves de greix i del teixit muscular, i les podem classificar com a alteracions produïdes per factors tumorals (provinents del tumor directament) i alteracions produïdes per factors humerals (provinents del propi hoste en resposta al tumor,

principalment les citoquines). En tot cas, però, aquests canvis fisiològics només expliquen una part de la síndrome de la caquèxia (Murialdo *et al.*, 1991). De fet, les alteracions del metabolisme intermediari de l'hoste associades a la caquèxia s'assemblen més a la resposta que té lloc durant una situació d'inflamació o de lesions traumàtiques (on es produeix una pèrdua important del nitrogen corporal) que a la fisiologia d'adaptació al dejuni.

2.1 MALNUTRICIÓ

La malnutrició és un quadre clínic caracteritzat per una alteració en la composició de l'organisme, ocasionat per un desequilibri sostingut entre la ingesta de nutrients i les necessitats nutricionals bàsiques. Quan aquest balanç és negatiu, es denomina desnutrició (Argilés i Novartis Consumer Health S.A., 2005). La desnutrició és comuna en pacients amb caquèxia associada a càncer, i és provocada per l'anorèxia i la disminució de la ingesta de nutrients (Baracos, 2006).

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

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

En general, durant la caquèxia té lloc una disminució de la ingestió de nutrients, causada en part per la mateixa teràpia, els efectes locals del tumor, i la incapacitat d'una alimentació adequada (Norton *et al.*, 1987). Si la malnutrició fos la principal causa de la

caquèxia cancerosa, l'aportació de nutrients exògens a través d'una alimentació forçada (enteral o parenteral) disminuiria els símptomes de la caquèxia, i milloraria la supervivència i la resposta a la teràpia. Malauradament, això no passa en la caquèxia cancerosa (Brennan, 1981). De fet, el tumor, fins i tot pot utilitzar la nutrició parenteral en benefici propi com una font suplementària de nutrients. Així, s'ha observat que les cèl·lules tumorals poden actuar com a trampes de nitrogen, i d'aquesta manera continuar creixent (Mider, 1951). De fet, un estudi dut a terme en rates portadores de tumor que havien estat sotmeses a una dieta pobra en proteïnes, demostrà que aquests animals presentaven una supervivència superior si es comparen amb les rates portadores de tumor alimentades amb una dieta equilibrada. S'ha comprovat que la substitució dels carbohidrats per lípids com a font energètica provoca menys estimulació del creixement tumoral i una recuperació adequada de l'hoste, gràcies a la baixa capacitat del tumor per utilitzar greixos (Kurzer i Meguid, 1986).

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

2.1.1 ALTERACIONS DE L'APARELL DIGESTIU I MALABSORCIÓ

Les alteracions de l'aparell digestiu es poden deure directament al tumor si aquest està localitzat en algun lloc del tracte gastrointestinal i interfereix mecànicament en la digestió, o si es troba en òrgans importants per a la digestió com en el cas del tumor pancreàtic o quan es localitza en la via biliopancreàtica. La malabsorció que això suposa contribueix notablement a l'empitjorament de l'individu. L'alteració pot ser també d'origen iatrogènic després d'un tractament quirúrgic, per radiacions o amb fàrmacs antineoplàsics. 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 (el factor de necrosi tumoral α (TNF- α) o la interleuquina 1(IL-1)) s'observa una disminució de l'absorció de lípids i aminoàcids (Argilés i López-Soriano 1989; Argilés *et al.*, 1998a). En casos de forta pèrdua de pes com en estadis avançats de càncer, poden donar-se pèrdues d'enzims digestius, repercutint així en l'absorció de determinats nutrients (Argilés i Novartis Consumer Health S.A., 2005).

2.1.2 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 (Morrison, 1984). S'associa freqüentment amb la caquèxia, però és difícil saber si n'és la causa o l'efecte. L'anorèxia, tot i que no és totalment la responsable del desgast tissular que pateixen els pacients neoplàstics, és un factor important que hi contribueix. De fet, l'anorèxia sembla que és més una conseqüència que

una causa de la caquèxia, ja que pot manifestar-se quan la pèrdua de pes ja ha aparegut, i s'estableix llavors un cicle de retroalimentació positiva entre el debilitament i la manca de gana (Padilla, 1986). De fet, es pot afirmar que la caquèxia es perpetua i s'empitjora a si mateixa a través d'un tipus de mecanisme de retroalimentació positiva que involucra l'anorèxia i que freqüentment condueix a la mort (Argilés *et al.*, 2001).

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

2.1.2.1 MECANISMES D'INDUCCIÓ DE L'ANORÈXIA

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

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

2.1.2.2 MEDIADORS DE L'ANORÈXIA

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

S'han proposat diversos mediadors que regulen la ingesta a diferents nivells, la producció o actuació dels quals està alterada en la síndrome de la caquèxia, alguns dels

quals són citoquines, neuropèptids (la serotonina, el neuropèptid Y i el factor alliberador de corticotropina) i hormones peptídiques (la insulina i el glucagó).

2.2 ALTERACIONS METABÒLIQUES

A més de la presència de l'anorèxia, una de les principals característiques de la caquèxia cancerosa és l'estat catabòlic que pateix l'hoste, particularment al múscul esquelètic i al teixit adipós. 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. A més, tot i que l'anorèxia és un component gairebé universal de la caquèxia, no explica totalment el desgast que presenten els pacients, ja que els patrons de pèrdua de pes i canvi de composició corporal difereixen dels de la inanició, i els seus efectes catabòlics no es poden contrarestar mitjançant l'administració extra de calories.

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

2.2.1 METABOLISME ENERGÈTIC

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

proporciona aminoàcids que entren en la via gluconeogènica o bé són oxidats directament per produir energia.

Els mecanismes bioquímics que expliquen l'augment de la despesa energètica són tots aquells que comporten ineficiència energètica. Aquests mecanismes bioquímics es poden classificar en quatre tipus principalment: l'activació de vies metabòliques de reciclatge amb un alt consum energètic, les alteracions de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de la membrana plasmàtica, l'acció de les proteïnes desacobladores, i finalment altres com serien la febre i els nivells elevats de catecolamines (Argilés i Novartis Consumer Health S.A., 2005).

2.2.2 METABOLISME GLUCÍDIC

Els nivells plasmàtics de glucosa, tant en pacients neoplàstics com en animals experimentals portadors de tumor, poden presentar una àmplia variabilitat en relació amb el tipus de tumor i el seu grau de desenvolupament. Tot i aquesta àmplia variabilitat en relació al metabolisme glucídic, es pot generalitzar pel que fa a situacions de caquèxia associada a càncer, en les que 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 (Argilés i Novartis Consumer Health S.A., 2005).

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 (Taula 4) (Shaw i Wolfe, 1986). 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 (Taula 4). A més, l'alliberació perifèrica de lactat (glucòlisi del tumor), aminoàcids (proteòlisi muscular) i glicerol (lipòlisi) augmenta la disponibilitat dels precursors gluconeogènics, els quals poden tenir també un paper en la regulació d'aquesta via.

Freqüentment, el pacient neoplàstic presenta una intolerància a la glucosa (Taula 4) (Norton *et al.*, 1985), que s'observa prèviament a l'aparició de la caquèxia, i la magnitud d'aquesta intolerància es correlaciona amb el desenvolupament tumoral. Aquesta incapacitat d'utilitzar la glucosa exògena pot relacionar-se amb la resistència a la insulina dels teixits (Taula 4) (Jasani *et al.*, 1978).

A més 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. Sembla que aquest alt transport de glucosa no és dependent d'insulina, ja que sovint s'observen estats d'hipoglucèmia en aquests pacients, paral·lelament a nivells d'insulina normals o fins i tot baixos (Jasani *et al.*, 1978).

2.2.3 METABOLISME LIPÍDIC

El metabolisme lipídic també està alterat: s'observa una clara hiperlipèmia i una reducció de les reserves de greix, principalment del teixit adipós (Taula 4) (Kralovic *et al.*, 1977). L'atròfia del teixit adipós, juntament amb la mobilització de lípids que té lloc a l'hoste durant el procés invasiu, contribueix notablement a la pèrdua de pes corporal dels individus caquètics. Tanmateix, i a diferència del que passa en el dejuni, la supervivència dels individus portadors de tumor està generalment poc correlacionada amb les reserves lipídiques (Morrison, 1989). La mobilització de les reserves lipídiques sembla que està relacionada amb la massa tumoral, i té lloc en les primeres etapes de la malaltia, quan la mida del tumor encara és petita. De fet, la caquèxia associada a càncer provoca quatre alteracions principals en el metabolisme lipídic (Taula 4). En primer lloc, es dona una activació lipolítica i una inactivació de la captació de lípids circulants a nivell del TAB (disminució de l'activitat de la LPL). En segon lloc, s'observa una lipogènesi alterada, que afecta tant al TAB (on es veu disminuïda), com al fetge (on es veu augmentada). En tercer lloc, i causada per les alteracions anteriors, una hiperlipèmia, deguda a una hipertrigliceridèmia (degut a la inhibició de la LPL), a una hiperacidèmia (degut a l'augment d'àcids grassos circulants) i a una hipercolesterolèmia (degut a l'excés de síntesi de colesterol a la massa muscular) (Argilés i Novartis Consumer Health S.A., 2005). En quart i últim lloc, trobem un augment de la termogènesi en teixit adipós marró (TAM) i també en múscul (Oudart *et al.*, 1995).

2.2.4 METABOLISME PROTEIC

Una de les característiques principals de la caquèxia associada a càncer és l'astènia. Aquest símptoma està directament relacionat amb la pèrdua de massa muscular observada en els estats caquètics. Durant el dejuni, les proteïnes musculars són degradades per obtenir aminoàcids que posteriorment són utilitzats per la gluconeogènesi; tot i així, quan aquest període s'allarga, la degradació proteica disminueix per conservar el contingut de nitrogen i mantenir la massa magra corporal. Aquesta capacitat, que és essencial per conservar el nitrogen quan la ingesta és reduïda, sembla que és absent durant l'estat de caquèxia associada al càncer, conduint l'hoste a una depleció del contingut de proteïna greu.

El múscul esquelètic, que representa gairebé la meitat del contingut proteic de tot el cos, es troba, com ja s'ha indicat prèviament, greument afectat per aquesta síndrome. A part, si és té en compte que la caquèxia tendeix a desenvolupar-se en estadis avançats de creixement neoplàsic, la prevenció de la pèrdua de múscul en pacients amb càncer és de gran interès clínic (Argilés *et al.*, 2007a). Es coneix que durant la caquèxia associada a malalties neoplàsiques, els músculs que es troben més afectats són els de fibra blanca,

també anomenats de contracció ràpida o glucolítics, i en canvi els de fibra vermella de contracció lenta o oxidatius, no es troben tan afectats. Hi ha casos en que la pèrdua de massa muscular associada a altres malalties varien pel que fa a la taxa i al tipus de múscul afectat.

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. Els músculs creixen (hipertròfia) quan la síntesi proteica excedeix a la degradació. D'altra banda, els músculs minven (atròfia) quan predomina la degradació. No està totalment clar a què és deguda la pèrdua de massa proteica associada a caquèxia cancerosa, si és deguda a canvis en la taxa de síntesi o bé de degradació, o bé deguda a canvis en totes dues taxes. S'ha suggerit que la massa muscular disminueix durant la caquèxia cancerosa degut a una baixa taxa de síntesi (Dworzak *et al.*, 1998). Al contrari d'aquests resultats, d'altres autors asseguren, mitjançant un marcador de degradació de proteïna miofibril·lar, que aquesta està molt augmentada (Mitch i Goldberg, 1996). Resultats del nostre grup demostren que la síntesi proteica, en els nostres models tumorals experimentals, està poc alterada en múscul esquelètic, però que hi ha un augment molt gran de degradació, totes dues mesurades en estudis *in vivo* i *in vitro* (Carbó *et al.*, 1994; Costelli *et al.*, 1993; Llovera *et al.*, 1995).

A més d'una pèrdua massiva de proteïna del múscul, la caquèxia associada al càncer provoca una disminució del contingut de DNA en aquest teixit, conduint a l'apoptosi (Van Royen *et al.*, 2000). Sembla doncs, que la degradació de proteïna i l'apoptosi són dos fenòmens metabòlics molt importants al múscul esquelètic d'un individu portador d'un tumor caquètic i que, per tant, estudis terapèutics centrats en aquestes dianes serien de gran utilitat.

A diferència del que passa al múscul esquelètic, molts autors descriuen una síntesi proteica hepàtica augmentada en els animals portadors de tumor (Taula 4) (Tessitore *et al.*, 1987), de manera similar al que passa en situacions de sèpsia o trauma (Fischer i Hasselgren, 1991). A més, en pacients amb càncer s'ha observat un augment de la producció de proteïnes de fase aguda, com l' α -glucoproteïna àcida, l' α -antitripsina, les proteïnes C-reactives i les haptoglobulines (Levin i Gevers, 1981), que s'han utilitzat com a marcadors de la progressió tumoral en una gran varietat de tumors humans. La captació excessiva de certs aminoàcids per les cèl·lules tumorals pot causar una disminució de la disponibilitat d'aquests compostos per part dels teixits de l'hoste, en particular del múscul esquelètic (Taula 4), fet que contribuiria al balanç nitrogenat negatiu observat en pacients neoplàstics (Argilés *et al.*, 1992). Aquest balanç nitrogenat negatiu comporta una alliberació massiva d'aminoàcids, especialment en forma d'alanina i glutamina (Argilés i Azcon-Bieto, 1988), que en part són captats pel fetge per ser utilitzats per la via gluconeogènica

(Waterhouse *et al.*, 1979) i per la síntesi de proteïnes de fase aguda (Tisdale *et al.*, 2002), de manera que s'estableix un flux important d'aminoàcids del múscul cap al fetge (Fischer i Hasselgren, 1991).

METABOLISME GLUCÍDIC	<ul style="list-style-type: none"> Gluconeogènesi hepàtica incrementada Activitat del cicle de Cori incrementada Intolerància a la glucosa Disminució de la captació de glucosa al múscul esquelètic
METABOLISME LIPÍDIC	<ul style="list-style-type: none"> Hiperlipèmia Disminució de les reserves lipídiques Lipòlisi incrementada Disminució de l'activitat de l'LPL (lipoproteïna lipasa) en TAB Augment de la termogènesi en teixit adipós marró (TAM)
METABOLISME PROTEIC	<ul style="list-style-type: none"> Degradació proteica al múscul esquelètic incrementada Taxa de recanvi proteic incrementada Síntesi proteica hepàtica incrementada Disminució de la captació d'aminoàcids al múscul esquelètic Recanvi elevat dels AACR (aminoàcids de cadena ramificada) Canvis en el patró d'aminoàcids circulants
CANVIS HORMONALS	<ul style="list-style-type: none"> Resistència a la insulina Secreció d'insulina normal o disminuïda Augment de les hormones contrareguladores (cortisol, catecolamines)

Taula 4. Principals alteracions metabòliques observades en la síndrome de la caquèxia (Argilés *et al.*, 2007a).

2.3 MEDIADORS DE LA CAQUÈXIA CANCEROSA

Malgrat que la malnutrició i la competència metabòlica que s'estableix entre el tumor i l'hoste estan implicats en el desenvolupament de la caquèxia, s'ha de tenir en compte la participació de determinats factors circulants alliberats pel tumor o generats per la reacció de l'hoste. Alguns dels efectes sistèmics que tenen lloc en els individus amb càncer s'han atribuït a factors lipolítics i proteolítics produïts pel tumor (Beck i Tisdale, 1987). A més, l'estat hormonal de l'hoste pot tenir un paper important, ja que s'han descrit nivells elevats d'hormones catabòliques, nivells baixos d'insulina i resistència a la insulina en teixits perifèrics (Taula 4). En resum, aquests mediadors es poden classificar en dos tipus: per una

banda els factors tumorals produïts per la neoplàsia i per l'altra factors humorals produïts per cèl.lules sanes del pacient en resposta al procés tumoral.

2.3.1 FACTORS TUMORALS

2.3.1.1 FACTORS MOBILITZADORS DE LÍPIDS

S'ha suggerit que part dels efectes observats en animals experimentals portadors de tumor podrien ser el resultat de l'acció directa dels compostos secretats pel mateix tumor. Una part d'aquests compostos van rebre inicialment el nom de factors mobilitzadors de lípids, i la seva concentració al sèrum de pacients amb càncer estaria relacionada amb la magnitud de la pèrdua de pes. Nakahara i Fukuoka (1948), a partir de teixits tumorals, aïllaren un factor anomenat toxohormona, que és una proteïna de 75 kD responsable de la pèrdua de lípids i de la immunosupressió. Més tard, a partir de ratolins portadors de sarcomes i de pacients amb hepatomes, es va aïllar l'anomenada toxohormona-L, la qual, administrada a animals experimentals, induïa una clara mobilització lipídica (Masuno *et al.*, 1984).

D'altra banda, el grup de Tisdale desenvolupà un model tumoral d'adenocarcinoma murí de còlon induït amb metilcolantrè (MAC16), capaç de provocar caquèxia amb una massa tumoral molt petita i en absència d'hipofàgia (Tisdale, 1990). En aquest model s'ha trobat un factor mobilitzador de lípids responsable de la dissolució del teixit adipós i també implicat en la degradació proteica muscular, denominat factor mobilitzador de lípids o LMF (Beck i Tisdale, 1987). Quan el factor lipolític procedent dels animals amb MAC16 s'injecta a animals sans, es produeix una reducció de la massa corporal acompanyada d'una pèrdua de teixit adipós, sense variacions en la ingesta (Beck *et al.*, 1990). Aquest LMF ha resultat ser un homòleg d'una proteïna sintetitzada per les cèl.lules sanes del pacient coneguda com a Zn-glicoproteïna o ZAG, que també és capaç d'induir la lipòlisi en adipòcits murins (Hirai *et al.*, 1998). Aquests efectes semblen ser mediatos via els receptors β 3-adrenèrgics (Russell *et al.*, 2004). Alhora s'ha observat que augmenta l'expressió d'UCP1 (*uncoupling protein-1* o proteïna desacobladora-1) en el TAM (teixit adipós marró), i d'UCP2 i UCP3 en miotubs, igual com també ho fa la seva homòloga LMF (Russell *et al.*, 2004). Semblaria que l'augment de l'expressió d'aquesta proteïna, tant en TAB (teixit adipós blanc) com en TAM, podria contribuir a la dissolució de la massa adiposa que té lloc durant la caquèxia associada a càncer. A més, s'ha descrit que els glucocorticoides estimulen l'expressió de ZAG, suggerint que els nivells elevats de cortisol presents en caquèxia podrien conduir a un augment de la lipòlisi a través d'aquesta glicoproteïna (Russell i Tisdale, 2005).

2.3.1.2 FACTOR INDUCTOR DE PROTEÒLISI (PIF)

El grup de recerca del Doctor Tisdale van identificar un compost amb un pes molecular relatiu de 24 kD i amb característiques de proteoglicà que va ser anomenat factor inductor de proteòlisi o PIF (Lorite *et al.*, 1998). Aquest pot induir caquèxia *in vivo* activant el catabolisme proteic muscular sense provocar anorèxia. També s'ha detectat a l'orina de pacients amb caquèxia cancerosa, però no en individus sans o amb càncer amb poca pèrdua de pes corporal (Todorov *et al.*, 1996). De fet, els factors inductors de proteòlisi (PIF) aïllats pel grup de Tisdale van ser dos: un es va obtenir a partir del tumor murí inductor de caquèxia MAC16 (Lorite *et al.*, 1998) i l'altre, idèntic immunològicament, a partir del melanoma humà G361, tumor també inductor de caquèxia quan s'inocula a ratolins *nude* (Todorov *et al.*, 1999). Ambdós factors induïen pèrdua de pes corporal quan s'injectaven a ratolins sans, sense produir canvis ni en la ingesta d'aliments ni en la beguda. La pèrdua de pes era deguda a la disminució de la massa no grassa de la carcassa (Lorite *et al.*, 1998, Todorov *et al.*, 1999). A més, s'han detectat nivells elevats de PIF en pacients amb tumor afectats de caquèxia (Wigmore *et al.*, 2000). S'ha descrit que la seva acció pot ser inhibida per part de l'àcid eicosapentaenoic (EPA), fet que indica que la seva acció podria ser via els metabòlits de l'àcid araquidònic (Barber *et al.*, 1999). També s'ha vist que el PIF estimula la síntesi de proteïnes de fase aguda a través de la via del factor de transcripció NF-κB (Whitehouse i Tisdale 2003).

2.3.2 FACTORS HUMORALS

2.3.2.1 INSULINA

Entre les principals alteracions que apareixen en la caquèxia associada a 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 (Argilés *et al.*, 1997). Se sap que la insulina actua sobre la proteïna muscular per mitjà de la disminució de la proteòlisi i l'augment de la síntesi proteica (Fulks *et al.*, 1975). El paper important de la insulina es va observar en estudis fets amb animals dejunats i diabètics, en els quals els nivells baixos d'insulina contribuïen a la proteòlisi muscular (Li i Goldberg, 1976). També s'ha descrit que en alguns tipus de tumor, malgrat haver-hi hiperinsulinèmia, l'hoste perd massa muscular, a causa segurament del desenvolupament de la resistència a la insulina (Lawson *et al.*, 1982), malgrat que no es coneix el mecanisme involucrat. D'altra banda, s'ha observat més aclariment d'insulina en pacients neoplàstics i anorèctics (Byerley *et al.*, 1991), fet que pot inhibir la supressió de la producció hepàtica de glucosa, i evitar així l'aparició de la hipoglucèmia. Aquestes alteracions del metabolisme poden reflectir una capacitat adaptativa

de l'individu per evitar la hipoglucèmia per restricció calòrica, i és reversible amb l'administració d'aliment (Zuniga-Guajardo *et al.*, 1986).

2.3.2.2 HORMONES TIROÏDALS

Des de fa molt temps, hi ha descrites alteracions dels nivells d'hormones tiroïdals associades a malalties neoplàsiques. Així, s'han detectat nivells baixos de T_3 associats a nivells normals, elevats o reduïts de T_4 . Els nivells baixos de T_3 es poden deure a la inhibició de l'enzim responsable de la conversió perifèrica de T_4 (Chopra *et al.*, 1978). Els nivells baixos de T_4 s'associen a malalties greus i es correlacionen positivament amb la taxa de mortalitat. En animals portadors del carcinoma de Walker 256, s'han observat nivells baixos d'ambdues hormones. Tant en aquest cas com en la patologia humana, els nivells de TSH (hormona estimuladora de la tiroïdes) són normals, cosa que suggereix que la glàndula tiroïde no està en situació d'hipofuncionalitat (Kumara-Siri *et al.*, 1981).

2.3.2.3 GLUCOCORTICOIDES

En diferents malalties, com ara la infecció, l'anorèxia i el càncer, s'han descrit nivells elevats de cortisol. Aquest augment de la síntesi de glucocorticoides per la glàndula adrenal facilitaria la mobilització de les proteïnes musculars i la captació hepàtica d'aminoàcids. En casos de càncer de mama, s'ha observat una correlació directa entre l'estadi clínic de la malaltia i la producció de cortisol (Saez, 1971). D'altra banda, en animals portadors de tumor s'ha descrit una marcada hipertròfia de la glàndula suprarenal, que no s'evita amb una nutrició forçada (Begg, 1958).

2.3.2.4 CATECOLAMINES

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

2.3.2.5 CITOQUINES

S'ha suggerit que, d'entre els mecanismes que desencadenen la caquèxia cancerosa, les citoquines tenen un paper primordial en un ampli ventall d'accions fisiològiques. La producció d'aquests mediadors de la resposta immunitària està regulada d'una manera

extraordinàriament complexa, i els desequilibris en la producció poden conduir a un ampli ventall d'alteracions metabòliques.

Se sap que en situacions d'infecció, trauma o creixement tumoral, l'hoste experimenta una sèrie d'alteracions bioquímiques i fisiològiques. Inicialment es va pensar que aquests canvis eren atribuïbles a factors produïts per l'agent invasor, però actualment se sap amb certesa que són sintetitzats pel mateix hoste com a mecanisme de defensa enfront l'estímul invasor.

En situacions de malaltia s'ha observat un augment de la síntesi de citoquines (Moldawer i Copeland, 1988) que, com s'ha demostrat en un gran nombre d'estudis, indueixen una sèrie de canvis metabòlics importants produint una gran varietat de respostes biològiques així com immunitat, inflamació, hematopoiesi, curació de ferides, i participació en la resposta sistèmica contra agents invasius i altres malalties. De fet, 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 caquètic (Argilés i Novartis Consumer Health S.A., 2005).

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

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 àmplia 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. A causa d'aquesta complexitat, han d'haver-hi mecanismes que en 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 segresten les citoquines i n'impedeixen la unió amb el receptor de la membrana cel·lular (Gehr *et al.*, 1992).

2.3.2.5.1 PRINCIPALS TIPUS DE CITOQUINES

Com ja s'ha indicat, durant la resposta immunològica de l'hoste davant d'una situació anòmala s'alliberen nombrosos mediadors, i un d'aquests són les citoquines. Les citoquines constitueixen una superfamília de compostos polipeptídics solubles que tenen característiques bioquímiques similars entre si, cosa que en dificulta la seva purificació. Tot i que l'existència de diverses citoquines es va descriure fa molts anys, el seu aïllament en forma pura a partir de teixits ha estat molt difícil. La dificultat radica en el fet que les citoquines es produeixen en quantitats ínfimes i són molt làbils. Fins als anys vuitanta no es va disposar de les eines adients per afrontar aquestes dificultats. Així, es van poder purificar i se'n van poder seqüenciar els gens gràcies a les tècniques d'immunocitoquímica i DNA recombinant (Trotta, 1991). Encara que són produïdes per diferents tipus cel·lulars a la vegada, a l'inici es van classificar, segons les cèl·lules majoritàriament productores, en monoquines (citoquines produïdes per monòcits i macròfags) i limfoquines (citoquines produïdes per limfòcits). Actualment les podem agrupar en diferents famílies, segons es mostra en la Taula 5. També es poden diferenciar dos grups de citoquines si en tenim en compte el seu paper en la caquèxia: les procaquètiques i les anticaquètiques.

Interleuquines (IL)

Se'n coneixen de la IL1 a la IL35

Factors de creixement hematopoètic

Eritropoetina

CSF (factors estimuladors de colònies):

MultiCSF (IL3)

GMCSF (*granulocyte/macrophageCSF*)

G-CSF (*granulocyte-CSF*)

M-CSF (*macrophage-CSF*)

Interferons (INF)

IFN α , IFN β i IFN γ

Factors necròtics tumorals (TNF)

TNF- α o caquectina

TNF- β o limfotoxina

Factors de creixement

EGF (*epidermal growth factor*)

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

FGF (*fibroblast growth factor*)

PDGF (*platelet-derived growth factor*)

NGF (*nerve growth factor*)

IGF (*insulin-like growth factor*)

Quimioquines

RANTES

MCP1 (*monocyte chemotactic protein1*)

Taula 5. Classificació de les citoquines per famílies.

Les citoquines implicades en l'activació de la resposta inflamatòria desencadenada pel sistema immunitari en resposta a estímuls invasius reben el nom de proinflamatòries. Les principals citoquines d'aquest grup són el TNF- α , el TNF- β o limfotoxina, la IL1, la IL6, l'IFN α , l'IFN β i l'IFN γ . Les citoquines que s'han relacionat amb la resposta caquèctica (anomenades citoquines procaquèctiques) pertanyen a aquest grup de citoquines proinflamatòries, d'entre les quals destaquen el TNF- α , la IL1, la IL6 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 (Argilés i López-Soriano, 1999). De fet, també s'ha vist que els propis teixits diana, com és el cas del múscul esquelètic, poden produir intrínscament aquestes citoquines. Aquestes proteïnes comparteixen molts efectes metabòlics i la seva activitat està íntimament interrelacionada; fins i tot es produeixen efectes sinèrgics.

Hi ha un altre grup de citoquines, les antiinflamatòries o anticaquètiques, les quals actuen en sentit contrari, modulant l'acció de les citoquines proinflamatòries. En aquest grup s'inclouen la IL10, la IL4, la IL13, l'antagonista del receptor IL1 (IL1ra), i altres molècules com ara el receptor soluble de la IL6 (sIL6R) i els receptors solubles del TNF- α (sTNFR) (Argilés i López-Soriano, 1998c). La IL15 és una citoquina que no té un paper antiinflamatori tant potent com les anteriors, però és una candidata important al grup de citoquines anticaquètiques gràcies a les seves accions anabòliques sobre el múscul esquelètic (Quinn *et al.*, 1995, Figueras *et al.*, 2004).

Cal destacar també entre les citoquines proinflamatòries 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 procaquètica, ja que és inductora de nombroses alteracions metabòliques que condueixen al procés caquètic (Argilés i Novartis Consumer Health S.A., 2005) i que presenta una marcada pleiotropia, induint nombrosos efectes en molts tipus cel·lulars. A més, el TNF- α és un important estimulador de secreció d'altres citoquines, com ara la IL6 i quimioquines (Pedersen *et al.*, 2003). El TNF- α és una citoquina citotòxica per a molts tipus cel·lulars tumorals i, a més, induïx necrosi de la vascularització tumoral, a través de la qual impedeix el subministrament sanguini de nutrients al tumor.

S'ha proposat el TNF- α juntament amb altres citoquines proinflamatòries com la IL1, com a factors claus per a l'anorèxia associada a caquèxia, possiblement a través de l'augment dels nivells de CRH (hormona alliberadora de corticotropina), un neurotransmissor del sistema nerviós central que suprimeix la ingesta (Stovroff *et al.*, 1988, Opara *et al.*, 1995). A més, l'administració de TNF- α a rata, ratolí i cobai, provoca una disminució de l'activitat LPL del teixit adipós. Aquesta disminució de l'activitat LPL condueix a la incapacitat de captar lípids exògens per part del teixit adipós i l'augment dels triacilglicerols circulants, una de les característiques importants de la caquèxia associada al càncer (Grunfeld *et al.*, 1990). Utilitzant un anticòs policlonal anti-TNF- α de rata, el nostre grup va poder observar, que aquesta citoquina està involucrada en les anormalitats presents en el metabolisme lipídic trobades en rates portadores de tumor (López-Soriano *et al.*, 1997). Alhora, el nostre grup de recerca va descriure que, almenys durant el creixement tumoral, la degradació proteica està associada amb un increment de l'activitat i de l'expressió del sistema dependent d'ATP i ubiquitina i, després de realitzar un tractament crònic amb un anticòs anti-TNF- α i observar que disminuïa l'expressió del gen de la ubiquitina, es va pensar que aquesta activació era mediada pel TNF- α (García-martínez *et al.*, 1994a, Llovera *et al.*, 1996a; Llovera *et al.*, 1997). Es va observar un augment en l'expressió dels receptors de TNF- α (TNFR1 i TNFR2) tant en múscul esquelètic com en teixit adipós durant la caquèxia (Figueras *et al.*, 2005). Es va suggerir que l'efecte del TNF- α sobre el múscul podia ser

directe ja que, mitjançant la incubació de músculs EDL amb TNF- α , es va veure un increment de la proteòlisi dependent d'ATP i ubiquitina (Llovera *et al.*, 1997). Sembla ser que, després de la interacció amb el seu receptor, aquesta citoquina actua via el factor de transcripció NF- κ B (Chen *et al.*, 2001). Durant la caquèxia associada a càncer, l'activitat d'unió d'aquest factor de transcripció també es troba disminuïda, fet que es troba associat a una disminució de l'expressió de MyoD, el principal factor de transcripció de diferenciació muscular (Costelli *et al.*, 2005). Utilitzant un model experimental de caquèxia associada al creixement tumoral, el nostre grup també va poder observar que el TNF- α estava, en part, involucrat en la fragmentació del DNA (Carbó *et al.*, 2002).

2.4 MÚSCUL ESQUELÈTIC

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

2.4.1 RECANVI PROTEIC

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

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. Tanmateix, en els individus portadors de tumor aquest equilibri està alterat i hi ha un flux de nitrogen des dels teixits normals als neoplàstics, que dona lloc a un clar balanç nitrogenat negatiu (Kurzer i Meguid, 1986), a causa d'una activació de la degradació enfront d'una síntesi inalterada o reduïda (recanvi proteic incrementat) (Smith i Tisdale, 1993).

Durant la caquèxia, la síntesi proteica pot ser disminuïda degut al desequilibri d'aminoàcids causat per l'augment de la utilització d'aminoàcids específics, com ara els aminoàcids de cadena ramificada com la leucina, que no són únicament substrats de síntesi proteica sinó que actuen també com a activadors de la via de transducció de la senyal que modula l'inici de la traducció (Yoshizawa *et al.*, 1994). De totes maneres, el recanvi proteic pot ser regulat per nombrosos factors, com són la insulina, de la qual estudis en preparacions de múscul esquelètic i cardíac han demostrat que estimula la síntesi proteica i inhibeix la degradació; el glucagó, capaç d'inhibir la síntesi proteica tant *in vivo* com *in vitro*; les hormones tiroidees, les quals afecten a la taxa de síntesi i degradació proteica muscular, exercint efectes oposats segons la dosi utilitzada; i els glucocorticoides, que poden influir notablement en la mida del múscul.

2.4.2 SISTEMES PROTEOLÍTICS

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

a altres teixits que els utilitzaran per a la gluconeogènesi, la síntesi proteica i l'obtenció d'energia (Mitch i Goldberg, 1996).

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

Sistema lisosomal

Sistemes citosòlics no lisosomals:

Dependent de calci

Caspases o proteases ICE (*interleukin- β converting enzymes*)

Dependent d'ATP i ubiquitina

Dependent d'ATP i independent d'ubiquitina

Sistemes mitocondrials:

Dependent d'ATP

2.4.2.1 SISTEMA LISOSOMAL

La proteòlisi lisosomal és un dels sistemes proteolítics més estudiats en les cèl·lules de mamífer. Els lisosomes són orgànuls cel·lulars que contenen gran nombre de proteases (anomenades catepsines) i altres hidrolases àcides, totes amb l'activitat òptima pròxima al pH 5 (pH present a l'interior dels lisosomes). Es coneixen més de 40 enzims lisosomals, tots ells hidrolítics: proteases, nucleases, glucosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases i sulfatases. S'ha descrit que la proteòlisi s'inicia amb l'acció de les endopeptidases (catepsines B i H), les quals són el pas limitant, i el procés continua mitjançant les exopeptidases (catepsines A i C). Els lisosomes s'encarreguen de degradar sobretot proteïnes extracel·lulars (hormones), proteïnes plasmàtiques i de membrana, glicoproteïnes, bacteris fagocitats o receptors de membrana, els quals són endocitades per la cèl·lula (Lecker *et al.*, 1999a).

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

El múscul esquelètic conté pocs lisosomes, i s'ha comprovat que les principals proteases lisosomals (catepsines B, H, L i D) no contribueixen gaire a la proteòlisi general en músculs incubats (Temparis *et al.*, 1994).

En condicions nutricionals deficientes, s'activa la degradació de diverses proteïnes solubles als lisosomes. S'ha observat que la no addició d'insulina, aminoàcids o sèrum al medi d'incubació, provoca un augment de la proteòlisi lisosomal en diferents teixits, com ara el múscul esquelètic i cardíac (Kettelhut *et al.*, 1988), fibroblasts (Chiang i Dice, 1988) i fetge (Lardeaux i Mortimore, 1987), sense presentar variacions en el contingut d'enzims lisosomals.

2.4.2.2 SISTEMA DEPENDENT DE CALCI

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

S'han identificat fins al moment onze membres de la família, que es divideixen en mamífers segons la seva distribució a l'organisme. Així, es poden dividir en ubiques (μ -calpaïna i m-calpaïna, les més estudiades), i específiques de teixit: calpaïna 3 (específica de múscul esquelètic), n-calpaïna 2 i n-calpaïna 2' (específiques d'estómac) (Saido *et al.*, 1994), n-calpaïna 4 (específica de túbuls digestius) (Sorimachi *et al.*, 1997), n-calpaïna 5, n-calpaïna 6 i n-calpaïna 11 (expressades en diferents teixits i períodes de desenvolupament en el ratolí) (Dear i Boehm, 1999). A més, s'han identificat dues proteïnes reguladores: una d'inhibidora citosòlica, component del citoesquelet, anomenada calpastatina, i una d'estimuladora al cervell i a les plaquetes (Takeyama *et al.*, 1986). Tot això indica que aquestes proteases pertanyen a un sistema proteolític força complex.

Les calpaïnes normalment no són actives *in vivo*, però poden activar-se mitjançant interaccions amb els lípids de la membrana cel·lular, especialment amb el fosfatidilinositol i per la presència de concentracions elevades de calci.

Entre els substrats proteics de les calpaïnes podem destacar les proteïnes de membrana, proteïnes contràctils i del citoesquelet, proteïnes plaquetàries i enzims que experimenten modificacions postraduccionals com ara la proteïna quinasa C (Johnson *et al.*, 1990).

2.4.2.3 SISTEMA DEPENDENT D'ATP I UBIQUITINA

Actualment se sap que la gran majoria de proteïnes intracel·lulars són degradades pel sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina (Lecker *et al.*, 1999a). Els substrats proteics d'aquest sistema són marcats prèviament per la unió covalent de diverses molècules d'ubiquitina, i la proteòlisi es duu a terme en el complex proteasòmic 26S, el qual degrada les proteïnes fins a petits pèptids (Kisselev *et al.*, 1998). En aquest sistema

proteolític es degraden proteïnes anormals i proteïnes reguladores de vida curta, però també és el responsable del recanvi lent de les proteïnes de vida llarga, que constitueixen la gran majoria de proteïnes intracel·lulars (Rock *et al.*, 1994; Mitch i Goldberg, 1996), com també de generar els pèptids que es presenten al MHC (complex d'histocompatibilitat major) de classe I durant la resposta immunitària (Rock *et al.*, 1994). A més, aquesta via proteolítica té un paper molt important en la proteòlisi accelerada de les proteïnes miofibril·lars durant el dejuni i altres estats patològics, com s'explicarà més endavant. S'ha postulat també que el sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina podria ser una de les principals vies per la qual es degradarien selectivament les proteïnes intracel·lulars.

2.4.2.3.1 UBIQUITINA

La ubiquitina està implicada en una llista quasi inacabable de processos cel·lulars. Aquesta proteïna, formada per 76 aminoàcids, és present en tots els eucariotes estudiats, ja sigui en forma lliure o unida a un gran nombre de proteïnes citoplasmàtiques, nuclears i de membrana. Totes les funcions cel·lulars en les quals participa les duu a terme a través de l'associació a un complex multienzimàtic, que s'encarrega d'unir o desunir molècules d'ubiquitina a una gran varietat de substrats proteics. Les característiques més rellevants d'aquesta proteïna són la gran conservació durant l'escala evolutiva, la gran abundància, i la gran estabilitat estructural. S'ha demostrat que la ubiquitinització té un paper important en el metabolisme de les proteïnes, de l'RNA i del DNA (Schlesinger, 1990).

Estructura i propietats

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

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

conjugades, ja sigui amb histones, amb proteïnes d'elevat pes molecular, o amb enzims d'activació o conjugació del seu sistema (Carlson i Rechsteiner, 1987).

2.4.2.3.2 DEGRADACIÓ PROTEICA

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

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

2.4.2.3.3 ENZIMS DEL SISTEMA

E1: enzim activador de la ubiquitina

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

E2: enzim conjugador de la ubiquitina

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

E3: lligases d'ubiquitina

Algunes de les reaccions de la conjugació de la ubiquitina i el substrat requereixen un tercer tipus d'enzims: E3 o lligases de la ubiquitina. Aquests enzims ajuden al reconeixement dels substrats susceptibles de ser ubiquitinatzats (Ciechanover i Schwartz 1989; Hershko 1991). En aquests casos, la unió de la ubiquitina a les proteïnes diana té lloc en dues etapes: primer el substrat proteic s'uneix en un lloc específic de l'E3, i després la ubiquitina activada és transferida de l'E2 a la proteïna (Figura 4). S'ha suggerit que, per facilitar aquesta transferència, és probable que l'E3 tingui un lloc d'unió amb l'E2. A causa de l'elevada estabilitat dels llocs d'unió del substrat proteic, l'E3 sembla tenir un paper important en la selecció de les proteïnes que han de ser degradades. S'han identificat dues E3s específiques de múscul anomenades atrogin/MAFbx (proteïna f-box d'atròfia muscular) i MuRF1 (proteïna de múscul RING finger1), que estan sobreexpressades en nombrosos estats catabòlics (Bodine *et al.*, 2001). A més, recentment s'ha identificat una tercera E3 (E3 α -II), classificada també com a marcador d'atròfia (Acharyya i Guttridge, 2007). Aquests enzims proporcionen l'alta especificitat que caracteritza el sistema dependent d'ATP i d'ubiquitina (Ciechanover *et al.*, 2000).

Proteasoma 26S

El proteasoma 26S, de 1.500 kD, s'ha detectat tant al citoplasma com al nucli i funciona com una proteasa dependent d'ATP (Goldberg i Rock, 1992; Rivett, 1993). Està implicat en la degradació de proteïnes anormals, proteïnes de vida curta i llarga, proteïnes reguladores de vida curta i antígens de presentació (Peters, 1994). La degradació de substrats depèn del grau de poliubiquitinatzació, tot i que pot passar que la ubiquitina s'alliberi de les proteïnes diana gràcies a l'acció de certes hidrolases i quedi lliure per ser reutilitzada en un nou cicle de conjugació (Matsui *et al.*, 1982) (Figura 4).

El proteasoma 26S està format per diferents subunitats com són la 19S i 11S ambdues amb funcions reguladores, donant especificitat a la proteòlisi o participant en el desplegament del substrat (Lecker *et al.*, 1999a). També presenta la partícula 20S, la qual és l'encarregada de degradar els substrats proteics, prèviament marcats per la ubiquitina i desplegats (Lecker *et al.*, 1999a). Aquesta subunitat 20S té tres accions proteolítiques específiques: l'activitat "semblant a la quimotripsina", l'activitat "semblant a la tripsina" i l'activitat "semblant a la caspasa" (Tisdale, 2005).

Enzims desubiquitinatzants

Els enzims desubiquitinatzants es poden dividir en dues famílies: les hidrolases C-terminals de la ubiquitina (UCH), anomenades també isopeptidases, i les proteases específiques de la ubiquitina (UBP) (Wilkinson, 2000). Aquests s'encarreguen de la

regeneració de la ubiquitina lliure i de la seva reutilització, donant lloc a l'escissió de la ubiquitina dels pèptids petits derivats de la proteòlisi de la proteïna diana. Aquests enzims són també necessaris per a la conjugació reversible de proteïnes amb la ubiquitina, és a dir, per eliminar la ubiquitina de les proteïnes conjugades incorrectament, mostrant així un paper corrector (Matsui *et al.*, 1982). Una altra funció essencial d'aquests enzims és el processament dels precursors biosintètics de la ubiquitina (Ozkaynak *et al.*, 1987).

Tripeptidilpeptidasa II i aminopeptidases

Una vegada les proteïnes han estat processades pel proteasoma, els oligopèptids de 6 a 9 residus que resten són ràpidament degradats a tripèptids per la tripeptidilpeptidasa II i després degradats a aminoàcids per part de les aminopeptidases. La seva funció és important, ja que l'acumulació de pèptids anormals a la cèl·lula podria ser perjudicial (Hasselgren *et al.*, 2001).

Caspases

Recentment s'ha proposat que les caspases podrien exercir un pas inicial en la proteòlisi miofibril·lar mitjançant el trencament de l'actinmiosina. En aquest sentit les caspases, que són proteïnes executores de l'apoptosi, podrien estar preparant les proteïnes miofibril·lars per fer-les accessibles a la ubiquitinització (Du *et al.*, 2004).

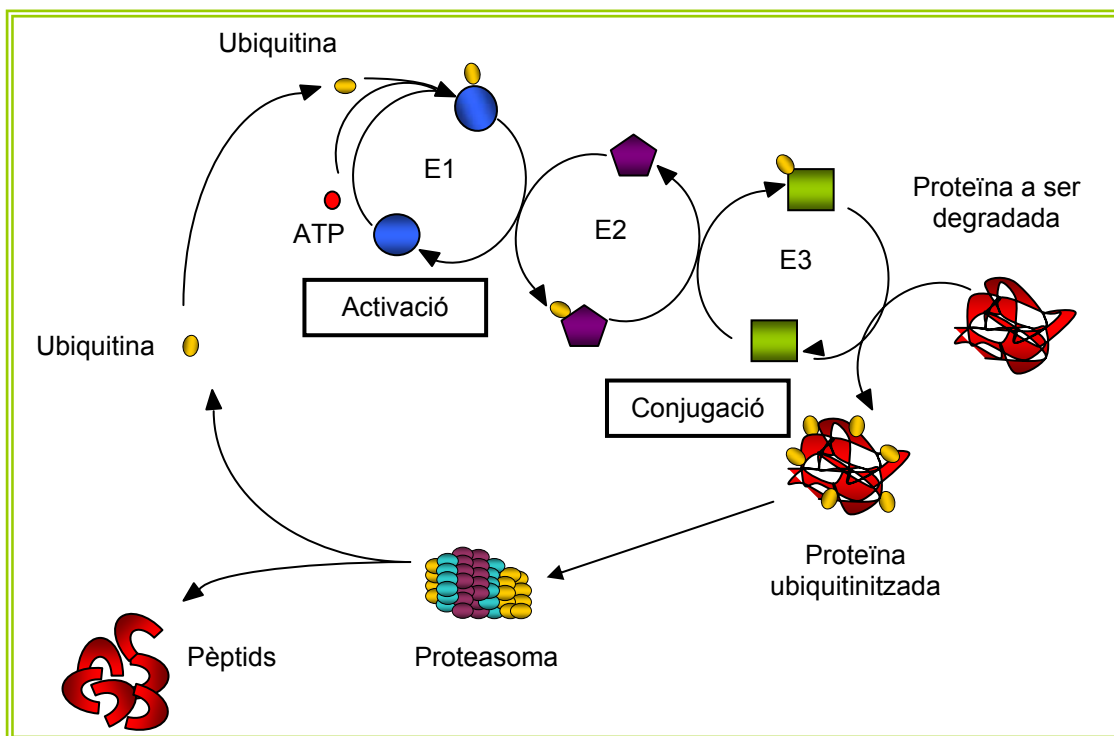


Figura 4. Degradació proteica a través del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina. El procés de degradació proteica mitjançant aquest sistema consta de les següents etapes: l'E1, juntament amb l'ATP, genera un enllaç tioèster d'alta energia amb la ubiquitina, que es transfereix a l'E2. Això permet el reconeixement del substrat mitjançant el proteasoma 26S i, conseqüentment, la degradació proteolítica en un procés dependent d'ATP. En certes ocasions, el reconeixement del substrat per l'E2 està mediat

per la formació d'un complex substrat-E3. La ubiquitina s'allibera del proteasoma un cop s'ha degradat el substrat, mitjançant l'acció dels enzims desubiquitinizants. L'especificitat del procés de degradació sembla estar mediada pels enzims E2 i E3.

2.4.2.4 PROTEÒLISI MUSCULAR EN ESTATS CATABÒLICS

El desgast muscular que es produeix en pacients o animals amb caquèxia (com ara durant el càncer, les infeccions cròniques o els traumatismes) està relacionat amb un augment de la degradació proteica, sense afectar pràcticament la síntesi proteica. Això comporta l'aparició d'un balanç nitrogenat negatiu al múscul. S'ha demostrat que el sistema dependent d'ATP i ubiquitina té un paper important en el desgast de teixit muscular en diverses situacions patològiques (Argilés *et al.*, 1998b). El nostre grup d'investigació ha treballat durant molts anys en aquest camp, i ha aconseguit resultats que indiquen que aquest sistema proteolític és el que contribueix en més mesura en aquesta proteòlisi incrementada durant la caquèxia. Així, s'ha demostrat un increment dels nivells de conjugats d'ubiquitina (García-Martínez *et al.*, 1993) i també un augment de l'expressió dels gens relacionats amb el sistema dependent d'ubiquitina (Llovera *et al.*, 1994) al múscul esquelètic de rates portadores de tumor que indueix caquèxia. Aquesta activació del sistema dependent d'ubiquitina es va demostrar també en un model d'incubació de múscul esquelètic *in vitro* (Llovera *et al.*, 1995). L'activació del sistema dependent d'ATP i ubiquitina no sembla estar relacionada amb l'augment de la concentració circulants de glucocorticoides (augment que es dona en la caquèxia, apartat 2.3.2.3), com tampoc amb la presència d'un antagonista dels receptors de glucocorticoides (RU38486) (Llovera *et al.*, 1996b). En dejuni, en canvi, els glucocorticoides sí que són capaços d'activar el sistema proteolític dependent d'ubiquitina (Wing i Goldberg, 1993). L'activació del sistema proteolític durant la caquèxia, a més, es pot fer revertir si s'administren agonistes β_2 -adrenèrgics, com ara el clenbuterol (Costelli *et al.*, 1995b) i el formoterol (Busquets *et al.*, 2004).

Com ja s'ha comentat en l'apartat 2.3.2.5.1, el TNF- α té un paper destacat en situacions de caquèxia cancerosa, i el nostre grup d'investigació ha demostrat la implicació d'aquesta citoquina en l'activació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina. Així, el tractament amb anticossos anti-TNF- α fa revertir l'increment d'expressió dels gens relacionats amb el sistema dependent d'ubiquitina i ATP (Llovera *et al.*, 1996a). Els ratolins *knockout* pel receptor de tipus 1 del TNF- α portadors de tumor no presenten expressions elevades dels gens del sistema dependent d'ubiquitina, la qual cosa indica que l'activació del sistema induïda per la citoquina està mediada per la unió al receptor de tipus 1 (Llovera *et al.*, 1998a). També l'administració de TNF- α intravenosa provoca un increment de l'expressió dels gens de la ubiquitina al múscul esquelètic de rates sanes (García-Martínez *et al.*, 1994a). S'ha demostrat que el TNF- α actua directament sobre l'activació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, ja que en músculs aïllats incrementa la proteòlisi (Llovera *et al.*, 1997).

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

En models experimentals d'infecció aguda també s'ha demostrat l'activació del sistema de la ubiquitina al múscul esquelètic (Tiao *et al.*, 1994) i s'han demostrat resultats equivalents en pacients humans (Tiao *et al.*, 1997). Algunes citoquines com ara la IL-6 no semblen estar involucrades en l'activació de la proteòlisi en rates afectades per infeccions agudes (García-Martínez *et al.*, 1994b).

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

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

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

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

2.4.3 VIES DE TRANSDUCCIÓ DE LA SENYAL AL MÚSCUL ESQUELÈTIC DURANT LA CAQUÈXIA ASSOCIADA AL CÀNCER

Entendre les vies de senyalització que regulen la massa del múscul esquelètic és crucial pel desenvolupament de bones estratègies nutricionals o farmacològiques que poden atenuar el desgast i la feblesa, ambdues característiques de la caquèxia associada a càncer, i poden millorar l'estructura del múscul i la seva funció. Fins fa poc no es trobaven massa estudis que fessin referència a les vies de senyalització intracel·lular en caquèxia, però recentment hi ha hagut nombrosos avenços en aquest camp. Les vies més estudiades han estat les de degradació i síntesi proteica i l'apoptosi en múscul esquelètic.

Penner i col·laboradors (2001) van descriure un augment dels dos factors de transcripció NF- κ B i AP1 (*activator protein 1*) en múscul esquelètic en un model experimental

animal de sèpsia. Al contrari del que s'esperava, dades recents del nostre laboratori indiquen que NF- κ B no estaria involucrat en el múscul esquelètic durant el desenvolupament de la caquèxia associada al nostre model tumoral, però en canvi, sí que s'incrementa l'activitat d'unió d'AP1 (Moore-Carrasco *et al.*, 2007). Resultats molt interessants mostren que la inhibició de AP1 dóna lloc a una reversió parcial de la degradació proteica en el múscul esquelètic associada a un creixement tumoral (Moore-Carrasco *et al.*, 2007). A més, el tractament amb TNF- α a les cèl·lules musculars C2C12 provoca un augment de l'expressió de c-jun (subunitat d'AP1) (Thinakaran *et al.*, 1993). Altres estudis mostren com l'ús d'un oligonucleòtid que competeix amb el lloc d'unió de l'NF- κ B, pot revertir la caquèxia en un model murí experimental de caquèxia associat a un procés neoplàstic, sense afectar al creixement tumoral, però frenant la metastasi (Kawamura *et al.*, 1999; 2001). L'augment d'NF- κ B que es dóna en múscul esquelètic en un model experimental de sèpsia, pot ser mimetitzat pel TNF- α . Dades més recents mostren un augment de l'activitat d'unió al DNA del factor de transcripció NF- κ B i de la degradació d'I κ -B α (inhibidor d'NF- κ B), en múscul esquelètic de pacients amb caquèxia associada a la malaltia pulmonar obstructiva crònica (Agusti *et al.*, 2004). Així doncs, sembla que és difícil confirmar si l'efecte de TNF- α sobre els sistemes proteolítics és per via o no del factor de transcripció NF- κ B (Costelli *et al.*, 2005).

Una altra família de factors de transcripció importants són els PPARs (receptors activadors de la proliferació peroxisomal) amb una importància potencial en el procés de depleció muscular associat a la síndrome caquètica. Realitzen funcions relacionades amb el metabolisme lipídic, que poden ser de gran importància en la caquèxia associada a càncer. De fet, el nostre grup ha proposat una relació potencial entre el múscul esquelètic i el teixit adipós que podria estar lligada al control del pes corporal, de les reserves lipídiques i de la massa muscular (Argilés *et al.*, 2005).

Nombrosos estudis demostren que PPAR α i PPAR γ són reguladors negatius de la resposta inflamatòria (Delerive *et al.*, 2001). A més, es coneix el mecanisme pel qual aquests factors de transcripció actuen en el procés antiinflamatori. Així, PPAR α ho fa antagonitzant la cascada de senyalització del NF- κ B (Delerive *et al.*, 1999). A més, s'ha vist com PPAR α actua també estimulando l'expressió d'I κ -B α . D'altra banda s'ha observat que PPAR α també és capaç d'interaccionar amb AP1, a través de la subunitat c-jun (Delerive *et al.*, 1999). PPAR γ també exerceix la seva funció antiinflamatòria inhibint NF- κ B, AP1 i STAT1. Aquest factor de transcripció actua inhibint la degradació d'I κ B.

Resultats molt recents mostren com el tractament amb agonistes de PPAR δ provoca un augment de l'expressió de les lligases E3 (atrogen1 i MuRF1), tot i que no es veu un augment de l'expressió ni tampoc de l'activitat del proteasoma (Constantin *et al.*, 2007). Aquest efecte ha estat descrit com a activació del programa d'atròfia i inducció del canvi de substrat energètic en el múscul per part de PPAR δ , però sense canvis en la funció mitocondrial.

Altres factors de transcripció que s'han vist implicats en condicions catabòliques són C/EBP β i δ , que es troben augmentats en múscul durant un estat de sèpsia (Guttridge *et al.*, 2000), PW1, PGC1 α , FOXO i Sp1. S'ha descrit un possible paper de la família de factors de transcripció FOXO en el control de la degradació muscular en un model d'atròfia per denervació (Sandri *et al.*, 2006). A més, es constata que el control transcripcional de les lligases E3 (atrogen1 i MuRF1) està realitzat per part de FOXO i NF- κ B (Sandri *et al.*, 2004).

La miostatina és un membre de la superfamília dels TGF β , i és una molècula que exerceix una potent regulació negativa de la massa muscular, i per tant pot ser una possible diana terapèutica a tenir en compte (Lee, 2004; Tsuchida, 2008). Acharyya i col·laboradors (2005) han demostrat una nova via de senyalització per distrofina, una proteïna que es troba mutada en nombrosos tipus de distròfia muscular. La distrofina sembla bloquejar l'atròfia inhibint vies d'atròfia muscular, com ara l'augment de l'expressió de les lligases E3 atrogen1 i MuRF1 en models d'atròfia muscular (Acharyya *et al.*, 2005). A més, els canvis en la distrofina es correlacionen positivament amb la caquèxia i negativament amb la supervivència en pacients amb càncer gastrointestinal amb varis graus de pèrdua de pes (Acharyya i Guttridge, 2007).

Pel que fa a les vies d'hipertròfia que es podrien activar per contrarestar l'elevada degradació de proteïnes, es pot assenyalar el paper antiproteolític que tenen tant la insulina com l'IGF1 (*insulin-like growth factor1*) inhibint el sistema de degradació proteica dependent d'ubiquitina i ATP (Attaix *et al.*, 2005).

2.5 ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES

Com ja s'ha mencionat amb anterioritat, la caquèxia és una síndrome complexa. Els components principals d'aquest estat patològic són l'anorèxia i les anormalitats metabòliques com són la intolerància a la glucosa, la pèrdua de massa adiposa, i la forta degradació proteica al múscul entre d'altres.

Encara 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 l'ús de la nutrició parenteral total no atura la pèrdua de pes corporal (Ng i Lowry, 1991). Com ja s'ha indicat en apartats anteriors, 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 (Argilés *et al.*, 1997). 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 que s'exposaran a continuació resulten efectives per elles mateixes, i per tant el que cal és fer una o varies aproximacions farmacològiques i nutricionals a la vegada que permetin afavorir al màxim l'anabolisme del pacient.

2.5.1 ESTRATÈGIES PER CONTRARESTAR L'ANORÈXIA

2.5.1.1 ESTRATÈGIES FARMACOLÒGIQUES

Derivats de la progesterona

Els derivats de la progesterona, com l'acetat de megestrol (MA) o la medroxiprogesterona (MPA) són fàrmacs sintètics oralment actius. En humans aquests compostos milloren la gana, la ingestió calòrica i l'estat nutricional en diferents casos clínics (Bruera *et al.*, 1990; Loprinzi *et al.*, 1993; Neri *et al.*, 1997). El mecanisme pel qual provoca un guany de pes no és conegut; malgrat això, s'ha postulat que el seu efecte està parcialment mediat pel neuropèptid Y, un estimulador del centre de la gana. En cas del MPA, s'ha vist que és capaç de reduir la producció *in vitro* de serotonina i citoquines procaquèctiques (IL1, IL6 i TNF- α) per part de monòcits perifèrics aïllats de pacients amb càncer (Mantovani *et al.*, 1997). Els casos d'humans tractats amb derivats de progesterona demostren que sí hi ha un efecte favorable en la gana i el guany de pes, però aquest darrer s'atribueix a un increment en la massa grassa i no de la massa muscular (Loprinzi *et al.*, 1993). Dades més actuals mostren com administrant MA en suspensió a pacients amb estadis avançats de càncer i anorèxia, aquests experimenten una millora de la gana i de la qualitat de vida (Tomiska *et al.*, 2003).

Cannabinoides

Els cannabinoides, presents en la marihuana i els seus derivats, tenen un efecte demostrat sobre el guany de pes corporal, i per aquest motiu han estat utilitzats per incrementar la ingesta en pacients amb càncer (Mitchelson, 1992). El mecanisme pel qual els cannabinoides exerceixen els seus efectes encara no s'ha aclarit. S'ha suggerit que actuen mitjançant els receptors d'endorfina o bé inhibint la síntesi de prostaglandines (Mitchelson, 1992). Altres estudis proposen que els derivats de la marihuana podrien actuar inhibint la producció/secreció de citoquines (Watzl *et al.*, 1991; Srivastava *et al.*, 1998; Facchinetti *et al.*, 2003). Estudis recents mostren que pacients amb càncer en estat avançat mostren una millora en la ingesta després de l'administració del delta-9-tetrahidrocannabinoid, un derivat de cannabinoides (Strasser *et al.*, 2006).

Glucocorticoides

Els corticosteroides varen ser la primera aproximació farmacològica pel tractament de l'anorèxia en càncer. S'han utilitzat per incrementar la ingesta 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 (Vigano *et al.*, 1994). El mecanisme d'acció dels corticosteroides és ben conegut: la seva acció antiinflamatòria es dona per la inhibició de l'alliberament de TNF- α (Han *et al.*, 1990) i també s'ha relacionat amb la proteòlisi muscular induïda per TNF- α , fet característic de la caquèxia (Han *et al.*, 1990). Tot i això, se sap que els efectes dels glucocorticoides sobre la taxa de degradació en el múscul esquelètic són transitoris: poden afectar primerament a la degradació proteica miofibril·lar, però només es pot observar utilitzant dosis farmacològiques (Odedra i Millward, 1982; Odedra *et al.*, 1983). Hi ha altres estudis, però, que descarten la implicació dels glucocorticoides en el desgast del múscul esquelètic associat a la caquèxia cancerosa (Llovera *et al.*, 1996b).

D'altra banda, la disminució de la síntesi proteica ha estat àmpliament demostrada en diferents estudis tant *in vivo* com *in vitro* (McGrath i Goldspink, 1982). A més, es coneix que la síntesi de proteïnes miofibril·lars és especialment sensible a la inhibició per glucocorticoides (Odedra *et al.*, 1983).

Altres tractaments farmacològics

S'han realitzat molts estudis per trobar noves estratègies farmacològiques per contrarestar l'anorèxia, com són els basats en la ciproheptadina (inhibidor de la serotonina) (Kardinal *et al.*, 1990), la insulina (Tessitore *et al.*, 1993; Lundholm *et al.*, 2007) i alguns mediadors orexigènics i anorexigènics. Dins d'aquest últim grup s'hi troben la leptina (López-Soriano *et al.*, 1999; Aleman *et al.*, 2002; Arpacı *et al.*, 2002; Schulze *et al.*, 2003), l'adiponectina (Jacobi *et al.*, 2006), la grelina (Nagaya *et al.*, 2003) i el receptor de la melanocortina MC4 (Foster i Chen, 2007). Una de les aproximacions terapèutiques més destacables, la grelina, sembla millorar la ingesta i la composició corporal dels animals portadors de tumor, (Wang *et al.*, 2006) a través d'efectes que involucren neuropèptids orexigènics i canvis antiinflamatoris (Schulze *et al.*, 2003; Akamizu i Kangawa, 2007; DeBoer *et al.*, 2007; Foster i Chen, 2007).

2.5.1.2 ESTRATÈGIES NUTRICIONALS

La nutrició enteral és una alternativa a la via oral en pacients amb tumors avançats de cap, coll o carcinoma esofàgic, que no poden empassar però conserven la gana i tenen un bon estat físic (Vigano *et al.*, 1994). La nutrició parenteral total s'aplica a pacients amb càncer desnutrits que no poden rebre ni una nutrició oral ni enteral. El seu ús clínic té resultats conflictius. Mentre que en alguns estudis s'observa que aquest tipus de nutrició té efectes beneficiosos (Muller *et al.*, 1982; Bozzetti *et al.*, 1987), altres, després d'avaluar les conseqüències del tractament, conclouen que els beneficis són limitats i poden portar complicacions (Klein *et al.*, 1986). De totes maneres, com ja s'ha indicat, les estratègies

nutricionals són eines pel tractament de l'anorèxia i de la caquèxia, i la combinació de les dues estratègies, la nutricional i la farmacològica, pot conduir a resultats prometedors.

2.5.2 ESTRATÈGIES PER CONTRARESTAR LES ALTERACIONS METABÒLIQUES

2.5.2.1 MEDIADES PER CITOQUINES

La presència del tumor és un estímul invasiu que provoca l'alliberament de citoquines per part de les cèl·lules del sistema immune de l'hoste. Les citoquines que han estat implicades en la resposta caquètica són principalment: TNF- α , IL1, IL6 i IFN γ (Evans *et al.*, 1989). Per combatre els canvis metabòlics produïts per aquestes citoquines, l'estratègia podria dirigir-se a neutralitzar-les. Així, es poden neutralitzar les citoquines mitjançant fàrmacs que en bloquegen la síntesi o l'acció (Yamamoto *et al.*, 1998).

2.5.2.1.1 BLOQUEIG DE LA SÍNTESI DE CITOQUINES

Tant la pentoxifil·lina com la talidomida són dues drogues que inhibeixen la síntesi del TNF- α . La pentoxifil·lina, un derivat de la metilxantina, és un inhibidor de la fosfodiesterasa que inhibeix la síntesi de TNF- α mitjançant la disminució de la transcripció gènica. Hi ha estudis en els que es descriu que la pentoxifil·lina preserva l'eficàcia del tractament antitumoral (Balazs i Kiss, 1994) i n'hi ha que indiquen que no és capaç de millorar la gana ni d'incrementar el pes corporal dels pacients caquètics (Goldberg *et al.*, 1995). D'altra banda, s'ha vist que la talidomida disminueix la pèrdua de pes associada a la caquèxia en pacients amb càncer pancreàtic avançat (Gordon *et al.*, 2005).

2.5.2.1.2 BLOQUEIG DE L'ACCIÓ DE LES CITOQUINES

Anticossos i receptors solubles

En rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 (un tumor altament caquètic), la teràpia amb anticossos anti-TNF- α provoca una reversió parcial de les alteracions associades tant al metabolisme lipídic (Carbó *et al.*, 1994) com al proteic (Costelli *et al.*, 1993). Malgrat això, el tractament amb anti-TNF- α no ha donat gaire bons resultats en la reversió del catabolisme proteic associat a la sèpsia en humans (Reinhart *et al.*, 1996). A més, l'ús clínic d'etanercept (proteïna de fusió contra el receptor p75 del TNF- α) o l'infliximab (anticòs monoclonal contra el TNF- α) en el tractament de la fallida cardíaca crònica tampoc han funcionat (Anker i Coats, 2002). Estudis clínics pilot utilitzant combinació d'etanercept amb agents antitumorals (docetaxel) en pacients amb càncer avançat, mostren una disminució de la fatiga i una millora de la tolerància al tractament antitumoral (Monk *et al.*, 2006).

Per altra banda, la suramina (la qual preveu la unió de la IL6 al receptor de membrana) bloqueja parcialment els efectes catabòlics associats amb l'adenocarcinoma 26 de còlon en ratolí (Strassmann *et al.*, 1993). En humans, el tractament de malalts de SIDA amb anticossos anti-L6 ha resultat molt positiu en la febre i la caquèxia (Emilie *et al.*, 1994).

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

Citoquines antiinflamatòries

El grau de la síndrome caquètica no només depèn de la producció de les citoquines esmentades anteriorment, conegudes com a citoquines proinflamatòries, sinó també de les anomenades citoquines antiinflamatòries com són la IL4, la IL10, i la IL12. A dosis baixes de IL12 s'han observat efectes anticaquètics en el model d'adenocarcinoma de còlon de ratolí, encara que són insuficients per inhibir el creixement tumoral. Els efectes de la IL12 sembla que són dependents d'una important disminució de la IL6 (Mori *et al.*, 1996), que és la responsable de la caquèxia associada a aquest model tumoral (Fujimoto-Ouchi *et al.*, 1995).

Estudis realitzats en el nostre laboratori han proposat a la IL15 com un factor anabòlic del múscul esquelètic (Carbó *et al.*, 2000). Encara que no hi ha dades a nivell clínic, sí que hi ha dades obtingudes d'animals experimentals portadors de tumor, en els que la IL15 condueix a una millora en la massa muscular (Carbó *et al.*, 2001; Figueras *et al.*, 2004).

2.5.2.2 EFECTE MEDIAT PER HORMONES

L'altra estratègia per evitar els canvis metabòlics que perjudiquen la salut del pacient consisteix en la utilització d'hormones que reverteixen algunes de les alteracions metabòliques presents als pacients amb caquèxia associada al càncer. S'ha demostrat, en models experimentals, que l'administració d'hormona del creixement recombinant de rata a rates portadores de tumor resulta en una considerable estimulació de la síntesi proteica (Ng *et al.*, 1993). Així mateix, sembla que IGF-I actua com a mediador d'algunes propietats anabòliques de l'hormona del creixement (Froesch *et al.*, 1985) i podria estar implicat en la regulació del recanvi proteic (Florini *et al.*, 1985). A més, l'IGF-I també disminueix la lipòlisi (Froesch *et al.*, 1985), una via metabòlica que s'activa en l'adipòcit durant la caquèxia cancerosa. També s'ha observat que l'administració de melatonina a pacients amb tumors metastàsics provoca una disminució en els nivells de TNF- α circulant per inhibició de la secreció d'aquesta citoquina (Lissoni *et al.*, 1994), i una menor pèrdua de pes (Lissoni *et al.*, 1996). A més, el tractament amb melatonina sembla que redueix la toxicitat a la quimioteràpia (Lissoni *et al.*, 1997). D'altra banda, Bartlett i col·laboradors (1994) van estudiar els efectes de la somatostatina en combinació amb la insulina i l'hormona del

creixement en animals portadors de tumor; el tractament incrementava el pes de la carcassa, el pes muscular i el contingut proteic (Bartlett *et al.*, 1994).

2.5.2.3 ALTRES APROXIMACIONS

Existeixen moltes altres estratègies farmacològiques per contrarestar les alteracions metabòliques que es donen durant la caquèxia associada a processos neoplàsics entre les quals es troben els esteroides anabòlics (Patton *et al.*, 1986; Hengge *et al.*, 1996), els àcids grassos ω -3 (Fearon *et al.*, 2003), els aminoàcids de cadena ramificada (Busquets *et al.*, 2002), els nucleòtids (Van Buren *et al.*, 1990) i el sulfat d'hidrazina (Chlebowski *et al.*, 1990). Entre aquestes aproximacions terapèutiques també es troben els inhibidors de l'enzim convertidor de l'angiotensina (ACE) (Zhao i Xie, 2001; Anker *et al.*, 2003), els fàrmacs antianèmics com l'eritropoietina (EPO) (Kanzaki *et al.*, 2005), l'ATP i la creatina (Agteresch, *et al.*, 2002), la 5'desoxi-5-fluorouridina (Tanaka *et al.*, 1990), els inhibidors del proteasoma, els β -bloquejants (Lainscak i Keber, 2006), els antagonistes de la miostatina (TGF β que regula negativament el creixement i el desenvolupament muscular) (McFarlane *et al.*, 2006), el receptor 2 del factor alliberador de la corticotropina (Argilés *et al.*, 2007b), i els agonistes dels receptors β 2-adrenèrgics (Busquets *et al.*, 2004).

Una de les aproximacions terapèutiques experimentals de més importància, però que presenta una alta toxicitat associada, és la dels inhibidors del sistema de degradació proteica dependent d'ATP i d'ubiquitina. De fet, l'increment de la degradació proteica en el múscul esquelètic durant la caquèxia implica l'activació d'aquest sistema de degradació. Així doncs, es disposa d'inhibidors d'aquest sistema proteolític, com la lactacistina i la β -lactona, els quals poden bloquejar en les cèl·lules més del 90% de la degradació de proteïnes normals i de vida curta (Lee i Goldberg 1998). Aquests compostos, però, tenen una elevada toxicitat perquè no són inhibidors específics del sistema proteolític en el teixit muscular. Per tant, són necessaris més estudis per descobrir inhibidors de les lligases d'ubiquitina específiques de múscul (MuRF1, atrogin1) que s'han considerat com a marcadors d'atròfia muscular, i que podrien ajudar a frenar el catabolisme proteic amb efecte només al múscul (Bodine *et al.*, 2001).

3. NUTRACÈUTICS

A l'iniciar-se el nou mil·lenni, la ciència dels aliments i de la nutrició ha guanyat protagonisme en l'àmbit de la Medicina. La interacció entre la medicina i els aliments cada vegada és més reconeguda i accepta els components dels aliments com a nutrients essencials per al manteniment d'una bona qualitat de vida. Recentment existeix un interès accentuat pel consum de certs aliments que, a més d'un valor nutritiu, aporten beneficis a les funcions de l'organisme. Hipòcrates, fa gairebé 2500 anys citava, *“deixa que l'alimentació sigui la teva medicina i que la medicina sigui la teva alimentació”*; de la mateixa manera, la relació entre dieta i salut va ser reconeguda per la medicina xinesa cap a l'any 1000 AC. Actualment, existeix una renovada atenció en incloure certs components nutricionals als aliments processats amb l'objectiu de complementar alguna possible deficiència en la població.

Investigacions en el camp de l'epidemiologia i la dietètica permeten establir certes relacions entre els estils de vida i els hàbits alimentaris, determinant la incidència d'algunes malalties. Aquests estudis han ressaltat que existeixen certs ingredients naturals que proporcionen beneficis i resulten extraordinàriament útils per a la prevenció de malalties o fins i tot per al seu tractament.

3.1 CONCEPTES

Degut a la importància i efecte de la nostra dieta en la salut, han anat sorgint una sèrie de conceptes que sovint creen confusió i que tant la seva definició com la seva regulació pot variar d'un país a un altre.

3.1.1 ALIMENTS FUNCIONALS

El primer d'aquests conceptes és el d'aliment funcional, que va ser proposat al Japó l'any 1980 i que va ser descrit com l'aliment del que s'ha demostrat satisfactòriament que aporta efectes beneficiosos per l'organisme, a més dels seus valors nutricionals corresponents, com el fet d'aportar la quantitat necessària d'hidrats de carboni, greixos, proteïnes, vitamines, etc. Són aquells aliments naturals o processats que, a part del seu contingut nutritiu, contenen ingredients que realitzen una activitat específica en les funcions fisiològiques del cos, afavorint la capacitat física i la salut mental. Un exemple podria ser el tomàquet, que conté licopè, compost del que s'ha demostrat que actua reduint el risc de càncer de pròstata (Ansari *et al.*, 2005), o alguns peixos rics en àcids grassos omega-3 que redueixen el risc de patir malalties cardiovasculars, o la fruita i les verdures que són fonts excel·lents de fibra, vitamines i minerals, i alhora també contenen components com fenols, polifenols, terpens i alcaloides que poden proporcionar importants beneficis per la salut més enllà de la nutrició bàsica. Estudis en l'última dècada han demostrat que diferents

micronutrients de la fruita i la verdura actuen reduint l'aparició d'alguns tipus de càncer (Aggarwal *et al.*, 2006).

Les principals tasques dels aliments funcionals estan relacionades amb un òptim creixement i desenvolupament, el funcionament adequat i prevenció de malalties del sistema cardiovascular, hepàtiques i degeneratives com el càncer, l'aportació d'antioxidants i la protecció del sistema gastrointestinal, entre d'altres. La cerca de teràpies alternatives per algunes de les malalties cròniques que afecten a la societat com són el càncer, l'obesitat, la diabetis, la hipertensió, els trastorns cardiovasculars i l'envelliment, sumant a les seves causes la falta de certs nutrients en els aliments, porten com a conseqüència l'avenç en la tecnologia alimentària, considerant la salut com un bé preferentment controlable a través de l'alimentació. També contribueixen al seu desenvolupament els canvis de la reglamentació en les legislacions vigents en diversos països, provocant un gran interès en el desenvolupament d'aliments funcionals. Es poden considerar aliments funcionals als també anomenats aliments modificats o enriquits, amb una variació en la seva composició original (addició d'alguns nutrients, especialment vitamines i minerals), la funció específica dels quals és restaurar o augmentar el seu valor nutricional per a satisfer les necessitats nutritives d'un determinat grup poblacional (Zeisel, 1999).

3.1.2 SUPLEMENT DIETÈTIC

La DSHEA (*Dietary Supplement Health and Education Act*) defineix suplement dietètic com un producte destinat a complementar la dieta per a millorar la salut i que conté un o més dels següents ingredients: vitamines, minerals, aminoàcids, herbes o altres tipus botànics. Són substàncies dietètiques que complementen la dieta augmentant la quantitat total ingerida diàriament d'aquesta substància. S'acostuma a ingerir en forma de pastilla, càpsula, pols o líquid. No s'utilitza com un aliment convencional ni com a element únic de la dieta, ha d'estar etiquetat com a suplement dietètic, i la dosi a administrar no està inclosa com a part de la definició (Zeisel, 1999).

3.1.3. NUTRACÈUTIC

La Nutracèutica Mèdica es dedica a la investigació i desenvolupament de productes que són constituents naturals dels aliments i que demostren aportar beneficis tant en la prevenció com en el tractament de determinades malalties.

El terme nutracèutic va ser definit pel Dr Stephen DeFelice l'any 1989 i prové de la conjunció entre les paraules "nutrició" i "farmacèutic", tot i que el concepte ja venia essent utilitzat des del Paleolític i es trobava en ple desenvolupament en països industrialitzats com per exemple al Japó, on ja utilitzaven els aliments com a medicaments (Kalra, 2003). Un compost nutracèutic es pot definir com un suplement dietètic, presentat en una matriu no

alimentària (pastilles, càpsules, etc.), i es tracta d'una substància natural bioactiva concentrada present als aliments i que, administrada en dosis superiors a l'existent en aquests, té un efecte favorable sobre la salut, major del que podria tenir l'aliment no suplementat. Per tant, es diferencien dels medicaments donat que aquests últims no tenen un origen biològic natural, i es diferencien dels extractes d'herbes, infusions i similars en la concentració dels seus components i que els darrers no han de tenir necessàriament una acció terapèutica (Zeisel, 1999).

La frontera en la que un ingredient alimentari es converteix en un nutracèutic sovint no està ben definida. Hi ha casos en els que un nutrient utilitzat per al tractament d'una malaltia és considerat un fàrmac, mentre que el mateix nutrient, utilitzat per els seus beneficis per la salut, hauria de ser considerat un suplement dietètic o un aliment funcional. Per exemple, aquest enfoc podria tenir lloc davant un agent que ajuda a disminuir el colesterol o a tractar l'aterosclerosi, o aquest mateix agent utilitzat per a prevenir-la.

Alhora, alguns suplementes són considerats fàrmacs quan són ingerits en quantitats que mai podrien ser adquirides en la dieta tot i ser nutrients essencials quan són ingerits en petites quantitats. Aquest és el cas del triptòfan, que és un aminoàcid necessari pel metabolisme i per a la incorporació a proteïnes, però aquest mateix aminoàcid, en dosis altes, augmenta la síntesi de serotonina i, per tant, actua com a fàrmac per fer front a l'insomni (Zeisel, 1999).

Un altre dels punts a aclarir en front a la utilització d'aquest tipus de productes és que pel fet de ser naturals són segurs per a la nostra salut. La teòrica seguretat garantida deriva d'una història d'exposició a l'agent com a part de la dieta normal. Quan la dosi és superior a l'exposició habitual no es pot garantir la seva seguretat, de la mateixa forma que si s'excedeix en la ingesta d'un aliment determinat pot arribar a perjudicar el nostre organisme. Per tant, és evident que s'ha d'exigir una rigorosa avaluació de la seguretat dels nutracèutics ja que, per exemple, existeixen plantes que contenen una gran varietat de productes químics tòxics que les ajuden a sobreviure en el seu hàbitat i defensar-se de bacteris, insectes o herbívors. Així, els fabricants podrien agregar inadvertidament tòxics durant el procés de fabricació. També s'ha de tenir en compte i ser estudiada la forma d'emmagatzematge dels productes naturals.

L'ús de nutracèutics per a obtenir resultats terapèutics favorables minimitzant els efectes secundaris en front la cerca de nous fàrmacs, és un objectiu preferent en moltes companyies farmacèutiques i de biotecnologia (Kalra, 2003).

3.2 VI

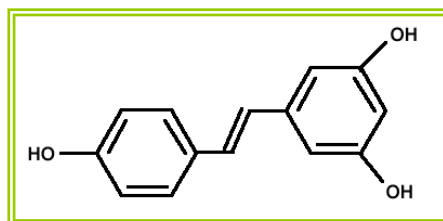
El vi ha format part de la cultura humana des de fa 6000 anys, i al llarg de les seves etapes evolutives l'home l'ha considerat un plaer pel paladar, una ajuda per a la convivència i un element amb propietats que beneficien la salut. D'aquesta forma, diverses begudes han estat utilitzades per a prevenir i tractar diferents malalties. Això és degut a que es fan a base de productes naturals com el raïm, la poma, l'arròs o la civada entre d'altres, i que al ser tractats no perden les seves propietats i en alguns casos fins i tot les incrementen. Avui en dia, nombrosos estudis han confirmat algunes d'aquestes propietats que es coneixen des de fa milers d'anys.



Les propietats dietètiques i terapèutiques del vi són reconegudes actualment per la ciència i són degudes a la seva composició, aportant propietats digestives i presentant vitamina B₂, la qual permet eliminar toxines i potenciar la regeneració hepàtica. També és diurètic, conté una elevada concentració de sal minerals, és un bon bactericida i presenta característiques antisèptiques i anti-al·lèrgiques. Actua en el sistema cardiovascular prevenint l'infart, accelerant la depuració de colesterol ja que reforça l'acció de la vitamina C, estabilitza les fibres de col·lagen i evita la producció d'histamina. Tot i així, com va citar Hipòcrates, pare de la medicina, *"el vi és una cosa meravellosament apropiada per l'home si, tant en salut com en malaltia, és administrada en la seva justa mesura"*.

3.2.1 RESVERATROL

El resveratrol (3,5,4-trihidroxiestilbè) és un compost fenòlic present en plantes com el cep, el cacahuet o el pi. La seva síntesi s'indueix en situacions d'estrès per un trauma o una infecció, i és per això que se l'ha classificat com una fitoalexina, ja que confereix



protecció a la planta. Fins al 1992 el resveratrol no tenia interès en el món de la Bioquímica Clínica, però en aquest any es va detectar la seva presència en el vi. Aquest descobriment va tenir lloc en un moment en el que determinats estudis epidemiològics senyalaven que el consum de vi moderat podia ser un factor capaç de disminuir el risc de malalties coronàries. Va sorgir així el terme *"paradoxa francesa"*, en el que s'observava que a França la taxa de malalties cardiovasculars era sorprenentment més baixa tenint en compte l'elevat consum de greixos d'origen animal existent en aquest país. Es va suggerir que l'element diferencial era l'elevat consum de vi, i posteriorment es va poder comprovar que el resveratrol era possiblement el factor responsable d'aquesta protecció. En aquest sentit, l'acció antioxidant que presenta aquest compost era capaç de disminuir l'oxidació de les lipoproteïnes de baixa

densitat (LDL), les quals estan implicades en la formació de plaques ateroscleròtiques (Rimando *et al.*, 2005). A part dels efectes hipolipidèmics esmentats anteriorment, un dels mecanismes més importants d'actuació d'aquest nutraceutic es centra en la seves propietats antioxidants, que tendeixen a protegir a les cèl·lules dels danys exercits per les espècies reactives de l'oxigen (ROS). Alhora, és capaç d'inhibir l'agregació plaquetària actuant sobre l'enzim ciclooxigenasa (COX), el qual intervé en la síntesi del tromboxà A₂, compost fonamental en el procés d'agregació (Russo *et al.*, 2001). A més, es va veure que podia modular la producció d'òxid nítric a l'endoteli vascular (Klinge *et al.*, 2008).

Altres estudis amb animals experimentals han permès ampliar la llista d'efectes beneficiosos d'aquest compost, ja que s'ha vist que l'administració de resveratrol pot prevenir la formació de tumors induïts químicament, fet que es podria relacionar amb la prevenció de càncer en humans (Jang *et al.*, 1997). El seu efecte antitumoral s'ha pogut veure tant *in vitro* com *in vivo* (Jang *et al.*, 1997 ; Carbó *et al.*, 1999). S'ha proposat com a mecanisme d'actuació la inhibició de COX2 i dels factors NF-κB i AP-1, tots dos implicats en el procés de tumorigènesi i transactivació de gens relacionats amb la inflamació, gens antiapoptòtics i reguladors del cicle cel·lular (Holmes-McNary *et al.*, 2000; Manna *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2002b). A més, altres publicacions han demostrat que el resveratrol bloqueja parcialment el desgast muscular associat a diferents patologies interferint en l'activació de NF-κB. Aquest factor de transcripció sembla estar associat a la inducció de proteòlisi exercida pel factor PIF (factor inductor de proteòlisi) en ratolins portadors del tumor MAC16 (Wyke *et al.*, 2004).

3.3 SOJA

La soja (*Glycine max*) és una llegum de la família de les papilionàcies dins la qual hi trobem plantes tan comuns com les mongetes o els pèsols. És una planta anual d'1'5 m d'alçada aproximadament, i té el seu origen al sud-est asiàtic. Hi ha proves de la seva existència a la Xina des de fa més de 5000 anys i el seu ús com a aliment apareix documentat, en aquest país, des de l'any 2800 AC.



La soja és molt rica en calci, amb un contingut pròxim al de la llet de vaca, per la qual cosa pot aportar totes les propietats d'aquest mineral i, al mateix temps, resulta especialment adequada per aquelles persones que no toleren bé la llet o presenten intolerància a la lactosa. Alhora, és important per les persones que pateixen osteoporosi, com dones en l'etapa de la menopausa reduint els seus símptomes. També posseeix molta riquesa en fòsfor, un mineral molt important per l'organisme ja que contribueix en la formació dels ossos i intervé en la composició de molt enzims, a més de ser important per a la bona salut dels nervis i el bon funcionament del cervell. La soja és també utilitzada pel seu elevat

contingut proteic i en molt casos substituint la proteïna animal, fet que aporta beneficis en la circulació al reduir el colesterol. El seu alt contingut en potassi contraresta al sodi, ajudant a l'eliminació de líquids de l'organisme, el que la fa interessant, juntament amb el contingut de magnesi, en el tractament de la hipertensió. Tanmateix, el potassi és important per al bon manteniment del cor, nervis i ronyons. A més, s'ha demostrat que la soja funciona com un potent anticancerígen. Estudis realitzats al Japó, on és habitual el consum de sopa de soja, van demostrar que la seva ingesta diària reduïa fins a un terç la possibilitat de desenvolupar càncer d'estómac. Com s'ha esmentat anteriorment, el consum de productes de soja ha estat relacionat amb molts beneficis per la salut, associats amb el sistema ossi i cardiovascular i protegint de determinats tipus de càncer, com el càncer de mama, d'úter, de còlon o el de pròstata. Molts d'aquests beneficis venen donats, en gran part, pel contingut d'isoflavones i fitoestrògens que presenta aquesta planta.

3.3.1 ISOFLAVONES DE LA SOJA

Flavonoide (del llatí *flavus*, "groc") és el terme genèric amb el que s'identifica una sèrie de metabòlits secundaris de les plantes. Són sintetitzats a partir d'una molècula de fenilalanina i 3 de malonil-CoA mitjançant el que es coneix com la via biosintètica dels flavonoides, l'estructura base dels quals es cicla gràcies a un enzim isomerasa. L'estructura base, un esquelet C₆-C₃-C₆, pot patir posteriorment moltes modificacions i addició de grups funcionals, fet que converteix als flavonoides en una família formada per molts compostos, encara que tots els productes finals es caracteritzen per ser polifenòlics. Els que conserven el seu esquelet poden classificar-se segons les isomeritzacions i grups funcionals. D'aquesta manera, tenim les xalcones, les flavones, els flavonols, els flavandiols, les antocinines i els tanins condensats. Si l'esquelet pateix algun tipus de modificació ens apareixen també els isoflavonoides o els neoflavonoides.

Entre les funcions dels flavonoides hi trobem la d'oferir a les plantes resistència a la fotooxidació de la llum ultraviolada del sol, a més intervenen en el transport de l'hormona auxina, en la de defensa en front l'herborisme i com a atraients d'animals pol·linitzadors. Els flavonoides han adquirit protagonisme arrel de la seva activitat biològica en l'home, que els consumeix amb els vegetals. Són molt apreciats en la Medicina com a antimicrobians, anticancerígens o disminuint el risc de malalties cardiovasculars, entre d'altres.

L'any 1923, Allen Doisy descriu l'existència de productes derivats de les plantes amb activitat estrogènica, entre els quals hi trobem les isoflavones de la soja. Aquestes són diferents als esteroids endògens humans però amb capacitat d'unir-se als receptors estrogènics. Les més importants són la genisteïna i la deiceïna, i s'han presentat evidències que aquests compostos poden jugar un paper beneficiós en el sistema cardiovascular, contra el càncer, la inflamació, l'obesitat i la diabetis, entre d'altres. Per exemple, estudis d'intervenció nutricional realitzats en animals suggereixen que la ingesta de proteïnes de la

soja associades amb isoflavones milloren el control de la glucosa i la resistència a la insulina (Wagner *et al.*, 2008).

3.3.1.1 GENISTEÏNA

La genisteïna és una de les isoflavones més abundants de la soja i dels seus derivats. Comparteix estructura amb un potent estrogen endogen anomenat 17- β estradiol (Barnes *et al.*, 2000) i per tant té la capacitat d'unir-se als seus receptors però exercint en l'organisme ambdues accions, estrogènica i antiestrogènica, aquesta



última per competència per la unió amb el receptor. També s'ha observat la seva similaritat estructural amb el tamoxifè un antiestrogen sintètic provat com a agent preventiu en dones amb risc de càncer de mama (Dewick, 1994; Dixon *et al.*, 2002).

S'han realitzat múltiples estudis, tant *in vitro* com *in vivo*, que han anat evidenciant els múltiples efectes que la genisteïna pot exercir en el nostre organisme i no tan sols relacionats amb la seva activitat estrogènica anteriorment esmentada. En aquest sentit, s'ha observat que la genisteïna és capaç d'inhibir la topoisomerasa i la proteïna tirosina quinasa (Akiyama *et al.*, 1987). També s'ha observat que és capaç de millorar els paràmetres de neoformació òssia i redueix els indicadors de resorció (Alekel *et al.*, 2000).

Assajos en animals experimentals han mostrat que tant la soja de la dieta com el consum de genisteïna purificada, poden conferir un efecte protector en front a determinats tipus de càncer, com són el càncer de mama, colon i pell (Barnes, 1995; Kazi *et al.*, 2003), així com la capacitat d'inhibir el creixement de diverses línies tumorals humanes (Yu *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2006). S'ha suggerit que els mecanismes pels quals realitza aquests efectes poden ser per inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals (Fotsis *et al.*, 1995; Aggarwal *et al.*, 2006), inhibició de l'angiogènesi (Fotsis *et al.*, 1993), inhibició de la invasió de cèl·lules tumorals i metastasi (Li *et al.*, 1999), i per les seves propietats antioxidants. Altres estudis han mostrat com la genisteïna és capaç d'estimular enzims antioxidants com la glutatió peroxidasa (Wei *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2002). Els efectes de la genisteïna s'han estudiat àmpliament en el càncer de pròstata i de mama. En relació al primer, s'ha observat que la genisteïna és capaç de bloquejar el cicle cel·lular per la disminució de la ciclina B1 i de Cdc25C i per l'increment de p21 *in vitro* (Davis *et al.*, 1998). Altres estudis realitzats en cèl·lules mamàries han mostrat l'efecte apoptòtic de la genisteïna per l'estimulació de la caspasa 3 (Kumi-Diaka *et al.*, 2000) i alhora s'ha vist la inhibició d'NF- κ B a través de la via d'Akt (Li *et al.*, 2002; Sarkar *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2003). A més, tant en cèl·lules mamàries com prostàtiques, s'ha observat la capacitat de la genisteïna per inhibir el proteasoma incidint en l'activitat de la quinasa dependent de ciclina p27, I κ -B α (inhibidor del

factor nuclear NF- κ B) i la proteïna proapoptòtica Bax. Tanmateix, inhibeix l'activitat semblant a la tripsina de la subunitat 20S purificada del proteasoma (Kazi *et al.*, 2003; Landis-Piwowar *et al.*, 2006). A més, aquesta isoflavona pot atenuar la inducció de l'expressió del proteasoma per part de PIF (Smith i Tisdale, 2003).

Estudis epidemiològics suggereixen que una dieta rica en isoflavones contribueix a una disminució en la incidència de malalties cardiovasculars (Hwang *et al.*, 2001). En aquest sentit, la genisteïna sembla regular els lípids plasmàtics i disminuir les LDL (lipoproteïnes de baixa densitat) en dones menopàusiques (MerzDemlow *et al.*, 2000). Recentment s'ha demostrat que la genisteïna pot disminuir el mRNA de la LPL del teixit adipós (Naaz *et al.*, 2003; Heim 2004). A més, pot intervenir en l'adipogènesi i activar PPAR α (Kim *et al.*, 2004) i PPAR γ (Dang *et al.*, 2003). Alhora es va suggerir que la genisteïna podia disminuir l'expressió de PPAR γ i C/EBP α en adipòcits 3T3-L1 per la inhibició de l'activitat de C/EBP β , la qual és necessària per la diferenciació adipogènica (Harmon *et al.*, 2002; Orgaard i Jensen, 2008). A tots aquests estudis relacionats amb l'obesitat, s'hi afegeixen d'altres que demostren una disminució de la síntesi de colesterol i de l'esterificació i l'alliberació de l'apolipoproteïna B (lipoproteïna principal de les partícules d' LDL) en hepatòcits (Borradaile *et al.*, 2002)

La genisteïna és una de les isoflavones més estudiades també per la seva implicació en el sistema immune. S'han realitzat estudis *in vivo* en els que s'ha observat com és capaç de disminuir els elevats nivells de TNF- α induïts per LPS (Zhao *et al.*, 2006). En resultats més recents, s'ha vist la seva capacitat per a potenciar la resposta citotòxica mediada per les cèl·lules NK (*natural killer*) i els limfòcits T, i la producció de citoquines per aquests limfòcits. Alhora també inhibeix la resposta inflamatòria a al·lèrgies (Sakai *et al.*, 2008). La genisteïna a dosis elevades pot inhibir la proliferació de limfòcits T induïda per un mitogen o al·loantigen *in vitro* (Rapaport *et al.*, 1997). Els seus efectes també s'han relacionat amb l'atròfia del timus (Yellayi *et al.*, 2002).

3.4 TE VERD

El te (*Camellia sinensis*) és la base d'una de les begudes més antigues del món, i els seus extractes són un dels agents medicinals utilitzats des de temps ancestrals. És consumit per aproximadament un terç de la població mundial diàriament i és originari del sud de Xina i conreat extensament a l'Àsia i països de l'Àfrica central (Liao, 2001). La medicina tradicional asiàtica coneix les seves virtuts des de fa mil·lennis, però a Occident fa poc més de dues dècades que se l'estudia en profunditat comprovant les seves propietats curatives i preventives. Recentment, molts estudis en humans han suggerit que el te verd possiblement contribueix a la reducció del risc de



malalties cardiovasculars, a la prevenció d'alguns tipus de càncer, al control del pes corporal, a la salut bucal, presenta acció antibacteriana, protegeix la pell en front al sol, incrementa la densitat òssia i té poder neuroprotector (Cabrera *et al.*, 2006). Els principals tipus de te són el te negre i el te verd. Aquest últim és al que se li atribueixen múltiples propietats favorables per a l'organisme, fet que es basa en el seu procés de fabricació. El te negre resulta d'un procés de fermentació de la fulla mentre que el te verd es produeix a partir de fulles fresques, seques i joves de la planta en les quals el procés de fermentació és aturat mitjançant calor que destrueix un enzim oxidant, la polifenol oxidasa. Al no actuar aquest enzim, la planta seca segueix tenint el mateix aspecte, i d'aquí que se'l conegui com a te verd. L'enzim polifenol oxidasa actua sobre els polifenols provocant la seva oxidació i transformant-los en uns compostos amb una coloració marronosa. Ambdós mantenen les seves propietats estimulants, digestives i circulatòries, però les propietats atribuïbles als polifenols, de les que posteriorment se'n farà referència, queden eliminades en el procés de fermentació al que es veu sotmès el te negre. Això fa que, des d'un punt de vista fitoterapèutic, sigui més aconsellable la utilització del te verd (Tijburg *et al.*, 1997; Hodgson *et al.*, 2000).

Les fulles del te verd contenen moltes sals minerals i vitamines, com són seleni, calci, crom, magnesi, manganès, ferro, zinc, fòsfor, potassi, al·lumini, fluor i vitamines A,C,E, B2 i àcid fòlic. També hi trobem aminoàcids com la valina, arginina, asparagina, leucina, etc. A més, conté un 2-4% d'alcaloides dels quals els més abundants són la cafeïna i la teofil·lina, i un 3% de polifenols del tipus flavonoide (antioxidants naturals) que són els que li confereixen el gran efecte medicinal. Els principals flavonoides del te verd són les catequines, a les quals se'ls hi atribueix un 25% del seu pes sec (Balentine *et al.*, 1998).

El té verd generalment no produeix efectes secundaris; els efectes adversos més freqüents són en persones que en consumeixen en grans quantitats, l'insomni, ansietat i altres símptomes provocats pel contingut de cafeïna.

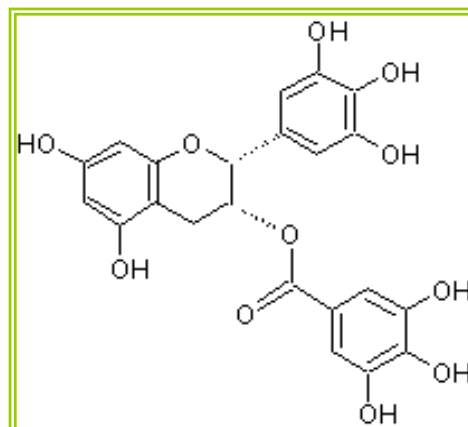
3.4.1 CATEQUINES DEL TE VERD

Les catequines són metabòlits polifenòlics antioxidants de les plantes. Dels polifenols totals presents al te verd, aproximadament un 60% són catequines (Graham, 1992). Les catequines estan formades per 5 àtoms de carboni i contenen dos nuclis fenòlics (dos anells) que estan units per 3 àtoms de carboni que, juntament amb un àtom d'oxigen, formen part d'un tercer anell. Els carbonis de dos dels anells són enantiòmers (+) o (-) (Yamamoto *et al.*, 1997). S'han identificat 8 catequines diferents a l'extreure els polifenols del te amb etilacetat, sent les majoritàries la (-)-galat d'epigalocatequina (EGCG) i la (+)-galocatequina (GC), les quals representen el 65% de les catequines. Una tassa de te conté entre 100-200 mg d'EGCG (Zaveri, 2006). S'han associat al consum de te diferents efectes beneficiosos

sobre la salut, i en particular aquests efectes s'han atribuït a les principals catequines, sent l'EGCG el que presenta una major activitat farmacològica (Stagg *et al.*, 1975).

3.4.1.1 GALAT D'EPICALOCATEQUINA

El galat d'epigalocatequina (EGCG) és considerat l'ingredient actiu principal del te i la catequina més abundant d'aquest i ha estat diana de molts estudis científics amb l'objectiu de testar els seus efectes terapèutics. Entre les seves propietats hi destaca la de presentar acció antioxidant, participant en el segrest d'ions metàl·lics fonamentals per a la formació de radicals lliures de l'oxigen (ROS) i també segrestant anions superòxid i radicals hidroxil que



podrien malmetre el DNA cel·lular i iniciar reaccions de peroxidació. Els peròxids tenen un paper important en la carcinogènesi alterant el DNA, el creixement i la diferenciació cel·lular. Estudis *in vivo* semblen demostrar que el consum d'aquest compost bloqueja parcialment l'activació de carcinògens que involucren el citocrom P450 hepàtic (Argilés i López-Soriano, 1998). L'EGCG, a l'estar atenuant l'acció d'aquests radicals, està prevenint malalties com el càncer de pell, de mama, de pròstata i de pulmó (Mukhart i Ahmad 2000; Yang *et al.*, 2002), malalties cardiovasculars o l'envelliment, juntament amb malalties neurodegeneratives com el Parkinson o l'Alzheimer (Mandel i Youdim, 2004), totes elles relacionades, en part, amb l'acció dels ROS.

Les propietats anticancerígenes del te s'han pogut observar en estudis en models animals, en diferents estadis de la malaltia (inici, promoció i progressió) (Chung *et al.*, 2003). Aquesta polifacètica acció de l'EGCG s'atribueix a la combinació de la seva activitat antioxidant, amb el seu efecte antiproliferatiu i el proapoptòtic (Gouni-Berthold *et al.*, 2004), així com també per la seva acció anti-angiogènica i anti-metastàsica (Adhami *et al.*, 2003; Fassina *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2008). En cèl·lules tumorals de mama i de pròstata, el tractament amb EGCG pot provocar l'aturada del cicle cel·lular en fase G1 i la inhibició de quinases dependents de ciclines per la inducció de factors com p27 o p21 (Park i Dong, 2003; Gupta *et al.*, 2004). Altres estudis van mostrar que, a més, l'EGCG era capaç d'inhibir l'activació d'NF-κB el qual, en resposta als ROS, activa l'expressió de gens proinflamatoris i antiapoptòtics (Schoonbroodt *et al.*, 2000).

En estadis avançats del tumor, les ciclooxigenases-1 i 2 (COX-1 i COX-2), involucrades en la progressió del tumor, són regulades per l'endotelina, doncs s'ha pogut observar que en cèl·lules tumorals d'ovari, l'expressió del receptor per aquesta proteïna és inhibida per l'acció de l'EGCG (Spinella *et al.*, 2006).

A més, aquesta catequina té la propietat d'inhibir l'activitat del proteasoma, permetent l'acumulació d'I κ -B α , i proteïnes proapoptòtiques com ara Bax (Nam *et al.*, 2001). Concretament, exerceix el seu efecte sobre la subunitat 20S del proteasoma inhibint la seva activitat semblant a la quimiotripsina, fet observat en subunitats 20S aïllades i en cèl·lules humanes (Nam *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2004).

Com s'ha esmentat anteriorment, el consum de te ha estat relacionat amb una disminució de la incidència de malalties cardiovasculars (Sano *et al.*, 2004). En aquest sentit, cal destacar la capacitat de l'EGCG per a disminuir la susceptibilitat de les LDL a ser oxidades, tret important en el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques (Miura *et al.*, 2000; Kalkan *et al.*, 2004), la inhibició de la lipooxigenasa endotelial (Ho *et al.*, 1992) i la prevenció de la fragmentació de l'Apo B en LDL aïllades (Hashimoto *et al.*, 2000). Alhora, s'ha posat de manifest la capacitat de l'EGCG *in vivo* per a disminuir l'absorció intestinal de colesterol sense veure's afectades les HDL, així com per disminuir els seus nivells plasmàtics (Ikeda *et al.*, 1992; Raederstorff *et al.*, 2003). Una fase fonamental en el desenvolupament d'ateromes és l'adhesió de monòcits a la paret endotelial i la seva posterior infiltració i diferenciació a macròfags (Sánchez-Muniz *et al.*, 2001). En cultius de cèl·lules endotelials tractades amb dosis de 10-100 μ M d'EGCG, aquest és capaç d'inhibir, de forma dosi-dependent, l'expressió de molècules d'adhesió. A més, s'ha pogut observar com l'EGCG provoca una disminució de l'agregació plaquetària disminuint l'entrada de calci a l'interior de la plaqueta (Kang *et al.*, 1999).

Una altra de les seves propietats és la d'exercir un control del pes corporal, i per tant aportant beneficis en trastorns com l'obesitat, el síndrome metabòlic o la diabetis (Bose *et al.*, 2008). L'EGCG té la capacitat d'incrementar la termogènesi i l'oxidació de greixos. S'ha observat que aquesta catequina, *in vitro*, inhibeix la catecol o-metiltransferasa, enzim responsable de la degradació de la noradrenalina, fet que provoca un augment en el temps d'actuació d'aquest neurotransmissor en els adipòcits marrons (Borchardt *et al.*, 1975). Alhora s'ha observat en preadipòcits murins que l'EGCG és capaç d'inhibir la seva proliferació i l'acumulació de TG durant la seva diferenciació (Kao *et al.*, 2000a), a més d'inhibir l'acetil CoA carboxilasa, enzim que intervé en la síntesi d'AG (Watanabe *et al.*, 1998). En adipòcits tractats amb l'EGCG s'ha observat un increment en la sensibilitat a la insulina (Anderson i Polansky 2002; Wu *et al.*, 2004) i un possible potenciament de la translocació a la membrana de GLUT4 estimulant així la captació de glucosa (Ueda *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008). També s'ha considerat que els polifenols del te exerceixen efectes inhibitoris sobre gens codificants per PPAR γ , CD36 entre d'altres, i estimula PPAR α i LDL-R en cèl·lules a nivell transcripcional (Kaul *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2004).

En models de distròfia muscular el tractament amb EGCG proporciona un cert grau de protecció per part d'aquest compost en el múscul en front a la necrosi massiva i alhora l'estimulació del múscul cap a un fenotip més resistent (Dorchies *et al.*, 2006).

Donat que també s'ha demostrat un efecte antibacterià, antivíric (Stapleton *et al.*, 2004) i certa activitat antiinflamatòria (Dona *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008), últimament també s'ha descrit l'efecte d'aquesta catequina en malalties infeccioses com la SIDA, on s'ha observat una disminució de la replicació del virus HIV-1. Tot i així, en aquest camp queda un llarg camí per tal d'esbrinar el seu possible efecte terapèutic (Zaveri, 2006; Nance i Shearer, 2003).

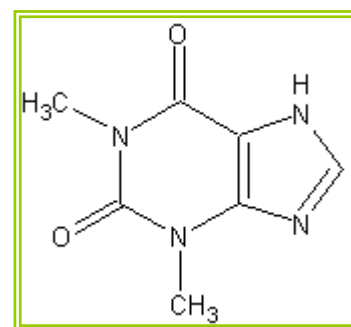
Finalment, també cal esmentar els possibles efectes adversos derivats del consum de les catequines que, tot i no ser nombrosos, s'han pogut veure. Així com injeccions intraperitoneals d'EGCG produeixen canvis significatius en determinats paràmetres endocrins com, per exemple, la disminució de testosterona en mascles o la disminució de 2-estradiol en femelles, i la possible variació en el pes del òrgans sexuals (Kao *et al.*, 2000b).

3.4.2 ALCALOIDES DEL TE VERD

S'anomenen alcaloides a aquells metabòlits secundaris sintetitzats per les plantes, generalment, a partir d'aminoàcids i, per tant, estan nitrogenats. La seva estructura química és variada i posseeixen una acció fisiològica important en els animals tot i utilitzar dosis baixes, amb efectes psicoactius, fet que fa que siguin molt utilitzats en medicina per a tractar problemes de la ment i calmar el dolor. Es considera que un alcaloide és, per definició, un compost químic amb un nitrogen heterocíclic procedent del metabolisme dels aminoàcids. Generalment, actuen sobre el sistema nerviós central (SNC), però en alguns casos també afecten al sistema nerviós simpàtic i parasimpàtic. L'activitat biològica dels alcaloides és variable; la més estudiada és l'acció euforitzant, tot i que d'altres poden tenir efecte depressor en el SNC (Azcón-Bieto *et al.*, 2000).

3.4.2.1 TEOFIL·LINA

Un dels alcaloides més estudiats en el camp de la nutraceutica és la teofil·lina, actualment comercialitzada com a tractament per l'asma bronquial i per a l'estimulació cardíaca. La teofil·lina (1,3-dimetilxantina) és un alcaloide de la família de les metilxantines, la mateixa a la qual pertanyen la cafeïna i la teobromina (Pareja *et al.*, 2005). Es troba al te i a la xocolata de forma natural. El cacao (*Theobroma cacao*) conté una gran



varietat de components amb efectes estimulants per a l'organisme: la xocolata negra conté de mitjana 460 mg/100 g de teobromina i 65 mg/ 100g de cafeïna, mentre que la teofil·lina està present en quantitats menors. Els seus efectes principals són la dilatació general dels vasos perifèrics, la broncodilatació, la relaxació de la musculatura llisa bronquial i els vasos pulmonars per acció directa sobre aquests en els receptors β dels pulmons, estimulació a

nivell de l'escorça cerebral, cardíaca i del múscul esquelètic, inhibició de l'alliberació de mediadors a partir de mastòcits i altres cèl·lules inflamatòries, enfortiment de la contracció del diafragma i estimulació de la funció endocrina i exocrina, per exemple, augmentant la secreció d'àcid clorhídric (Nyska *et al.*, 1998).

El mecanisme d'acció de la teofil·lina no és conegut completament. Es caracteritza per ser un inhibidor de fosfodiesterases (PDE) no selectiu, possiblement explicant així el seu efecte broncodilatador provocant un augment d'AMPc inhibint les PDE 3 i 4 i augmentant el GMPc amb la inhibició de PDE5 (Rabe *et al.*, 1995). Tal i com succeeix en resposta a l'adenilatciclasa, la teofil·lina provoca un augment de l'AMPc intracel·lular, activant la PKA i desencadenant un seguit de reaccions enzimàtiques que poden tenir com a conseqüència la secreció d'hormones esteroidees com el 17β -estradiol (Pareja *et al.*, 2005). L'AMPc també és un important regulador intracel·lular que funciona com a mediador de l'activitat per a un elevat nombre d'hormones, com la l'hormona adrenocorticotròpica (ACTH), el glucagó o l'adrenalina. Per altra banda, i també relacionat amb el seu efecte broncodilatador, s'ha observat que la teofil·lina altera la concentració de calci i inhibeix l'acció de les prostaglandines en la musculatura llisa (Barnes, 2005), bloqueja els receptors d'adenosina i inhibeix l'alliberació d'histamina i leucotriens en els mastòcits (Pauwels *et al.*, 1995). L'activitat de les cèl·lules nervioses està regulada, entre d'altres factors, per l'adenosina; quan aquesta s'uneix als seus receptors, redueix l'activitat de les cèl·lules diana, acció que no exerceix la teofil·lina. Aquest alcaloide estimula el sistema nerviós central actuant directament sobre el cervell, sense disminuir l'activitat de les cèl·lules diana, fet que comporta un augment de l'activitat nerviosa i provoca una emissió d'adrenalina i els seus conseqüents efectes, com l'augment del ritme cardíac, l'augment de la contracció cardíaca, la canalització dels fluxos sanguinis cap als músculs en detriment dels òrgans perifèrics, i la producció de glucosa hepàtica (Pauwels *et al.*, 1995).

La teofil·lina ja fa anys que és utilitzada com a tractament per a l'asma i la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) juntament amb els glucocorticoides i els β_2 -agonistes, però altres estudis han evidenciat, alhora, un efecte antiinflamatori i immunomodulador d'aquest alcaloide (Barr *et al.*, 2003; Barnes, 2003). En pacients amb MPOC, baixes dosis de teofil·lina proporcionen efectes antiinflamatoris reduint el nombre total de neutròfils (Culpitt *et al.*, 2002). A més, també es va observar que era capaç de disminuir el TNF- α (Semmler *et al.*, 1993; Reuter *et al.*, 1999), citoquina que es troba elevada en aquest tipus de pacients (Semmler *et al.*, 1993; Di Francia *et al.*, 1994; Barnes, 2005). Altres estudis mostren un augment en l'alliberació de la citoquina antiinflamatòria IL-10, efecte possiblement mediat per a la inhibició de les PDE (Mascali *et al.*, 1996). També s'ha observat la seva capacitat per inhibir la fosfoinositol-3 quinasa δ , un subtipus relacionat amb la resposta a l'estrès oxidatiu (Foukas *et al.*, 2002). Entre totes les propietats que s'han anat estudiant d'aquest compost cal destacar la capacitat de la teofil·lina per a prevenir la

translocació de NF- κ B al nucli, reduint així l'expressió de gens proinflamatoris en pacients amb MPOC (Tomita *et al.*, 1999). La inhibició de NF- κ B sembla ser deguda a un efecte protector en front a la degradació de la proteïna I κ B- α , la qual evita la translocació d'aquest factor nuclear (Ichiyama *et al.*, 2001). En els macròfags alveolars i bronquials l'activitat de la histona desacetilasa es troba disminuïda, provocant un increment de la resposta inflamatòria mediada per NF- κ B, doncs davant aquesta situació s'ha pogut observar un efecte més d'aquest compost, potenciant l'activitat d'aquest enzim sota condicions d'estrès oxidatiu (Ito *et al.*, 2002; Cosio *et al.*, 2004). Altres estudis han mostrat que la teofil·lina promou l'apoptosi *in vitro* de neutròfils (Yasui *et al.*, 1997), en eosinòfils s'ha relacionat amb una reducció de la proteïna antiapopòtica Bcl-2 (Chung *et al.*, 2000) i l'apoptosi de limfòcits T relacionat amb la inhibició de PDE (Ohta *et al.*, 1999). També és capaç de millorar la sensibilitat als corticosteroides en pacients amb MPOC (Barnes, 2005). Estudis recents en eosinòfils humans aïllats han demostrat que la teofil·lina és capaç de potenciar tant els nivells de mRNA com de proteïna del PPAR γ , suggerint un possible paper d'aquest en l'efecte antiinflamatori de la teofil·lina (Usami *et al.*, 2006).

Val a dir que s'han estudiat, i cal continuar-ho fent, els efectes adversos d'aquest compost, ja que els seus efectes beneficiosos estan estretament relacionats amb la dosi i alguns d'ells requereixen altes dosis de teofil·lina. Si s'excedeix en la dosi pot provocar efectes adversos com nàusees, vòmits, diarrea, dolor epigàstric nerviosisme o cefalea (Pareja *et al.*, 2005; Barnes, 2005).

3.5 ALL

L'all (*Allium sativum*), de la família de les Liliàcies, és una de les plantes medicinals més estudiades i de la que s'ha demostrat científicament la capacitat d'aportar efectes beneficiosos per la nostra salut. Es coneix des de temps remots, sent utilitzat per un gran nombre de cultures com l'egípcia, la grega, la romana o la hindú. Sembla ser que el seu origen s'ubica a l'Àsia central, des d'on es va estendre àmpliament (Block, 1985). Els seus components principals són aigua, carbohidrats i greixos. Alhora conté aminoàcids (àcid glutàmic, arginina, àcid aspàrtic, leucina, lisina, valina, etc.), vitamines (principalment B6 i C), minerals i olis essencials rics en components sulfurosos (Argilés i López-Soriano, 1998).



Al llarg de les últimes dècades, s'han realitzat molts estudis en els que s'ha demostrat l'ampli ventall d'efectes beneficiosos que pot proporcionar la ingesta d'all, entre els quals hi destaquen la disminució del risc a patir malalties cardiovasculars per la seva capacitat per disminuir el colesterol en sang, la inhibició de l'agregació plaquetària o l'augment de la lisis del fibrinogen (Agarwal, 1996; Steiner *et al.*, 1998; Steiner *et al.*, 2001). També existeixen clares evidències en la disminució del risc a patir determinats tipus de

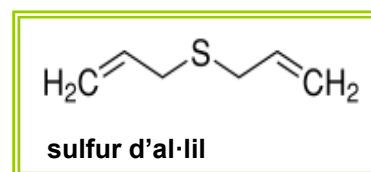
càncer inhibint l'activació de carcinògens i/o la destoxicació d'aquests (Milner, 2001). S'ha pogut observar que el consum d'all està inversament relacionat amb la incidència de càncer de colon (Steinmetz *et al.*, 1994), d'estómac (You *et al.*, 1989) i el de pròstata (Hsing *et al.*, 2002). L'all també potencia el sistema immunològic amb l'activació de macròfags i l'estimulació de la proliferació de cèl·lules T (Lau *et al.*, 1991), pot incidir en els nivells de glucosa sanguínia (Sheela *et al.*, 1995), i alhora ofereix protecció en front infeccions bacterianes, víriques o fúngiques (Guo *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 2001; Davis, 2005). Per últim, esmentar els seus efectes neuroprotectors en front l'envelliment (Nishiyama *et al.*, 1997; Borek, 2006).

Molts estudis consideren que, pels efectes anteriorment esmentats així com per les seves propietats antioxidants (Borek, 2001; Khanum *et al.*, 2004), l'all seria adequat com a preventiu i/o en el tractament d'una sèrie de malalties prevalents en la nostra societat com són el càncer, l'obesitat, la diabetis i l'aterosclerosi, entre d'altres.

Degut a totes aquestes característiques, al llarg dels anys s'han anat generant una sèrie de productes basats en l'all (extractes, en pols, macerat, olis, etc.), cada un d'ells presentant diferents proporcions dels seus components, que després de molts anys de recerca, se'ls hi ha anat atribuint els efectes terapèutics d'aquesta planta. Alhora, i després d'anar esbrinant sobre quins compostos recauen les propietats de l'all, s'ha vist el paper primordial dels seus components organosulfurats, els quals representen un 1% del seu pes sec (Jones *et al.*, 2004). Conseqüentment, la purificació d'aquests compostos i l'estudi del seu potencial terapèutic ha estat objectiu de molts estudis científics.

3.5.1 COMPONENTS ORGANOSULFORATS DE L'ALL

Les propietats medicinals de l'all es relacionen amb tota una sèrie de compostos rics en sofre (organosulfurats) presents en aquesta planta, que poden ser tant hidrosolubles com liposolubles. El component sulfurat primari és el γ -



glutamil-S-alquenil-L-cisteïna, el qual pot ser hidrolitzat donant lloc a l'al·liina (sulfòxid de S-alquenil-L-cisteïna). L'al·liina s'acumula durant el procés d'emmagatzematge dels bulbs a baixes temperatures, i és el precursor dels components organosulfurats (OSCs). Durant el processat de l'all, s'allibera l'enzim al·linasa, que actua sobre l'al·liina donant lloc a la formació d'al·licina. Aquest és un compost molt inestable que es descomposarà i donarà lloc als OSCs liposolubles, entre els qual hi destaquen el sulfur d'al·li (DAS), el disulfur d'al·li (DADS), el trisulfur d'al·li (DATS) i l'ajoeno (Block, 1985). Al mateix temps, del compost primari γ -glutamil-S-alquenil-L-cisteïna apareixen els components hidrosolubles, com la S-al·li-cisteïna (SAC) i la S-al·li-mercaptopcisteïna (SAMC), generalment després d'una fermentació alcohòlica (Knowles *et al.*, 2001).

La forma en la que es prepara i s'ingereix l'all és important a l'hora d'obtenir els seus efectes beneficiosos. L'all cru i cuit tenen diferents propietats medicinals, és a dir, alguns dels efectes de l'all es produeixen amb una major efectivitat ingerint l'all cru, mentre que d'altres s'obtenen de l'all cuit. Per exemple, l'al·licina no està present en l'all sinó que es forma quan l'al·liïna i l'al·linasa es combinen, fet que es produeix quan l'all és triturat, o en el cas de suplementos d'all, durant el procés digestiu, l'al·licina només perdura uns minuts, així que és important ingerir-lo ràpidament després de ser tallat. Al ser cuinat, aquest compost es destrueix (Argilés i López-Soriano, 1998).

Com s'ha esmentat anteriorment, la majoria dels efectes beneficiosos que aporta l'all recauen en els OSCs, a partir dels quals s'han realitzat diferents estudis. S'ha observat que, tant els compostos hidrosolubles com liposolubles, poden influenciar en nombrosos esdeveniments moleculars relacionats amb el càncer, com són la proliferació i diferenciació cel·lular, l'angiogènesi, la inhibició de la mutagènesi o l'eliminació de radicals lliures (Milner, 2006). També s'ha observat que els seus compostos hidrosolubles tenen un fort poder antioxidant, sent capaços d'augmentar l'activitat de la superòxid dismutasa, la catalasa o la glutatió peroxidasa, i que inhibeixen la peroxidació lipídica. Altres observacions indiquen una disminució del risc de patir malalties cardiovasculars, ja que s'ha vist una inhibició de la lipogènesi hepàtica així com de l'enzim HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa) provocant una disminució del colesterol (Liu *et al.*, 2001). Tanmateix, poden augmentar la microcirculació evitant, per exemple, accidents vasculars en casos de diabetis (Borek, 2006). Estudis realitzats en cèl·lules T humanes van mostrar la capacitat del SAC per inhibir el TNF- α i l'activitat d'NF- κ B (Geng *et al.*, 1997).

Per altra banda, hi trobem el DAS i tots els seus derivats, que són els que li confereixen a l'all tant la seva olor com el seu gust tan característic. En base a aquests components liposolubles de l'all s'han realitzat nombrosos experiments que mostren un ampli ventall d'efectes. En estudis en rates i ratolins que presentaven una diabetis induïda químicament, l'administració d'oli d'all va induir una disminució de la glucosa en sang (Farva *et al.*, 1986; Swanston-Flatt *et al.*, 1990). A més, es va veure una disminució de la fosfatasa àcida, de la fosfatasa alcalina, de l'aspartat transferasa i de l'amilasa sèrica (Ohaeri, 2001). Per aquest motiu, recentment ha estat revisat el paper de l'all com a agent antidiabètic (Liu *et al.*, 2007).

El DAS és un dels nutracèutics més estudiats de l'all pel que fa a tumorigènesi. S'ha estudiat l'efecte antiproliferatiu del DAS i els seus derivats, observant-se que aquests eren més potents que els components hidrosolubles. Estudis *in vitro* mostren la capacitat de suprimir la proliferació de cèl·lules tumorals canines (Sundaram i Milner 1993), resultats que es repeteixen pel DAS i els seus derivats en cèl·lules humanes de càncer de colon, pell i pulmó (Knowles *et al.*, 2001). Per altra banda, en models animals de càncer de mama es va observar la seva capacitat per atenuar l'augment de ROS durant el desenvolupament

d'aquesta patologia (Green *et al.*, 2003). Un dels mecanismes que s'ha proposat pel qual els OSCs disminueixen el risc de càncer és per la disminució de l'activitat del citocrom P450E1, el qual és responsable de l'activació de diferents carcinògens, fet que s'ha pogut observar en models animals de càncer de colon (Park *et al.*, 2002; Wargovich, 2006) i per l'activació del metabolisme xenobiòtic destoxificant (Zhang *et al.*, 2006). En diferents línies cel·lulars tumorals humanes, el tractament amb OSCs liposolubles ha provocat l'aturada del cicle cel·lular o l'apoptosi. S'han descrit diferents mecanismes pels quals podrien realitzar aquests efectes com per exemple, mitjançant un augment de Bax i una disminució de Bcl-2 (Thomson *et al.*, 2003), o un augment de p53 (Nakagawa *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2004), o per una disminució dels complex cdk-1-ciclina B1 (Knowles *et al.*, 2003). Per altra banda, també podria ser degut a un increment de l'acetilació d'histones (H₃, H₄) o el fet que influència en l'homeòstasi del calci (Rizzuto *et al.*, 2003). Totes aquestes accions han anat sent descrites al llarg de molts estudis científics.

Altres efectes clau que caracteritzen a aquests compostos liposolubles són les seves propietats antiinflamatòries i antioxidants ja anteriorment esmentades, i que diferents estudis han anat corroborant. Entre aquests hi trobem la capacitat per inhibir l'alliberació de citoquines proinflamatòries i inhibir l'activitat d'NF-κB. S'ha observat com DADS i DATS disminueixen la producció de d'òxid nítric induïda per LPS en macròfags, acció que sembla ser que exerceixen mitjançant la inhibició de l'expressió de l'òxid nítric sintasa i de la ciclooxygenasa-2 (Chang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006).

A més, l'administració de DAS en hepatòcits podria induir la hemooxygenasa-1 (OH-1), la qual juga un paper important en situació d'estrès oxidatiu a través de la via de les MAPK (Gong *et al.*, 2004). El DAS també estimula l'activitat de la glutatió peroxidasa (Pinto *et al.*, 2001). Addicionalment, aquests compostos són capaços d'activar enzims destoxificants com la glutatió-S-transferasa (GST) i la quinona reductasa (Sparnins *et al.*, 1986; Guyonnet *et al.*, 2001). Alhora estimulen la síntesi de glutatió, que és substrat de la GST actuant com a antioxidant intracel·lular (Dickinson *et al.*, 2002).

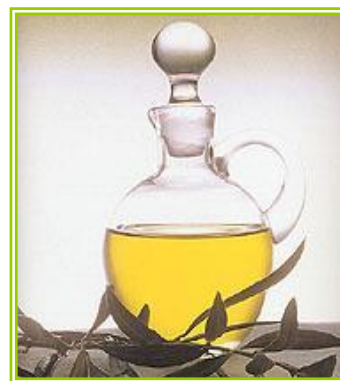
En estudis en humans, l'administració d'oli d'all pot donar lloc a la millora de problemes de coagulació, donat que s'ha vist que el DAS té capacitat antitrombòtica, disminueix la formació de tromboxans, posseeix activitat fibrinolítica, i evita la formació d'agregacions plaquetàries (Laurence *et al.*, 1989; Banerjee *et al.*, 2002a).

3.6 ÀCIDS GRASSOS ESSENCIALS

El consum d'olis i greixos i la seva possible relació amb diferents tipus de patologies han estat àmpliament estudiats. En particular, s'ha vist que el consum d'aquests nutrients manté una estreta relació amb malalties cardiovasculars i amb el càncer. Els greixos es diferencien entre si per la seva composició en àcids grassos (AG). En aquest sentit, existeixen AG saturats, monoinsaturats i poliinsaturats. Els primers són molt abundants en

els greixos d'origen animal (excepte al peix), mentre que els mono i poliinsaturats són principalment d'origen vegetal.

S'anomenen àcids grassos essencials (AGE) aquells AG que el nostre organisme no pot sintetitzar i que, per tant, s'han d'obtenir de la dieta. Molts mamífers, entre ells l'home, són incapaços de sintetitzar determinats AG poliinsaturats amb dobles enllaços prop de l'extrem metil de la molècula (Nettleton, 1991). Els AGE poden ser precursors d'eicosanoids, els quals



són un grup de compostos que afecten a diferents processos fisiològics com la coagulació o agregació plaquetària, la contracció dels vasos sanguinis o el manteniment de la pell, i que poden intervenir en el metabolisme del colesterol. Alhora, poden tenir activitat per ells mateixos, essent importants constituents de la membrana plasmàtica, conferint-li fluïdesa i influenciant en el comportament d'aquesta en front la unió amb enzims i receptors. Poden tenir acció antibiòtica (Sun *et al.*, 2003), estimulen la síntesi d'òxid nítric inhibint l'enzim convertidor d'angiotensina (Okuda *et al.*, 1997) i poden regular la producció de citoquines per les cèl·lules T (Kumar *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1994).

Existeixen dos tipus d'AGE: els de la sèrie ω -6, que deriven de l'àcid linoleic, i els de la sèrie ω -3, derivats de l'àcid α -linolènic. Aquests s'han d'obtenir de la dieta, i un cop interioritzats es poden convertir en altres tipus d'AG poliinsaturats com l'àcid araquidònic (AA), l'àcid eicosapentaenoic (EPA) i l'àcid docosahexaenoic (DHA). Els metabòlits de cadena llarga que s'obtenen són importants a nivell cerebral, per la retina, el fetge, els ronyons, les glàndules adrenals, entre d'altres (Das, 2006). La relació entre la quantitat d'AG ω -3 i d' ω -6 presents a la membrana pot ser modulada per la dieta, i aquesta relació influeix en la neurotransmissió i en la formació de prostaglandines, ambdós processos vitals per a un bon funcionament cerebral (Haag, 2003) (Figura 5).

Els AG poliinsaturats, per ells mateixos o per a tota la sèrie de compostos biològicament actius que en deriven, poden estar relacionats tant en processos fisiològics com patològics.

3.6.1 ÀCIDS GRASSOS ω -6 : ÀCID LINOLEIC

Els AG ω -6 es troben en llavors, verdures, fruits secs, fruites i olis de girasol, soja o carbassa (Ollis *et al.*, 1999; Das, 2002). El precursor d'aquesta sèrie d'AG és l'àcid linoleic. Aquest és metabolitzat donant lloc a la formació de determinades prostaglandines i a l'àcid araquidònic, que alhora deriva en altres compostos que poden ser tant prostaglandines com leucotriens o tromboxans, alguns dels quals promouen agregació plaquetària, trombosis i reaccions inflamatòries. La major part de les seves activitats biològiques s'han relacionat amb el metabolisme energètic i amb una reducció de la gana. D'aquesta forma, redueix la ingesta d'aliments per una sensació de sacietat, facilita la pèrdua de pes i redueix el

sobrepès i l'obesitat alentint, per exemple, el desenvolupament d'aterosclerosi (Gaullier *et al.*, 2004).

A part de les seves funcions fisiològiques, s'ha de tenir en compte que, quan la dieta és rica en AG ω -6, l'àcid araquidònic i els seus potents eicosanoids es produeixen significativament, conduint a una sobreactivació del sistema immunològic que podria contribuir l'aparició de malalties cròniques com el càncer, malalties coronàries i diabetis entre d'altres. Fins i tot hi ha estudis en els que s'ha observat que l'àcid linoleic és capaç de promoure el creixement de cèl·lules tumorals, estimulant directament la mitosi o inhibint l'apoptosi (Cravo *et al.*, 2000).

3.6.2 ÀCIDS GRASSOS ω -3: ÀCID EICOSAPENTAENOIC

Les principals fonts d' AG de la sèrie dels ω -3 són el peix blau, l'oli de llinça, llavors (soja, mostaçà, carbassa), fruits secs (nous, pipes), hortalisses de fulla verda i cereals (Ollis *et al.*, 1999; Das, 2002).

En l'organisme, l'àcid α -linolènic, precursor dels ω -3, pot ser metabolitzat de tres maneres diferents: com a font d'energia a través de la seva β -oxidació, emmagatzemant-se en forma de triglicèrids i fosfolípids de la membrana plasmàtica, i per últim, convertint-se en AG ω -3 de cadena llarga, d'entre els quals hi destaca l'àcid eicosapentaenoic (EPA) i l'àcid docosahexaenoic (DHA). Els AG ω -3 tenen diferents efectes biològics que els fa útils en la prevenció i tractament de determinades malalties o condicions cròniques com la diabetis de tipus II, malalties del fetge, artritis reumàtica, pressió sanguínia elevada, malalties coronàries i determinats tipus de càncer. Per exemple, els AG presents en l'oli de peix han tingut una àmplia i controvertida aplicació en medicina, des de l'alleujament de malalties dermatològiques, passant per algunes de les malalties anteriorment esmentades, inflamacions intestinals, patologies renals o problemes cardiovasculars (Argilés i López-Soriano, 1998).

Bioquímicament, els efectes beneficiosos d'aquest conjunt d'AG es poden explicar si considerem la seva facilitat per a competir com a substrats amb els AG ω -6 en la síntesi d'eicosanoids, formats enzimàticament per ciclooxigenases i lipooxigenases. Cada vegada és més clar que els AG ω -3, al competir amb els AG ω -6, disminueixen la formació d'alguns eicosanoids relacionats amb la formació de lesions artrítiques i trombòtiques, desplaçant l'àcid araquidònic de la membrana cel·lular i disminuint la formació de molècules proinflamatòries (Das, 2006; Calder, 2008).

L'EPA és precursor d'alguns eicosanoids que, com s'ha esmentat anteriorment, regulen, entre d'altres, processos inflamatoris. La seva alliberació és una resposta normal a les lesions i la seva acció es requereix per a la reparació del teixit malmès. No obstant, no tots els eicosanoids són iguals. Els que provenen de l'EPA tendeixen a no promoure la inflamació. Aquesta és una de les principals raons per la qual els experts en nutrició

recomanen el consum d'AG ω -3, ja que dietes riques en aquest tipus d'AG poliinsaturats són beneficioses per l'organisme, disminuint la inflamació i reduint així el risc de patir malalties cròniques. A més, l'EPA i el DHA poden ser metabolitzats en uns compostos antiinflamatoris anomenats resolvines, rebent aquest nom degut a que es localitzen en llocs en recuperació d'inflamacions. Un balanç adequat entre els diferents derivats dels AG poliinsaturats poden determinar el progrés i finalització d'una determinada patologia (Das, 2006).

L'EPA ha estat en el punt de mira de molts estudis com a potencial agent terapèutic, ja que s'han anat evidenciant numerosos efectes beneficiosos després de l'administració d'aquest compost. S'ha observat *in vivo* que els AG ω -3 tenen un efecte moderador en front al desenvolupament de resistència a la insulina després d'una dieta rica en greixos. Diferents estudis han suggerit que aquest efecte es basa en la capacitat d'aquests AG per evitar la disminució de la PI3 quinasa i atenuar la disminució de la translocació del transportador GLUT4 a la membrana de les cèl·lules musculars. També s'ha vist que inhibeix la disminució de l'expressió de GLUT4 en teixit adipós i que, alhora, disminueix l'activitat i l'expressió de l'enzim glucosa-6-fosfatasa del fetge, disminuint així la producció de glucosa hepàtica i augmentant la captació de glucosa per part del múscul i del teixit adipós. En relació a la protecció d'accidents cardiovasculars, també esmentar que entre els efectes d'aquest AG ω -3 hi trobem el de regular les HDL, la peroxidació lipídica i els enzims antioxidants (Kesavulu *et al.*, 2002).

Estudis en l'àrea del càncer i de patologies associades, també han confirmat la capacitat dels AG ω -3 (concretament de l'EPA), d'aportar beneficis per a l'organisme. Alguns estudis han mostrat una disminució de la progressió del tumor així com una disminució de la pèrdua de pes deguda al creixement d'aquest. A més, s'ha pogut observar un retard en el desenvolupament d'anorèxia, tret característic d'aquests tipus de pacients, revertint la pèrdua de pes (Ramos *et al.*, 2004). En un model de sarcoma en rata es va poder observar la influència de l'EPA sobre determinats senyals hipotalàmics relacionats amb la ingesta, com un augment del NPY (neuropèptid Y), una disminució de l'hormona estimuladora de melanòcits (α -MSH), com també una disminució dels receptors de la serotonina, donant lloc a un augment de la ingesta (Goncalves *et al.*, 2006). Alhora, es va veure que l'EPA era capaç d'interferir en la síntesi de citoquines proinflamàtores i en la producció de derivats de l'àcid araquidònic (Calder, 2002). S'ha vist com en pacients amb caquèxia associada al càncer als que se'ls administrava com a complement nutricional EPA els hi aportava efectes favorables interferint en múltiples mecanismes implicats en aquesta síndrome, revertint-la fins al punt de millorar la supervivència del pacient (Argilés, 2005). En el context de la caquèxia també s'ha vist una atenuació de l'atròfia muscular per una reducció de l'activitat del sistema proteolític dependent d'ubiquitina (Whitehouse *et al.*, 2007) i una disminució de l'acció de PIF a través de la inhibició de la fosfolipasa A_2 , fet que evita l'alliberament d'àcid araquidònic el qual, en última instància, és capaç d'activar NF- κ B mitjançant la degradació

de κ -B α (Smith *et al.*, 1999; Whitehouse *et al.*, 2003). En aquest mateix àmbit, es va veure la capacitat dels AG ω -3, després de l'administració de càpsules d'oli de peix, per inhibir la lipòlisi i la degradació proteica associada a models de caquèxia (Tisdale, 2001; Argilés *et al.*, 2001),, alhora que també era capaç de disminuir la fatiga i les proteïnes de fase aguda, fets relacionats amb la disminució de la IL-6 (Wigmore *et al.*, 1997).

En estudis en cultius cel·lulars es van obtenir resultats que indicaven que l'EPA era capaç de disminuir la producció de IL-1 β i del TNF- α dels monòcits i la producció de IL-6 i IL-8 de les cèl·lules endotelials (Khalfoun *et al.*, 1997; Babcock *et al.*, 2002).

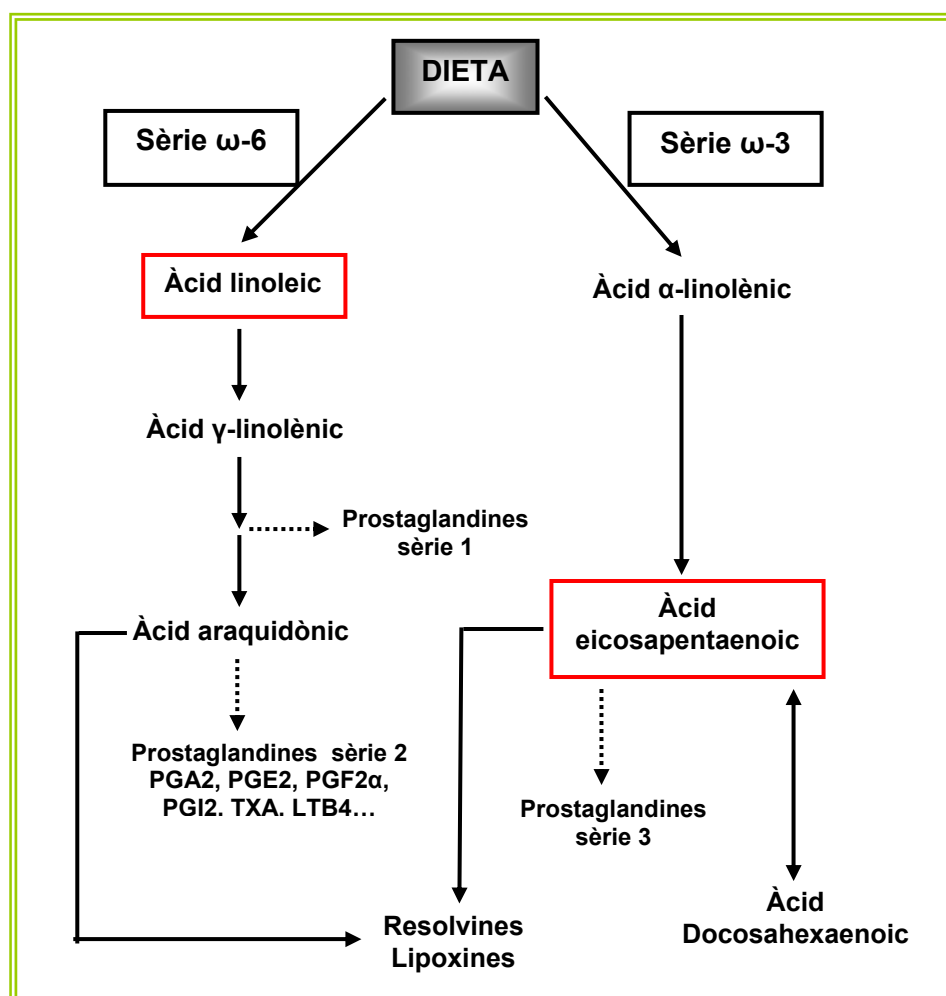


Figura 5. Metabolisme dels àcids grassos essencials de la sèrie ω -6 i ω -3.

II. OBJECTIUS

La diabetis i el càncer són algunes de les malalties més prevalents de la societat occidental, ambdues caracteritzades per presentar greus alteracions metabòliques, les quals dificulten el manteniment d'una bona qualitat de vida. Existeixen múltiples teràpies farmacològiques per a combatre-les però, cada vegada és més evident que una bona alimentació podria evitar o, si més no, alentir el desenvolupament d'aquestes malalties. En l'actualitat, tot i que aquesta visió ja formava part d'altres cultures des de fa milers d'anys, s'han potenciat els estudis científics on els protagonistes són els components que formen part de la nostra dieta i s'han demostrat les seves propietats beneficioses.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat estudiar un ventall de nutracèutics presents en diferents aliments per tal de determinar la seva potencialitat de cara a utilitzar-los com a estratègia terapèutica per fer front a dues situacions catabòliques: la diabetis mellitus de tipus 2 (DMT2) i la síndrome caquètica associada al càncer.

Les aproximacions experimentals utilitzades han estat varies. D'una banda, per l'estudi de l'efecte dels nutracèutics sobre la DMT2, vàrem utilitzar el model animal de rates diabètiques Goto-Kakizaki. Per altra banda, per l'estudi d'aquests sobre la caquèxia cancerosa, vàrem realitzar una primera aproximació *in vitro* en un model d'hipertèrmia puntual en cèl·lules musculars de la línia C2C12, i una segona aproximació *in vivo*, utilitzant el model tumoral de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 en rates i el carcinoma pulmonar de Lewis en ratolins.

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

1. Efecte de l'EPA sobre la diabetis mellitus de tipus 2

Per l'estudi de l'efecte de l'àcid eicosapentaenoic (EPA) sobre la DMT2 es van utilitzar rates Goto-Kakizaki, un model espontani de DMT2, i es va valorar:

- L'estat general de l'animal (guany de pes, ingesta, pesos dels diferents òrgans i teixits i mesura de determinats paràmetres plasmàtics).
- L'efecte de l'EPA en metabolisme glucídic
- L'efecte de l'EPA en metabolisme lipídic
- L'efecte de l'EPA en la inflamació

2. Efecte dels nutraceutics sobre la caquèxia cancerosa

Per a la realització d'aquest treball i, donat l'ampli ventall de nutraceutics existents, vàrem haver d'escollir aquells que, per les seves propietats beneficioses, podrien ser bons candidats pel tractament de la caquèxia:

- Resveratrol
- Genisteïna
- Galat d'epigallocatequina
- Teofil·lina
- Sulfur d'al·lil

Per l'estudi de l'efecte d'aquests nutraceutics sobre la caquèxia cancerosa es van dur a terme les següents aproximacions experimentals:

► Model *in vitro* d'hipertèrmia puntual (model experimental d'inducció de proteòlisi) en cèl·lules musculars de la línia C2C12, per tal de testar diferents dosis dels nutraceutics i valorar el possible efecte sobre la degradació proteica.

► Models *in vivo* de caquèxia cancerosa en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 i en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis, per tal de valorar:

- L'estat general de l'animal (guany de pes, ingesta, pesos dels diferents òrgans i teixits i mesura de determinats paràmetres plasmàtics)
- El creixement tumoral
- L'expressió de gens implicats en els principals sistemes proteolítics
- Els nivells plasmàtics de citoquines

III. MATERIALS I MÈTODES

1. ESTUDIS *IN VIVO*

1.1 ANIMALS I CONDICIONS D'EXPERIMENTACIÓ

Els experiments presentats es van realitzar emprant rates mascles de les soques Goto-Kakizaki (model espontani de diabetis tipus II (Taconic, Denmark)) i Wistar, i ratolins mascles de la soca C57BL/6J (Harlan Interfauna Ibérica). Els animals es van mantenir estabulats en condicions ambientals estàndard ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, humitat relativa del 70-80%, cicle d'il·luminació de 12 hores diàries de llum), amb lliure accés al pinso i l'aigua. La dieta (Teklad Global, Harlan Interfauna Ibérica) estava constituïda per un 63.9% d'hidrats de carboni, 14.5% de proteïna i 4% de greix en el cas de les rates i per a ratolins la composició era de 57.3% d'hidrats de carboni, 18.9% de proteïna i 5.7% de greix.

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

1.2 MODELS EXPERIMENTALS

1.2.1 MODEL DE DIABETIS: GOTO- KAKIZAKI

Goto-Kakizaki és un model espontani de diabetis de tipus II (Diabetis no dependent d'insulina). Les rates que la manifesten presenten alteracions metabòliques, hormonals i vasculars similars als de la diabetis humana i, a diferència d'altres models animals de diabetis, les rates Goto-Kakikazi no són obeses. Aquests animals presenten hiperglucèmia, una defectuosa secreció d'insulina en resposta a la glucosa, tant *in vivo* com en cèl·lules pancreàtiques aïllades, resistència a la insulina a nivell hepàtic i perifèric i, en estats més avançats, poden arribar a manifestar retinopatia, microangiopatia, neuropatia o nefropatia.

Aquest model s'obté per repetició d'encreuaments selectius entre rates que presenten una menor tolerància a la glucosa, potenciant així, que després de 3 o 4 generacions, els animals manifestin la simptomatologia pròpia de la diabetis de tipus II.

1.2.2 HEPATOMA ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

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

Les cèl·lules tumorals van ser recollides amb una xeringa estèril directament de la cavitat peritoneal d'una rata amb un tumor en fase exponencial (7 dies després de la inoculació), es van diluir en PBS estèril (tampó fosfat salí, Lonza group, Suïssa) a una

concentració de 10^4 cèl·lules/ml, i es van inocular, mitjançant una injecció intraperitoneal, 2 ml (10^8 cèl·lules) a cada una de les rates del grup de portadores de tumor. Al final del període experimental, es va recollir el tumor de la cavitat peritoneal i es va mesurar el seu volum en una proveta graduada. En un tub eppendorf es va barrejar 875 μ l de PBS, 100 μ l de blau tripà i 25 μ l de suspensió de cèl·lules tumorals; es va agitar suaument, i es van posar 20 μ l a l'hematocítomètre. Es van comptar les cèl·lules de 6 quadrats de cadascun dels quadrants (X) i es va calcular la mitjana dels 16 quadrats que componen un quadrant; tenint en compte que la suma dels 16 representa un volum de 0.1 mm^3 , el nombre de cèl·lules es va calcular de la següent forma: $X \times 16 \times F$ (factor de dilució) $\times 10^4 =$ nombre de cèl·lules / ml.

Aquest model tumoral es va mantenir *in vivo* en la nostra colònia de l'estabulari de forma permanent, obtenint-se per a la realització dels experiments, mostres de tumor en fase de creixement exponencial 7 dies després de la inoculació.

1.2.3 CARCINOMA PULMONAR DE LEWIS (LLC)

El LLC constitueix un model experimental de caquèxia caracteritzat pel creixement d'un tumor primari sòlid, en aquest cas en una de les potes posteriors, i per l'aparició de metàstasis pulmonars. És també de creixement ràpid i provoca un elevat grau de caquèxia.

Per tal de procedir a la seva inoculació, es van injectar intramuscularment 200 μ l del tumor que contenien 5×10^5 cèl·lules. Les cèl·lules van ser obtingudes de tumors en fase exponencial de creixement de ratolins als que se'ls havien injectat la mateixa quantitat de cèl·lules 15 dies abans. El comptatge de cèl·lules es va dur a terme de la mateixa manera que en el model anterior però, al tractar-se d'un tumor sòlid, prèviament s'havien de disgregar les cèl·lules i resuspendre-les en PBS estèril.

Els experiments es van realitzar fins a 14 dies després de l'inòcul, moment en el que determinàvem el nombre de metàstasis pulmonars i el pes del nòdul tumoral com a indicadors del desenvolupament del tumor, ja que l'elevada necrotització d'aquest, ens dificultava la determinació del nombre total de cèl·lules tumorals.

1.2.3.1 DETERMINACIÓ DE LES METÀSTASIS PULMONARS

Una vegada netejat el pulmó vàrem separar els 5 lòbuls pulmonars i els vam pesar (pes total del pulmó). El nombre de metàstasis es va estimar visualment en funció de la seva superfície 1mm^2 , 4mm^2 , 9mm^2 , 16mm^2 i 25mm^2 , les classificàvem en els tipus 1,2,3,4 i 5 respectivament. Calculàvem el pes de les metàstasis mitjançant la fórmula $\frac{4}{3}\pi r^3$. Vam considerar que cada metàstasi s'aproximava a una geometria esfèrica, on "r" era el seu radi. El volum fou llavors convertit en el pes assumint que la densitat del tumor era pròxima a la unitat. La següent taula ens relaciona el tipus de metàstasi i el seu respectiu pes (Donati, 1978):

Tipus	pes (mg)
1	0.52
2	4.19
3	14.13
4	33.49
5	65.41

1.3 TRACTAMENTS

A continuació es descriuen els diferents tractaments realitzats. En tots els casos es va dur a terme el seguiment de la ingesta, del consum d'aigua i del pes corporal diàriament durant l'administració de tots els tractaments de cada un dels experiments.

Àcid eicosapentaenoic (EPA) i àcid linoleic (LINO)

El tractament crònic va consistir en una administració intragàstrica diària durant 28 dies a rates Goto-Kakizaki de 3 setmanes d'edat. Els animals es van dividir en 3 grups: el grup control, un segon grup al que s'administrava 0.5 g/kg de pes corporal (pc) d'EPA (Novartis Nutrition Corporation, Minnesota, USA) i un últim que va rebre 0.5 g/kg pc de LINO (Novartis Nutrition Corporation, Minnesota, USA). S'utilitzava com a vehicle la carboximetilcel·lulosa a l'1%. Al grup control es va administrar, de la mateixa manera, el volum equivalent del vehicle.

Resveratrol

El tractament crònic va consistir en una administració intraperitoneal diària en ratolins controls i portadors del carcinoma pulmonar de Lewis durant 14 dies, a partir del moment de l'inòcul. Els animals es van dividir en diferents grups: control i tractats a les dosis de 5 i 25 mg/kg pc de resveratrol (Sigma Aldrich). Com a vehicle es va utilitzar DMSO:PBS (1:20) que també va ser administrat (el volum equivalent) als grups control.

Genisteïna

El tractament crònic va consistir en una administració intragàstrica diària en rates control i portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 durant 7 dies a partir del moment de l'inòcul. Els animals es van dividir en diferents grups: control i tractats a les dosis de 10, 5 i 2.5 mg/kg pc de genisteïna (Sigma Aldrich). Es va preparar un estoc de genisteïna amb dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma Aldrich), que posteriorment va ser dissolt en el vehicle d'administració: oli de blat de moro (5% de DMSO). Al grup control se'ls va administrar, de la mateixa manera, el volum equivalent del vehicle amb un 5% de DMSO.

Galat d'epigallocatequina (EGCG)

El tractament crònic va consistir en una administració intragàstrica diària en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 durant 7 dies a partir del moment de l'inòcul. Els animals es van dividir en diferents grups: control i tractats a les dosis de 50, 25 i 10 mg/kg pc d'EGCG (Sigma Aldrich). Com a vehicle es va utilitzar aigua, que també va ser administrada (el volum equivalent) als grups control.

Teofil·lina

El tractament crònic va consistir en l'administració intragàstrica diària en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 durant 7 dies a partir del moment de l'inòcul. Els animals es van dividir en diferents grups: control i tractats a les dosis de 50, 25 i 10 mg/kg pc de teofil·lina (Sigma Aldrich). Com a vehicle es va utilitzar oli de blat de moro on el tractament quedava en suspensió. Als grup control se'ls hi va administrar el volum equivalent del vehicle.

Sulfur d'al·lil (DAS)

El tractament crònic va consistir en una administració intragàstrica diària a rates control i portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 i a ratolins controls i portadors del carcinoma pulmonar de Lewis durant 7 i 14 dies, respectivament, a partir del moment de l'inòcul. Els animals es van dividir en diferents grups: control i tractats a les dosis de 150, 100 i 25 mg/kg pc de sulfur d'al·lil (Sigma Aldrich). Com a vehicle es va utilitzar oli de blat de moro que també va ser administrat (el volum equivalent) als grups control.

Es va realitzar el seguiment de la ingesta, del consum d'aigua i del pes corporal diàriament durant l'administració de tots els tractaments de cada un dels experiments.

1.4 ANESTÈSIA I SACRIFICI

Al finalitzar els experiments, els animals van ser pesats i anestesiats intraperitonealment amb 2 ml/kg d'una barreja (3:1) de ketamina (Imalgene®, Merial, França) i xilacina (Rompún®, Bayer, Alemanya). La mort va ser provocada per l'extracció de la sang després de l'obertura de la cavitat peritoneal i assegurada mitjançant la ruptura del diafragma.

1.5 EXTRACCIÓ DE TEIXITS I SANG

Inicialment es va obrir la cavitat abdominal i, una vegada visualitzada l'aorta, es va procedir a l'extracció de la mostra de sang amb una xeringa heparinitzada de 5 ml; aquesta

sang es va dipositar en un tub que es va mantenir fred en gel. A continuació es van extreure els teixits, que immediatament van ser congelats en nitrogen líquid per *freeze-clamping* i pesats, i es van conservar a -80°C.

1.6 MESURA DE LA COMPOSICIÓ CORPORAL

La composició corporal va ser valorada en rates Wistar portadores del tumor ascític Yoshida AH-130 abans de la seva inoculació i 7 dies després del creixement tumoral. Es va dur a terme en col·laboració amb el grup de recerca del Dr. Anker (Departament de Cardiologia, Charité Medical School, Berlín, Alemanya) realitzant una espectroscòpia per ressonància magnètica nuclear amb el sistema EchoMRI-700™ (Echo Medical Systems, Houston, TX). Aquest dispositiu ens permet determinar la massa adiposa, la massa magra, els fluids corporals i l'aigua corporal total amb una sensibilitat de 2 g. El sistema es basa en un iman que constitueix l'analitzador i que té un camp magnètic de 0.05 T en la regió sensible. Es produeixen una sèrie de polsos a 2 MHz que indueixen canvis en la polarització magnètica de l'hidrogen nuclear, aquests canvis es produeixen a diferents temps en funció de cada teixit i són aquestes diferències les que determinen la quantitat de cada una de les substàncies estudiades (Akashi *et al.*, 2008).

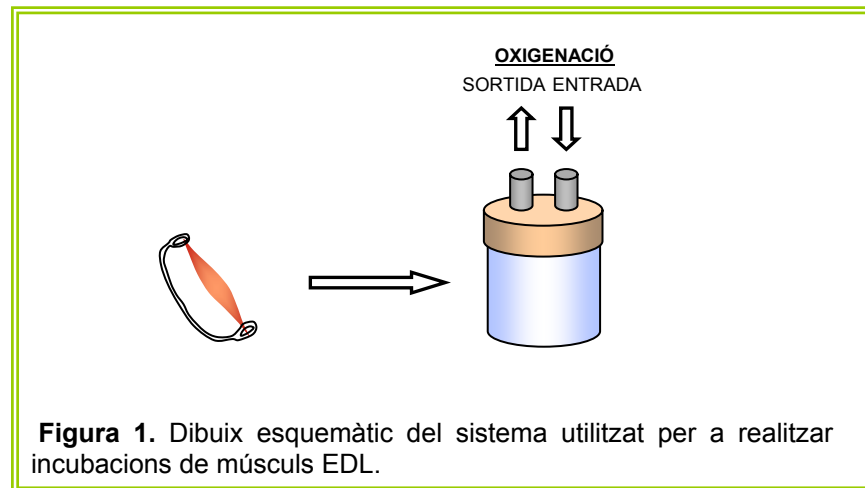
1.7 MESURA DE L'ACTIVITAT LOCOMOTORA

L'activitat locomotora va ser valorada en rates Wistar portadores del tumor ascític Yoshida AH-130 en col·laboració amb el grup de recerca del Dr. Anker (Departament de Cardiologia, Charité Medical School, Berlín, Alemanya) mitjançant un sistema de sensors Supermex (Muromachi, Tokio, Japó) durant un període de 24h abans de la inoculació del tumor i 7 dies després del creixement d'aquest. Els animals estaven en gàbies individuals i els resultats s'expressaren com a nombre de moviments realitzats en un dia.

2. ESTUDIS *EX VIVO*

2.1 PREPARACIÓ DE TEIXITS AÏLLATS

Es van extreure els músculs EDL (*extensor digitorum longus*) i els teixits adiposos dorsals (TABd) de rates anestesiades amb Imalgene®-Rompún® (3:1) (segons el mètode utilitzat per Busquets *et al.*, 2002) dels que es van preparar tires (*strips*) o es van mantenir sencers depenent de l'experiment. Els músculs es van col·locar en un suport metàl·lic de manera que es pogués mantenir la tensió muscular en la que es troben els EDL en situació fisiològica (Figura 1). S'ha descrit que, durant 3 hores d'incubació, els músculs mantenen intactes els seus nivells d'ATP i fosfocreatina (Busquets *et al.*, 2000).



Un cop extrets els dos teixits, es van incubar en vials de vidre durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1), en 3 ml de tampó Krebs-Henseleit suplementat amb piruvat (2 mM), HEPES (20 mM) i aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM), a pH 7.4, prèviament gassejat amb carbogen durant 20 min. A continuació es va procedir a incubar els teixits en el medi adequat segons el tipus d'assaig (aquest procediment es troba detalladament explicat a l'apartat 8.1.1.).

Els teixits procedien de rates control en les que es va complementar el medi d'incubació amb EPA i LINO 2 mM i de rates Goto-Kakizaki que prèviament havien estat tractades diàriament durant 28 dies amb 0.5 g/kg pc d'EPA, 0.5 g/kg pc de LINO i d'un grup control que se li havia administrat el volum equivalent del vehicle (carboximetilcel·lulosa).

3. ESTUDIS *IN VITRO*

3.1 CULTIUS CEL·LULARS

3.1.1 NORMES GENERALS DE MANIPULACIÓ

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

Es va intentar sempre mantenir la màxima netedat possible; també rentant-nos les mans amb sabó i mullant-les amb etanol abans de començar. Es va treballar sempre sota campana de flux laminar vertical, la seva superfície es descontaminava amb etanol abans i després de cada sessió de treball. Tot el material fungible estèril es guardava en bosses ben tancades per protegir-lo de contaminacions i brutícia, obrint-les i tancant-les preferentment

dins de la campana i mantenint-les dins de la sala de cultius. Les ampolles de medis i reactius, els succionadors i altre material que no estigués convenientment embolicat, es fregava amb una mica d'alcohol abans d'introduir-lo dins de la campana. Les ampolles de medi estèrils s'obrien i es tancaven dins de la campana, a prop de la flama del encenedor Bunsen, i es segellaven amb una cinta al voltant del tap abans de treure-les. Tota substància o material que hagués d'estar en contacte amb les cèl·lules es procurava que fos específic per cultius (normalment ja estèrils) o s'esterilitzaven per filtració (filtre de 0,22 µm) o per temperatura (autoclau).

Tenint en compte que el flux laminar de la campana és vertical de dalt a baix, els taps de les ampolles i les tapes de les plaques obertes es col·locaven boca avall, i es procurava no passar la mà o qualsevol altre objecte per sobre dels medis, plaques al descobert o qualsevol material destinat a estar en contacte amb les cèl·lules. També es realitzaven neteges periòdiques de la campana i de l'incubador per evitar contaminacions, i tota la sala era sotmesa a radiacions ultraviolades durant tota la nit. Les condicions dins de l'incubador eren sempre de 37°C, 90% d'humitat relativa i 5% de CO₂. Es va procurar mantenir les cèl·lules el menor temps possible fora de l'incubador.

Degut a que les cèl·lules amb les que treballem són immortalitzades, és relativament fàcil l'aparició d'alteracions fenotípiques degudes a l'adquisició espontània de característiques de transformació; per això seguïem atentament l'aspecte dels cultius en l'observació microscòpica, i no utilitzàvem cèl·lules de més de 12 subdivisions a partir de la zero del proveïdor. El manteniment de l'estoc es va fer de manera que mai arribés a la confluència per no deplecionar el component mioblàstic de la població de cèl·lules, ja que una vegada els mioblasts han iniciat el programa miogènic, perden irreversiblement la capacitat proliferativa. Les cèl·lules congelades van ser mantingudes en nitrogen líquid.

Al no ser detectable a simple vista, es va comprovar l'absència de contaminació per micoplasma mitjançant el kit de detecció de micoplasmes (Biological Industries Co. Reactiva S.A).

3.1.2 LÍNIA CEL·LULAR C2C12

Aquesta línia cel·lular és un subclon derivat per H. Blau (Blau *et al.*, 1985) de la línia cel·lular miogènica murina C2, establerta a partir de cèl·lules satèl·lit de múscul esquelètic de l'extremitat posterior de ratolí C3H adult (Yaffe i Saxel, 1977). Aquesta línia es diferencia ràpidament i produeix amplis miotubs contràctils que expressen característiques de múscul esquelètic. Aquest clon proporciona un model excel·lent per a l'estudi de la miogènesi *in vitro* i la diferenciació cel·lular (Blau *et al.*, 1985).

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

3.1.3 MEDIS DE CULTIU, SUPLEMENTS I ANTIBIÒTICS

Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Aquest medi és estèril i està suplementat amb 4,5 g glucosa/ml, 110 mg piruvat sòdic/ml i 2 mM L-glutamina. L'obriem dins de la campana i el suplementàvem immediatament amb 100 unitats de penicil·lina/ml, 100 mg d'estreptomicina/ml, 25 ng de fungizona/ml i el sèrum corresponent. Una vegada obert es conservava a 4°C i no més de 15 dies.

Sèrum Fetal Boví (FBS)

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

Sèrum Equí (HS)

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

Antibiòtics

Vàrem utilitzar la combinació de Penicil·lina-Estreptomicina-Fungizona (PSF); els dos primers són antibiòtics, i el tercer és un antifúngic. S'afegia al DMEM just després d'obrir l'ampolla, diluint-lo 1:100. Es conserva en alíquotes de 5 ml a -20°C.

Tripsina (Tripsina-Versene)

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

3.1.4 TÈCNiques GENERALS EN CULTIUS CEL·LULARS

3.1.4.1 MANTENIMENT DE L'ESTOC

L'estoc es va mantenir sempre en DMEM 10% FBS en plaques de 10 cm de diàmetre o en flascons de rosca de 75 mm², i es va mantenir sempre per sota del 80% de confluència, fent subdivisions cada dues o tres vegades per setmana en les que es diluïen les cèl·lules entre 5 i 15 vegades. Es posava especial cura en que les cèl·lules estiguessin ben disperses perquè no es formessin clons, ja que en el centre d'aquests grups els mioblasts poden

començar el programa miogènic. Les alíquotes descongelades procedien d'una subdivisió 2 o 3 a partir de l'original, de les quals no es van realitzar més de 8 o 10 subdivisions. El temps aproximat de duplicació de la població és d'unes 24 hores (quan les cèl·lules no estan gaire diluïdes). Una placa de 10 cm de diàmetre conté aproximadament 4×10^6 cèl·lules.

3.1.4.2 SUBDIVISIÓ

S'aspirava el medi de les plaques i es rentaven dues vegades amb PBS o amb DMEM sense sèrum (procurant eliminar tota la resta de sèrum ja que aquest inhibeix la tripsina). S'afegia 1 ml de tripsina sense diluir per placa de 10 cm de diàmetre i s'incubaven durant 7 min a 37°C. Es treien i es parava la reacció afegint medi amb sèrum. Es centrifugava a 220 g durant 4 min i es retirava el sobrenedant que contenia la tripsina. Finalment es resuspenien les cèl·lules amb medi amb sèrum.

3.1.4.3 COMPTATGE

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

$$\text{N}^\circ \text{ cèl·lules/ml} = \text{mitjana del comptatge dels 4 quadrants} \times 10^4$$

3.1.4.4 SEMBRA

Una vegada tripsinitzat l'estoc, es feia una primera dilució d'aproximadament $1.5\text{-}2 \times 10^6$ cèl·lules/ml, i es realitzava el comptatge. Després de fer els càlculs es sembrava a 3.7×10^4 cèl·lules/cm², de forma que es posaven:

- En cada placa de 10 cm de diàmetre, 10 ml de medi amb 2.5×10^6 cèl·lules.
- En cada pouet d'una placa de 6 pous, 2 ml amb 3.5×10^5 cèl·lules.

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

3.1.4.5 CONGELACIÓ

Les cèl·lules tripsinitzades i resuspeses en DMEM-10%FBS es comptaven, es centrifugaven durant 4 min a 220 g i, una vegada eliminat el sobrenedant, es resuspenien en medi de congelació (DMEM-10%FBS, 10% DMSO) a una concentració de 10^6 cèl·lules/ml. Es repartien en alíquotes d'1 ml en els vials de congelació i es procedia a la següent

seqüència de congelació: 1h a 4°C, 2 hores a -20°C i tota la nit a -80°C. Es conservaven congelades en nitrogen líquid.

3.1.4.6 DESCONGELACIÓ

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

3.2 ESTUDIS EN CULTIUS DE C2C12 DIFERENCIADES

Les cèl·lules C2C12 es van sembrar a 3.7×10^4 cèl·lules/cm² en DMEM-10%FBS. Al dia següent les cèl·lules es trobaven en un 90-100% de confluència, de manera que es procedia al canvi de medi per diferenciar; en aquest cas s'utilitzava DMEM-10%HS. Els experiments es van realitzar a dia 5 ó 6 de diferenciació (segons el tipus d'experiment).

3.2.1 MODEL PROTEOLÍTIC D'HIPERTÈRMIA PUNTUAL

Vàrem utilitzar el model descrit per Smith i col·laboradors (2005). Aquest model de proteòlisi es basa en sotmetre a les cèl·lules a un augment de temperatura durant un període de temps curt. Els experiments es van realitzar a dia 5 de diferenciació, dia en el que es van incubar les cèl·lules amb DMEM durant 2 hores i posteriorment es va substituir el medi per DMEM-10%HS que contenia el tractament. Les cèl·lules es van incubar a 41°C durant 6 hores. Passat aquest temps, es van recollir les cèl·lules i el medi, o es van retornar a les condicions normals (37°C) durant 24h depenent de l'experiment.

3.2.2 TRACTAMENTS

A la taula següent s'hi poden veure els diferents tractaments utilitzats en els experiments *in vitro* d'aquest treball, les dosis escollides i la preparació prèvia a la seva administració:

Producte	Dosis testades	Solució mare
RESVERATROL (Sigma)	100, 10, 1, 0.1 µM	DMSO
GENISTEÏNA (Sigma)	50, 10, 5, 2.5 µM	DMSO
EGCG (Sigma)	10, 5, 0.5, 0.25 µM	PBS
TEOFIL·LINA (Sigma)	0.1, 0.05, 0.01 mM	DMSO
DAS (Sigma)	1, 0.5, 0.25, 0.1 mM	Etanol

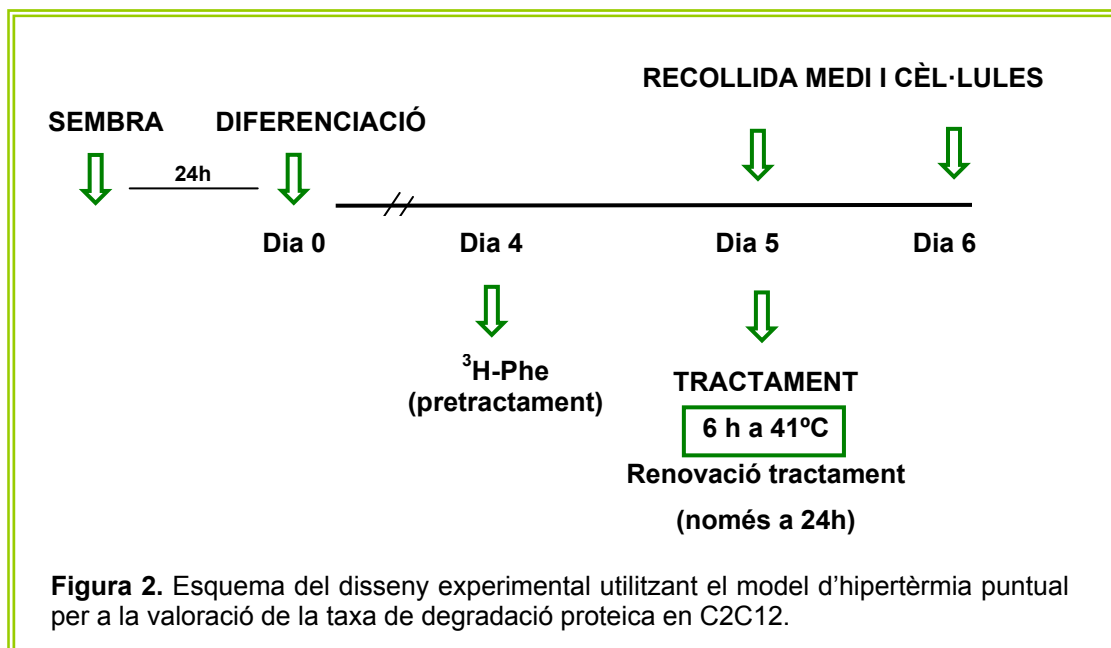
Posteriorment a l'obtenció dels estocs, es van preparar els tractaments en medi DMEM + 10%HS, quedant finalment concentracions tant d'etanol com de DMSO inferiors al 0.1%.

3.2.3 TAXA DE DEGRADACIÓ PROTEICA

Per a la determinació de la taxa de degradació proteica es van seguir els mètodes descrits per Gulve i col·laboradors (1991) amb algunes modificacions. Les cèl·lules C2C12 es van sembrar i diferenciar com s'ha descrit anteriorment en plaques de 6 pous. Per marcar radioactivament les proteïnes es va utilitzar fenilalanina (Phe) tritiada (L-[2,3,4,5,6-³H]fenilalanina, 126 Ci/mmol, Amersham, UK). S'utilitza la fenilalanina com aminoàcid marcador ja que no és significativament degradat ni sintetitzat pel múscul, proporcionant d'aquesta forma un bon paràmetre per la mesura del recanvi proteic. S'ha de tenir en compte que la seva reutilització és minimitzada amb un excés d'aminoàcid en el medi (Attaix *et al.*, 1994). Els miotubs van ser incubats amb 2 ml/pou de DMEM-10%HS i 1 µl ³H-Phe/ml a dia 4 de diferenciació durant 24 hores.

Els experiments es van realitzar a dia 5 de diferenciació, dia en el que vàrem incubar les cèl·lules durant 2 hores a 37°C amb DMEM. Passat aquest temps es va substituir el DMEM pel medi de diferenciació que contenia les diferents dosis del tractament. Les cèl·lules es van mantenir a 41°C durant 6 hores. Acabat aquests procés es van recollir alíquotes d'1 ml de medi, vam rentar les cèl·lules amb PBS i les vàrem guardar a -80°C. En algunes d'aquestes plaques es va renovar el tractament passades les 6 hores a 41°C i van ser retornades a condicions normals (37°C) fins a les 24h, en aquest cas es va recollir medi a les 6 i a les 24 hores.

En alguns casos també s'afegia el tractament en el moment de posar la radioactivitat realitzant així un pretractament de 24h (Figura 2).



Processament de les mostres

Medis: Als medis de les al·lquotes obtingudes de l'experiment (0.5 ml), se'ls va afegir 250 µl d'àcid tricloroacètic (TCA) al 10% i es van incubar 1 hora a 4°C. Passat aquest temps, es van centrifugar durant 5 min a 9600 g a 4°C per separar les proteïnes del medi i vàrem recollir el sobrenedant. Aquest va ser transferit a un vial de comptatge amb 10 ml de líquid d'escintil·lació i 47.5 µl de NaOH 10 M per neutralitzar el TCA.

Cèl·lules: les plaques es van mantenir en gel. Per lisar les cèl·lules es va afegir 0.5 ml de desoxicolat sòdic 0.1%-NaOH 0.1M per pou i es van incubar durant 1 hora a 37°C. Tot el volum del lisat es va transferir a un vial de comptatge amb 10 ml de líquid d'escintil·lació i es va neutralitzar el medi amb 26 µl de TCA al 30%.

Els vials de comptatge van ser agitats i es van guardar tota la nit protegits de la llum a 4°C. El contingut de radioactivitat va ser determinat en un comptador d'escintil·lació líquid (Packard 2100TR). Els resultats van ser obtinguts a partir del quocient entre la radioactivitat alliberada al medi i la comptabilitzada a l'interior de les cèl·lules.

4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

4.1 EXTRACCIÓ DE L'RNA

Per a l'extracció d'RNA es va utilitzar el reactiu Tripure Isolation Reagent (Roche), el qual permet obtenir aproximadament 0.5-2 µg RNA/mg de teixit en el cas de múscul i teixit adipós blanc així com de cèl·lules en cultiu. Per realitzar l'extracció, es van homogenar entre 100 i 200 mg de teixit amb 1 ml de Tripure en un polítró a velocitat mitjana (8000-16000 rpm). Els homogenats es van centrifugar (12000 g 1 min 4°C) per eliminar restes de teixit no disgregades, i el sobrenedant es va passar a un tub eppendorf nou. Després d'afegir 200 µl de cloroform, es va agitar durant 15 segons i es van incubar les mostres 10 min a temperatura ambient. Es va centrifugar (12000 g 15 min 4°C) i es van obtenir tres fases: una inferior amb els dissolvents orgànics (fenol-cloroform), una superior (la fase aquosa) que contenia l'RNA, i un anell central que corresponia a les proteïnes. Després de passar la fase superior a un nou eppendorf, es van afegir 500 µl d'isopropanol, es va incubar 5 min a temperatura ambient, i es va centrifugar 10 min en les condicions anteriors. Un cop eliminat el sobrenedant, el precipitat va ser resuspès en 1 ml d'etanol al 75% en aigua DEPC (tractada amb dietil pirocarbonat, Sigma Aldrich) i es va tornar a centrifugar durant 5 min en les mateixes condicions. Finalment, després d'eliminar el sobrenedant i assecar el precipitat, es va resuspendre l'RNA en 40 µl d'aigua DEPC i es va procedir a la valoració de la seva concentració amb un espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000.

Per a l'extracció d'RNA de cèl·lules, el protocol a seguir va ser el mateix, amb la diferència de que el pas inicial no va ser l'homogenització sinó que es van posar 500 µl de Tripure a cada un dels pous, i amb l'ajuda d'una rasqueta es va recollir el lisat.

4.2 TRANSCRIPCIÓ REVERSA I PCR A TEMPS REAL (PCR-RT)

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es basa en l'amplificació d'una determinada regió de DNA, simulant el procés de replicació que es produeix de forma natural a la cèl·lula. Aquesta tècnica permet obtenir un gran nombre de còpies a partir d'un determinat segment mitjançant la utilització d'oligonucleòtids sintètics (encebadors) d'uns 15-25 pb complementaris a la zona flanquejant de la regió que es vol amplificar. La PCR consisteix en un número de cicles en els quals es produeixen canvis de temperatura que provoquen la desnaturalització del DNA, la hibridació dels oligonucleòtids, i finalment l'extensió que permet a la Taq polimerasa sintetitzar la resta de la cadena complementària. Aquest cicle (desnatura-hibridació-extensió) es repetirà un determinat número de vegades depenent dels nivells d'expressió del gen que es vol estudiar, de la concentració d'encebadors amb la qual treballem, i de la mida de l'amplicó.

En aquest treball s'ha utilitzat la tècnica de la PCR a temps real, que es realitza en dues parts: la transcripció reversa i l'amplificació del fragment amb la PCR-RT.

Transcripció reversa (TR)

Degut a que l'RNA està format d'una única cadena i és termosensible, s'haurà de fer una transcripció reversa abans d'iniciar l'amplificació. En aquest procés es genera una còpia de DNA complementari (cDNA) sobre la que podem aplicar la metodologia de la PCR.

Vàrem partir d'una dilució d'RNA de 0.5 µg/µl i, prèviament a preparar la reacció de TR, vàrem realitzar un tractament amb DNases barrejant 8 µl de la mostra amb 1 µl de tampó d'incubació, 0.5 µl de DNAasa (DNAasa I recombinant Rnase free, Roche) i 0.5 µl d'inhibidor de RNases (Promega N₂₅₁A 40 U/µl). Ho vam incubar 10 min a 37°C i seguidament 5 min a 75°C per inactivar l'enzim.

Seguidament vam preparar la reacció de TR en la que vàrem afegir, als 8 µl de mostra anterior, 2 µl d'una barreja de dNTP (desoxiribonucleòtids) 10 mM (Attend-Bio), 2 µl d'encebadors oligo(dT) (kit Ready-to-go stock: 0.55 µg/µl, Attend-bio) i 2 µl d'encebadors *random* (Roche). Aquesta barreja la vàrem incubar 10 min a 65°C en el bany termostatitzat. Un cop transcorregut aquest temps i conservant les mostres en gel, vam preparar la barreja per a la TR que consistia en afegir a cada una de les mostres 4 µl de tampó TR 5x (Roche), 0.5 µl d'inhibidor d'RNases i 0.5 µl de transcriptasa reversa (10U, Roche). Un cop afegida la barreja a cada un dels tubs eppendorf que contenien les mostres, ho vàrem barrejar, incubar 1 hora a 55°C al bany termostatitzat, i finalment 5 min a 85°C al *termomixer* per aturar la

reacció. Immediatament es van posar les mostres en gel i es va afegir una quantitat d' aigua estèril, adequant aquesta dilució en funció dels nivell d'expressió dels gens que posteriorment volíem estudiar. En aquest pas, l'aigua també adquireix la funció de diluir la sals de la TR ja que podrien inhibir la reacció de la PCR. Les mostres obtingudes es van guardar a -20°C.

PCR a temps real

La PCR a temps real ens dóna una mesura semiquantitativa del cDNA. Per a poder detectar els nivell d'amplificació vam utilitzar el kit LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I de Roche. El Syber Green és una molècula fluorescent que s'uneix al DNA de doble cadena intercalant-se, per tant, en els fragments amplificats.

Per això, es va emprar un termociclador de 32 capil·lars (Light Cycler 3.5, Roche) en els quals hi vam posar 5 µl de la mostra més 5 µl d'una barreja de reacció formada per 2 µl Sybr Green i de 0.2 a 0.6 µl de cada encebador (sentit i antisentit). Per a dissenyar els encebadors es va utilitzar el programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) a partir de la seqüència del mRNA obtinguda al PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov). Realitzant un megablast en una altre aplicació de la mateixa pàgina web, ens vam assegurar de l'especificitat dels encebadors dissenyats.

A la taula següent es detallen els encebadors utilitzats en aquest treball:

Gen	Encebadors	Mida del producte (pb)
18S	5' CGCAGAATTCCCCTCCCGACCC 3' 5' CCCAAGCTCCAACACTACGAGC 3'	212
Ubiquitina C	5' CACCAAGAAGGTCAAACAGGA 3' 5' CAAACCCAAGAACAAGCACA 3'	87
C2	5' GTTCCATTGGGATTGTTGG 3' 5' TGTTCCATTGGTTCATCAGC 3'	161
C8	5' CGACCCATCAGGTGTTTCAT 3' 5' CGGCAAGTCATTTCCCTTCAT 3'	108
E2	5' CTCTCTCCCCACAGCATTGT 3' 5' CTCCTCCTCCTCCTCCTCAT 3'	159
Murf	5' GTGAAGTTGCCCCCTTACAA 3' 5' GTGGCTGTTTTCTTGGTCA 3'	149
Atrogina	5' TGTGCGATGTTACCCAAGAA 3' 5' GGTGAAAGTGAGACGGAGCA 3'	138
catepsina B	5' AGTGTGGGGATGGCTGTAAT 3' 5'GGGATGGTGTAGGGTAAGCA 3'	121
m-calpaïna	5' GAGGAAGATGGGTGAGGACA 3' 5' GCTGAGGTGGATGTTGGTCT 3'	91
FAT	5'CTCTGACATTTGCAGGTC 3' 5'CACAGGCTTTCCTTCTTTGC 3'	214
FATP	5' GCATGGATGATCGGCTATTT 3' 5' GATGTTCCCTGCTGAGTGGT 3'	179
PPARα	5' CATCACGGACACGCTTTCACC 3' 5' GTTCTTCAAGTAGGCCTCGTAG 3'	301
PPARδ	5'GAAGCCATCCAGGACACCAT 3' 5'AAGGTCTCACTCTCCGTCTT 3'	172
PPAR γ	5' GATCCTCCTGTTGACCCAGA 3' 5' TCAAAGGAATGGGAGTGGTC 3'	164
GLUT4	5' AGCGTAGGTACCAACACTTTCT 3' 5' CCGCCCTTAGTTGGTCAGAAG 3'	80
TNF-α	5' TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTC 3' 5' AGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC 3'	298
IL-6	5'TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC3' 5'TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC3'	78

4.3 ANÀLISI DE L'ACTIVITAT DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ: ESTUDIS DE RETARD EN GEL

4.3.1 OBTENCIÓ DELS EXTRACTES NUCLEARS

Per realitzar els estudis de retard en gel (EMSA) és necessària l'obtenció d'extractes nuclears. El protocol que vàrem utilitzar va ser una adaptació dels descrits per Blough i col·laboradors (1999) i Hayashi i Faustman (2000), que es basen en l'extracció i purificació de les proteïnes que es troben en el nucli mitjançant un augment de l'osmolaritat i de la força iònica. En aquest procés, els nuclis es contrauen i alliberen de forma soluble les proteïnes entre les quals hi trobem els factors de transcripció que estan units al DNA i que són l'objectiu d'aquest estudi.

Per a l'obtenció d'extractes nuclears a partir de teixit, es van homogenar 50 mg de teixit muscular amb 3 ml de tampó 1 (veure composició a la Taula 1) amb el politró a velocitat mitja durant 45 segons. L'homogenat es va centrifugar (2300 g 5 min 4°C), es va separar el sobrenedant (el qual contenia la fracció citoplasmàtica) i es va guardar a -80°C. El precipitat el vàrem resuspendre en 500-1000 µl de tampó 2 (Taula 1) i es va incubar durant 30 min a 4°C. Posteriorment es va centrifugar (2300 g 5 min a 4°C) i es va recuperar el sobrenedant, que corresponia a la fracció nuclear. Per comprovar la puresa dels extractes nuclears, es realitzà una quantificació de proteïna pel mètode BCA (detallat a l'apartat 5.2) i un Western blot de la tubulina, una proteïna del citoesquelet que no es localitza al nucli.

4.3.2 ESTUDIS DE RETARD EN GEL o EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

L'EMSA ens permet detectar i caracteritzar *in vitro* la interacció DNA-proteïna; per tant, és una eina molt important en l'estudi de l'activitat dels factors de transcripció. Aquesta tècnica es basa en l'observació de la migració, en un gel de poliacrilamida no desnaturitzant, del complex DNA-proteïna, que és més lenta que la de la molècula de DNA lliure. Per a dur a terme aquest assaig, es van incubar extractes nuclears amb una sonda marcada radioactivament. Aquesta sonda contenia la seqüència consens dels factors de transcripció estudiats. El producte d'aquesta incubació es va carregar en el gel on la mobilitat de la sonda estava determinada per la seva unió amb les proteïnes dels extractes nuclears. Com a control positiu vàrem utilitzar cèl·lules HeLa (Kit Promega), a més de carregar en el gel un competidor específic i un d'inespecífic per comprovar l'especificitat de la unió.

4.3.2.1 MARCATGE DE LA SONDA I PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

Els oligonucleòtids que contenen la seqüència consens pels factors de transcripció estudiats, els vam obtenir a partir del kit de Promega E3000. Per obtenir el marcatge de la

sonda, es van incubar durant 10 min a 37°C els oligonucleòtids (1.75 pmol/μl), ATP marcat amb ³²P, T4 polinucleòtid quinasa i aigua bidestil·lada estèril en el tampó per a la T4 polinucleòtid quinasa. Finalment es va bloquejar la reacció amb EDTA 0.5M. Un cop marcades les sondes, es va afegir tampó TE (Taula 1) i es va purificar la mostra mitjançant les columnes Micro spin G-25 (Amersham). Després de la purificació de la sonda, es va afegir 25 μl d'aquesta a cada mostra i ho vàrem deixar durant 20 min a temperatura ambient perquè s'unissin les proteïnes al DNA.

4.3.2.2 ELECTROFORESI

En primer lloc es van preparar els gels en condicions no desnaturalitzants per permetre la separació dels oligonucleòtids lliures dels complexos DNA-proteïna. La concentració de la barreja de reacció i la relació acrilamida i bisacrilamida a utilitzar depenen de la mida de la sonda i la migració dels complexos que volem detectar. Per assajos amb sondes petites, d'entre 25-30 parells de bases (pb), el percentatge idoni és d'un 7%; per sondes més grans, el percentatge a utilitzar serà d'un 4%.

Vàrem utilitzar el sistema d'electroforesi Protean II Xi Cell (Biorad) acompanyat amb tampó TBE 0.5X (Taula 1) durant aproximadament 1h a 350 V. Un cop va finalitzar l'electroforesi, es va assecat el gel en l'assegador BioRad Gel Drier, realitzant un preescalfament a 80°C, i deixant assecat el gel entre 60-120 min (mai menys de 60 min). Finalment el vàrem exposar en un pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham) durant 24h a -80°C i el vàrem revelar. Un cop revelada, es va quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Phoretix (versió 2.51, Phoretix International Ltd).

Taula 1. Tampons utilitzats en la tècnica de l'EMSA

<u>Tampó 1</u>	<u>Tampó 2</u>	<u>TBE</u>
Hepes 10 mM pH 7.5	Hepes 20 mM pH 7.9	Tris-HCl 0.45 mM
MgCl ₂ 10 mM	Glicerol 25%	Àcid bòric 0.45 mM
KCl 5 mM	NaCl 500 mM	EDTA 10 mM pH 8
EDTA 0.1 mM pH 8	MgCl ₂ 1.5 mM	
Tritó X-100 0.1%	EDTA 0.1 mM pH 8	<u>TE</u>
Ditiotreitol (DTT) 1M	DTT 1M	Tris-HCl 10 mM pH8
PMSF 0.1 mM	PMSF 0.1 mM	EDTA 1 mM
Aprotinina 2 μg/ml	Aprotinina 2 μg/ml	
Leupeptina 2 μg/ml	Leupeptina 2 μg/ml	

5. ANÀLISI DEL CONTINGUT PROTEIC

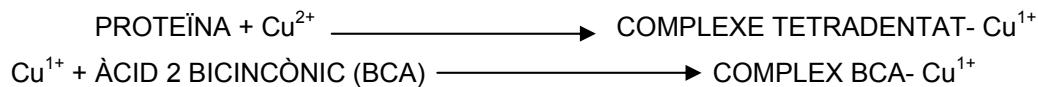
5.1 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA TOTAL

Es van homogenar 100 mg de teixit en 1 ml de tampó d'extracció (Trizma base 50mM, sacarosa 0.25 mM, EDTA 5 mM, tritó 0.5% i cocktail d'inhibidors de proteases (SIGMA, 5 µl per ml de tampó)), en el politró (Ultra Turrax T25 Polytron) a velocitat mitjana (8000-16000 rpm). Els homogenats es van centrifugar (4500 g 1 min a 4°C) i el sobrenedant es va recollir en un eppendorf nou, a on es va guardar a -20°C fins la seva utilització.

5.2 DETERMINACIÓ DE LA PROTEÏNA TOTAL

La determinació de la quantitat de proteïna es va realitzar amb el kit d'assaig de BCA (Pierce), molt útil en el casos ens els que el tampó d'homogeneïtzació porta algun detergent que pugui interferir en la quantificació per altres mètodes com ara el Bradford.

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



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

Per realitzar les determinacions, es va preparar una recta patró de 0-2000 µg proteïna/ml. En una placa d'ELISA de 96 pouets es va posar 25 µl d'estàndard o mostra i 200 µl del tampó de reacció (40 parts del reactiu A: 1 part del reactiu B). Després d'incubar-ho 2 hores a 37°C es va determinar l'absorbància a 590 nm en un lector de plaques d'ELISA.

5.3 WESTERN BLOT

El Western blot és una tècnica per a la detecció de proteïnes específiques en una mostra de teixit homogenat o un extracte cel·lular. Es duu a terme mitjançant un gel d'acrilamida sotmès a una electroforesi per separar les proteïnes desnaturalitzades en funció del seu pes molecular. Posteriorment, les proteïnes són transferides del gel a una membrana de nitrocel·lulosa, on són detectades utilitzant anticossos específics per a cada una de les proteïnes estudiades. El resultat ens permet examinar la presència i quantitat d'una determinada proteïna en una mostra i comparar-la entre mostres de diferents grups.

Preparació del gel i de les mostres

En aquests tipus d'electroforesi s'utilitzen dos gels: un gel concentrador (*stacking*) i un gel separador (*running*), cadascun d'ells amb una concentració diferent d'una solució d'acrilamida:bisacrilamida (37.5:1, Protogel, National Diagnostics) (veure composició a la Taula 2). El primer conté un 5% d'acrilamida i té la funció d'apilar les proteïnes en un mateix punt just a l'inici del separador, on la concentració d'acrilamida dependrà de la mida de les proteïnes que volem estudiar. Tots dos gels contenen dos catalitzadors de la polimerització, que són el persulfat amònic (PSA) al 13% i la tetrametilendiamina (TEMED).

Abans de carregar les mostres en el gel, se'ls va afegir tampó de mostra 3x (Taula 2), i seguidament es van bullir durant 5 minuts.

Taula 2. Composició dels gels i tampons utilitzats en la tècnica del Western blot.

<u>Gel concentrador</u>	<u>Gel separador</u>	<u>Tampó de mostra</u>
Tris-HCl 0.126 M pH 6.8	Tris-HCl 0.39 M a pH 8.8	Tampó fosfat 30 mM pH7
SDS 0.1%	SDS 0.1%	Glicerol 30%
Acrilamida al 5%	Acrilamida (% variable)	SDS 7.5%
TEMED 0.1%	TEMED al 0.06%	Ditiotreitòl 9.72 mM
PSA 0.1%	PSA 0.1%	Blau de bromofenol 0.05%

Condicions d'electroforesi i transferència

L'electroforesi es va realitzar amb el sistema Mini-Protean II de BioRad. El gel va córrer sotmès a un voltatge de 100 volts amb tampó d'electroforesi (veure composició a la Taula 3) fins que el blau de bromofenol va arribar a la part inferior del gel. Un cop finalitzada l'electroforesi, es va preparar la transferència, utilitzant la membrana *Immobilon-P Transfer Membrane* (Millipore, USA). La transferència es va realitzar a 25 mA durant tota la nit, o bé a 400 mA durant 1 hora en tampó de transferència (Taula 3). Per comprovar que la transferència es realitzés correctament, el gel es va tenyir amb blau de Coomassie, i la membrana amb Ponceau. Per això, es va tenyir el gel durant 5 min amb blau de Coomassie (0.25% Coomassie Blue G-250, metanol 45%, àcid acètic 10%) i la membrana amb Ponceau (0.2% de Ponceau S en àcid acètic al 3%). Després de les tincions, es va decolorar la membrana 10 minuts amb aigua destil·lada, i els gels amb solució de destinció (150 ml d'àcid acètic, 150 ml d'isopropanol i 2 l d'aigua destil·lada) i es van visualitzar les bandes.

Detecció de les proteïnes:

Prèviament a la incubació amb els anticossos, es va realitzar el bloqueig de la membrana incubant la membrana a temperatura ambient durant 1 hora amb 5% de llet desnatada en pols en PBS per evitar unions inespecífiques. Després vàrem realitzar 3

rentats de 10 min amb tampó TBS II (Taula 3). La membrana es va incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari i després de 3 rentats més, en les mateixes condicions que les anteriorment descrites, es va incubar amb l'anticòs secundari durant 1h (anticòs que porta unit l'enzim peroxidasa, necessari per a la visualització dels resultats). Un cop finalitzada la incubació es van realitzar 3 rentats més.

Per revelar, es van incubar les membranes durant 1 min amb ECL™ (Amersham Biosciences), i ràpidament es van exposar a una pel·lícula fotogràfica (Hyperfilm MP, Amersham), la qual, un cop revelada, va servir per quantificar densitomètricament les bandes obtingudes amb el programa d'anàlisi d'imatge Phoretix (versió 2.51, Phoretix InteARNtional Ltd). Es va utilitzar la bomba de Na⁺-K⁺ com a control de càrrega.

Taula 3. Tampons utilitzats en la tècnica de Western blot

<u>Tampó d'electroforesi</u>	<u>Tampó de transferència</u>	<u>TBS I</u>	<u>TBS II</u>
Tris 0.025 mM pH 8.3	Tris 25 mM	Tris 20 mM	Tris 4 mM
glicina 0.195 M	Glicina 192 mM	NaCl 150 mM	NaCl 0.5 M
SDS 0.1%	SDS 0.02%	Tween 20 0.05%	Tween 20 0.5%
	Metanol 20%	pH 7.4	pH 7.4

Els anticossos utilitzats en aquest treball van ser:

Anticossos	Procedència	Dilució
Glut 4	Cedit pel Dr. A. Zorzano	1:400
AMPK	Cedit pel Dr. A. Zorzano	1:1000
Iκ-Bα	Cedit pel Dr.R. Hay	1:50
Bomba de Na⁺-K⁺	<i>Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa</i>	1:100
Ac Secundaris:	<i>Goat Anti-rabbit (BioRad)</i> <i>Donkey Anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch)</i>	1: 3000

La dilució dels anticossos es va realitzar en TBS I (Taula 3).

6. MESURES PLASMÀTIQUES

Per a l'obtenció del plasma, es va centrifugar la sang durant 10 minuts a 1200 g a 4°C i vàrem descartar el precipitat.

6.1 METABÒLITS

Les mesures dels diferents metabòlits en plasma es van obtenir per química seca utilitzant tires reactives multiparamètriques d'Spotchem II Panel-2 (proteïna total, albúmina,

calci, triglicèrids, àcid úric i lactat dehidrogenasa) (A. Menarini Diagnostics). Aquestes tires estan compostades per una tira de plàstic on s'han adherit diferents camps reactius per a cada paràmetre. La determinació es produeix per una sèrie de reaccions acoblades que tenen com objectiu final la formació d'un cromòfor el qual es mesura a una longitud d'ona de 610 nm.

Una quantitat fixa de plasma es va col·locar i es va estendre de manera uniforme per tota la superfície de la tira; a continuació el plasma penetra dins la capa de reactiu on s'inicia la reacció.

6.2 NIVELLS PLASMÀTICS D'HORMONES

Insulina

Els nivells d'insulina van ser obtinguts mitjançant la utilització d'un kit per a la detecció i quantificació d'insulina en plasma de rata (Insulin ELISA kit, Cat.#EZRMI-13K, LINCO Research). Aquest assaig es basa en la captura de les molècules d'insulina contingudes a la mostra per anticossos monoclonals que la reconeixen i que es troben cobrint els pouets de la placa. Posteriorment aquest complex és reconegut per un segon anticòs biotinitzat i lligat a l'enzim peroxidasa, que també s'hi uneix i que, a l'afegir-hi el seu substrat, ens permetrà espectrofotomètricament (450 nm) mesurar la seva activitat i, per tant, la quantitat d'insulina a la mostra (ng/ml plasma).

Adiponectina

Els nivells d'adiponectina van ser obtinguts mitjançant la utilització d'un kit per a la detecció i quantificació d'adiponectina en plasma de rata (Rat Adiponectin ELISA kit, Cat. No.CYT288, CHEMICON®). Les bases d'aquest assaig són similars a les del kit anterior i la lectura espectrofotomètrica es realitzà també a 450 nm. Resultats expressats com µg/ml plasma.

6.3 CITOQUINES INFLAMATÒRIES

Factor de necrosi tumoral (TNF-α)

Per a determinar la quantitat de TNF-α en plasma es va utilitzar el kit Rat TNF-α Immunoassay (Quantikine®, R&D Systems). El kit es basa en la captura de les molècules de TNF-α contingudes per anticossos monoclonals que es troben recobrint els pouets de la placa; posteriorment s'afegeix un segon anticòs anti-TNF-α unit a un enzim, i finalment el substrat d'aquest, que ens donarà un producte colorejat detectable per espectrofotometria (450 nm). Els resultats varen ser expressats en pg/ml plasma.

Interleuquina-6 (IL-6)

Per a determinar la quantitat de IL-6 en plasma es va utilitzar el kit Rat IL-6 Immunoassay (Quantikine®, R&D Systems). Les bases d'aquest assaig són les mateixes que en el kit anterior. La lectura espectrofotomètrica es realitzà també a 450 nm, i els resultats varen ser expressats en pg/ml plasma.

Interleuquina-10 (IL-10)

Per a determinar la quantitat de IL-10 en plasma es va utilitzar el kit Rat IL-10 ELISA set (BD Biosciences, San Diego). Les bases d'aquest assaig són les mateixes que en el kit anterior. La lectura espectrofotomètrica es realitzà també a 450 nm i els resultats varen ser expressats en pg/ml plasma.

7. VALORACIONS DEL METABOLISME GLUCÍDIC

7.1 TEST ORAL DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

Aquest test es va realitzar a rates mascles Goto-Kakizaki a dia 0, 15 i 28 de tractament amb EPA i LINO. Per a dur-lo a terme, es van administrar als animals 3 g/kg pc de glucosa intragàstricament. Es van anar recol·lectant mostres de sang de la cua cada 30 min durant un període de 3 hores. D'aquestes mostres n'obteníem la concentració de glucosa (mg/dl) mitjançant l'aparell ACCU-CHEK (Roche), on s'hi col·locaven unes tires de plàstic a les que hi havíem posat una gota de sang.

7.2 NIVELLS DE GLICOGEN EN MÚSCUL

La determinació de glicogen en múscul es va realitzar a partir dels músculs *gastrocnemius* de rates Goto-Kakizaki tractades durant 28 dies amb EPA i LINO. Aquesta tècnica es basa en la capacitat de les bases fortes de solubilitzar les proteïnes cel·lulars, alliberant així el glicogen sense gairebé alterar-lo. El glicogen es precipita amb etanol i s'hidrolitza en medi àcid. D'aquesta forma s'allibera la glucosa, que posteriorment es va valorar espectrofotomètricament.

De manera més detallada, es van utilitzar 200 mg de teixit que vàrem col·locar en tubs de vidre que contenien 1 ml de KOH al 30%. Els vàrem incubar a 100°C durant 20 min en agitació i els vàrem deixar refredar. A continuació es van afegir 2 ml d'etanol fred, es varen tapar amb parafilm i es van deixar a -20°C tota la nit. Posteriorment es van centrifugar a 400 g a 4°C durant 15 min i vàrem eliminar el sobrenedant. Vàrem redissoldre el precipitat amb 1 ml d'aigua destil·lada i 2 ml d'etanol i es va tornar a deixar tota la nit a -20°C.

L'endemà es va centrifugar 15 min a 400 g, es va obtenir el sobrenedant, s'hi va afegir 1 ml d' H₂SO₄ i es va incubar durant 2-3 hores a 100°C amb agitació constant. Després vàrem neutralitzar el contingut amb KOH al 30% i es va enrasar amb aigua destil·lada fins a 2 ml. Arribat aquest punt, es va procedir a la valoració de la glucosa mitjançant el kit Glucose PAP CP (ABX Pentra) basat en la incubació de les mostres amb un reactiu i en la posterior determinació de la concentració de glucosa mitjançant un lector de plaques d'ELISA a 500 nm. Els resultats van ser expressats com mg de glucosa /g de múscul.

7.3 CAPTACIÓ DE 2-DESOXI-[¹⁴C]GLUCOSA EN C2C12

La 2-desoxiglucosa (2-DOG) és un anàleg de la glucosa que és captat per les cèl·lules pel mateix sistema de transportadors, i que presenta la característica de que, a diferència de la glucosa, no pot ser metabolitzada. Això permet fer una estimació indirecta de la taxa de captació de glucosa. Per estudiar la captació de 2-DOG en cèl·lules C2C12, es va realitzar un experiment establint diferents grups: control i cèl·lules tractades a la dosi de 500 µM d'EPA i de LINO. Un cop ja havíem sembrat i diferenciat les cèl·lules en plaques de 6 pous, vam realitzar l'experiment a dia 7 de diferenciació. Es van rentar dues vegades amb PBS i es van afegir 3 ml de tampó Krebs-Henseleit (NaCl 150 mM, KCl 6.17 mM, H₂KPO₄ 1.54 mM, MgSO₄ 1.58 mM, CaCl₂ 0.5 mM) a pH 7.4 suplementat amb piruvat 2 mM, HEPES 20 mM, 2-desoxiglucosa 25 mM i 0.1µCi/ml de 2-desoxi-[¹⁴C]glucosa (activitat específica 56 mCi/mmol, Amerhsam, UK); en el cas del grup tractat, el medi també contenia EPA o LINO. Es van incubar les cèl·lules 3 hores a 37°C. Posteriorment es van rentar els pous dues vegades amb el tampó Krebs-Henseleit i es van incubar durant 1 hora més a 37°C amb 1 ml d' NaOH 0.1N -Tritó 0.1%. Es va realitzar una valoració de proteïnes pel mètode de BCA, i es va valorar la radioactivitat continguda en 250 µl del lisat cel·lular en un comptador d'escintil·lació líquid (Packard 2100TR). Els resultats es van expressar com mmols de 2-DOG per mg de proteïna.

7.4 CAPTACIÓ DE 2-DESOXI-[¹⁴C]GLUCOSA EN MÚSCULS EDL AÏLLATS

Per determinar la captació de 2-DOG en músculs aïllats, es van extreure els músculs EDL de rates anestesiades amb Imalgene®-Rompún® (3:1). Els músculs es van manipular amb les consideracions abans esmentades. Un cop extrets, es van incubar en vials de vidre durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d'O₂/CO₂ (19:1), en 3 ml de tampó Krebs-Henseleit complementat amb piruvat (2 mM), HEPES (20 mM) i aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM), a pH 7.4, prèviament gasejat amb carbogen durant 20 min. Passat aquest temps, es van transferir els músculs a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació fresc, el qual portava, en el cas dels grups tractats, 2 mM d'EPA i de LINO. Després de 30 min d'incubació, es van posar els músculs en uns altres vials amb el mateix medi, i es van incubar durant 2 hores més. Passat

aquest temps es va procedir a realitzar un últim canvi de medi, compost en aquest cas per tampó Krebs-Henseleit complementat amb manitol 1 mM, D- ^3H]manitol (activitat específica 20 Ci/mmol, Amerhsam, UK), 2-desoxiglucosa 0.1 mM i 2-desoxi-D- ^{14}C]glucosa (activitat específica 56 mCi/mmol, Amerhsam, UK). El manitol serveix com a mesura indirecta de la quantitat de 2-DOG que, en lloc de ser absorbida, es queda a l'espai intersticial. Amb aquest medi radioactiu, es van incubar els músculs durant 30 min més, temps després del qual es van recollir els músculs, es van netejar amb medi d'incubació per eliminar les restes de traçador adherit i no incorporat, i van ser congelats en nitrogen líquid. Els medis es van utilitzar per determinar la radioactivitat present.

Per determinar la quantitat de 2-DOG captada pel múscul, es van posar els EDL en tubs Pyrex amb 250 μl de Protosol® (Du Pont) amb el qual es van incubar a 50°C durant hores fins la seva completa digestió. Un cop el teixit va estar totalment digerit, es van afegir 250 μl de toluè i 300 μl d' H_2O_2 al 30%, amb els quals es va incubar durant 10 min a la mateixa temperatura. Posteriorment es va neutralitzar amb 150 μl d'àcid acètic al 25% i es va realitzar el recompte de la radioactivitat amb 10 ml de líquid d'escintil·lació, realitzant una doble determinació tant pel ^3H com pel ^{14}C en un comptador d'escintil·lació líquid (Packard 2100TR). Els resultats es van expressar com nmols de 2-DOG / g múscul.

8. VALORACIONS DEL METABOLISME LIPÍDIC

8.1 DESTÍ METABÒLIC DEL PALMITAT

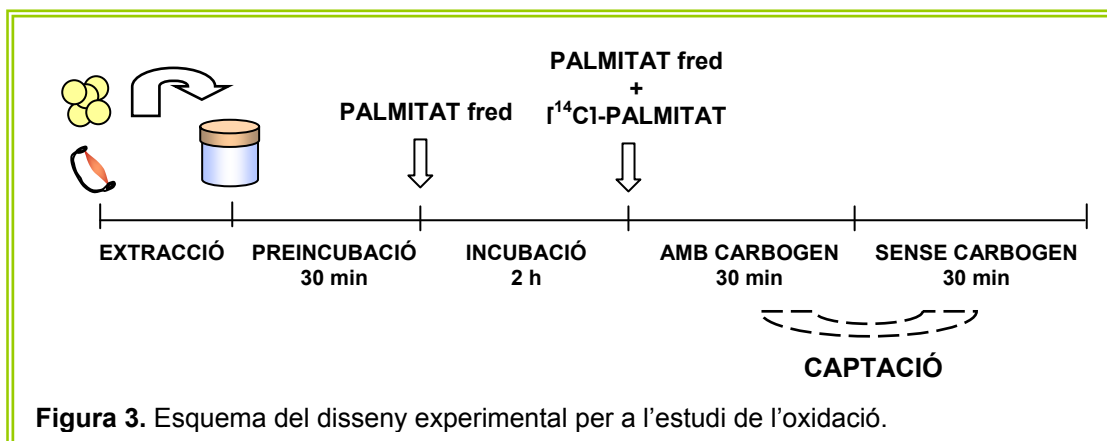
La valoració del destí metabòlic de l'àcid palmític es va realitzar mitjançant la incubació de trossets de teixit adipós blanc dorsal (TABd) (100 mg) i de tires de músculs aïllats de rates Goto-Kakizaki que havien estat sotmeses a un tractament crònic intragàstric durant 28 dies d' EPA i LINO (0.5 g/kg pc).

8.1.1 OXIDACIÓ

Es van extreure els teixits de rates anestesiades amb Imalgene® -Rompún® (3:1). Els músculs es van col·locar en un suport metàl·lic, de manera que es pogués mantenir al màxim les condicions de tensió fisiològiques. Un cop extrets, es van incubar (preincubació) en vials de vidre durant 30 min a 35°C (en un bany termostatitzat) sota una atmosfera d' O_2/CO_2 (19:1), en 3 ml de tampó Krebs-Henseleit suplementat amb piruvat (2 mM), HEPES (20 mM) i aminoàcids de cadena ramificada (leucina 17 mM, isoleucina 10 mM, valina 20 mM), a pH 7.4, solució que vàrem anomenar medi d'incubació la qual s'havia de gassejar amb carbogen durant 20 min abans de la seva utilització. Passat aquest temps, es van transferir els teixits a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació suplementat amb 0.2 mM d'àcid palmític. Per evitar que aquest precipités, es va suplementar el medi amb albúmina

(2%) i es va anar afegint el palmitat gota a gota mantenint el medi a 37°C i en agitació constant. Es van incubar durant 2 hores en aquestes condicions, i seguidament es van tornar a transferir a vials nous amb 2 ml de medi d'incubació, 0.2 mM d'àcid palmític i 1.56 nM d'àcid [^{14}C]palmític (400000 dpm/vial; activitat específica 60 mCi/mmol; Amersham,UK). Es van incubar durant 30 min gassejats amb carbogen i els següents 30 min sense gassejar (Figura 3). Per tal de recollir el CO_2 produït, es van afegir al medi 200 μl d'àcid perclòric al 60% en el cas del múscul i 100 μl en els vials amb TABd, i 150 μl d'hidròxid d'hiamina al paper insertat en el tap (els vials van ser tapats amb un tap de cautxú, al qual se li havia insertat una tira de paper on posteriorment es recolliria el CO_2). Es van deixar incubar durant 1 hora amb agitació constant i, d'aquesta manera, l'àcid va desplaçar el CO_2 produït a gas, el qual va ser recollit en el paper impregnat d'hidròxid de hiamina.

Per determinar la quantitat de palmitat que havia estat oxidat, es va posar la tira de paper amb l'hidròxid d'hiamina en vials amb 10 ml de líquid d'escintil·lació i es va procedir al seu recompte en un comptador d'escintil·lació líquid (Packard 2100TR). Els resultats es van expressar com nmols de CO_2 produït per gram de teixit.



8.1.2 DESTÍ DEL PALMITAT

Per analitzar el destí metabòlic de l'àcid palmític es va realitzar una extracció de proteïnes i lípids del múscul i del TAB. Els teixits, un cop triturats en un morter amb nitrogen líquid, es van col·locar en tubs de vidre. Es van precipitar les proteïnes afegint 0.5 ml de TCA fred, vortejant i incubant 15 min a 4°C. Després d'una centrifugació (3000 g, 10 min), el sobrenedant es va guardar per l'extracció de lípids, i el precipitat es va resuspendre en 1 ml de cloroform:metanol (2:1). Es va centrifugar en les mateixes condicions, posant el sobrenedant obtingut amb l'anterior per la posterior extracció de lípids. Per realitzar l'extracció de proteïnes, es va deixar assecat el precipitat i després es va resuspendre amb 2 ml d' NaOH 0.3 N i desoxicolat sòdic 0.4%. Es va bullir durant 1 hora i, un cop refredats els tubs, es van posar les proteïnes en vials amb 10 ml de líquid d'escintil·lació i 100 μl d' HCl (per neutralitzar) pel seu posterior recompte. Respecte a l'extracció de lípids, es van afegir 5 ml de cloroform:metanol (2:1) als sobrenedants recollits i es va agitar per inversió durant 5

min. Després es van afegir 5 ml de PBS i es va tornar a agitar per inversió 5 min, centrifugant posteriorment a 2000 g durant 2 min. Un cop separades les fases, es va descartar la superior (de la qual vam comptar 500 µl en 8 ml de líquid d'escintil·lació que corresponien al palmitat en fase soluble) i la inferior es va transferir a un vial i es va deixar evaporar. Un cop els lípids van estar secs, es van resuspendre en 8 ml de líquid d'escintil·lació i es va procedir al seu recompte en un comptador d'escintil·lació líquid (Packard 2100TR). Els resultats es van expressar com nmols d'àcid palmític incorporat per gram de teixit.

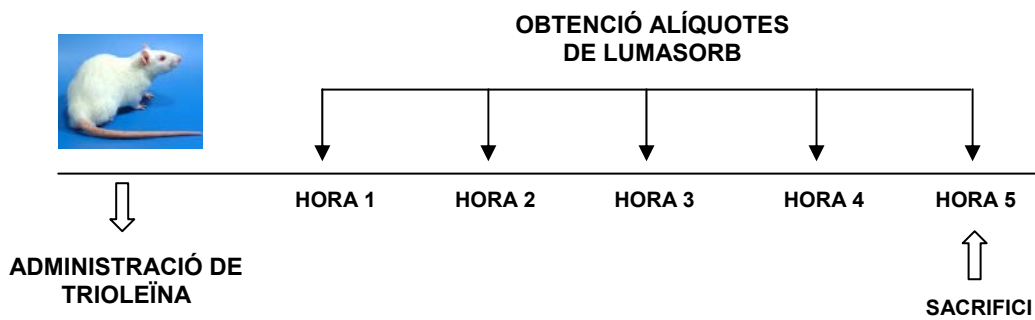
8.2 DESTÍ METABÒLIC DE LA TRIOLEÏNA

8.2.1 OXIDACIÓ

Al final del tractament crònic amb EPA i LINO es va realitzar una administració intragàstrica amb una cànula metàl·lica (Fine Science Tools) de 0.5 µCi de glicerol tri[1-¹⁴C]oleate (activitat específica 50 mCi/mmol; Amersham, Bucks.,UK) dissolt en 0.5 ml de trioleïna (Sigma; Triolein (C18:1, [cis]-9) 99%), sense anestèsia però procurant el mínim estrès per l'animal.



Es va determinar la taxa d'oxidació d'aquest lípid i la seva incorporació diferencial als teixits per estudiar el seu destí metabòlic (Oller do Nascimento i Williamson, 1986). Per determinar la taxa d'oxidació d'aquest àcid gras, el CO₂ expirat va ser recollit cada 60 minuts durant 5 hores mitjançant la seva absorció en Lumasorb (Lumac, Holanda) i la taxa de producció de ¹⁴CO₂ es va estimar mitjançant el comptatge de la radioactivitat de la mostra de Lumasorb.



8.2.2 ABSORCIÓ INTESTINAL

Per determinar la radioactivitat absorbida, es va mesurar la quantitat de ^{14}C -trioleïna que havia estat retinguda al tracte gastrointestinal (TGI). Es va homogenar el tracte en un *Waring-Blender* amb 150 ml d'àcid perclòric al 3%, es va agafar una alíquota d'1 ml, i es va realitzar l'extracció de lípids segons el mètode de Stansbie i col·laboradors (1976). En tubs de vidre de 20 ml es va posar 1 ml de l'homogenat amb 3 ml de KOH 30% i es va incubar 10 min a 70°C . Després es va afegir a cada tub 3 ml d'etanol 100% i es va incubar 2 hores més, remenant de tant en tant. Després de deixar-ho refredar, es van afegir 3 ml de H_2SO_4 per saponificar els lípids. Un cop freds, es va procedir a l'extracció de lípids afegint 5 ml d'èter de petroli de $40\text{-}60^{\circ}$, remenant 10 min i centrifugant. La fase superior amb l'èter de petroli i els lípids es va transferir a un tub nou, i es va repetir l'extracció de la fase inferior. L'èter de petroli, amb els lípids, es va posar en un vial d'escintil·lació prepesat i es va deixar evaporar, de manera que al vial van quedar els lípids. Per diferència de pes d'aquests vials (vial amb lípids - vial buit) es va obtenir la quantitat de lípids per gram de teixit.

Posteriorment, es van dissoldre els lípids en 10 ml de líquid d'escintil·lació i es va procedir al recompte de la radioactivitat. La diferència entre la radioactivitat administrada i la que restava al TGI va permetre determinar el percentatge de ^{14}C -trioleïna absorbida.

8.2.3 INCORPORACIÓ A TEIXITS

Per calcular la quantitat de radioactivitat incorporada als teixits, es va realitzar una extracció de lípids amb èter de petroli de 500 mg de cada teixit (o 150 μl en el cas del plasma), de la mateixa manera que amb el TGI, i es va expressar la quantitat de radioactivitat incorporada en funció de la radioactivitat absorbida. El percentatge de lípids tissulars es va calcular per gravimetria, igual que en l'apartat anterior.

De la mateixa manera es va procedir a l'extracció de lípids de les carcasses dels animals, amb un pas previ d'homogeneïtzació d'aquestes en 350 ml d' HClO_4 al 3%. D'aquest homogenat vàrem agafar 1.5 ml i es realitzà el protocol esmentat anteriorment.

En el cas del fetge s'incorporà un pas més ja que també conté lípids no saponificables. En aquest teixit després de la incubació de 2 hores amb etanol es van afegir 5 ml d'èter de petroli es va remenar durant 10 min i es va centrifugar a 100 g per separar les

dues fases. Els lípids no saponificables es trobaren a la part superior que vàrem traspasar en un vial i ho vàrem deixar evaporar. Amb la part inferior es va seguir realitzant el mateix procediment que en la resta de teixits anteriorment explicats. Els resultats es van expressar com % de la dosi absorbida /g de teixit.

8.3 ACTIVITAT DE LIPOPROTEÏNA LIPASA

L'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL) es va valorar en teixit adipós blanc dorsal, teixit adipós marró i cor de rates Goto-Kakizaki que havien rebut un tractament crònic intragàstric d'EPA i LINO (0.5 g/kg pc) durant 28 dies. Es van mesurar segons una modificació del mètode de Ramírez i col·laboradors (1985), basat en la utilització d'un precursor radioactiu en forma de liposomes reconstituïts i la quantificació dels àcids grassos lliures alliberats per l'acció de l'enzim. Aquesta tècnica només és vàlida per teixits sense lipasa hepàtica, donat que no es realitza una deslipidació prèvia. Les mostres es van homogenar en fred i manualment amb tampó IB (veure composició a la taula 4) amb una proporció de 100 mg de teixit per ml de tampó IB. Es van centrifugar (5000 g 3-5 min), i després d'eliminar els lípids que quedaren en la part superior, es va guardar la fase aquosa descartant-ne el precipitat. El tampó d'incubació estava format per tampó LPL (taula 4) del que vàrem descongelar una alíquota en el moment de la valoració i li vam afegir sèrum de rata dejunada (dejuni de 24 hores i inactivat a 65°C durant 5 min) en proporció 29:1. El substrat es va preparar afegint a 600 µCi de glicerol tri[9,10(n)³H]oleat (activitat específica 10 Ci/mmol; Amersham, Bucks., UK), 49 mg de trioleïna i 8 ml de toluè. Després de barrejar molt bé, es van agafar 100 µl de la barreja per cada ml de tampó a utilitzar, i es va deixar evaporar el toluè. Un cop evaporat el solvent, es va afegir la quantitat proporcional de tampó d'incubació amb sèrum, sonicant en fred durant 3-5 min, fins a obtenir una emulsió homogènia. Un cop preparades les mostres i el tampó d'incubació, es van afegir en tubs de vidre 5 µl de la mostra homogenada, 15 µl de tampó IB i 180 µl de tampó LPL (amb el substrat), i es va deixar incubar a 25°C durant 30 min. La incubació es va aturar afegint 3.5 ml de cloroform:metanol:heptà (28:25:20) fred i 1 ml de K₂CO₃ 0.1 M pH 10, agitant al vòrtex i centrifugant (3000 g, 15 min) per separar les fases. Finalment, es va valorar la radioactivitat que contenien 0.5 ml de la fase aquosa obtinguda. Els resultats varen ser expressats en mU/mg de teixit.

Taula 4. Tampons utilitzats en la valoració de l'activitat de la LPL

<u>Tampó IB</u> (pH 7.5)	<u>Tampó LPL</u> (pH 7.5)
HEPES 10 mM	PIPES 18.75 mM
EDTA 1 mM	MgCl ₂ 57.4 mM
DTT 1 mM	BSA lliure d'àcids grassos 0.57 mg/ml
Sacarosa 250 mM	
Heparina 5 U/ml	

9. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Les anàlisis estadístiques de les dades presentades en aquest treball es van realitzar amb el test estadístic *t*-Student.

IV. RESULTATS

1. EFECTE DE L'EPA SOBRE LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 2

Els pacients amb DMT2, com s'ha esmentat anteriorment, es caracteritzen principalment per la presència de resistència a la insulina i, per tant, un conjunt d'alteracions metabòliques provocades per la manca d'acció d'aquesta hormona. Tenint en compte l'elevada incidència d'aquesta malaltia en la població, vàrem voler testar el potencial terapèutic dels àcids grassos essencials ω -3, i més concretament de l'EPA (àcid eicosapentaenoic) a diferents nivells en un model experimental de DMT2.

Per estudiar si l'EPA podia millorar la sensibilitat a la insulina i/o influir favorablement en els trastorns metabòlics que desencadenen aquesta malaltia, es van utilitzar rates Goto-Kakizaki (model espontani de DMT2), amb les quals vàrem realitzar una sèrie d'aproximacions tant *ex vivo* com *in vivo* després de l'administració intragàstrica d'EPA a la dosi de 0.5 g/kg de pes corporal (pc) durant 28 dies. En aquest estudi es va incorporar un grup d'animals tractats amb àcid linoleic (LINO) a la mateixa dosi per poder comparar els possibles efectes de l'EPA amb un AG de la família dels ω -6. Un cop finalitzat el tractament, es van realitzar diferents estudis a nivell de metabolisme glucídic, lipídic i de marcadors d'inflamació.

Durant tot el tractament es va fer un seguiment del pes dels animals, de la ingesta i de la beguda i es va observar que ni l'EPA ni el LINO provocaven canvis significatius en aquests paràmetres respecte els animals diabètics no tractats (Taula 1).

	CONTROL	EPA	LINO
Pes inicial	115 \pm 6.6	117.7 \pm 5.0	117 \pm 6.0
Pes final	264.8 \pm 5.3	262.9 \pm 4.4	262.4 \pm 5.4
Guany de pes	4.4 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1	4.2 \pm 0.1
Ingesta	19.2 \pm 0.4	18.7 \pm 0.3	19.2 \pm 0.4
Beguda	20.4 \pm 0.2	20.4 \pm 0.7	20.3 \pm 0.7

Taula 1. Pes, ingesta i beguda dels animals durant el tractament. El pes dels animals està expressat en g, la ingesta i la beguda en g i ml respectivament i per dia. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, n \geq 14. CONTROL: grup no tractat, EPA: grup tractat amb àcid eicosapentaenoic, i LINO: grup tractat amb àcid linoleic.

Un cop finalitzat el tractament, es van sacrificar els animals dels quals es van extreure i pesar els diferents teixits i òrgans. No es van observar, per efecte d'aquests compostos, canvis en el pes dels músculs ni en el dels diferents teixits adiposos valorats (Taula 2).

	CONTROL	EPA	LINO
GSN	1309 ± 93.5	1218 ± 45.8	201 ± 50.7
Tibialis	349 ± 15.6	329 ± 11.9	329 ± 12.8
Soleus	87 ± 5.7	82 ± 3.0	85 ± 4.1
EDL	88 ± 3.8	80 ± 2.4	80 ± 3.1
TABd	4044 ± 222.9	3784 ± 161.7	3989 ± 250
TABe	2055 ± 83.3	1938.6 ± 111.5	1989 ± 107.7
TAM	306 ± 16.5	297 ± 12.9	304 ± 20.3

Taula 2. Pes dels músculs i teixits adiposos un cop finalitzat el tractament. Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 14. CONTROL: grup no tractat, EPA: grup tractat amb àcid eicosapentaenoic, i LINO: grup tractat amb àcid linoleic. Gastrocnemius (GSN), extensor digitorum longus (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

Com en els resultats anteriors, tampoc vàrem observar influència del tractament en el pes dels diferents òrgans estudiats (Taula 3).

	CONTROL	EPA	LINO
Fetge	10.5 ± 0.9	8.8 ± 0.6	9.7 ± 0.8
Cor	864 ± 48.8	785 ± 29.8	839 ± 49.7
Ronyons	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
Melsa	638 ± 42	643 ± 27.7	638 ± 35.2
Pulmons	876 ± 47.8	840 ± 24.1	872 ± 36.2
TGI	17 ± 1	17 ± 1	17 ± 0.1
Carcassa	174 ± 7.2	167 ± 5.8	170 ± 7

Taula 3. Pes dels òrgans i de la carcassa un cop finalitzat el tractament. Els pesos del fetge, els ronyons, el TGI (tracte gastrointestinal) i la carcassa s'expressen en g / 100 g de pes corporal inicial. Els pesos del cor, la melsa i els pulmons s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 14. CONTROL: grup no tractat, EPA: grup tractat amb àcid eicosapentaenoic, i LINO: grup tractat amb àcid linoleic.

Posteriorment, per recollir més dades de l'estat general dels animals sotmesos al tractament, vam fer una valoració dels nivells circulants de diferents paràmetres, valorant així la concentració de la proteïna total, de l'albumina, del calci, dels triglicèrids, de l'àcid úric i de l'enzim lactat deshidrogenasa en el plasma de cada un dels animals i, en cap cas, es van veure canvis significatius (Taula 4).

	CONTROL	EPA	LINO
Proteïna total	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.1	5.6 ± 0.1
Albúmina	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1
Calci	10.8 ± 0.2	10.6 ± 0.2	10.8 ± 0.1
Triglicèrids	79.6 ± 10.3	72.3 ± 9	65.3 ± 7.6
Àcid úric	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.4
LDH	747 ± 1312	895 ± 115	1031 ± 161

Taula 4. Mesura de diferents paràmetres plasmàtics a les rates després del tractament. La proteïna total i l'albumina s'expressen en g/dl; el calci, els triglicèrids i l'àcid úric en mg/dl; la LDH (lactat deshidrogenasa) en IU/l. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 14. CONTROL: grup no tractat, EPA: grup tractat amb àcid eicosapentaenoic i LINO: grup tractat amb àcid linoleic.

1.1 ESTUDI DEL METABOLISME GLUCÍDIC

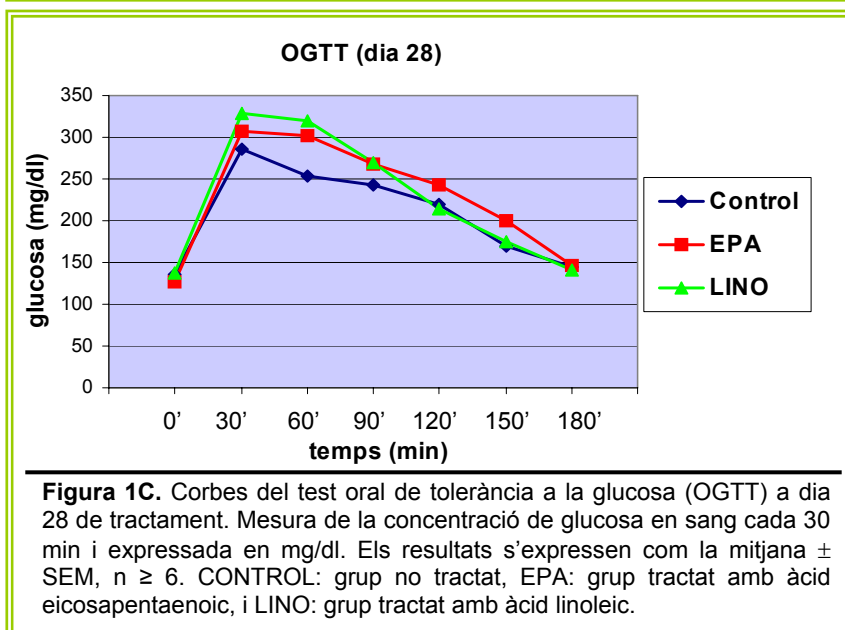
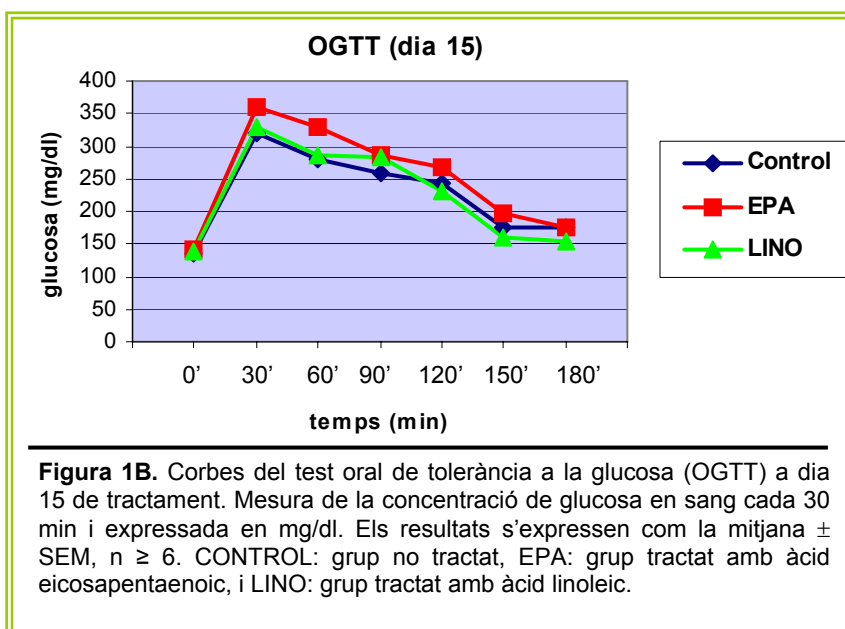
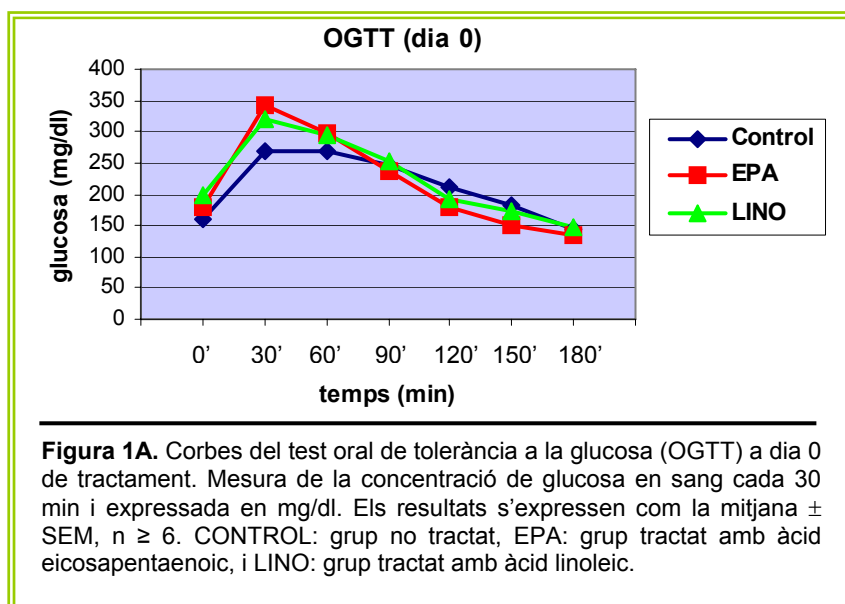
El paper de la insulina en el metabolisme de la glucosa és ben conegut, sent la principal responsable de la seva captació i utilització per part dels teixits i del seu emmagatzematge en forma de glicogen. És per això que ens vàrem plantejar realitzar una sèrie d'estudis per a valorar si l'administració d'EPA era capaç de potenciar la sensibilitat a la insulina atenuant la intolerància a la glucosa o, si més no, atenuar, a diferents nivells, les conseqüències derivades de la resistència a l'hormona, ja que aquesta, alhora, controla directament un conjunt d'enzims metabòlics, així com també és capaç de regular l'expressió gènica d'enzims hepàtics relacionats amb la gluconeogènesi o la glucòlisi (Pilkis i Granner, 1992).

1.1.1 TEST ORAL DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA (OGTT)

Un dels primers estudis que vam realitzar durant el tractament i un cop finalitzat aquest va ser un test oral de tolerància a la glucosa. Aquest test s'utilitza per mesurar la concentració que assoleix la glucosa i la seva correcta absorció. És una prova mèdica que s'utilitza per a detectar tant hiperglucèmies com hipoglucèmies i per al diagnòstic de la diabetis.

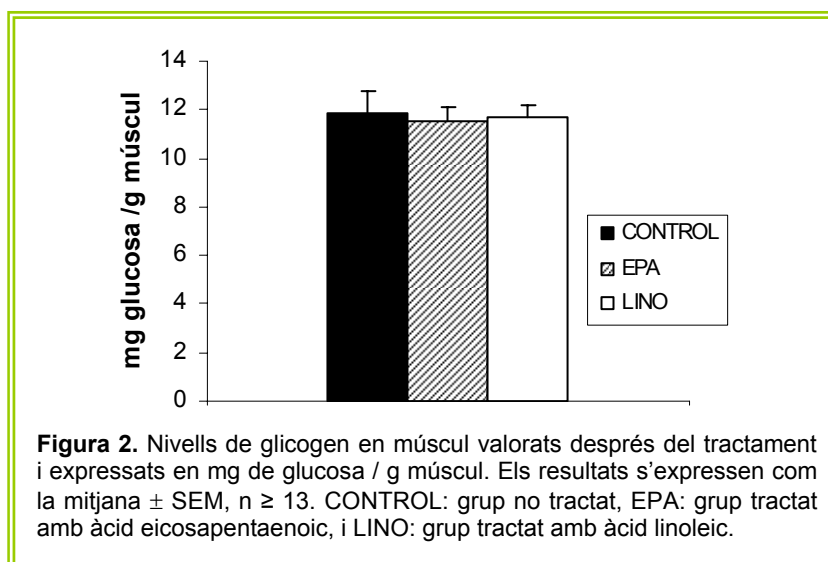
Per dur a terme aquest estudi, es van administrar intragàstricament 3 g/kg de glucosa i es van recollir mostres de sang cada 30 minuts durant un període de 3 h. Les corbes de glucosa en sang van ser determinades a dia 0, 15 i 28 del tractament amb EPA i LINO.

En les gràfiques següents es mostren les corbes de la concentració de glucosa en sang els 3 dies en els que es va realitzar el test (Figura 1A,1B i 1C). Es pot observar que, durant tot el mes, no es van detectar canvis en el resultat de l'OGTT en funció del tractament amb EPA, així com tampoc amb LINO.



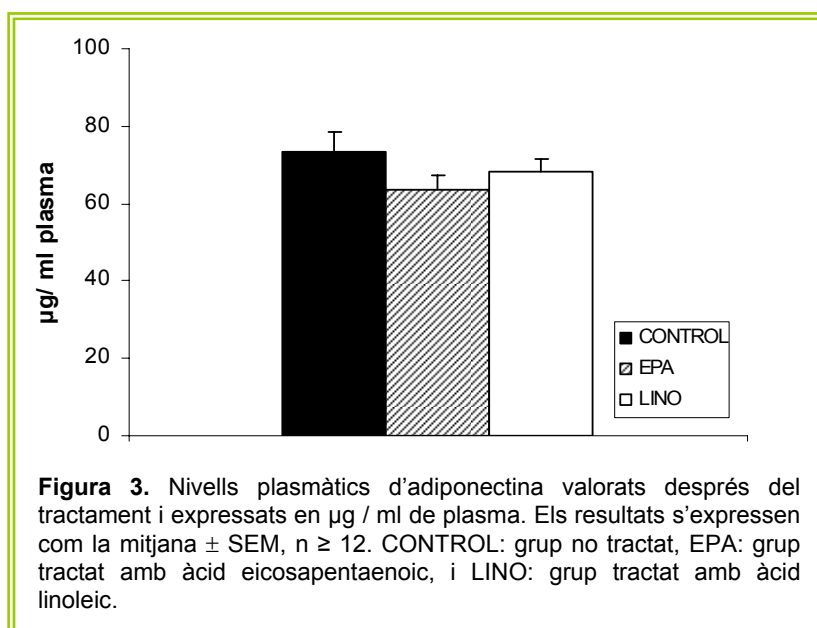
1.1.2 NIVELLS DE GLICOGEN EN MÚSCUL

Finalitzat el tractament, vàrem valorar el contingut de glicogen en múscul esquelètic ja que aquest teixit, després d'un àpat, s'encarrega de captar una gran part de la glucosa circulant i d'emmagatzemar-la en forma de glicogen (DeFronzo *et al.*, 1981). En aquest cas no vam veure canvis per efecte de l'EPA ni del LINO (Figura 2).



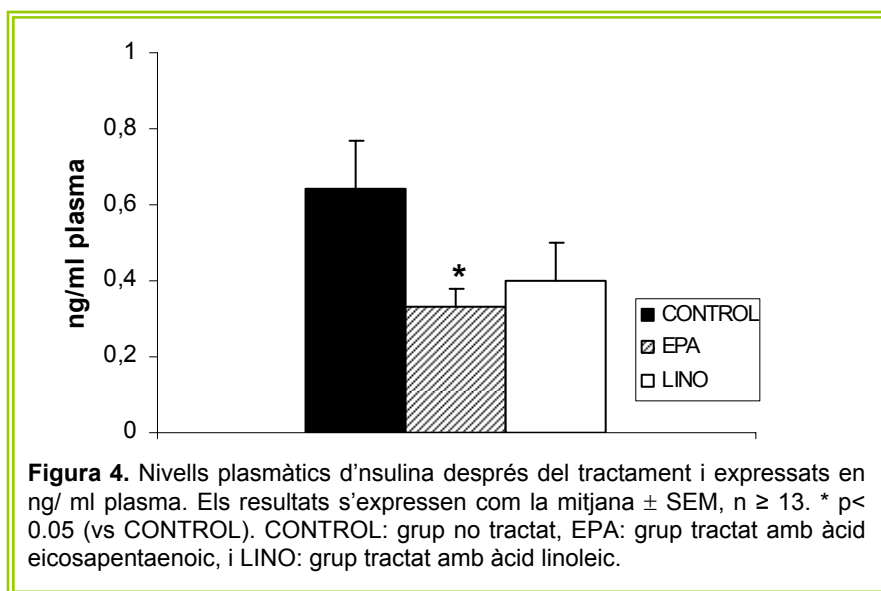
1.1.3 NIVELLS PLASMÀTICS D'ADIPONECTINA

Una altra de les determinacions que vàrem realitzar va ser la dels nivells plasmàtics d'adiponectina, hormona produïda pel teixit adipós que arriba a la circulació sistèmica i de la que s'ha detectat un augment de la seva concentració quan la sensibilitat a la insulina millora (Matsuzawa *et al.*, 2004). Els resultats obtinguts, però, no van mostrar efectes del tractament (Figura 3).



1.1.4 NIVELLS PLASMÀTICS D'INSULINA

S'ha vist que en casos de DMT2 no tan sols hi ha alteracions degut a la resistència a la insulina sinó també per una situació d'hiperinsulinèmia provocada per un intent, per part del pàncrees, de contrarestar la manca d'actuació de l'hormona. Per aquest motiu, entre els nostres estudis vam voler valorar els nivells plasmàtics d'insulina.

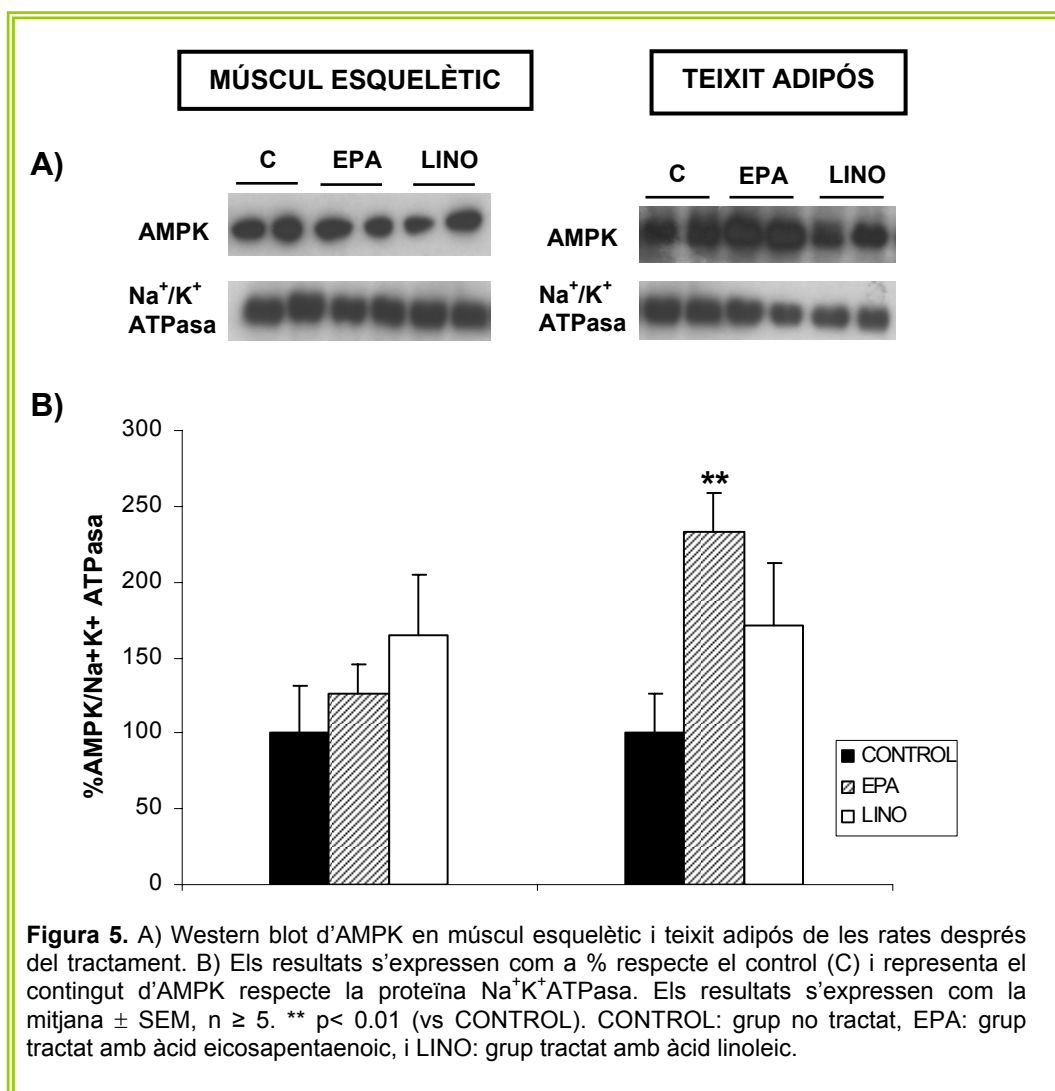


Els resultats obtinguts mostren que en les rates a les que se'ls hi va administrar EPA presenten una disminució significativa de la insulina circulant respecte el control, a diferència del grup tractat amb LINO on no vàrem veure cap efecte significatiu (Figura 4).

1.1.5 NIVELLS D'AMPK

L'AMPK (quinasa activada per AMP) és un enzim que actua com a sensor de la càrrega energètica cel·lular i que s'activa quan hi ha canvis en els dipòsits energètics de la cèl·lula, com per exemple, en el cas de l'exercici. Entre les seves funcions, s'ha vist que presenta un paper important en el consum de glucosa estimulant la captació de glucosa en el múscul i la glucòlisi. També juga un paper important en el metabolisme lipídic, reduint la síntesi lipídica així com també la gluconeogènesi al fetge, i provocant un augment de l'oxidació d'AG.

Per tant, degut a la seva actuació en el metabolisme i donat que, juntament amb la insulina i el glucagó, participa activament en la regulació de la glucèmia, vàrem trobar interessant valorar el contingut proteic de l'AMPK tant en el múscul esquelètic com en el teixit adipós de les rates diabètiques després del tractament.

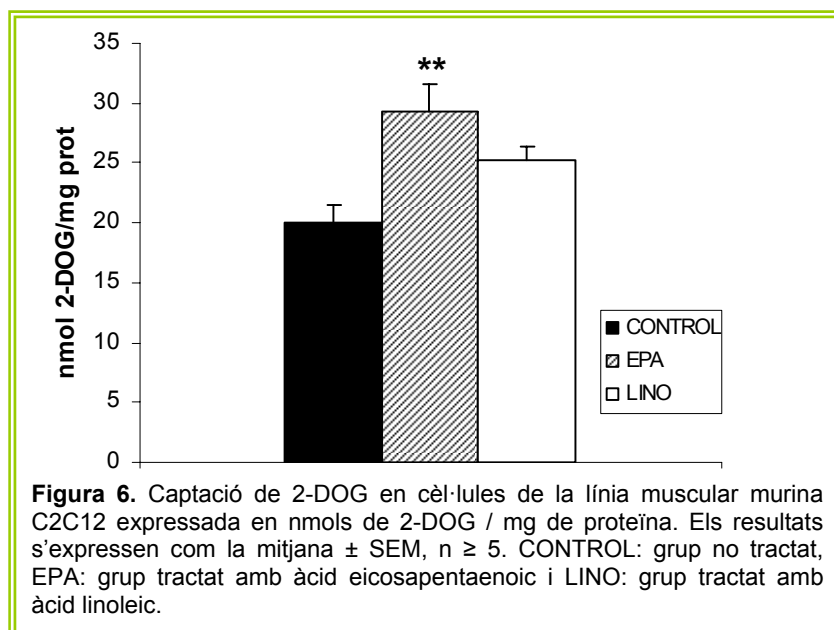


En aquest estudi no vàrem observar canvis en el múscul esquelètic però sí un augment significatiu de l'AMPK en el teixit adipós del grup tractat amb EPA. En cap dels dos teixits s'observaren canvis per efecte del LINO (Figura 5).

1.1.6 CAPTACIÓ DE 2-DESOXIGLUCOSA EN CÈL·LULES C2C12

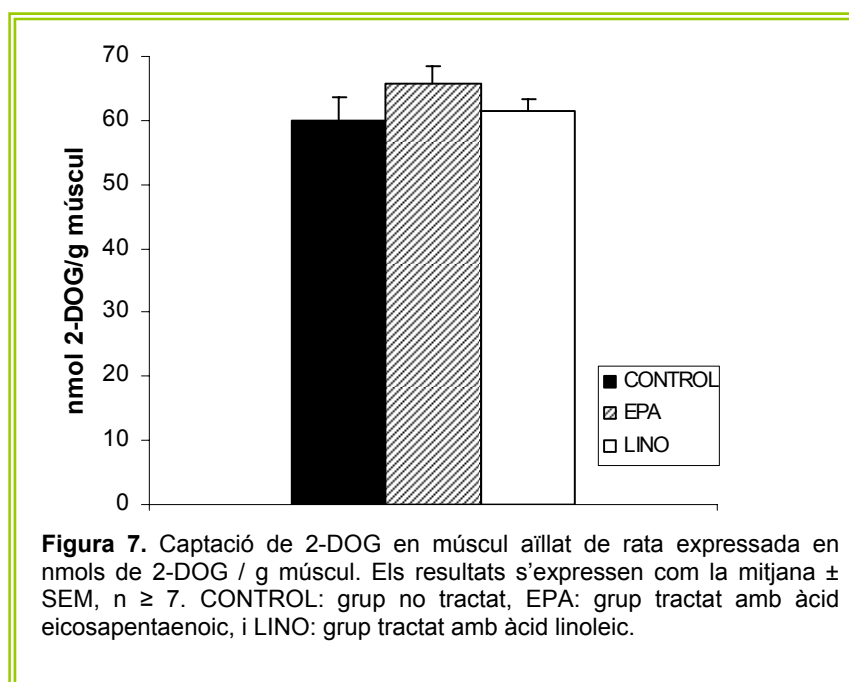
Per estudiar els possibles efectes d'aquests nutracèutics en la captació de glucosa, vàrem realitzar un experiment *in vitro* incubant a 37°C cèl·lules de la línia muscular C2C12 amb EPA i LINO a una dosi de 500 µM durant 3 h, i vam valorar la captació de 2-DOG transcorregut aquest temps (més detalls a la secció de materials i mètodes 7.3).

Com es pot observar a la Figura 6, les cèl·lules incubades amb l'àcid gras ω-3 mostraven un increment significatiu (46%) en la captació de glucosa respecte les cèl·lules control. En canvi, el tractament amb LINO no va produir canvis destacables en la captació de glucosa.



1.1.7 CAPTACIÓ DE 2-DESOXIGLUCOSA EN MÚSCULS AÏLLATS

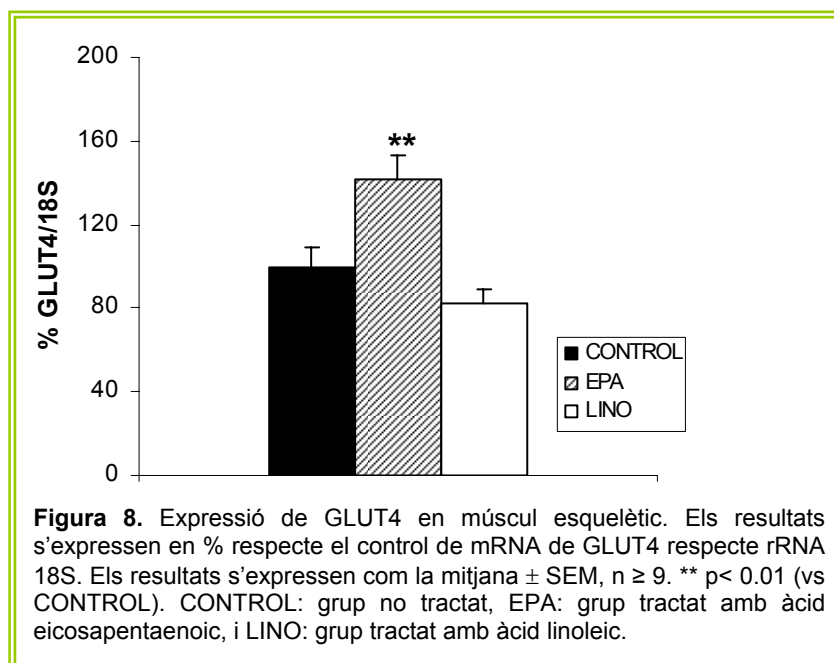
Continuant amb el plantejament del punt anterior i havent observat l'efecte de l'EPA en la captació de glucosa *in vitro*, vàrem voler repetir l'experiment, però en aquest cas *ex vivo*, incubant músculs EDL (*extensor digitorum longus*) amb els dos compostos a una dosi de 0.2 mM i, posteriorment, valorar la captació de 2-DOG (més detalls a la secció de materials i mètodes 7.4).



Els resultats obtinguts en aquest experiment no van mostrar canvis significatius en la captació de glucosa en cap dels dos tractaments (Figura 7).

1.1.8 EXPRESSIÓ GÈNICA DE GLUT4 EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

A continuació, i en relació als experiments anteriors en els que, tot i no observar un augment de la captació de glucosa en EDL, sí l'observàrem *in vitro*, vàrem voler determinar si l'EPA podia influir en l'expressió del transportador de glucosa GLUT4 en el múscul esquelètic de les rates que havien estat sotmeses al tractament durant un mes.



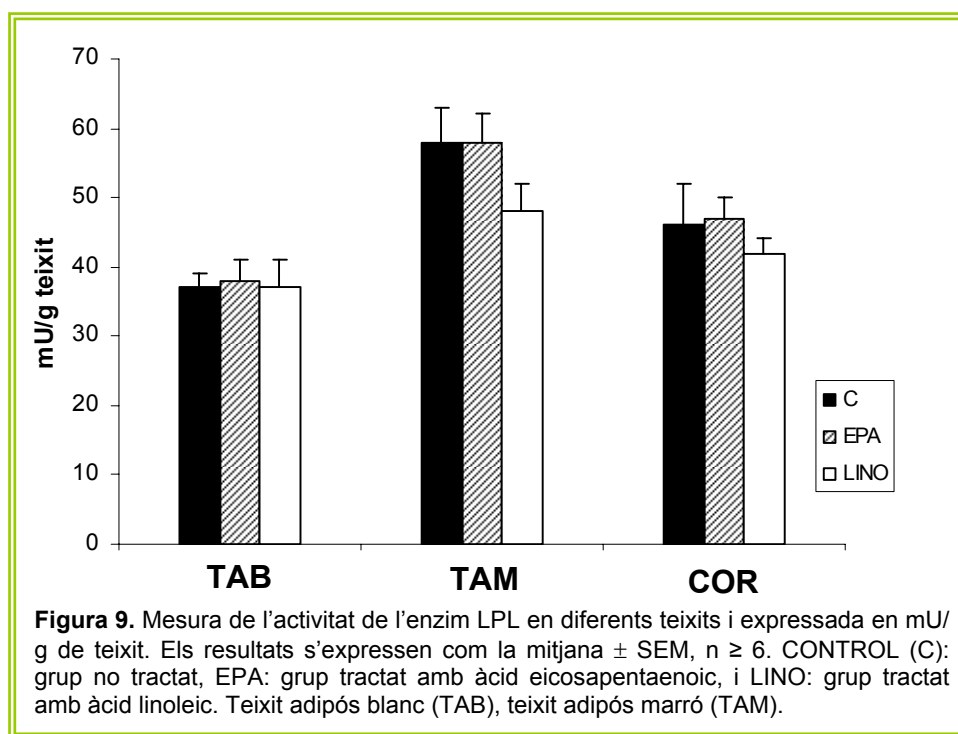
Obtinguts els resultats, vàrem observar un increment significatiu d'un 40% respecte el control de l'expressió gènica de GLUT4 en el múscul de les rates tractades amb EPA (Figura 8).

1.2 ESTUDI DEL METABOLISME LIPÍDIC

Com ja s'ha esmentat anteriorment, entre les funcions de la insulina també hi trobem la d'intervenir en el metabolisme lipídic promovent la síntesi de lípids i inhibint la seva degradació. En situació de diabetis, en la que els pacients presenten intolerància a la glucosa, hi ha un augment en l'oxidació d'AG. Donada aquesta situació, vàrem realitzar un seguit d'experiments per a valorar si el tractament tenia algun efecte en la utilització i destí dels àcids grassos.

1.2.1 ACTIVITAT LPL

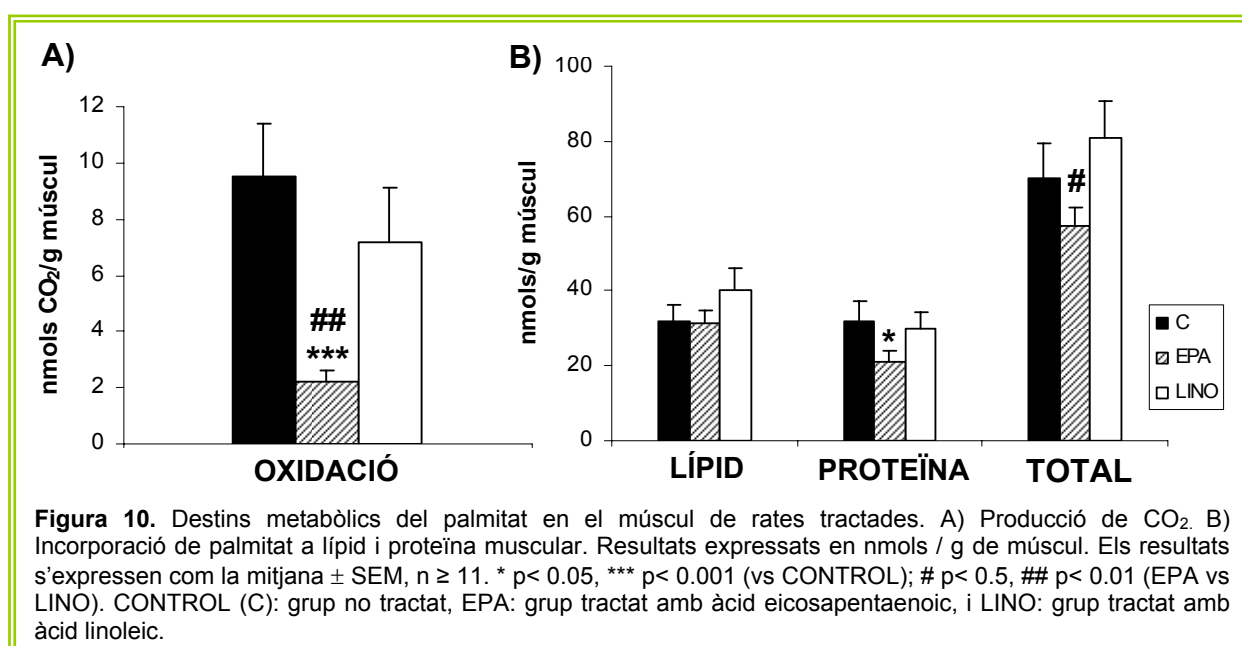
El primer que vàrem valorar va ser l'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL) en diferents teixits, ja que la insulina promou l'emmagatzematge de greixos mitjançant l'estimulació d'aquest enzim (Figura 9).



No vàrem observar canvis en l'activitat de la LPL en cap dels teixits estudiats de les rates que havien estat tractades amb EPA i LINO respecte les controls.

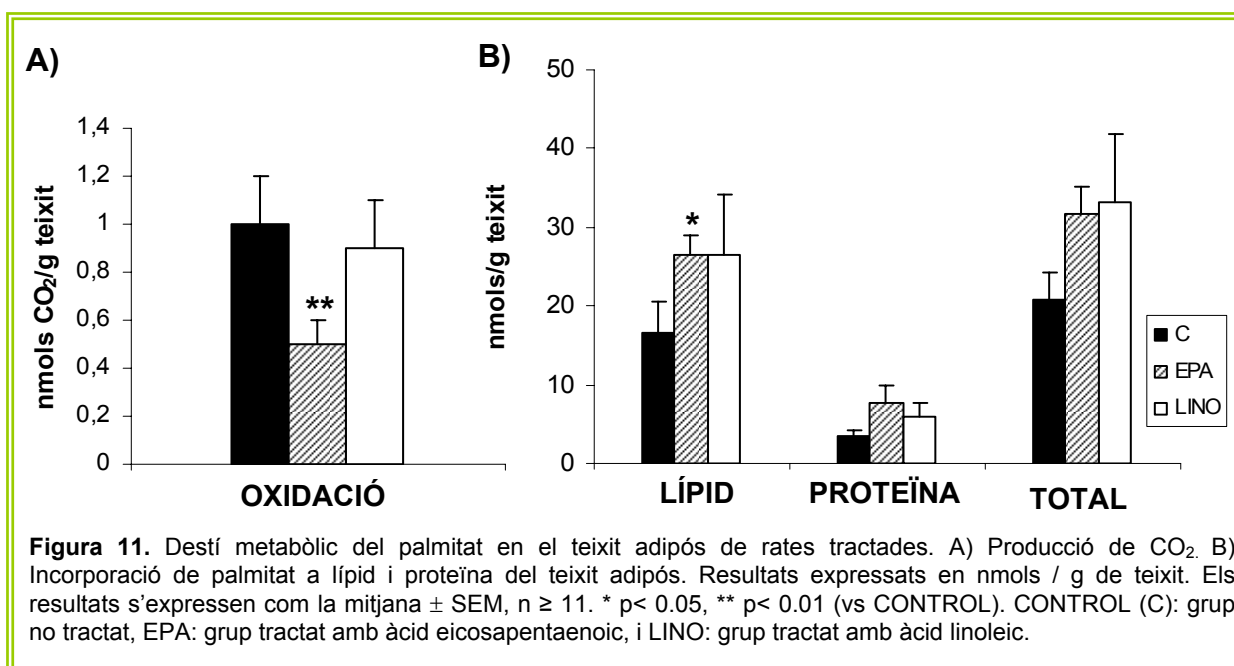
1.2.2 DESTÍ METABÒLIC DEL PALMITAT *EX VIVO*

Per a valorar l'efecte de l'EPA sobre el metabolisme dels AG, vàrem aïllar el múscul EDL i el teixit adipós dels animals que havien estat sotmesos al tractament, i els vàrem incubar amb palmitat marcat radioactivament per a la posterior determinació de la seva oxidació i la incorporació a lípids i a proteïna tissular (més detalls a la secció de materials i mètodes 8.1).



Els resultats obtinguts en els múscul incubats ens van mostrar una disminució significativa de l'oxidació del palmitat d'un 76% respecte el control en el grup tractat amb EPA, i cap efecte degut al tractament amb LINO. Pel que fa a la incorporació del palmitat als lípids tissulars, no vàrem observar diferències significatives, però si vàrem detectar una disminució significativa en la incorporació del palmitat a proteïna en el grup de l'EPA respecte el control, veient alhora una disminució significativa en la captació total del grup tractat amb EPA respecte el tractat amb LINO (Figura 10).

Realitzant el mateix procediment en el teixit adipós, els resultats van mostrar, de la mateixa manera que en el múscul, una disminució significativa (50%) de l'oxidació en el grup tractat amb EPA, a diferència de grup tractat amb LINO en el que no vàrem veure canvis respecte el grup control. Fent referència a la incorporació tissular, vàrem observar un augment significatiu de la incorporació del palmitat als lípids del teixit adipós dels animals tractats amb EPA. En canvi, no vàrem detectar efecte dels tractaments en la incorporació de palmitat a proteïna ni en la captació total (Figura 11).



1.2.3 DESTÍ METABÒLIC DE LA TRIOLEÏNA *IN VIVO*

Donades les diferències observades en el destí metabòlic del palmitat de l'assaig anterior, vàrem voler determinar quin seria l'efecte de l'EPA *in vivo*. Amb aquest objectiu, vàrem valorar el destí metabòlic de la trioleïna en rates que havien estat tractades durant 28 dies amb EPA i LINO. Per tal de valorar el destí metabòlic de la trioleïna, la qual va ser administrada abans d'iniciar l'estudi, vam determinar la seva oxidació i la seva incorporació a lípids en diferents teixits dels animals (més detalls a la secció de materials i mètodes 8.2).

	CONTROL	EPA	LINO
CO₂	20.46 ± 0.51	19.74 ± 1.18	19.59 ± 1.75
Absorció	88.5 ± 2.65	87.2 ± 2.55	88.9 ± 2.65
<u>Incorporació a lípid (% dosi abs / g)</u>			
GSN	0.039 ± 0.002	0.046 ± 0.004	0.046 ± 0.005
Fetge	0.377 ± 0.026	0.370 ± 0.013	0.414 ± 0.025
Cor	0.119 ± 0.007	0.128 ± 0.013	0.125 ± 0.009
TABe	0.260 ± 0.047	0.310 ± 0.046 #	0.205 ± 0.017
TABd	0.269 ± 0.029	0.259 ± 0.040	0.200 ± 0.019 *
TAM	0.956 ± 0.271	1.455 ± 0.331	0.923 ± 0.175
Plasma	0.054 ± 0.010	0.072 ± 0.008	0.094 ± 0.015 *
<u>Incorporació a lípid (% dosi abs / teixit total)</u>			
GSN	0.061 ± 0.004	0.064 ± 0.005	0.063 ± 0.007
Fetge	3.922 ± 0.284	3.379 ± 0.149	3.769 ± 0.247
Cor	0.122 ± 0.005	0.117 ± 0.008	0.117 ± 0.010
TABe	0.657 ± 0.123	0.783 ± 0.099 ##	0.451 ± 0.043
TABd	1.148 ± 0.138	1.128 ± 0.194	0.862 ± 0.097
TAM	0.329 ± 0.081	0.527 ± 0.125	0.327 ± 0.052

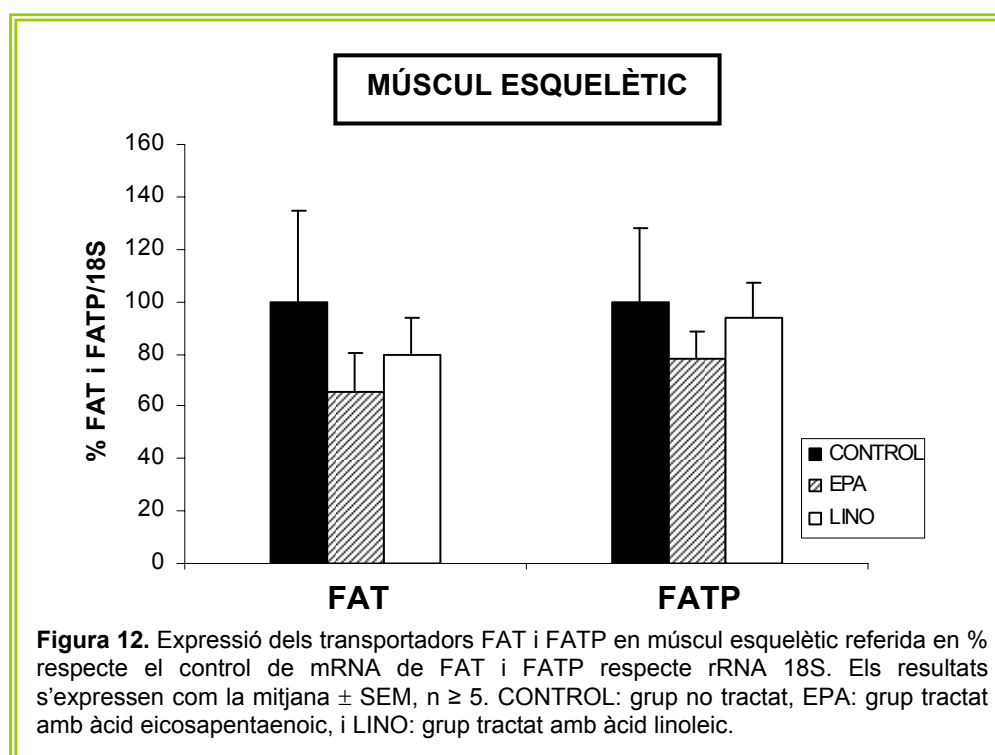
Taula 5. Destí metabòlic de la trioleïna en rates tractades amb EPA i LINO. La producció de CO₂ i la incorporació de la trioleïna a lípid dels diferents teixits s'expressa com a percentatge de la dosi absorbida per g o teixit total. La dosi absorbida es representa com la dosi administrada menys la retinguda al tracte gastrointestinal. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 8. * p < 0.05, (vs CONTROL); # p < 0.5, ## p < 0.01 (EPA vs LINO). CONTROL: grup no tractat, EPA: grup tractat amb àcid eicosapentaenoic, i LINO: grup tractat amb àcid linoleic. Gastrocnemius (GSN), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

Els resultats que es recullen a la Taula 5, mostren que ni l'EPA ni el LINO no van provocar canvis en l'oxidació de la trioleïna com tampoc en la seva absorció. Pel que fa a la incorporació a lípids tissulars, vàrem observar un augment significatiu de la incorporació de trioleïna al TABe del grup tractat amb EPA respecte al grup tractat amb LINO, en el qual vàrem veure una disminució significativa de la incorporació de trioleïna al TABd i un augment significatiu dels seus nivells circulants respecte el grup control.

Quan referíem els resultats obtinguts per teixit total, tot i no observar canvis en la resta de teixits, vàrem observar que es mantenia l'augment significatiu de la incorporació de trioleïna al TABe del grup tractat amb EPA respecte el tractat amb LINO.

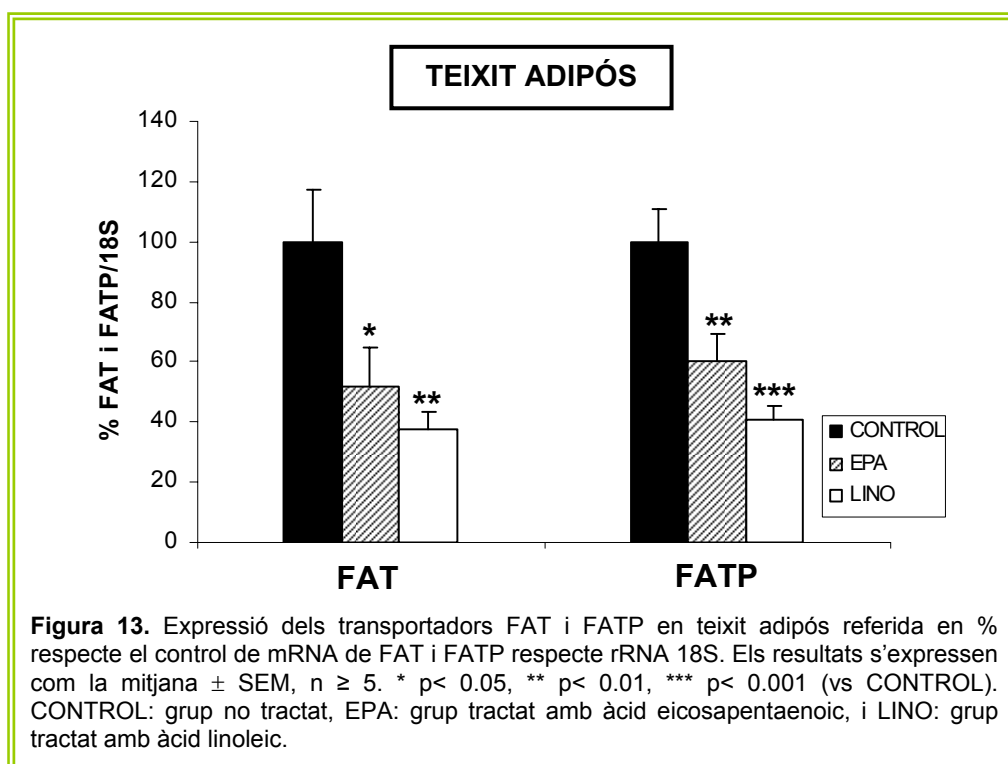
1.2.4 EXPRESSIÓ DELS TRANSPORTADORS FAT I FATP

Per esbrinar si les diferències en el contingut lipídic observades tant *ex vivo* com *in vivo* estaven relacionades amb els transportadors d'AG, vàrem estudiar els nivells d'expressió dels transportadors FAT (translocasa d'AG) i FATP (transportador d'AG) al múscul esquelètic i al teixit adipós dels animals diabètics sotmesos al tractament.



Com es pot observar a la Figura 12, no vàrem observar canvis en l'expressió de FAT ni de FATP en múscul per efecte del tractament.

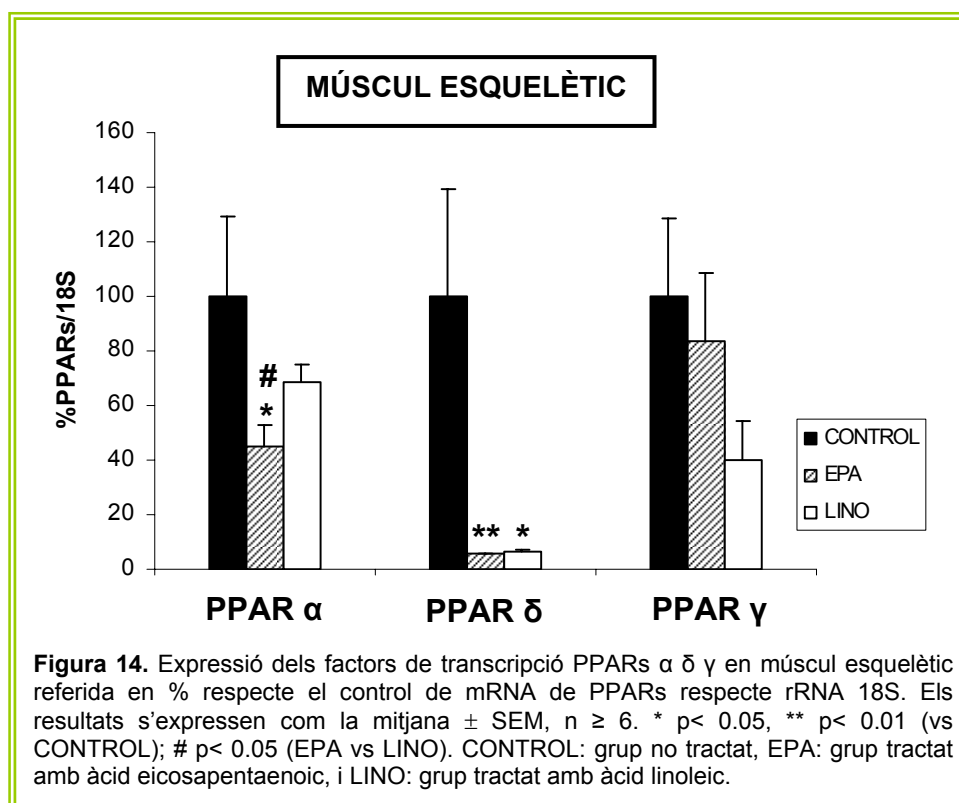
En canvi, en el teixit adipós, vàrem poder observar una disminució significativa de l'expressió de FAT i FATP del 50% i 40% respectivament en el grup tractat amb EPA respecte el control, i alhora una disminució també significativa del 70% de FAT i 60% de FATP en el grup tractat amb LINO respecte el grup control (Figura 13).



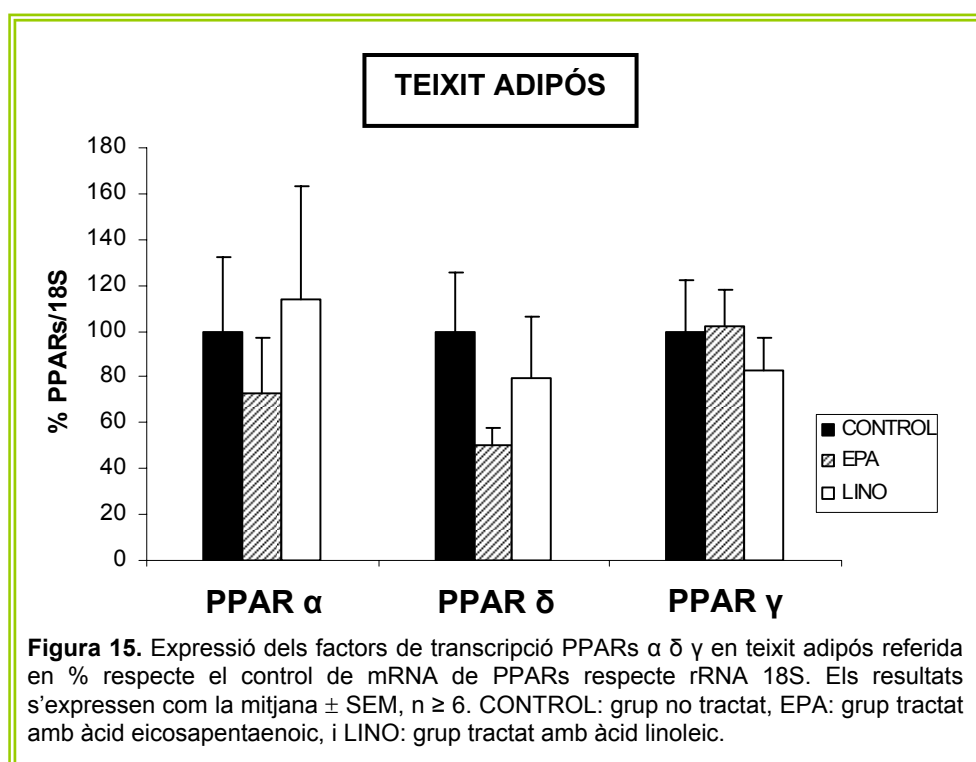
1.2.5 EXPRESSIÓ DELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ PPAR α , δ i γ

Paral·lelament, vàrem voler estudiar els PPARs, una família de factors de transcripció que tenen com a lligands naturals els AG i la implicació dels quals en el metabolisme lipídic és ben coneguda. A trets generals i, com ja s'ha esmentat anteriorment, PPAR α està relacionat amb un augment del catabolisme dels AG i del consum de glucosa, mentre que PPAR γ promou l'emmagatzematge de triglicèrids, i tant aquest com PPAR δ juguen un paper important en la sensibilització a la insulina. És per això que, mitjançant la tècnica de la PCR a temps real, vàrem estudiar el possible efecte de l'AG ω -3 i ω -6 escollits en l'expressió d'aquests receptors nuclears tant en múscul esquelètic com en teixit adipós.

Així, en múscul esquelètic l'administració crònica d'EPA va donar lloc a una disminució significativa de l'expressió de PPAR α respecte el grup control i el grup tractat amb LINO. Alhora, vàrem observar una davallada de PPAR δ promoguda pels dos tractaments. En canvi, tot i semblar que en el grup del LINO hi havia una tendència a la disminució de PPAR γ , no s'observaren diferències significatives en la seva expressió gènica (Figura 14).



Pel que fa als nivells d'expressió dels PPARs en el teixit adipós, esmentar que pràcticament es varen mantenir inalterats en ambdós grups tractats (Figura 15).

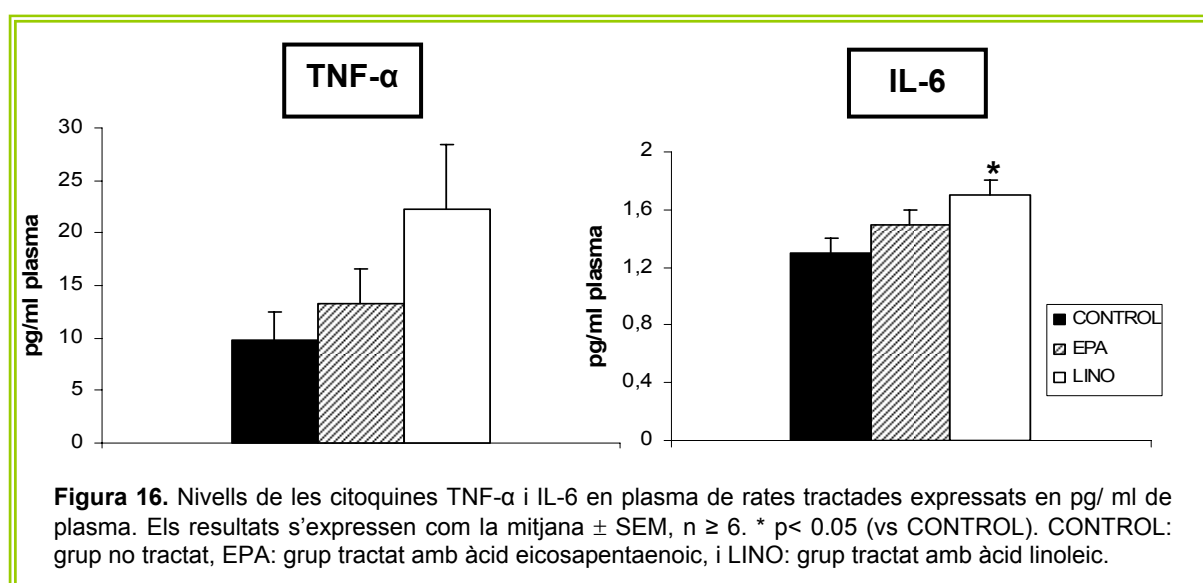


1.3 ESTUDI DE LA INFLAMACIÓ

Com s'ha esmentat anteriorment, existeixen diferents factors que poden anar obrint camí cap al desenvolupament de resistència a la insulina. La sobreproducció de citoquines inflamatòries que es pot donar, per exemple en casos d'obesitat, pel teixit adipós, pot generar un conjunt de trastorns que dificulten entre d'altres processos la correcta actuació de la insulina. Per tant, normalment un pacient amb DMT2 o que comença a desenvolupar resistència a l'hormona, també presentarà un quadre inflamatori. Amb la intenció d'esbrinar si l'EPA era capaç d'atenuar aquesta resposta inflamatòria, vàrem realitzar una sèrie d'aproximacions a nivell molecular.

1.3.1 NIVELLS PLASMÀTICS DE CITOQUINES PROINFLAMATÒRIES

El primer que vàrem avaluar varen ser els nivells de citoquines circulants, concretament els de dues de les citoquines proinflamatòries protagonistes en moltes situacions patològiques, com són la IL-6 i el TNF- α . Del TNF- α ja hi ha certes evidències que la relacionen amb l'aparició de la resistència a la insulina (més detall a la secció de la introducció 1.4.2.2).

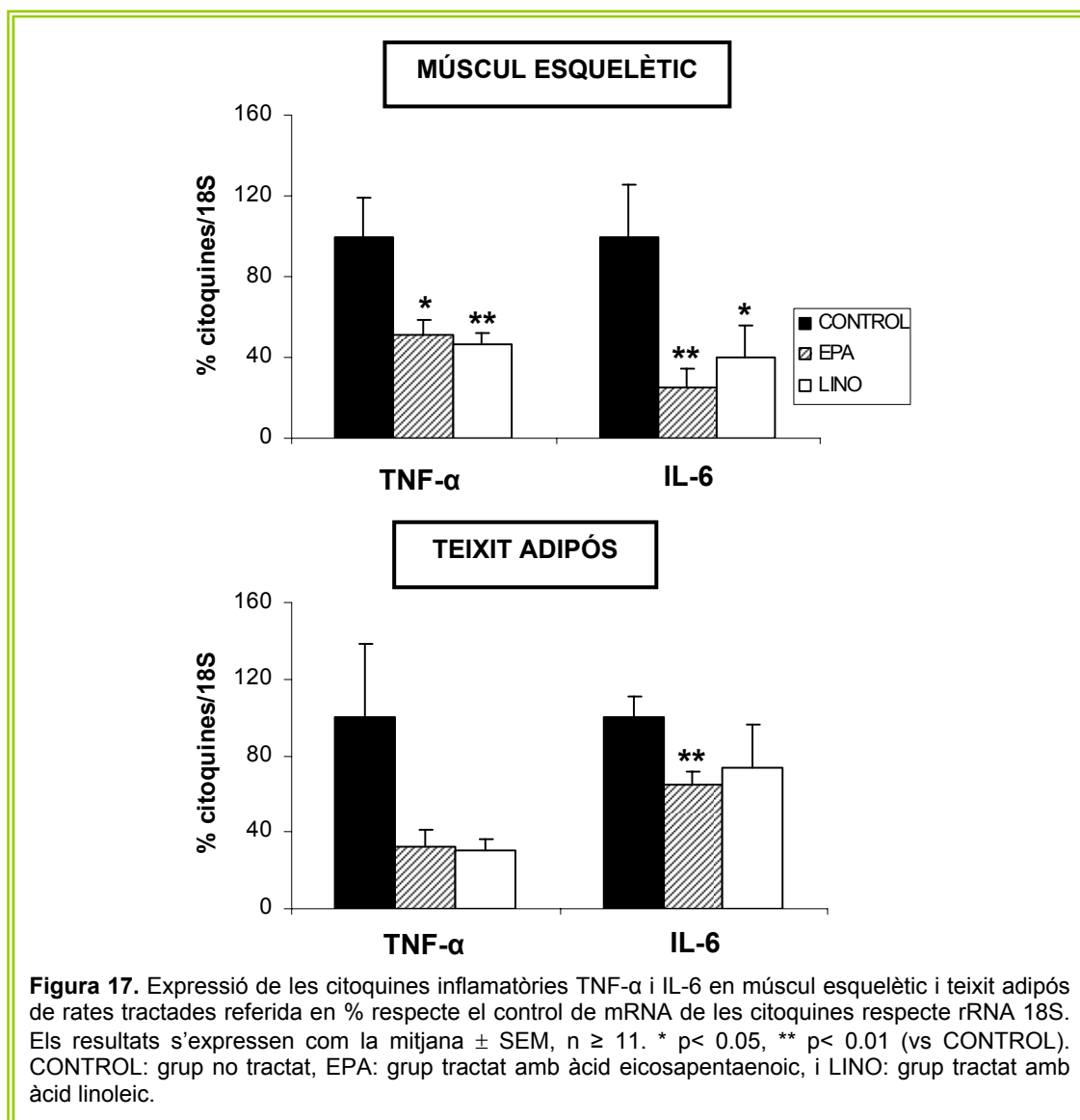


En aquest estudi vàrem observar que l'EPA no mostrava efectes en els nivells de cap de les dues citoquines estudiades, i el LINO provocava una certa tendència a incrementar el TNF- α i un augment significatiu de la IL-6 (Figura 16).

1.3.2 EXPRESSIÓ GÈNICA DE CITOQUINES PROINFLAMATÒRIES

Tot i no obtenir les diferències esperades en l'estudi anterior, vàrem voler comprovar si a nivell transcripcional aquests nutracèutics exercien algun tipus d'efecte sobre aquestes citoquines. Per això, vàrem avaluar els nivells d'expressió gènica tant del TNF- α com de la

IL-6 en múscul esquelètic i teixit adipós dels animals que havien estat sotmesos als tractaments crònics (Figura 17).

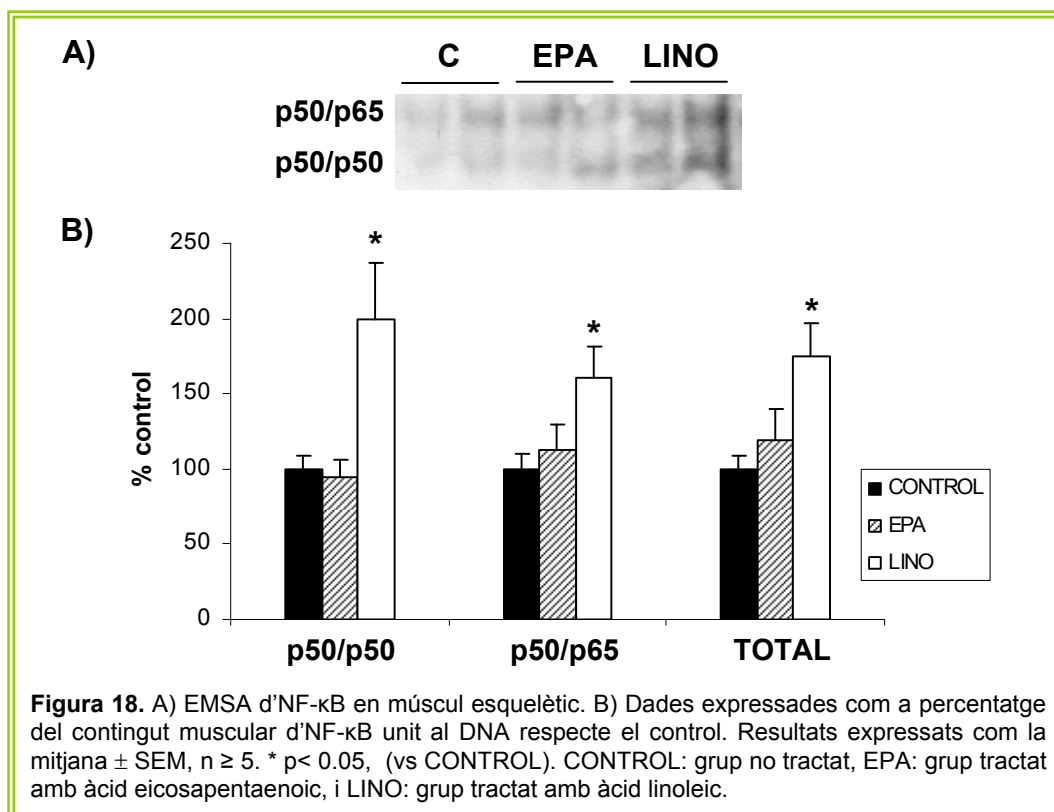


En el cas del múscul esquelètic, vàrem observar una disminució significativa (aproximadament del 50%) del TNF-α degut a ambdós tractaments, i una disminució del 75% i del 60% de la IL-6 en els grups de l'EPA i el LINO respectivament. En el teixit adipós no vàrem obtenir resultats tant evidents, però sí una clara tendència a disminuir el TNF-α en els dos grups tractats, i només en el grup de l'EPA es va veure una disminució significativa dels nivells d'expressió de la IL-6.

1.3.3 NIVELLS D'NF-κB

Per a continuar amb aquesta línia d'estudi després dels resultats obtinguts anteriorment, en els que vàiem que els tractaments eren capaços d'intervenir en l'expressió del TNF-α, vàrem obtenir extractes nuclears de teixit muscular dels animals tractats per a valorar els nivells de NF-κB actiu mitjançant la tècnica de l'EMSA (més detalls a la secció de

materials i mètodes 4.3). Aquest és un factor de transcripció que participa en la resposta immune i en la inflamació, i pot estar constituït per diferents subunitats (p50 i p65) en forma d'homodímer o heterodímer. Normalment es troba al citoplasma en la forma inactiva unit a la seva proteïna inhibidora (Ik-B α). Diversos estímuls, com la IL-1 o el TNF- α , provoquen l'activació d'NF- κ B, la seva posterior translocació al nucli, i l'activació de gens que codifiquen per a diferents citokines i molècules d'adhesió entre d'altres.

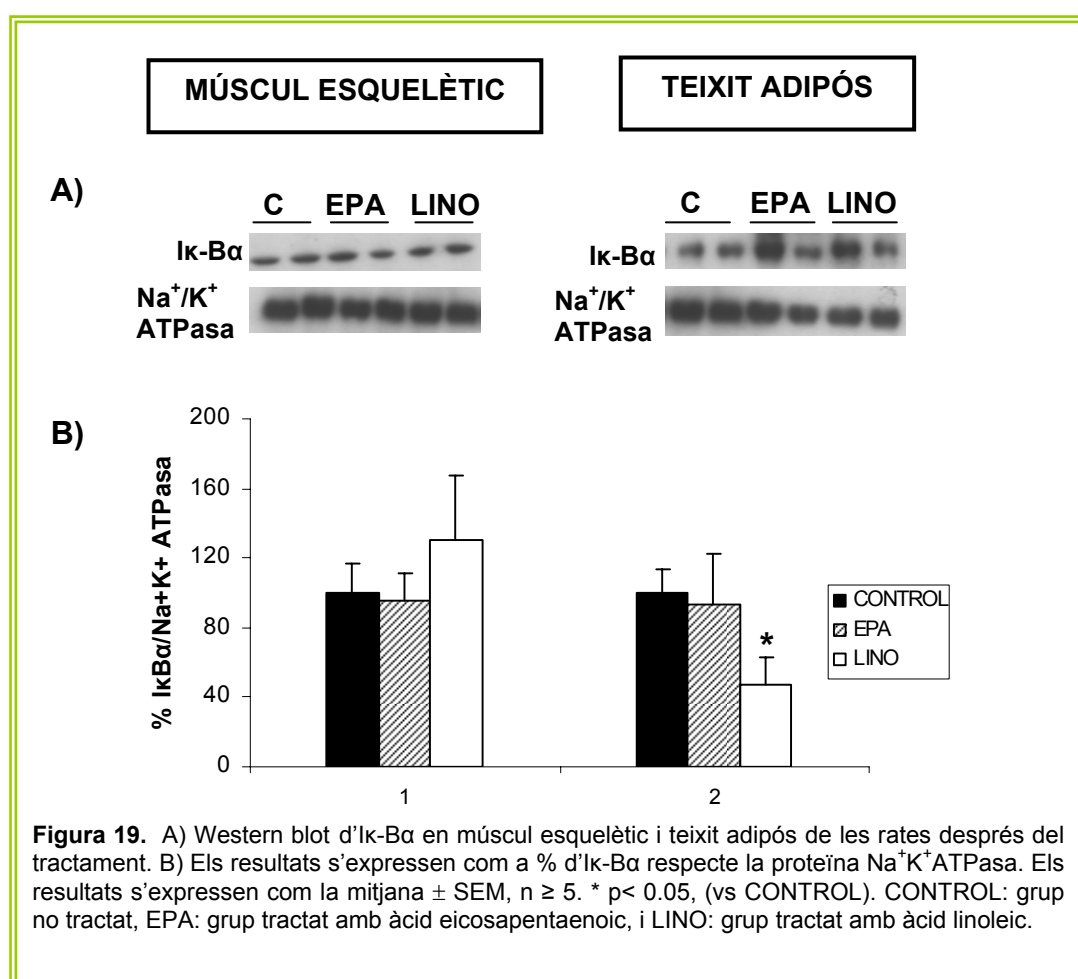


Com s'indica a la Figura 18, en el tractament amb LINO es va poder observar un increment significatiu de l'homodímer p50/p50 i de l'heterodímer p50/p65 respecte el grup control; en canvi no es van observar efectes degut al tractament amb EPA.

1.3.4 NIVELLS D'Ik-B α

Finalment, vàrem valorar el contingut de l'inhibidor d'NF- κ B mitjançant Western blot tant en múscul esquelètic com en teixit adipós.

Els resultats obtinguts en múscul esquelètic no van mostrar canvis en el contingut d'Ik-B α , a diferència del que es va observar en teixit adipós, on només el tractament amb LINO produïa una disminució significativa d'aquest factor (Figura 19).



2. EFECTE DELS NUTRACÈUTICS SOBRE LA CAQUÈXIA CANCEROSA

En els últims 20 anys, la caquèxia ha despertat un gran interès tant en la medicina clínica com en la investigació bàsica. L'anorèxia i les profundes alteracions metabòliques que caracteritzen aquesta síndrome han definit el desenvolupament de diferents estratègies terapèutiques, però només unes poques han arribat a nivell clínic amb resultats positius (Argilés *et al*, 2004). Un dels principals objectius en aquest camp és la cerca d'estratègies que permetin millorar la qualitat de vida dels pacients, així com contrarestar els mecanismes que condueixen al desgast de la massa muscular. En aquesta Tesi Doctoral vàrem decidir utilitzar com a estratègia terapèutica l'administració de nutracèutics procedents de diferents aliments per tal d'estudiar el seu potencial anticaquètic. Per a dur a terme aquest treball, vàrem realitzar dos tipus d'aproximacions: una primera aproximació *in vitro* en cultius cel·lulars amb un model d'hipertèrmia puntual que indueix un augment de la taxa proteolítica (una de les principals causes de la caquèxia), i una segona en animals portadors del tumor ascític de Yoshida AH-130 i del carcinoma pulmonar de Lewis, ambdós altament caquètics. En aquestes diferents situacions vàrem administrar els diferents nutracèutics per estudiar el seu possible potencial terapèutic.

2.1 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DEL RESVERATROL

Per tal de continuar amb la línia de recerca ja establerta al nostre grup en relació al resveratrol, vàrem iniciar un plantejament experimental amb el qual preteníem estudiar el potencial anticaquèctic d'aquest nutraceutic. Per això, vàrem fer una primera aproximació *in vitro* per a determinar si el resveratrol era capaç d'influir en el procés de degradació de proteïnes prèviament induït amb el model d'hipertèrmia puntual en miotubs, model que reproduceix el dany muscular en cèl·lules en cultiu (més detalls a la secció de materials i mètodes 3.2.1). Posteriorment, si d'aquest experiment extrèiem resultats favorables, podríem procedir a testar el resveratrol en animals caquèctics.

2.1.1 APROXIMACIÓ *IN VITRO*: EFECTE DEL RESVERATROL SOBRE LA DEGRADACIÓ PROTEICA EN MIOTUBS C2C12

Així doncs, amb l'objectiu de demostrar un possible efecte del resveratrol sobre la degradació proteica, el primer que vàrem fer va ser dissenyar un experiment utilitzant el model d'hipertèrmia puntual en cèl·lules de la línia muscular C2C12. Vam testar 3 dosis diferents de resveratrol (100, 10 i 0.1 μM), en dos grups: un incubat a 37°C durant 6h i l'altre sotmès a la hipertèrmia durant el mateix període de temps.

Els resultats ens mostraven un clar efecte del model d'hipertèrmia, augmentant significativament la proteòlisi en tots els grups, però pel que fa a l'efecte del resveratrol només vàrem veure una tendència a atenuar la proteòlisi a la dosi més baixa testada (Taula 6).

	37° 6h	H
C	100 \pm 8.7	149 \pm 6.8 ##
100 μM	94.3 \pm 3.9	140.3 \pm 0.8 ###
10 μM	87.6 \pm 2.1	131.5 \pm 6.6 ##
1 μM	89.6 \pm 4.8	130.5 \pm 2.9 ##

Taula 6. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb diferents dosis de resveratrol: 100, 10 i 1 μM durant els diferents temps d'incubació i temperatura. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control (37°C 6h). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, n=6. **##** p< 0.01, **###** p< 0.001 (efecte de la hipertèrmia). Control (C): sense tractament, Hipertèrmia (H): incubació a 41°C durant 6h.

Ja que no havíem obtingut resultats clars en l'experiment anterior, vàrem repetir-lo canviant el rang de dosis de resveratrol, utilitzant en aquest cas 10, 1 i 0.1 μM . Aquest assaig es va dividir en 4 grups condicionats a diferents temps d'incubació i temperatura: un incubat 6h a 37°C, un segon sotmès a la hipertèrmia durant 6h, un tercer grup incubat 24h a

37°C, i un últim sotmès a la hipertèrmia i passades les 6h va ser retornat a les condicions normals (37°C) fins a les 24h. En aquests dos últims grups els hi vam renovar el tractament passades les 6h.

Com es pot observar a la Taula 7, la hipertèrmia va augmentar la taxa proteolítica en tots els miotubs incubats a 41°C (H), i en el cas de l'últim grup (H+R) només en aquells que no havien rebut tractament. Pel que fa a l'efecte del resveratrol atenuant aquesta sobreactivació proteolítica, vàrem veure una disminució significativa de la degradació de proteïnes en situació control (6h 37°C) a les dues dosis més baixes. En situació d'hipertèrmia (H) o en aquelles que després de la incubació a 41°C havien estat retornades a 37°C, el resveratrol va ser significativament efectiu a totes les dosis sent aquesta diferència més marcada també a les dosis de 1 i 0.1 µM.

	37° 6h	H	37° 24h	H+R
C	100 ± 4.2	114 ± 2.4 #	323.9 ± 6.7	370.1 ± 7.8 ##
10 µM	91.6 ± 1.8	103.9 ± 3.6 # *	326.7 ± 6.9	341.5 ± 5.6 *
1 µM	87.1 ± 2.3 *	97 ± 2.8 # ***	315.1 ± 5.2	318.2 ± 3.8 ***
0.1 µM	87.3 ± 3.4 *	96.1 ± 2.9 ***	318.8 ± 5.1	311.4 ± 9.7 **

Taula 7. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb diferents dosis de resveratrol 10, 1 i 0.1 µM durant els diferents temps d'incubació i temperatura. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control (37°C 6h). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (efecte del tractament vs C), # p<0.05, ## p<0.01 (efecte de la hipertèrmia). Control (C): sense tractament, Hipertèrmia (H): incubació a 41°C durant 6h, Hipertèrmia durant 6h i retorn a 37°C fins a les 24h (H+R).

2.1.2 APROXIMACIÓ *IN VIVO*: EFECTE DEL RESVERATROL EN RATOLINS PORTADORS DEL CARCINOMA PULMONAR DE LEWIS

Els resultats positius obtinguts de l'efecte del resveratrol sobre la degradació proteica en miotubs, ens van conduir a testar aquest compost en un model *in vivo* de caquèxia. En aquesta ocasió vàrem administrar intraperitonealment 5 i 25 mg/kg pc de resveratrol en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis. Aquest model, desencadena una situació de caquèxia en l'animal caracteritzada per una forta pèrdua de massa muscular i adiposa, de forma semblant a l'hepatoma ascític de Yoshida AH-130, model que en estudis previs del grup s'havia utilitzat per la valoració del potencial anticaquèctic del resveratrol. La possibilitat que ens ofería la utilització del LLC era la d'administrar el tractament durant un període de temps més llarg, ja que aquest tumor pot créixer durant 14 dies i a més, la valoració del possible efecte antimetastàtic del nutracèutic ja que el LLC presenta metàstasis pulmonars de forma espontània (Sugiura, 1955).

Així doncs, el nostre disseny experimental es basava en 5 grups: un grup control (C) (sense tumor) i un grup control però tractat amb resveratrol a la dosi de 5 mg/kg pc (C+5) i, per altra banda un grup tumor (T) i dos grups portadors de tumor tractats amb 5 i 25 mg/kg pc de resveratrol (T+5 i T+25 respectivament).

	C	C + 5	T	T + 5	T+ 25
Pes inicial	25.5 ± 0.9	24.6 ± 0.9	25.7 ± 1.1	24.7 ± 1	23.9 ± 0.8
Pes final	26.7 ± 1.3	25.7 ± 1.1	22.7 ± 1.1 #	21.9 ± 0.7 #	21.6 ± 1.1 #
Ingesta	115.5 ± 11	103.5 ± 9	82.5 ± 9 #	81 ± 5 #	81 ± 4 #

Taula 8. Pes i ingesta dels animals control (C) i tumor (T) sense i amb tractament amb resveratrol a la dosi de 5 i 25 mg/kg pc (C+5), (T+5) i (T+25). El pes dels animals està expressat en g i la ingesta en g per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. # p<0.05 (efecte del tumor).

Com es pot observar a la Taula 8, la presència de tumor provoca una disminució significativa tant del pes final com de la ingesta dels ratolins portadors respecte els controls, però no veiem cap efecte del resveratrol.

Valorant els pes dels músculs i dels teixits adiposos, vàrem veure com tots (excepte el soleus) es veien disminuïts significativament per efecte del tumor, i que el resveratrol provocava una augment significatiu del TAM en els controls tractats a la dosi de 5 mg/kg pc respecte els controls i en els portadors de tumor tractats a la dosi de 25 mg/kg pc respecte els animals amb tumor no tractats (Taula 9).

	C	C + 5	T	T + 5	T+ 25
GSN	557 ± 6	552 ± 13	413 ± 13 ####	417 ± 18 ####	437 ± 20 ##
Tibialis	167 ± 5	181 ± 8	125 ± 6 ####	119 ± 9 ####	121 ± 2 ####
Soleus	28 ± 2	28 ± 1	26 ± 1	19 ± 3	26 ± 1
EDL	37 ± 1	37 ± 2	19 ± 2 ####	25 ± 2 ##	20 ± 2 ####
TABd	328 ± 26	334 ± 51	63 ± 8 ####	51 ± 12 ####	59 ± 17 ####
TAM	236 ± 15	371 ± 35 **	158 ± 14 ##	188 ± 16 ##	202 ± 9 *

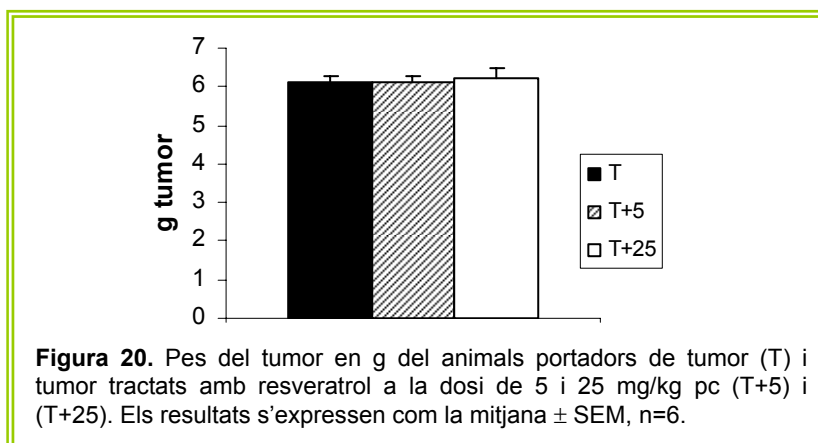
Taula 9. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals control (C) i tumor (T) sense i amb tractament amb resveratrol a la dosi de 5 i 25 mg/kg pc (C+5), (T+5) i (T+25). Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p< 0.05, ** p< 0.01 (efecte del tractament); ## p< 0.01, #### p< 0.001 (efecte del tumor). Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd) i teixit adipós marró (TAM).

Fent referència a la resta d'òrgans, vàrem poder observar l'efecte del tumor en alguns d'ells, disminuint significativament el pes del cor i la carcassa, i augmentant el pes de la melsa. No vàrem apreciar cap efecte del tractament (Taula 10).

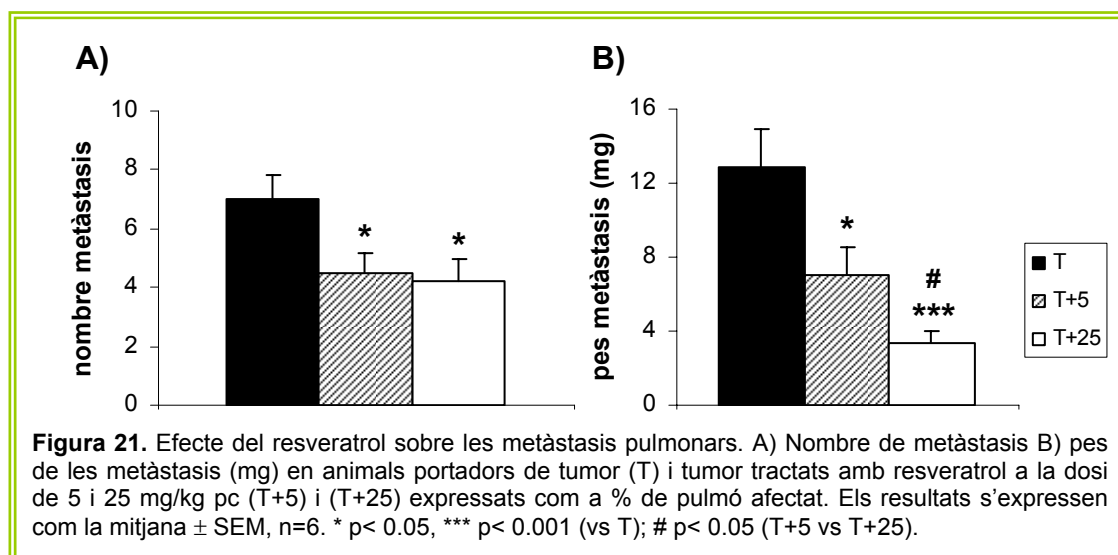
	C	C + 5	T	T + 5	T+ 25
Fetge	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.5	6.4 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.5 ± 0.2
Cor	489 ± 9	473 ± 26	440 ± 6 ###	435 ± 28	433 ± 17
Ronyons	1.2 ± 0.03	1.2 ± 0.03	1.2 ± 0.03	1.2 ± 0.08	1.2 ± 0.02
Melsa	381 ± 17	390 ± 27	1288 ± 138 ###	1352 ± 107 ###	1343 ± 82 ###
Carcassa	86 ± 1	89 ± 4	67 ± 2 ###	66 ± 3 ###	68 ± 1 ###

Taula 10. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals control (C) i tumor (T) sense i amb tractament amb resveratrol a la dosi de 5 i 25 mg/kg pc (C+5), (T+5) i (T+25). Fetge, ronyons i carcassa expressats en g / 100 g de pes corporal inicial. Cor i melsa expressats en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. L'anàlisi estadística (t-Student): * p < 0.05 (efecte del tractament); # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 (efecte del tumor).

A continuació vàrem valorar el pes del tumor, en aquesta ocasió, no es realitzà el comptatge de cèl·lules tumorals degut a les zones necròtiques que presenta aquest tumor. Els resultats no ens mostren cap efecte del tractament (Figura 20).



Finalment vàrem valorar el nombre i pes de les metàstasis i, en aquest cas, vàrem observar com el tractament amb resveratrol reduïa significativament ambdós paràmetres (Figura 21).



2.2 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DE LA GENISTEÏNA

Degut als resultats obtinguts fins al moment en diversos grups de recerca, ens els que s'havien estudiat les propietats de la soja i dels seus components, vàrem voler estudiar el potencial antitumoral de la genisteïna per tal d'esbrinar si aquest nutraceutic era capaç d'exercir un efecte beneficiós davant d'aquest estat catabòlic. Per dur a terme aquest objectiu, vàrem realitzar una sèrie d'aproximacions tant *in vitro* com *in vivo*, testant diferents dosis i avaluant els efectes d'aquest compost.

2.2.1 APROXIMACIÓ *IN VITRO*: EFECTE DE LA GENISTEÏNA SOBRE LA DEGRADACIÓ PROTEICA EN MIOTUBS C2C12

Per a realitzar aquest experiment es va escollir, com en el cas anterior, el model proteolític d'hipertèrmia puntual (H) en cèl·lules C2C12. Aquest model pot ser comparable a una situació de caquèxia cancerosa *in vivo*, ja que hi trobem una proteòlisi augmentada degut a l'activació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, fet descrit prèviament en el nostre grup d'investigació.

Així doncs, vàrem voler estudiar l'efecte de la genisteïna sobre la proteòlisi activada en miotubs C2C12 sotmesos a un augment puntual de temperatura. Per això, vam realitzar un primer experiment per testar diferents dosis del producte i avaluar-ne l'efecte sobre la proteòlisi. El nostre disseny experimental es basava en 6 situacions: per una banda miotubs sotmesos a una incubació de 6h a 37°C (37°C 6h) i altres a una hipertèrmia puntual a 41°C durant 6h (H). Alhora repetíem aquestes dues situacions però preincubant els miotubs amb genisteïna 24h i 48h prèvies a la hipertèrmia, ja que sospitàvem, degut a treballs anteriors, que aquest compost necessitava un major temps d'incubació per a mostrar els seus possibles efectes.

En els resultats presentats a la Taula 11 podem observar un clar efecte del model d'hipertèrmia puntual sobre la proteòlisi, veient un augment significatiu del 30% de la degradació proteica en tots els grups incubats a 41°C respecte als incubats a 37°C. Pel que fa al tractament, detectem un efecte de la genisteïna a les dosis de 10 i 5 µM, sent capaç de disminuir de forma significativa la degradació proteica en situació d'hipertèrmia. No vàrem observar cap diferència en aquells grups que havien estat preincubats amb genisteïna.

	37° 6h	H
C	100 ± 3	131.6 ± 3.6 ###
50 µM	104.2 ± 1.6	125.6 ± 3.2 ###
10 µM	94.8 ± 3	118.3 ± 4.2 ### *
5µM	93.3 ± 2.6	121.6 ± 2.9 ### *
	pre-24h 37°	pre-24h H
C	100 ± 4.1	126.9 ± 6 ##
50 µM	111.8 ± 2.4	136 ± 6.5 ##
10 µM	98.4 ± 3.2	135.7 ± 6.1 ###
5µM	102.9 ± 2.1	131.5 ± 3 ###
	pre-48h 37°	pre-48h H
C	100 ± 3	122.1 ± 1.7 ###
50 µM	109.7 ± 3.9	127.4 ± 3.8 ##
10 µM	107.6 ± 1.8	126.2 ± 2.3 ###
5µM	103.3 ± 4	126.3 ± 3.5 ###

Taula 11. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb diferents dosis de genisteïna: 50, 10, 5 µM. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control incubades a 37°C. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6. *p<0.05 (efecte del tractament); ## p<0.01, ### p<0.001 (efecte de la hipertèrnia). Control (C): sense tractament, Hipertèrnia (H): incubació a 41°C, pre-24h i pre-48h: incubació amb genisteïna 24 i 48h abans de l'experiment.

2.2.2 APROXIMACIÓ *IN VIVO*: EFECTE DE LA GENISTEÏNA EN ANIMALS PORTADORS DEL TUMOR ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

Una vegada obtinguts els resultats *in vitro* de l'efecte de la genisteïna i observat un efecte positiu i alhora prometedori a algunes de les dosis escollides, vam voler determinar els efectes d'aquest producte en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, model tumoral de ràpid creixement i que provoca caquèxia a les rates portadores del tumor. Aquest estudi es basava en un experiment pilot dins el qual preteníem testar diferents dosis del producte en rates a les que prèviament se'ls hi havia inoculat el tumor. Per dur a terme aquesta primera aproximació *in vivo*, vam dividir els animals en 4 grups: un grup tumor sense tractar (T) i 3 grups amb tumor tractats amb 3 dosis diferents d'aquest component de la soja (T+dosi) 10, 5 i 2.5 mg/kg pc i dia. El tractament dels animals es va iniciar el dia de l'inòcul del tumor i va durar 7 dies fins que es va procedir al sacrifici d'aquests.

En aquest experiment no vam veure efecte de la genisteïna ni en el pes ni en la beguda dels animals, però vàrem observar una disminució significativa de la ingesta en el grup tractat a la dosi de 2.5 mg/kg pc dia (Taula 12).

	T	T + 10	T + 5	T + 2.5
Pes inicial	128 ± 7.4	140.5 ± 2.1	135.2 ± 3.8	134.1 ± 2.9
Pes final	130 ± 6.2	145 ± 4.3	138.9 ± 4.4	129.6 ± 6.1
Guany de pes	2 ± 3.2	4.5 ± 2.9	3.7 ± 2.9	-4.5 ± 4
Ingesta	67.4 ± 0.6	69.4 ± 0.7	67.8 ± 2	60.8 ± 1.3 **
Beguda	177.1 ± 11.4	201.2 ± 16.8	204.2 ± 11.8	198.3 ± 9.9

Taula 12. Pes, ingesta i beguda dels animals amb tumor (T) després del tractament amb genisteïna a les dosis de 10 (T+10), 5 (T+5) i 2.5 (T+2.5) mg/kg pc. El pes dels animals està expressat en g, la ingesta i la beguda en g i ml respectivament i per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. ** p<0.01 (vs T).

Posteriorment vàrem valorar el pes dels diferents òrgans i teixits dels animals. Estudiant el pes dels músculs, vàrem observar que el del GSN i el del tibialis de les rates tractades a la dosi de 10 mg/kg pc tendien a disminuir, i que aquesta disminució era significativa en el tibialis a les dosis de 5 i 2.5 mg/kg pc respecte el grup no tractat. Pel que fa als diferents teixits adiposos valorats, vam observar una disminució significativa dels pes del TABd i del TABe en els grups tractats a les dosis de 10 i 2.5 mg/kg pc respecte el grup tumor (Taula 13).

	T	T + 10	T + 5	T + 2.5
GSN	561.4 ± 17.6	515.4 ± 11.9	515.3 ± 22.4	532.5 ± 12.3
Tibialis	180 ± 3.4	167.6 ± 3.8	166.7 ± 0.8 **	166.3 ± 3.9 *
Soleus	39.1 ± 1.8	37.6 ± 1.8	37.5 ± 1.8	35.2 ± 1.3
EDL	38.5 ± 1.3	38.3 ± 0.9	38.9 ± 1	39.7 ± 1.3
TABd	761.5 ± 85.9	596.6 ± 16.9 *	598.7 ± 88.9	504.8 ± 63.4 *
TABe	1022 ± 120.2	686.7 ± 64 *	747.6 ± 62	707 ± 61.8 *
TAM	181.9 ± 28.6	180 ± 13.1	185.6 ± 13.8	187.1 ± 16.4

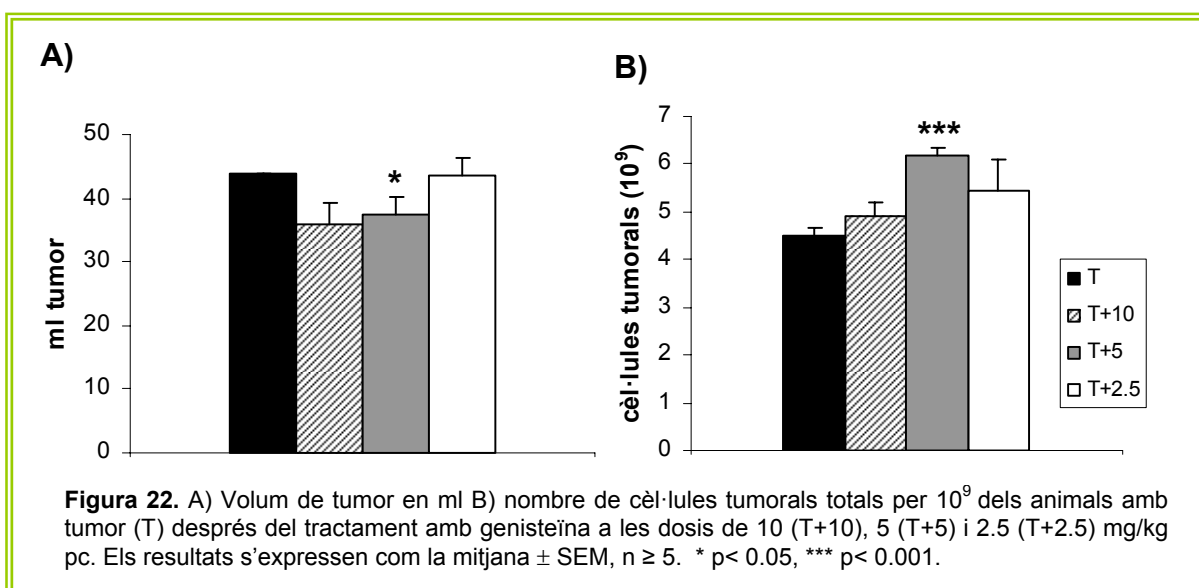
Taula 13. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals amb tumor (T) després del tractament amb genisteïna a les dosis de 10 (T+10), 5 (T+5) i 2.5 (T+2.5) mg/kg pc. Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p< 0.05, ** p< 0.01 (vs T). Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

Com es pot observar a la Taula 14, en la resta d'òrgans estudiats no vàrem observar diferències induïdes pel tractament amb genisteïna.

	T	T + 10	T + 5	T + 2.5
Fetge	5.7 ± 0.5	5.3 ± 0.3	5.4 ± 0.2	5.1 ± 0.2
Cor	368.5 ± 13.7	365.6 ± 17.8	353 ± 8.1	336.6 ± 16.9
Ronyons	0.9 ± 0.05	0.8 ± 0.03	0.9 ± 0.03	0.8 ± 0.03
Melsa	274.2 ± 38.1	284.7 ± 22.8	271.6 ± 15.5	265.9 ± 17.5
TGI	11.1 ± 1.1	11.4 ± 0.3	10.6 ± 0.1	9.4 ± 0.5
Carcassa	75.8 ± 2.1	72.9 ± 1.7	72.5 ± 3.9	70.5 ± 1.6

Taula 14. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals amb tumor (T) després del tractament amb genisteïna a les dosis de 10 (T+10), 5 (T+5) i 2.5 (T+2.5) mg/kg pc. Els pesos del fetge, els ronyons, el TGI (tracte gastrointestinal) i la carcassa s'expressen en g / 100 g de pes corporal inicial. Els pesos del cor i la melsa en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5.

També vam estudiar l'efecte de la genisteïna tant en el volum com en el nombre de cèl·lules tumorals, i vam observar que les rates tractades a la dosi de 5 mg/kg pc presentaven una disminució significativa del volum tumoral i alhora un increment també significatiu del nombre de cèl·lules (Figura 22).



2.2.3 APROXIMACIÓ *IN VIVO* : EFECTE DE LA GENISTEÏNA EN ANIMALS CONTROL

Degut als resultats obtinguts en l'experiment *in vivo* anterior, i presentant la genisteïna la capacitat de disminuir el pes del teixit adipós, vàrem voler esbrinar si aquest compost exercia aquest mateix efecte en rates que no fossin portadores de tumor. Per això, vàrem dissenyar un experiment constituït per dos grups: un primer grup no tractat i un altre grup tractat a la dosi de 10 mg/kg pc, dosi a la qual havíem vist els efectes més clars de la genisteïna. El procediment realitzat va ser el mateix que en el cas anterior, és a dir, vàrem tractar les rates durant 7 dies i vàrem procedir a l'extracció i valoració dels diferents òrgans i teixits.

	C	C + 10
Pes inicial	126.4 ± 4.1	126.2 ± 5
Pes final	164.6 ± 4.9	159.6 ± 5.5
Guany de pes	38.2 ± 1.3	33.4 ± 4.3
Ingesta	99.5 ± 2.9	96.1 ± 5
Beguda	158.3 ± 4.8	136.4 ± 12.6

Taula 15. Pes, ingesta i beguda dels animals control (C) després del tractament amb genisteïna a la dosi de 10 (C+10) mg/kg pc. El pes dels animals està expressat en g, la ingesta i la beguda en g i ml respectivament i per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6.

No vam detectar efecte de la genisteïna ni en el pes ni en la beguda com tampoc en la ingesta dels animals (Taula 15).

	C	C + 10
GSN	641.9 ± 15.7	638.6 ± 19.1
Tibialis	204.7 ± 5.7	208.6 ± 8.4
Soleus	44.8 ± 1.9	45.7 ± 1.5
EDL	46.9 ± 1.3	47.8 ± 1.5
TABd	1154 ± 131	1053 ± 120
TABe	925.2 ± 59.9	877.8 ± 67.7
TAM	230.6 ± 6.6	256.8 ± 14.9

Taula 16. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals control (C) després del tractament amb genisteïna a la dosi de 10 (C+10) mg/kg pc. Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6. Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

	C	C + 10
Fetge	6.2 ± 0.1	6.5 ± 0.7
Cor	454.9 ± 16.1	458.8 ± 24.2
Ronyons	1.02 ± 0.02	1.05 ± 0.04
Melsa	361.1 ± 11.1	367.7 ± 29
TGI	16.5 ± 0.6	16.7 ± 0.8
Carcassa	91.1 ± 0.9	88.7 ± 2.5

Taula 17. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals control (C) després del tractament amb genisteïna a la dosi de 10 (C+10) mg/kg pc. Els pesos del fetge, els ronyons, el TGI (tracte gastrointestinal) i la carcassa s'expressen en g / 100 g de pes corporal inicial. Els pesos del cor i la melsa s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6.

En aquest experiment amb rates control no vàrem observar cap canvi ni en els músculs ni en els teixits adiposos estudiats per efecte del tractament (Taula 16). Com tampoc vàrem observar cap variació en el pes de la resta d'òrgans per efecte de la genisteïna (Taula 17).

2.3 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DE L'EGCG

El següent nutracèutic escollit va ser el galat d'epigallocatequina (EGCG), catequina procedent del te, del qual ja havien estat àmpliament estudiades algunes de les seves propietats (antioxidant, antitumoral, etc.), les quals ens van fer pensar que seria convenient estudiar el seu possible potencial antitumoral.

2.3.1 APROXIMACIÓ *IN VITRO*: EFECTE DE L'EGCG SOBRE LA DEGRADACIÓ PROTEICA EN MIOTUBS C2C12

El primer que vàrem realitzar va ser un experiment *in vitro* utilitzant el model d'hipertèrmia puntual, per avaluar diferents dosis de l'EGCG i estudiar els seus efectes en la degradació proteica. Per a dur a terme aquest experiment, vàrem sotmetre les cèl·lules a 4 situacions de temps i temperatura: un grup incubat 6h a 37°C (control), un altre sotmès durant 6h a una hipertèrmia (41°C), un tercer grup incubat 24h a 37°C i finalment un grup sotmès a la hipertèrmia però posteriorment retornat a les condicions normals fins passades les 24h. En aquest dos últims grups vàrem renovar el tractament passades les 6h d'hipertèrmia.

	37° 6h	H	37° 24h	H + R
C	100 ± 4.4	128.6 ± 3.9 ###	359.7 ± 10.6	382.4 ± 13.5
10 µM	99.4 ± 2.6	128.48 ± 5.2 ###	328.3 ± 2 *	376.5 ± 3.7 ###
5 µM	87.4 ± 1.4 *	117.7 ± 4.3 ###	322.7 ± 8.2 *	354 ± 7 #
0.5 µM	87.9 ± 3.2 *	118.6 ± 3 ###	339.5 ± 12.9	339.4 ± 7.9 *

Taula 18. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb diferents dosis d'EGCG: 10, 5 i 0.5 µM durant els diferents temps d'incubació i temperatura. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control (37°C 6h). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6. *p<0.05 (efecte del tractament), # p< 0.05, ### p< 0.001 (efecte de la hipertèrmia). Control (C): sense tractament, Hipertèrmia (H): incubació a 41°C durant 6h, Hipertèrmia durant 6h i retorn a 37°C fins les 24h (H+R).

Els resultats representats a la Taula 18 ens mostren un clar efecte de la hipertèrmia, ja que s'observa un augment significatiu de la degradació proteica de gairebé un 30% en tots els grups sotmesos a la hipertèrmia i d'un 12% en dos dels grups tractats que van ser

incubats a 41°C i posteriorment retornats a condicions normals. Pel que fa a l'efecte del nutracèutic estudiat, veiem que l'EGCG és capaç de disminuir la degradació proteica un 13% en aquells miotubs incubats a 37°C durant 6h a les dosis de 5 i 0.5 µM i un 10% en els miotubs incubats durant 24h a les dosis de 10 i 5 µM. En situació d'hipertèrmia, l'efecte del tractament s'observa de forma significativa a la dosi de 0.5 µM en el grup H+R i alhora, malgrat no ser significatiu, es detecta una tendència a disminuir la degradació proteica en el grup H a les dues dosis més baixes.

2.3.2 APROXIMACIÓ *IN VIVO*: EFECTE DE L'EGCG EN ANIMALS PORTADORS DEL TUMOR ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

Una vegada avaluats els resultats dels experiments *in vitro*, vàrem voler anar més enllà i testar, en situació de caquèxia, el potencial terapèutic de l'EGCG. Per a dur a terme aquest assaig vàrem inocular a rates Wistar el tumor ascític Yoshida AH-130 anteriorment esmentat i del que ja ha estat ben descrita la seva capacitat per induir un estat de caquèxia en els animals portadors. Vàrem dividir l'experiment en 4 grups: animals portadors de tumor sense tractar i 3 en els que vam administrar 3 dosis diferents del producte (50, 25 i 10 mg/kg pc i dia). La durada del tractament va ser d'una setmana en paral·lel al creixement tumoral.

El primer que vàrem mesurar va ser el pes, la ingesta i la beguda dels animals, paràmetres en els que no vàrem veure cap efecte induït per l'EGCG (Taula 19).

	T	T + 50	T + 25	T + 10
Pes inicial	125.4 ± 4.6	127.7 ± 3.1	131.1 ± 1.2	127 ± 4.2
Pes final	131.5 ± 3	127.2 ± 5.3	133.5 ± 4.5	131.8 ± 6.3
Guany de pes	6.1 ± 3.9	-0.5 ± 3.5	2.3 ± 4.7	4.8 ± 2.8
Ingesta	82.3 ± 3.7	82.2 ± 3.6	82.2 ± 1.7	89.1 ± 4.5
Beguda	152.8 ± 13.3	136.7 ± 3.7	159 ± 3.3	154.9 ± 8.9

Taula 19. Pes, ingesta i beguda dels animals amb tumor (T) després del tractament amb EGCG a les dosis de 50 (T+50), 25 (T+25) i 10 (T+10) mg/kg pc. El pes dels animals està expressat en g, la ingesta i la beguda en g i ml respectivament i per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5.

A continuació vàrem pesar els diferents músculs i teixits adiposos on no vàrem detectar cap efecte de l'EGCG, excepte una disminució del GSN a la dosi més alta administrada (Taula 20).

	T	T + 50	T + 25	T + 10
GSN	553.8 ± 7.5	520.5 ± 9 *	545.5 ± 14.9	551.1 ± 10.1
Tibialis	169.1 ± 2.3	167.6 ± 7	169.3 ± 4.9	165.1 ± 3.9
Soleus	38.7 ± 1.36	35.6 ± 1	37 ± 2.1	37.9 ± 1.2
EDL	43.1 ± 1.1	39.7 ± 2.2	40.5 ± 1.6	39.6 ± 1.4
TABd	589.6 ± 63.5	556 ± 54.2	559.5 ± 124.2	607.5 ± 69.6
TABe	730.7 ± 77.9	626.6 ± 85.9	626.3 ± 73.5	559.3 ± 53.7
TAM	166.5 ± 18	170.7 ± 13.6	158.3 ± 17.3	166.8 ± 6.1

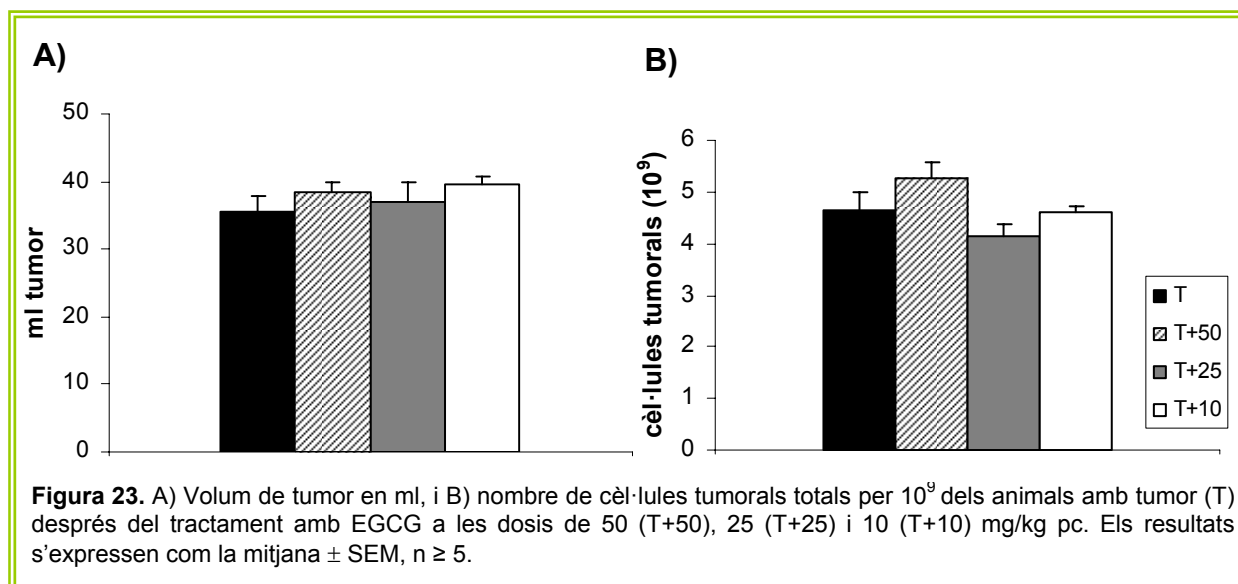
Taula 20. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals amb tumor (T) després del tractament amb EGCG a les dosis de 50 (T+50), 25 (T+25) i 10 (T+10) mg/kg pc. Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p< 0.05 (vs T). Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

En el pes de la resta d'òrgans tampoc vàrem observar cap canvi per efecte del tractament (Taula 21).

	T	T + 50	T + 25	T + 10
Fetge	5.4 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.4 ± 0.1	5.5 ± 0.1
Cor	359.6 ± 11.6	355.2 ± 8.8	346.2 ± 16.6	372.9 ± 13.9
Ronyons	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.02	0.8 ± 0.01	0.9 ± 0.03
Melsa	292.1 ± 19.1	296 ± 19.8	297.5 ± 10	308.6 ± 16.4
TGI	11.4 ± 1	10.5 ± 0.4	11.1 ± 0.7	11.2 ± 0.3
Carcassa	76.9 ± 2.1	72.7 ± 1.3	74.5 ± 2.6	74.7 ± 1.4

Taula 21. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals amb tumor (T) després del tractament amb EGCG a les dosis de 50 (T+50), 25 (T+25) i 10 (T+10) mg/kg pc. Els pesos del fetge, els ronyons, el TGI (tracte gastrointestinal) i la carcassa s'expressen en g / 100 g de pes corporal inicial. Els pesos del cor i la melsa s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5.

A l'observar les dades referents al tumor que es mostren a la Figura 23 veiem que l'EGCG tampoc afecta al creixement tumoral, ja que no s'observen canvis ni en el seu volum ni en el nombre total de cèl·lules tumorals.



2.4 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DE LA TEOFIL·LINA

Per a continuar dins la mateixa línia de recerca, en la que teníem com a objectiu testar un ventall de nutracèutics dels quals ja s'havien demostrat les seves propietats beneficioses, vàrem voler estudiar la teofil·lina, un alcaloide present en el te i la xocolata. Les seves propietats ens feien pensar que seria un bon candidat terapèutic per a contrarestar les alteracions que caracteritzen la síndrome caquètica. Per a dur a terme aquest estudi, vàrem mantenir el plantejament anteriorment utilitzat, realitzant una sèrie d'aproximacions *in vitro*, i en funció dels resultats testar el producte en un model tumoral *in vivo*.

2.4.1 APROXIMACIÓ *IN VITRO*: EFECTE DE LA TEOFIL·LINA SOBRE LA DEGRADACIÓ PROTEICA EN MIOTUBS C2C12

Inicialment vàrem dissenyar un experiment amb miotubs de la línia cel·lular C2C12 sotmesos al model d'hipertèrmia puntual. En aquest cas, per a veure si la teofil·lina era capaç de disminuir la degradació proteica, vàrem dividir les cèl·lules en dos grups: un incubat a 37°C i l'altre a 41°C durant 6h ambdós. Dins de cada un d'ells vàrem separar les cèl·lules per tal de testar 3 dosis diferents del producte (0.1, 0.05 i 0.01 mM).

Observant els resultats obtinguts d'aquest experiment, vàrem veure un clar efecte del model d'hipertèrmia, ja que en tots els grups incubats a 41°C augmentava de forma significativa la degradació proteica entre un 30-50%. A més, vàrem veure que la teofil·lina, davant d'aquesta situació, era capaç de disminuir-la significativament a les dosis de 0.1 i de 0.01 mM (Taula 22).

	37° 6h	H
C	100 ± 4.6	150.9 ± 3.9 ###
0.1 mM	91.8 ± 3.1	135.9 ± 2.7 ### **
0.05 mM	101.7 ± 3.6	141.7 ± 3.5 ###
0.01 mM	99.3 ± 4.6	138.4 ± 2.3 ### *

Taula 22. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb diferents dosis de teofil·lina: 0.1, 0.05 i 0.01 mM durant els diferents temps d'incubació i temperatura. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control (37°C 6h). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6. * p<0.05, ** p<0.01 (efecte del tractament), ### p< 0.001 (efecte de la hipertèrmia). Control (C): sense tractament, Hipertèrmia (H): incubació a 41°C durant 6h.

Ja que l'efecte era més evident a la dosi de 0.1 mM, vàrem repetir l'experiment a aquesta dosi però, per comprovar si el fet d'incubar les cèl·lules amb teofil·lina durant més temps condicionava el seu efecte, vàrem decidir afegir dues noves situacions ja anteriorment utilitzades que són: la incubació a 37°C durant 24h, i sotmetent els miotubs a la hipertèrmia durant 6h i posteriorment retornant-los a condicions normals (37°C). En aquest dos grups vam renovar el tractament passades les 6h de la incubació a temperatura elevada. Tot i així, només vàrem obtenir una disminució significativa de la proteòlisi al grup H (Taula 23).

	37° 6h	H	37° 24h	H + R
C	100 ± 3.3	141.6 ± 0.3 ###	338.6 ± 8.6	359.7 ± 10.6
0.1 mM	95.2 ± 3.4	128.2 ± 3 ### **	332.9 ± 18.8	388.6 ± 20.1

Taula 23. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb teofil·lina a la dosi de 0.1 mM durant els diferents temps d'incubació i temperatura. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control (37°C 6h). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6. **p<0.01 (efecte del tractament), ### p<0.001 (efecte de la hipertèrmia). Control (C): sense tractament, Hipertèrmia (H): incubació a 41°C durant 6h, Hipertèrmia durant 6h i retorn a 37°C fins les 24h(H+R).

2.4.2 APROXIMACIÓ *IN VIVO*: EFECTE DE LA TEOFIL·LINA EN ANIMALS PORTADORS DEL TUMOR ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

Donat els bons resultats obtinguts en l'aproximació *in vitro*, vàrem voler aprofundir en l'estudi d'aquest nutracèutic inoculant el tumor ascític Yoshida AH-130 en rates que, degut a la presència d'aquest, desenvolupen la síndrome caquètica. Per dur-ho a terme, vàrem dissenyar un experiment pilot en el qual preteníem testar 3 dosis de teofil·lina (50, 25, 10 mg/kg pc i dia) en animals portadors del tumor. El tractament, de la mateixa manera que en

els assajos anteriorment mostrats, el vàrem administrar intragàstricament durant els 7 dies del creixement tumoral.

El primer que vàrem fer va ser determinar si el tractament exercia algun efecte en el pes, la ingesta i la beguda dels animals. No vam veure cap canvi en aquests paràmetres, excepte que la dosi de teofil·lina de 50 mg/kg pc provocava un increment en la beguda (Taula 24).

	T	T + 50	T + 25	T + 10
Pes inicial	155.3 ± 6	153.7 ± 5.5	159 ± 5.3	154.8 ± 6.3
Pes final	169 ± 12.9	167.8 ± 7.7	170.7 ± 5.5	168.3 ± 8.3
Guany de pes	9.5 ± 3.3	13.8 ± 3.8	11.7 ± 2.6	13 ± 1.9
Ingesta	112.4 ± 5.3	117 ± 5.3	105.1 ± 3.27	120.7 ± 3
Beguda	251 ± 14.8	347.6 ± 33.3 *	260.9 ± 9	273.3 ± 7.9

Taula 24. Pes, ingesta i beguda dels animals amb tumor (T) després del tractament amb teofil·lina a les dosis de 50 (T+50), 25 (T+25) i 10 (T+10) mg/kg pc. El pes dels animals està expressat en g, la ingesta i la beguda en g i ml respectivament i per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p< 0.05 (vs T).

A continuació vàrem estudiar el pes dels músculs, on es va poder observar l'efecte de la teofil·lina a l'augmentar significativament el pes del soleus (9%) a la dosi de 50 mg/kg pc i, tot i no ser significatiu, a les altres dues dosis es mostrava una tendència a augmentar el pes del GSN respecte el grup tumor (T). En els teixits adiposos blancs no s'observaren canvis, però sí que es va produir una disminució significativa del teixit adipós marró a la dosi de 50 mg/kg pc respecte el grup T (Taula 25).

	T	T + 50	T + 25	T + 10
GSN	572.4 ± 12.8	580.3 ± 11.6	605.6 ± 13.5	589.3 ± 10.6
Tibialis	184 ± 5.9	184.5 ± 8.1	191 ± 3.5	190.2 ± 5
Soleus	40.9 ± 1.2	44.5 ± 0.7 *	42.6 ± 0.9	41.6 ± 0.8
EDL	44.4 ± 1	43.7 ± 1	45.4 ± 1.2	43.9 ± 0.8
TABd	651.5 ± 158.2	676.8 ± 110.8	647.4 ± 72.7	728.6 ± 103.2
TABe	596.3 ± 106.4	573.9 ± 85.3	665.5 ± 77.1	555.9 ± 44
TAM	188.5 ± 28.2	127.6 ± 12*	140.4 ± 12.1	153.7 ± 9.5

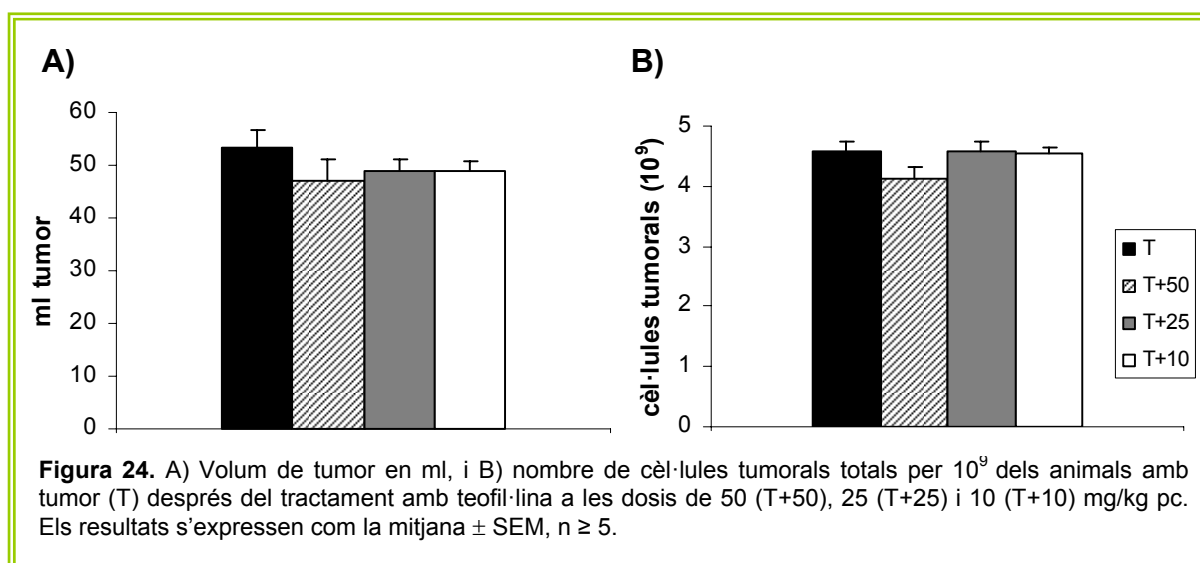
Taula 25. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals amb tumor (T) després del tractament amb teofil·lina a les dosis de 50 (T+50), 25 (T+25) i 10 (T+10) mg/kg pc. Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p< 0.05 (vs T). Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

En els òrgans estudiats vam poder observar un efecte de la teofil·lina, augmentant significativament un 11% el pes del cor a la dosi de 50 mg/kg pc respecte el grup no sotmès a tractament. En la resta d'òrgans no s'observaren canvis (Taula 26).

	T	T + 50	T + 25	T + 10
Fetge	5.5 ± 0.2	6 ± 0.2	5.5 ± 0.2	5.5 ± 0.1
Cor	357.2 ± 8.1	397.8 ± 10 *	366.2 ± 9	351.3 ± 7.2
Ronyons	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.03	0.9 ± 0.02	0.9 ± 0.02
Melsa	306 ± 7.9	300 ± 18.5	286.9 ± 33.2	338.6 ± 23.1
TGI	10.8 ± 0.2	10.7 ± 2.2	11.8 ± 0.4	11.8 ± 0.4
Carcassa	89.1 ± 9.2	76.5 ± 15.7	79.4 ± 1.1	80.6 ± 0.6

Taula 26. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals amb tumor (T) després del tractament amb teofil·lina a les dosis de 50 (T+50), 25 (T+25) i 10 (T+10) mg/kg pc. Els pesos del fetge, els ronyons, el TGI (tracte gastrointestinal) i la carcassa s'expressen en g / 100 g de pes corporal inicial. Els pesos del cor i la melsa s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p< 0.05 (vs T).

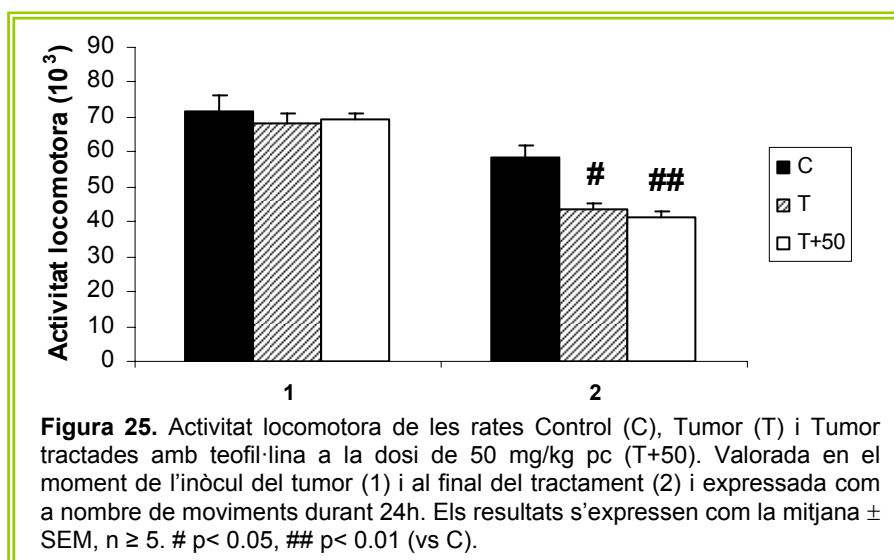
A nivell tumoral no vàrem veure l'efecte de la teofil·lina, ja que un cop realitzat l'estudi tant del volum com del contingut total de cèl·lules tumorals, no es van observar canvis remarcables (Figura 24).



2.4.2.1 ACTIVITAT LOCOMOTORA I COMPOSICIÓ CORPORAL

Fins al moment, els resultats obtinguts dels assajos amb teofil·lina ens revelaven un potencial efecte beneficiós per fer front a la caquèxia en els animals portadors de tumor sotmesos al tractament. En base a això, vàrem voler anar més enllà en la valoració de l'estat general d'aquests animals. Com ja s'ha explicat anteriorment, un pacient que presenta caquèxia, a més d'una inflamació sistèmica (Fearon *et al.*, 2006), pateix una important pèrdua de pes tant a nivell dels dipòsits de greix com de la massa muscular, i que aquesta

síndrome sol anar acompanyada d'astènia i debilitat (Argilés *et al.*, 1997). Per això, i en col·laboració amb el grup de recerca del Dr. Anker (Departament de Cardiologia, Charité Medical School, Berlín, Alemanya), vàrem realitzar dos experiments per a valorar la composició corporal i l'activitat locomotora dels animals portadors de tumor, ambdós paràmetres considerats marcadors de la qualitat de vida de l'animal (Bauhofer *et al.*, 2001). En aquest cas, a més dels dos grups portadors de tumor tractat o no a la dosi de 50 mg/kg pc de teofil·lina, vàrem afegir un grup control (C: no portador de tumor).



Els resultats obtinguts en l'estudi de l'activitat locomotora (més detalls a la secció de materials i mètodes 1.7), com era d'esperar, no mostren diferències en el moment de l'inòcul. En canvi sí vàrem veure un clar efecte del tumor disminuint significativament en ambdós grups l'activitat dels animals després d'una setmana de creixement tumoral, i que el tractament no era capaç de millorar aquesta situació (Figura 25).

A continuació vam estudiar la composició corporal per ressonància magnètica (més detall a la secció de materials i mètodes 1.6).

	C	T	T+50
Δ Greixos	3.2 \pm 1.1	-4.3 \pm 0.5 ###	-2.3 \pm 0.7 ### *
Δ Massa magra	23.5 \pm 1.5	1.7 \pm 1.7 ###	7 \pm 3 ###
Δ Aigua	21.2 \pm 1.6	0.8 \pm 1.5 ###	6.3 \pm 2.8 ##
Δ Fluids	0.03 \pm 0.24	-0.7 \pm 0.2 #	0.04 \pm 0.3 *

Taula 27. Composició corporal de les rates Control (C), Tumor (T) i Tumor tractades amb teofil·lina a la dosi de 50 mg/kg pc (T+50). Mesurat com l'increment (Δ) de greixos, massa magre, aigua i fluids i expressat en g. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, $n \geq 5$. * $p < 0.05$ (vs T); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (vs C).

Els resultats obtinguts ens varen mostrar una disminució significativa tant de greixos i de massa magra com d'aigua i fluids per efecte del tumor respecte el grup control. En aquest cas, el tractament amb teofil·lina en animals portadors provocava un augment significatiu dels greixos i una clara tendència a augmentar tant la massa magra com l'aigua corporal respecte el grup portador de tumor sense tractar. A més, el nivell de fluids dels animals tractats es manté igual que en els controls (Taula 27).

2.4.2.2 NIVELLS D'EXPRESSIONI DELS GENS DELS SISTEMES PROTEOLÍTIQS

Seguidament vàrem voler estudiar si l'efecte positiu de la teofil·lina observat a la dosi de 50 mg/kg que havíem obtingut en l'experiment anterior en el pes dels músculs i del cor, es veia reflectit en l'expressió diferents gens que formen part els principals sistemes proteolítics. Després de l'extracció del mRNA dels soleus i dels cors de les rates sotmeses al tractament, vàrem analitzar l'expressió gènica mitjançant la tècnica de la PCR a temps real.

	SOLEUS		COR	
	T	T + 50	T	T + 50
<u>Dependent d'ubiquitina</u>				
Ubiquitina	100 ± 7.4	57.9 ± 8.7 **	100 ± 16.8	58.7 ± 10.7
C2	100 ± 6.4	95.3 ± 23.9	100 ± 15.6	63 ± 7.4 *
C8	100 ± 7.4	87.7 ± 22.8	100 ± 10.1	62.4 ± 8.5 *
E2	100 ± 24.5	54.6 ± 15.5	100 ± 24.4	51 ± 8.5
Murf	100 ± 11	46.8 ± 15.5 *	100 ± 30	57.2 ± 12.4
Atrogina	100 ± 5.6	92.3 ± 18	100 ± 13.2	94.3 ± 13
<u>Dependent de calci</u>				
m-Calpaïna	100 ± 19.3	121.7 ± 37.2	100 ± 18.8	55.4 ± 5.8 *
<u>Lisosomal</u>				
Catepsina B	100 ± 7.1	135.5 ± 30.7	100 ± 20.5	57.5 ± 6.7

Taula 28. Expressió de diferents gens dels sistemes proteolítics en soleus i cor de rates amb TUMOR (T) tractades amb teofil·lina a la dosi de 50 mg/kg pc (T+50). Els resultats s'expressen en % respecte el control del mRNA del gen respecte el rRNA 18S. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 4. * p< 0.05, ** p< 0.01 (vs T).

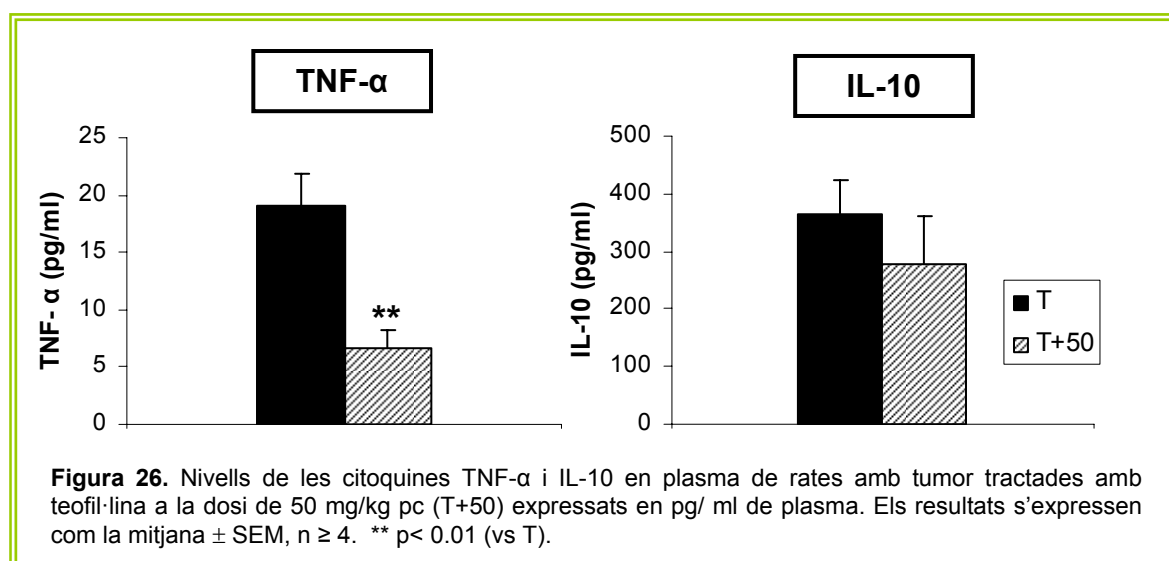
Com ja ha estat descrit per diversos autors, els nivells de mRNA dels gens dels sistemes proteolítics es troben augmentats en presència de tumor, principalment els gens del sistema dependent d'ATP i ubiquitina. Com es pot observar a la Taula 28, la teofil·lina provoca una disminució significativa de gairebé el 50% de l'expressió d'ubiquitina en soleus respecte el grup portador de tumor no tractat. En el cor també veiem una clara disminució (p=0.07) tot i no acabar de ser estadísticament significativa. Dins aquest mateix sistema també veiem una disminució significativa de les subunitats del proteasoma (C2 i C8) en el

cor dels animals tractats. Alhora s'observa una tendència clara a disminuir E2 tant en cor com en soleus i finalment una disminució significativa de Murf (també aproximadament del 50%) en els soleus dels animals tractats respecte el grup tumor. En canvi, en el sistema proteolític dependent de calci i el lisosomal no vam observar cap diferència en soleus, però sí una disminució significativa de la m-calpaïna i una tendència a disminuir de la catepsina B en el cor degut a l'administració del tractament.

2.4.2.3 NIVELLS PLASMÀTICS DE CITOQUINES: TNF- α i IL-10

En resposta a la infecció, al creixement tumoral o a altres estímuls invasius, el TNF- α és produït principalment per cèl·lules del sistema immunitari. De tota manera, molts altres tipus cel·lulars poden també produir i secretar aquesta citoquina (Aggarwal i Natarajan, 1996). Malgrat que els efectes del TNF- α en diversos tipus cel·lulars són molt coneguts, els estudis sobre múscul esquelètic encara són confusos i fins i tot contradictoris. S'ha descrit que el múscul és la principal font de pèrdua de proteïna en les patologies que tenen associat un desgast muscular, i que el TNF- α , citoquina proinflamàtoria, té un paper clau en aquest procés de desgast muscular (Argilés i López-Soriano, 1999).

Per tant, degut a la participació d'aquesta citoquina en el desenvolupament de la caquèxia, vàrem considerar que seria interessant estudiar l'efecte d'aquest nutraceutic sobre el TNF- α . Com ja s'ha esmentat anteriorment, s'han realitzat estudis en els que s'ha observat que la teofil·lina era capaç de produir una disminució del TNF- α (Semmler *et al.*, 1993; Reuter *et al.*, 1999); conseqüentment vàrem voler comprovar si en animals portadors del tumor Yoshida AH-130 el tractament a la dosi de 50 mg/kg pc de teofil·lina mostrava també aquest efecte. Per dur-ho a terme, vàrem valorar els nivells plasmàtics de TNF- α . A més, per aprofundir en la valoració de l'efecte antiinflamatori de la teofil·lina, vàrem afegir a l'estudi la quantificació dels nivells plasmàtics de la IL-10, una citoquina de caràcter antiinflamatori.



Com es pot observar a la Figura 26 el tractament amb teofil·lina indueix una disminució significativa (60%) dels nivells plasmàtics del TNF- α respecte el grup tumor (T). En canvi, no s'observen canvis en els nivells circulants de la citoquina IL-10 degut al tractament.

2.5 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DEL DAS

Seguint amb el mateix plantejament, el següent i últim nutraceutic presentat en aquest treball va ser un dels components organosulfurats de l'all anomenat sulfur de d'al·lil (DAS), del que ja han estat demostrades moltes de les seves propietats beneficioses per l'organisme, algunes d'elles relacionades amb el creixement tumoral i amb la inflamació. Degut a aquests antecedents, vàrem decidir testar el potencial antitumoral d'aquest compost.

2.5.1 APROXIMACIÓ *IN VITRO*: EFECTE DEL DAS SOBRE LA DEGRADACIÓ PROTEICA EN MIOTUBS C2C12

Degut als bons resultats obtinguts després de la utilització del model *in vitro* d'hipertèrmia puntual, vàrem dissenyar un experiment semblant als anteriors, en el que vàrem sotmetre els miotubs a diferents condicions de temps i temperatura d'incubació i a 3 dosis diferents de DAS (1, 0.5 i 0.25 mM). La primera condició experimental era una incubació de 6h a 37°C, la segona es basava en les 6h d'hipertèrmia (incubació a 41°C), una tercera en la que incubàvem les cèl·lules 24h a 37°C, i finalment un grup sotmès a les 6h d'hipertèrmia i posteriorment retornat a les condicions normals fins passades les 24h.

Els resultats recollits a la Taula 29 mostren, una vegada més, el clar efecte de la hipertèrmia augmentant significativament la degradació proteica, al voltant d'un 25% en tots els grups analitzats. En quant a l'efecte del DAS, podem veure una disminució significativa de la degradació proteica en aquells miotubs sotmesos a la hipertèrmia i incubats amb DAS a la dosi de 0.25 mM.

	37°C 6h	H	37°C 24h	H+R
C	100 \pm 5.2	125.5 \pm 2.4 ###	339.7 \pm 14	377.1 \pm 9.5 #
1 mM	96.6 \pm 2.7	128.4 \pm 2.4 ###	323.3 \pm 17.3	368.6 \pm 4.6 #
0.5 mM	88.5 \pm 3.1	123.3 \pm 2.1 ###	327.2 \pm 16.8	377.3 \pm 9.2 #
0.25 mM	94.7 \pm 1.8	117.1 \pm 2.4 ### *	309 \pm 19.1	352.9 \pm 4.3 #

Taula 29. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb diferents dosis de DAS: 1, 0.5 i 0.25 mM durant els diferents temps d'incubació i temperatura. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control (37°C 6h). Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SEM, n=6. *p<0.05 (efecte del tractament vs C), # p<0.05, ### p<0.001 (efecte de la hipertèrmia). Control (C): sense tractament, Hipertèrmia (H): incubació a 41°C durant 6h, Hipertèrmia durant 6h i retorn a 37°C fins a les 24h (H+R).

Un cop observat l'efecte del DAS a la dosi més baixa, vàrem realitzar un segon experiment *in vitro*. Per això, vàrem repetir la dosi de 0.25 mM i afegírem un grup tractat a la dosi de 0.1 mM. Amb la intenció de fer més evidents els efectes del nutracèutic, vàrem mantenir les mateixes condicions de temps i temperatura que en el cas anterior, però vàrem incorporar un pretractament de 24h i vàrem renovar el tractament a les 6h en aquells grups que eren incubats durant 24h.

Aquestes noves condicions ens van donar com a resultat l'aparició de l'efecte del DAS a totes les dosis testades. Seguïem veient el clar efecte de la hipertèrmia augmentant significativament la degradació de proteïnes en tots els grups, però en aquest cas el DAS, tant a la dosi de 0.25 mM com a la de 0.1 mM, produïa una disminució significativa de la taxa de degradació en el grup incubat 6h a 37°C. Alhora, vàiem que a la dosi de 0.25 mM la degradació disminuïa significativament al grup sotmès a la hipertèrmia (H) i a l'incubat 24h a 37°C (Taula 30).

	37°C 6h	H	37°C 24h	H+R
C	100 ± 2.6	163.3 ± 4.5 ###	295.4 ± 11.7	353.7 ± 11.6 ##
0.25 mM	86.6 ± 2.8 **	149.9 ± 2.5 ### *	261.9 ± 2.8 *	334.6 ± 4.4 ##
0.1 mM	89.44 ± 1 **	157.1 ± 2.7 ###	280.4 ± 5.2	337.5 ± 9.6 #

Taula 30. Experiment de degradació proteica en cèl·lules C2C12 tractades amb diferents dosis de DAS: 0.25 i 0.1 mM durant els diferents temps d'incubació i temperatura. Els valors de degradació proteica es calculen com el percentatge de radioactivitat entre els aminoàcids alliberats al medi respecte a la radioactivitat total incorporada, i estan expressats com el percentatge respecte a les cèl·lules control (37°C 6h). Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n=6. *p<0.05, ** p< 0.01 (efecte del tractament vs C), # p< 0.05, ## p< 0.01, ### p< 0.001 (efecte de la hipertèrmia). Control (C): sense tractament, Hipertèrmia (H): incubació a 41°C durant 6h, Hipertèrmia durant 6h i retorn a 37°C fins a les 24h (H+R).

2.5.2 APROXIMACIÓ *IN VIVO*: EFECTE DEL DAS EN RATES PORTADORES DEL TUMOR ASCÍTIC YOSHIDA AH-130

Una vegada vist que el DAS era capaç de disminuir la degradació proteica *in vitro*, ens vam plantejar testar aquest mateix nutracèutic en rates portadores del tumor ascític Yoshida AH-130, per tal d'esbrinar si en situació de caquèxia podia exercir efectes similars, millorant l'estat general de l'animal i concretament en el desgast muscular que caracteritza aquesta patologia.

Un cop més, vàrem dissenyar un experiment pilot en animals portadors de tumor per tal de decidir quina era la dosi més efectiva. Vam generar 4 grups: un primer grup sense tractar i 3 als que se'ls hi va administrar intragàstricament i durant 7 dies a partir de l'inòcul, 3 dosis diferents de DAS (150, 100 i 25 mg/kg pc).

A l'analitzar si el tractament havia tingut algun efecte en el pes, la ingesta o la beguda, no vam veure canvis en cap d'aquests paràmetres, excepte un augment significatiu en la beguda del grup tractat a la dosi de 150 mg/kg pc (Taula 31).

	T	T + 150	T + 100	T + 25
Pes inicial	132.3 ± 3.6	129 ± 3	131.7 ± 4.4	134.5 ± 2.4
Pes final	128.4 ± 5	125.7 ± 5.3	130.3 ± 5.1	135.4 ± 3.3
Guany de pes	-3.9 ± 2.1	-3.3 ± 2.8	-1.4 ± 1.7	1.6 ± 1.6
Ingesta	62 ± 3	54.2 ± 2.4	71.9 ± 3.4	64.6 ± 1.2
Beguda	128 ± 8.4	160.4 ± 4 **	135 ± 6.3	112.1 ± 3

Taula 31. Pes, ingesta i beguda dels animals amb tumor (T) després del tractament amb DAS a les dosis de 150 (T+150), 100 (T+100) i 25 (T+25) mg/kg pc. El pes dels animals està expressat en g, la ingesta i la beguda en g i ml respectivament i per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 6. ** p<0.01 (vs T).

A continuació vàrem estudiar el pes dels músculs i dels teixits adiposos.

	T	T+150	T + 100	T + 25
GSN	481.1 ± 14.1	477.6 ± 14.1	511.2 ± 16.4	495.1 ± 11.3
Tibialis	147.8 ± 4.4	154.6 ± 4.2	162.2 ± 4.32 *	156.4 ± 2.1
Soleus	31.3 ± 1	32.6 ± 1	36.5 ± 3.3	31.2 ± 1.8
EDL	30.7 ± 0.6	29.3 ± 2.1	34.3 ± 1.9	33.4 ± 1.3
TABd	490.2 ± 41.3	525.6 ± 50	380.1 ± 50	542.2 ± 44.4
TAM	184.3 ± 20.5	180.3 ± 13.4	145.1 ± 22.5	201.1 ± 18.1

Taula 32. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals amb tumor (T) després del tractament amb DAS a les dosis de 150 (T+150), 100 (T+100) i 25 (T+25) mg/kg pc. Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 6. L'anàlisi estadística (t-Student): * p< 0.05 (vs T). Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd) i teixit adipós marró (TAM).

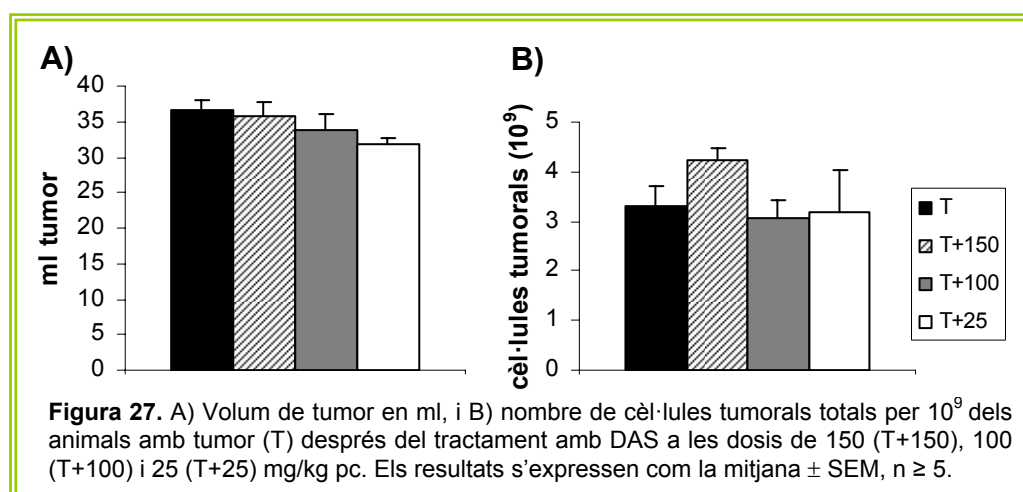
Com es pot observar a la Taula 32, vàrem veure un augment significatiu d'un 10% del pes del tibialis en el grup tractat a la dosi de 100 mg/kg de DAS respecte el grup no tractat (T) i alhora, tot i no ser significatiu, observàvem una tendència de la resta de músculs a augmentar de pes a la mateixa dosi. En canvi, en els diferents teixits adiposos no es van alterar per efecte del DAS.

Els resultats obtinguts de la valoració dels pesos de la resta d'òrgans ens mostren que al grup tractat a la dosi de 150 mg/kg pc disminuïa significativament el pes dels ronyons i de la carcassa respecte el grup T. A la dosi de 100 mg/kg pc vàrem observar un augment significatiu del pes del cor, i cap canvi en els òrgans dels animals tractats a la dosi més baixa de DAS (Taula 33).

	T	T + 150	T + 100	T + 25
Fetge	5 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.5 ± 0.1	5.1 ± 0.2
Cor	341.3 ± 8	335.7 ± 18.3	403 ± 18.6 **	356 ± 11
Ronyons	372 ± 16.2	303.2 ± 19.3 *	389 ± 13.6	377.5 ± 11.8
Melsa	221.1 ± 17.4	260.5 ± 14.9	286.8 ± 25.6	287.6 ± 19.4
Carcassa	68.8 ± 1	64.3 ± 1.5 *	69.3 ± 1.4	69.6 ± 1.7

Taula 33. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals amb TUMOR (T) després del tractament amb DAS a les dosis de 150 (T+150), 100 (T+100) i 25 (T+25) mg/kg pc. Els pesos del fetge i la carcassa s'expressen en g / 100 g de pes corporal inicial. Els pesos del cor, els ronyons i la melsa s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 6. * p < 0.05, ** p < 0.01 (vs T).

Pel que fa a la influència del producte sobre el creixement tumoral, tot i observar una tendència a l'augment del contingut de cèl·lules tumorals en el grup tractat amb DAS a la dosi de 150 mg/kg pc respecte el grup portador de tumor sense tractar (T), no vam veure canvis significatius ni en el comptatge de cèl·lules ni en el volum tumoral (Figura 27).



Degut als resultats obtinguts en l'experiment pilot a la dosi de 100 mg/kg pc, en els que observàrem un lleuger efecte del nutracèutic en algun dels paràmetres analitzats, concretament la seva acció en la musculatura esquelètica, un dels teixits més afectats en una situació de caquèxia, vàrem voler esbrinar quina repercussió tindria administrar el DAS a la mateixa dosi però en aquesta ocasió en animals control. El disseny experimental que ens vàrem plantejar es basava en 2 grups: un grup control (C) i un control tractat a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100) ambdós sense tumor per tal de completar l'experiment *in vivo* anterior. De la mateixa manera que en l'assaig anterior vàrem administrar el tractament intragàstricament durant 7 dies fins a procedir al sacrifici i extracció del teixits.

	C	C + 100
Pes inicial	110.3 ± 2.8	109.5 ± 1.9
Pes final	138 ± 4.38	143 ± 2.7
Guany de pes	27.7 ± 3.1	33.6 ± 1.9
Ingesta	86.9 ± 3.4	97.1 ± 2.5 *
Beguda	167.5 ± 10.7	170.5 ± 4.8

Taula 34. Pes, ingesta i beguda dels animals control (C) sense i amb tractament amb DAS a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100). El pes dels animals està expressat en g, la ingesta i la beguda en g i ml respectivament i per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 6. * p<0.05 (efecte del tractament).

El primer que vàrem analitzar va ser el pes, la ingesta i la beguda dels animals. Vàrem veure que els animals control que havien rebut el tractament tenien una ingesta significativament superior als controls sense tractar (Taula 34).

A la Taula 35 es recullen els resultats que fan referència al pes dels diferents músculs i teixits adiposos estudiats on podem veure un augment significatiu del GSN (6%), del tibialis (8%) i de l'EDL (10%) dels animals control per efecte del DAS. Pel que fa als teixits adiposos, no vàrem observar cap efecte del tractament.

	C	C + 100
GSN	602.4 ± 13.5	640.1 ± 8.7 *
Tibialis	188.8 ± 4.7	204.7 ± 3.6 *
Soleus	41.6 ± 2.3	45.9 ± 1.5
EDL	45.8 ± 1.9	50.6 ± 1.1 *
TABd	599.6 ± 89	723.9 ± 63.2
TABe	613.9 ± 52.8	694.9 ± 48.1
TAM	198.1 ± 23.1	231.7 ± 9.8

Taula 35. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals control (C) sense i amb tractament amb DAS a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100). Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 6. * p< 0.05 (efecte del tractament). Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

Posteriorment vàrem valorar el pes de la resta d'òrgans, on vam poder observar una tendència a augmentar el pes del cor similar a l'experiment pilot però, en aquest cas, per efecte del DAS en controls. Alhora, en relació amb l'augment de la musculatura observada en la taula anterior, vàrem veure un augment significatiu del pes de la carcassa en els animals control als que se'ls hi havia administrat el tractament (Taula 36).

	C	C + 100
Fetge	6 ± 0.3	6.4 ± 0.2
Cor	414.6 ± 17.9	451.8 ± 15.6
Ronyons	1 ± 0.02	1 ± 0.02
Melsa	377.3 ± 16.9	400 ± 16
TGI	16.8 ± 0.8	15.6 ± 0.7
Carcassa	86.8 ± 1.8	90.6 ± 0.9 *

Taula 36. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals control (C) sense i amb tractament amb DAS a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100). Fetge, ronyons i carcassa expressats en g / 100 g de pes corporal inicial. Cor i melsa expressats en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 6. * p< 0.05 (efecte del tractament).

2.5.2.1 NIVELLS D'EXPRESSIÓ DELS GENS DELS SISTEMES PROTEOLÍTICS

A l'observar canvis en el pes dels músculs, vàrem creure convenient aprofundir en el mecanisme pel qual el DAS era capaç de produir aquest efecte. Per això, vàrem extreure RNA dels GSN dels animals de l'experiment en rates control i de l'assaig *in vivo* en rates portadores de tumor (grups T i T+100) i, mitjançant la tècnica de la PCR a temps real, vàrem esbrinar si es produïen canvis en l'expressió dels gens principals dels diferents sistemes proteolítics.

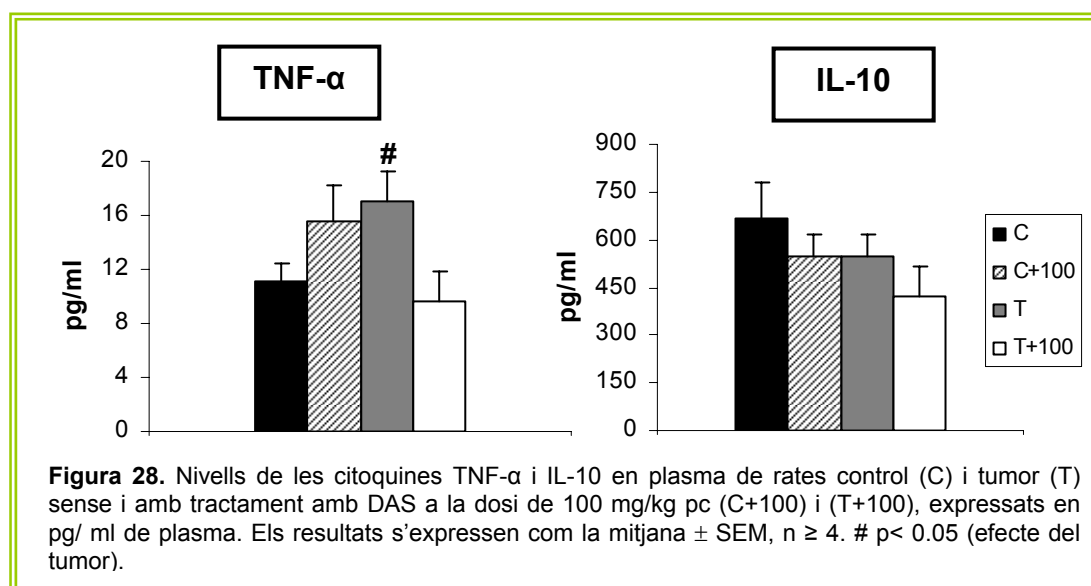
En concordança amb l'augment del pes dels músculs observat en els animals control als que se'ls hi havia administrat aquest tractament, els resultats de les PCRs ens van mostrar una disminució significativa de l'expressió d'alguns gens del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina per efecte del DAS, com eren la Ub i la subunitat del proteasoma C8, que varen disminuir gairebé un 50%, i Murf, la disminució del qual va ser del 37%. Alhora, en aquest mateix grup vàrem veure una disminució significativa tant de la m-calpaïna com de la catepsina B, ambdues amb un paper important en el sistema proteolític dependent de calci i el sistema lisosomal respectivament. A més, esmentar que en molts gens es veia una clara tendència a l'augment o augmentaven significativament la seva expressió en presència del tumor, excepte en el cas de Murf en el que observàrem una disminució significativa en el grup tumor tractat respecte el grup T (Taula 37).

	C	C + 100	T	T + 100
<u>Dependent d'ubiquitina</u>				
Ubiquitina	100 ± 11.7	47.8 ± 8.1 **	176.2 ± 46.3	284.4 ± 32.7 ###
C8	100 ± 6.8	48.7 ± 8.8 **	93.1 ± 12.8	177.2 ± 44
E2	100 ± 25.5	69.9 ± 25.6	592.1 ± 125.3 ##	469.3 ± 394.3
Murf	100 ± 9.9	63 ± 12.8 *	170 ± 40.5	9.8 ± 3 ## **
Atrogina	100 ± 13.8	78.3 ± 5	440.11 ± 29 ###	541.2 ± 114.1 ##
<u>Dependent de calci</u>				
m-Calpaïna	100 ± 12.7	65.7 ± 5.1 *	120.2 ± 12.9	195.9 ± 40.2 #
<u>Lisosomal</u>				
Catepsina B	100 ± 9.3	53 ± 6.9 **	66.1 ± 12.4	109.7 ± 21.9 #

Taula 37. Expressió de diferents gens dels sistemes proteolític en gastrocnemius dels animals control (C) i tumor (T) sense i amb tractament amb DAS a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100) i (T+100). Els resultats s'expressen en % respecte el control del mRNA del gen respecte rRNA 18S. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 4. * p < 0.05, ** p < 0.01 (efecte del tractament); # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 (efecte del tumor).

2.5.2.2 NIVELLS PLASMÀTICS DE CITOQUINES: TNF- α i IL-10

Per tal d'estudiar l'efecte del DAS sobre la situació inflamatòria que acompanya a la síndrome de la caquèxia, vàrem valorar els nivells plasmàtics de dues citoquines: el TNF- α (proinflamatòria) i la IL-10 (antiinflamatòria). Els resultats obtinguts van mostrar un augment significatiu del TNF- α per efecte del tumor i, tot i no ser significatiu, veiem una tendència a disminuir aquesta mateixa citoquina per efecte del DAS en animals portadors de tumor. En els nivell de IL-10 no observàrem canvis (Figura 28).



2.5.3 APROXIMACIÓ *IN VIVO*: EFECTE DEL DAS EN RATOLINS PORTADORS DEL CARCINOMA PULMONAR DE LEWIS

Els resultats obtinguts en l'experiment anterior mostraven un efecte prometedor del DAS, però tan sols reflectit en el grup control. Degut a aquest fet, ens vàrem plantejar dissenyar un experiment semblant però utilitzant un altre model tumoral de ratolí: el carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). Aquest model, com s'ha esmentat anteriorment, desencadena de forma semblant a l'hepatoma ascític de Yoshida AH-130 una situació de caquèxia en l'animal, també caracteritzada per una forta pèrdua de massa muscular i adiposa, i alhora produeix metàstasis pulmonars espontànies (Sugiura, 1955). Aquest model ens permet administrar el tractament durant un període de temps més llarg, ja que el tumor pot créixer durant 14 dies, període en el que administràvem intragàstricament el DAS a la dosi de 100 mg/kg pc. A més, vàrem realitzar un pretractament de dues setmanes prèvies a la inoculació de les cèl·lules tumorals. Així doncs, l'assaig es basava en 4 grups: ratolins control (C), ratolins control tractats amb DAS (C+100), ratolins portadors del tumor (T) i portadors de tumor tractats (T+100).

Els resultats que es recullen a la Taula 38 ens mostren el pes i la ingesta dels diferents grups d'animals. En aquests paràmetres vàrem poder observar que per efecte del tumor es produïa una disminució significativa del guany i del pes final dels animals. Aquest mateix efecte el veiem en la ingesta, però només en el grup tumor no tractat respecte els grups control. Vàrem veure un augment en el guany de pes en ratolins d'ambdós grups tractats, sent aquest guany significatiu en els ratolins portadors del tumor. Pel que fa a l'efecte del DAS en la ingesta, vàrem observar una disminució en els controls, però un augment significatiu en els ratolins amb tumor.

	C	C + 100	T	T + 100
Pes inicial	19.5 ± 0.4	19.7 ± 0.3	19.3 ± 0.4	20 ± 0.5
Pes final	21.4 ± 0.8	23.2 ± 0.7	17.7 ± 0.7 ##	19 ± 0.7 ##
Guany de pes	1.9 ± 0.6	3.51 ± 0.5	-1.6 ± 0.4 ###	-0.5 ± 0.1 ### *
Ingesta	355.4 ± 18.5	299.7 ± 6.2 *	264.8 ± 7.4 ###	332.2 ± 13 ***

Taula 38. Pes i ingesta dels animals control (C) i tumor (T) sense i amb tractament amb DAS a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100) i (T+100). El pes dels animals està expressat en g i la ingesta en g per 100g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p<0.05, *** p<0.001 (efecte del tractament), ## p<0.01, ### p< 0.001 (efecte del tumor).

Posteriorment vàrem valorar el pes dels músculs i dels teixits adiposos, en els que vàrem veure un clar efecte del tumor disminuint significativament el pes de tots ells respecte els controls. Només vàrem veure efecte significatiu del DAS en el pes del TABe del ratolins amb tumor tractats, en els que aquest teixit augmentava de pes respecte els no tractats (Taula 39).

	C	C + 100	T	T + 100
GSN	581.3 ± 11.6	594.9 ± 21.2	422.1 ± 13.2 ###	404.7 ± 19 ###
Tibialis	173.9 ± 4.8	181 ± 5.7	110.5 ± 3.5 ###	110.3 ± 4.6 ###
Soleus	54.4 ± 4.8	66.2 ± 5.8	20.1 ± 1.8 ###	23.4 ± 1.7 ###
EDL	84 ± 1.9	80.4 ± 3.6	22 ± 2.3 ###	24.1 ± 2.8 ###
TABd	270.6 ± 20.2	324.7 ± 50.7	33.2 ± 3.9 ###	39.3 ± 12.6 ###
TABe	1002.8 ± 77.3	1072 ± 100.8	167 ± 23.9 ###	268.3 ± 21.1 ### *
TAM	259.7 ± 12.1	298.6 ± 15.6	143.4 ± 9.7 ###	155.9 ± 13.3 ###

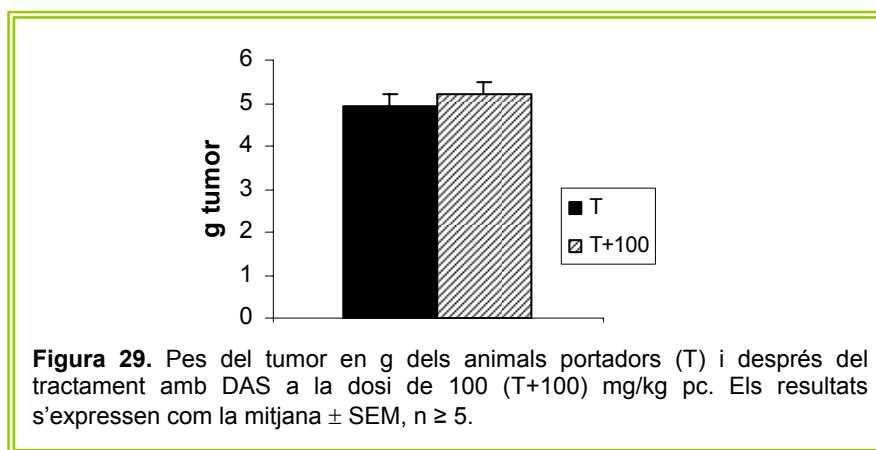
Taula 39. Pes dels músculs i teixits adiposos dels animals control (C) i tumor (T) sense i amb tractament amb DAS a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100) i (T+100). Els pesos dels teixits s'expressen en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p < 0.05 (efecte del tractament); ### p < 0.001 (efecte del tumor). Gastrocnemius (GSN), *extensor digitorum longus* (EDL), teixit adipós blanc dorsal (TABd), teixit adipós blanc epididimal (TABe) i teixit adipós marró (TAM).

Els resultats que es recullen a la Taula 40 mostren l'efecte del tumor i del DAS en la resta d'òrgans. Podem observar un augment significatiu del pes de la melsa i una disminució del pes tant del TGI com de la carcassa per efecte del tumor en animals no tractats. El grup de ratolins als que els hi vam inocular el tumor i administrar el tractament vàiem el mateix efecte en la melsa i en la carcassa, però no en el TGI. El DAS no produeix cap efecte rellevant, excepte l'augment del pes del fetge dels animals control tractats.

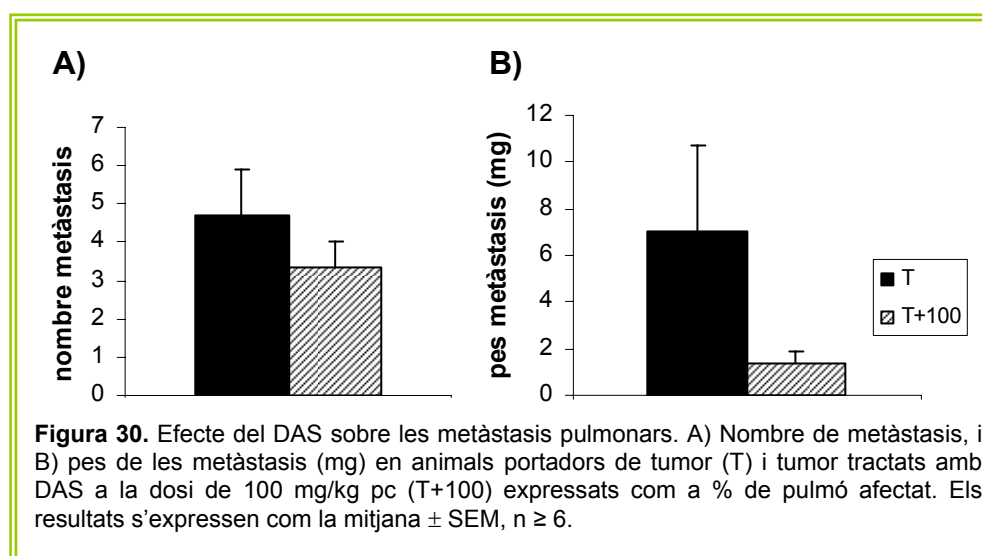
	C	C + DAS	T	T + DAS
Fetge	5.5 ± 0.2	6.6 ± 0.3 *	6.5 ± 0.3	7.1 ± 0.4
Cor	497.7 ± 12.8	510.6 ± 20.4	489.6 ± 12.9	493.5 ± 18.7
Ronyons	1.3 ± 0.01	1.3 ± 0.04	1.3 ± 0.03	1.5 ± 0.1
Melsa	357 ± 17.9	318.3 ± 12.7	1667 ± 124 ###	1715 ± 92.6 ###
TGI	12.8 ± 0.1	12.7 ± 0.2	10.3 ± 0.4 ###	11.1 ± 0.8
Carcassa	77 ± 2.3	76.4 ± 2.8	55.8 ± 1.2 ###	54.9 ± 1.1 ###

Taula 40. Pes dels òrgans i de la carcassa dels animals control (C) i tumor (T) sense i amb tractament amb DAS a la dosi de 100 mg/kg pc (C+100) i (T+100). Fetge, ronyons i carcassa expressats en g / 100 g de pes corporal inicial. Cor i melsa expressats en mg / 100 g de pes corporal inicial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SEM, n ≥ 5. * p < 0.05 (efecte del tractament); # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 (efecte del tumor).

A continuació vàrem procedir a la valoració del pes del tumor, paràmetre en el que tampoc vàrem detectar cap efecte del nutraceutic (Figura 29).



Finalment, vàrem voler valorar el nombre i pes dels nòduls tumorals secundaris que s'havien generat per metàstasi als pulmons (més detalls a la secció de materials i mètodes 1.2.3.1).



Com es pot observar a la Figura 30 el tractament no influeix en el nombre de metàstasi, en canvi, tot i no ser significatiu, sí que provoca una clara tendència a la disminució del pes d'aquestes.

V. DISCUSSIÓ

1. EFECTE DE L'EPA SOBRE LA DIABETIS MELLITUS DE TIPUS 2

En la societat occidental el nombre d'obesos està augmentant exponencialment. En alguns països, com ara els EEUU, ja són més del 30% de la població total (Ogden *et al.*, 2006). Clarament s'ha vist que l'obesitat està fortament associada a la diabetis mellitus de tipus 2 (DMT2) el nombre de pacients de la qual també es troba incrementant actualment. Aquesta situació suposa pels pacients uns elevats costos en salut, que sovint no són capaços de revertir la pobre qualitat de vida (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2006). Per aquesta raó, és essencial trobar, a més d'un tractament farmacològic per a la malaltia, mesures de suport nutricional. Des d'aquest punt de vista, s'ha suggerit que dietes riques en olis rics en AG ω -3 extrets del peix, són capaces de millorar algunes de les alteracions metabòliques associades a la DMT2. En aquesta tesi doctoral ens hem centrat en l'estudi de l'efecte de l'EPA (AG ω -3) sobre la DMT2. Vàrem voler valorar fins a quin punt l'EPA era capaç d'atenuar les alteracions metabòliques que comporta aquesta malaltia, ja que aquest compost havia estat objecte de molts estudis referents tant a la diabetis com al càncer i a la caquèxia. S'havia observat com els AG poliinsaturats, formant part de suplementos nutricionals, eren beneficiosos per als pacients amb malnutrició, i també havia estat demostrat que l'EPA, interferia en múltiples mecanismes implicats en la patogènesi de la caquèxia mostrant, en estudis clínics, una relació amb la reversió d'aquesta síndrome i una millora de la qualitat de vida dels pacients (Argilés, 2005).

A més, Tisdale i col·laboradors (2005) van suggerir que l'EPA era capaç d'inhibir la proteïna ZAG, implicada en la mobilització de lípids i en la degradació proteica muscular. Val a dir doncs, que pels efectes ja estudiats d'aquest AG ω -3, juntament amb el fet de ser un producte ja comercialitzat i àmpliament utilitzat per a la disminució de TG en sang, de la pressió sanguínia o dels nivells de colesterol, ens interessava estudiar aquest producte en el marc de la diabetis, amb l'objectiu de determinar el seu potencial terapèutic en aquesta situació catabòlica per millorar la qualitat de vida dels pacients.

1.1 EFECTE DE L'EPA EN EL PES I LA INGESTA DE RATES AMB DMT2

Per tal d'estudiar els efectes de l'EPA en DMT2, vàrem utilitzar el model animal de rates diabètiques Goto-Kakizaki. El vàrem escollir per ser un model espontani de DMT2 no associat a obesitat, que es caracteritza per presentar una defectuosa secreció d'insulina deguda a una disminució de la massa de les cèl·lules β pancreàtiques i per una defectuosa resposta a la glucosa en aquestes cèl·lules. Aquestes rates presenten hiperglucèmia, una disminuïda sensibilitat a la insulina al fetge, i resistència a aquesta hormona a múscul i teixit adipós (Goto i Kakizaki, 1981; Movassat, 2008). Per tal de comparar els efectes de l'administració de l'EPA amb un àcid gras de la sèrie dels ω -6, vàrem incloure en el nostre disseny experimental un grup de rates diabètiques tractades amb àcid linoleic (LINO), del

qual diferents estudis havien suggerit que provocava una disminució de la sensibilitat a la insulina en animals diabètics. A més, en nombrosos estudis s'ha observat un cert comportament proinflamatori del LINO (Calder, 2006). L'EPA es va administrar intragàstricament, ja que al ser un component de la dieta era la via més adient, i es va realitzar durant 28 dies a la dosi de 0.5 g/kg pc. El tractament no va afectar ni al pes dels animals així com tampoc a la ingesta ni a la beguda. Aquesta manca d'efecte també la vàrem observar en el grup tractat amb LINO respecte el control. Ni el tractament amb EPA ni amb LINO varen provocar canvis en el pes de la musculatura esquelètica ni la dels teixits adiposos, així com tampoc en la resta d'òrgans estudiats. Aquesta manca d'efectes podria ser atribuïble, per una banda, al temps de tractament (28 dies) que podria ser curt per a veure canvis en aquests paràmetres, i per altra banda a la dosi 0.5 g/kg pc, tot i que en estudis previs vàrem detectar efectes de l'EPA prevenint la pèrdua de pes corporal en animals portadors de tumor utilitzant la mateixa dosi durant un temps inferior (Rusell *et al.*, 2005). També s'havia observat, en el mateix model de rates diabètiques, que l'administració d'EPA a la dosi de 1 g/kg pc durant 2 setmanes de tractament, era capaç d'augmentar la sensibilitat a la insulina al fetge (Matsuura *et al.*, 2004).

1.2 EFECTE DE L'EPA EN EL METABOLISME GLUCÍDIC

La DMT2 es caracteritza per a presentar com a tret principal resistència a la insulina, que desemboca en greus alteracions metabòliques; entre elles, dins el metabolisme glucídic provoca una alteració de l'homeòstasi de la glucosa i de la utilització d'aquesta per part dels teixits.

És per això que el primer que ens vàrem plantejar va ser realitzar el test oral de tolerància a la glucosa i mesurar els nivells plasmàtics d'insulina. Tot i no veure l'efecte de l'EPA en les corbes de tolerància a la glucosa, la seva administració va provocar una disminució de la insulina circulant d'un 48%, fet que no s'observà en el grup al qual li vàrem administrar LINO. Estudis previs utilitzant l'administració a llarg termini d'EPA en humans (Woodman *et al.*, 2002) o en rates *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* (OLETF) (Kusunoki *et al.*, 2003) no varen mostrar cap efecte en els nivells d'insulina circulants. Aquesta discrepància possiblement es podria explicar per diferències en la dosi utilitzada o també que el model animal de diabetis esmentat presentava obesitat, mentre que les rates Goto-Kakizaki presenten un pes normal. La manca d'efecte en les corbes de tolerància podria estar relacionat amb el temps de tractament, ja que per a detectar canvis a aquest nivell possiblement necessitaríem un tractament més llarg. Per altra banda, la reducció en els nivells d'insulina circulants ens indica que possiblement l'EPA està contribuint a la millora de la sensibilitat a la insulina, ja que veiem una disminució en els nivells d'insulina sense cap augment en la corba de tolerància a la glucosa. Aquest fet és recolzat pels nivells d'expressió del transportador de glucosa GLUT4 en múscul esquelètic que augmenten un

40%. Aquest mateix efecte ja havia estat observat en altres models de diabetis (Mori *et al.*, 1997), i de forma semblant Delarue i col·laboradors (2004) havien suggerit que l'EPA era capaç de prevenir la disminució del contingut de mRNA de GLUT4 en múscul esquelètic i teixit adipós induïda per una dieta rica en greixos. A més, hem vist com el tractament amb EPA provoca un augment en el contingut proteic de l'AMPK en teixit adipós. L'AMPK és considerat un dels millors indicadors de la sensibilitat a la insulina, ja que s'ha pogut observar que és capaç de millorar l'homeòstasi de la glucosa, la concentració de colesterol circulant i la pressió sanguínia en models animals insulino-resistents (Schimmack *et al.*, 2006). Aquest últim resultat, juntament amb els anteriors, reforça la idea de que l'EPA podria estar millorant la sensibilitat a la insulina.

Per tot això, i per comprovar l'efecte de l'EPA sobre la captació de glucosa, vàrem valorar la captació de 2-desoxiglucosa (2-DOG) marcada radioactivament en músculs EDL aïllats i cèl·lules musculars de la línia C2C12 incubades amb EPA. Tot i no detectar un augment en la captació 2-DOG en EDLs sí s'observa un clar augment de la captació de 2-DOG en les cèl·lules incubades amb EPA. El fet de no obtenir resultats positius en la captació de glucosa en múscul podria està relacionat amb la dosi utilitzada o amb la dificultat que comporta la dissolució d'un compost de naturalesa lipídica en el medi d'incubació. Malgrat tot, el que mostren aquests resultats és que l'EPA actua directament augmentant la captació de glucosa en les cèl·lules musculars. En resum, l'augment de GLUT4 en múscul i del contingut proteic d'AMPK en teixit adipós per efecte de l'EPA, juntament amb la disminució dels nivells d'insulina, suggereixen que el tractament amb aquest AG ω -3 podria afavorir una millora de la resistència a la insulina, i podem dir que els seus efectes són directes, com a mínim en teixit muscular.

1.3 EFECTE DE L'EPA EN EL METABOLISME LIPÍDIC

Pel que fa al metabolisme lipídic, la insulina promou la síntesi de lípids i n'inhibeix la seva degradació. En els adipòcits, la glucosa és emmagatzemada sobretot en forma de lípids, degut a un augment en la seva captació i a l'activació d'enzims lipogènics com l'àcid gras sintasa o l'acetilCoA carboxilasa. La insulina també inhibeix la lipòlisi en els adipòcits i, a més, estimula la captació i emmagatzematge de greixos en el teixit adipós. Per tant, donada l'alteració del metabolisme lipídic que presenten els pacients amb DMT2, vam voler estudiar si el tractament amb EPA també provocava canvis en l'oxidació lipídica i/o en el seu emmagatzematge.

Per a dur a terme aquest estudi, vàrem determinar el destí metabòlic del palmitat, incubant músculs EDL i teixits adiposos aïllats de rates Goto-Kakizaki que havien estat tractades amb EPA i LINO durant 28 dies amb aquest AG marcat radioactivament. Així doncs, vàrem mesurar si la captació exògena, l'oxidació i l'acumulació de lípids es veia

afectada pel tractament amb l'EPA. Els resultats obtinguts mostren clarament com l'EPA provoca un increment en l'acumulació lipídica en el teixit adipós (38%) i una disminució del 50% de l'oxidació dels AG, mesurada mitjançant la producció de CO₂ en aquest mateix teixit. Resultats similars els vàrem obtenir en múscul esquelètic, on també vàrem observar una disminució (77%) de l'oxidació del palmitat. En canvi, no vàrem observar cap canvi per efecte del LINO.

Posteriorment realitzarem un experiment similar, però en aquest cas valorant el destí metabòlic de la trioleïna en rates Goto-Kakizaki prèviament sotmeses al tractament amb EPA i LINO i es va determinar la seva oxidació i la incorporació a lípids en els diferents teixits dels animals. En els resultats obtinguts no vàrem detectar canvis en l'oxidació lipídica com s'hauria esperat tenint en compte l'assaig *ex vivo* anterior, però cal dir que en aquest cas es treballava amb l'animal sencer, el que podria estar dificultant l'observació de canvis en l'oxidació. El que sí vàrem observar, en concordança amb l'experiment amb palmitat, va ser un important increment en l'acumulació lipídica en el TAB epididimal, respecte el grup tractat amb LINO però no respecte el control. Això ho podríem explicar tenint en compte la suposada millora de la sensibilitat a la insulina observada en els experiments anteriors. En el cas dels animals als que se'ls hi va administrar LINO, la manca d'efecte d'insulina dona lloc a una major lipòlisi i a la dificultat tant per dur a terme la lipogènesi (procés estimulat per la insulina, i inhibit per l'acumulació d'AG a l'interior dels adipòcits), així com a la disminució de l'esterificació dels AG, ja que possiblement al captar menys glucosa també generen menys glicerol per dur-la a terme. Cal remarcar que el tractament amb EPA va provocar canvis en el destí metabòlic dels lípids i que aquests no eren deguts a diferències en la quantitat de trioleïna captada, ja que l'absorció intestinal de la trioleïna no va variar.

Kusunoki i col·laboradors (2003) ja havien demostrat que l'administració d'EPA en rates diabètiques provocava l'acumulació de lípids al múscul esquelètic. L'increment en la captació de lípids per part del teixit adipós podria estar relacionat amb una millora en el metabolisme de les lipoproteïnes riques en triglicèrids. A més, l'EPA sembla millorar el metabolisme de les LDL (Nakamura *et al.*, 1998), afavorint l'acumulació de lípids en teixits perifèrics. D'altra banda, Singer i col·laboradors (1984) havien observat una correlació negativa entre l'administració d'EPA i l'acumulació de lípids en hepatòcits d'individus amb diabetis. Aquest fet també suggereix que l'EPA possiblement incideix de forma positiva en el metabolisme de les lipoproteïnes riques en TG, en aquest cas facilitant l'exportació d'AG hepàtics i, conseqüentment, la secreció de VLDL (Singer *et al.*, 1984). Els resultats obtinguts a nivell tant *ex vivo* com *in vivo* suggereixen que l'EPA afavoreix l'acumulació de lípids tissulars i la disminució de la seva oxidació i, juntament amb els resultats obtinguts de l'efecte de l'EPA en el metabolisme glucídic, ens podrien estar indicant que hi ha una menor utilització de lípids i una major utilització de glucosa com a font d'energia, recolzant per tant

la idea de que el tractament amb EPA podria ser capaç de millorar la sensibilitat a la insulina.

Posteriorment vàrem mesurar l'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL), un enzim situat a l'endoteli dels capil·lars sanguinis (especialment en teixit adipós i muscular) i encarregat d'hidrolitzar i captar els triglicèrids procedents de les lipoproteïnes riques en TG (quilomicrons i VLDL). En aquest estudi no vàrem veure cap efecte dels tractaments en l'activitat d'aquest enzim en cap dels teixits valorats. Possiblement en aquests resultats ha influït la tècnica utilitzada, ja que l'estudi de l'activitat enzimàtica es basa en la determinació de la velocitat màxima en front una concentració de substrat saturant; per tant, aquest resultat no exclouen el fet que la LPL pugui estar en major nombre o tenir una major afinitat.

Per a complementar a nivell molecular els resultats anteriors, vàrem valorar els nivells de mRNA de FAT (translocasa d'AG) i FATP (transportador d'AG) tant en múscul esquelètic (on no vàrem observar cap canvi) com en teixit adipós, on l'expressió d'ambdós va disminuir significativament per efecte de l'EPA i del LINO respecte el control. FAT és una proteïna de la família dels receptors *scavenger* situada a la membrana plasmàtica. Sobreexpressada en fibroblasts, s'ha vist que incrementa la captació i utilització d'AG de cadena llarga, i la seva pèrdua de funció està implicada en diferents estats fisiopatològics com la resistència a la insulina o la hipertrofia cardíaca (Ibrahimi *et al.*, 1996). D'altra banda, en presència d'insulina (Luiken *et al.*, 2002) i durant el procés contràctil (Bonen *et al.*, 2000), es dona un increment de la translocació a la membrana plasmàtica de FAT i del transport d'AG a nivell muscular. FATP és una proteïna de membrana present en els teixits que requereixen entrades importants d'AG de cadena llarga a la cèl·lula (Hirsch *et al.*, 1998), i la seva translocació a la membrana és induïda per la insulina (Stahl *et al.*, 2002). Els resultats referents a l'expressió d'ambdós transportadors en múscul esquelètic concorden amb el fet que el múscul, en principi, no és un teixit amb massa càrrega adiposa, i possiblement aquest fet ens dificulta l'observació de canvis en aquest transportadors. En canvi, el fet que ens disminueixin tant FAT com FATP en el teixit adipós no vol dir necessàriament que capti menys AG, sinó que possiblement l'augment d'AG que s'està produint degut al tractament ens està generant una regulació negativa sobre aquest transportadors que, tot i presentar disminuïda la seva expressió, continuaran captant una gran quantitat d'AG exògens.

Degut a la seva importància en el metabolisme glucídic i lipídic, vàrem decidir valorar els nivells d'expressió dels factors de transcripció PPARs. Els estudis realitzats ens mostren una disminució del contingut de mRNA de PPAR α (55%) i de PPAR δ (94%) en múscul esquelètic (Figura 14). Aquests dos factors de transcripció estan implicats en la regulació tant del metabolisme glucídic com lipídic, permetent l'adaptació a diferents estats nutricionals (Ferre, 2004; López-Soriano *et al.*, 2006). El PPAR α està present a fetge, cor i en menys quantitat al múscul esquelètic; quan s'activa, promou l'oxidació dels àcids

grassos, la síntesi de cossos cetònics, i el consum de glucosa. Per tant, la disminució de PPAR α en múscul podria estar associada a la disminució en l'oxidació d'AG ja observada. Per altra banda, el PPAR δ té un patró d'expressió més ampli en individus adults i també s'expressa durant l'embriogènesi en estadis molt primerencs (Grimaldi, 2005). Aquests últims anys s'ha demostrat que el tractament amb agonistes de PPAR δ normalitza els lípids circulants i també redueix la resistència a la insulina i l'adipositat en rosegadors i primats. El PPAR δ ha estat associat amb el combustible preferent en múscul esquelètic; Brunmair i col·laboradors (2006) ja havien vist que la seva activació permet al teixit muscular canviar el substrat preferent de la glucosa als AG. Aquest fet suggereix que l'EPA, possiblement mitjançant la disminució de PPAR δ en múscul, podria estar afavorint la utilització de glucosa en comptes d'AG.

1.4 EFECTE DE L'EPA EN LA INFLAMACIÓ

Molts estudis han mostrat que la DMT2 està associada a un estat d'inflamació, parcialment induït per factors humorals com les citoquines (Bastard *et al.*, 2006). Per tant, vàrem decidir valorar tant els nivells circulants, com el contingut de mRNA, de dues citoquines proinflamàtores com són el TNF- α i la IL-6, coneguts marcadors d'inflamació (Argilés *et al.*, 1994). Mentre que no vàrem observar canvis en els nivells circulants de TNF- α per l'efecte de cap dels dos tractaments, sí vàrem veure que el LINO provocava un augment significatiu de la IL-6, resultats que no ens varen sorprendre ja que coincidien amb altres autors que havien pogut observar un cert caràcter proinflamatori de l'àcid linoleic (Calder, 2006). Aquest fet també el podem relacionar amb els resultats obtinguts en la valoració de l'NF- κ B actiu, on observàrem que el LINO l'augmentava de forma significativa. Pel que fa als nivells d'expressió d'aquestes citoquines, vàrem obtenir una important disminució pel TNF- α (49%) com per la IL-6 (75%) per efecte de l'EPA en múscul esquelètic. El LINO també va mostrar efectes similars en aquest teixit. En el teixit adipós, l'EPA va induir una clara disminució dels nivells de la IL-6, i una notable tendència a disminuir els de TNF- α , tot i que els resultats no varen ser estadísticament significatius. Per tant, podríem dir que les dades obtingudes indiquen que el tractament amb EPA promou una disminució de l'estat inflamatori associat al nostre model de diabetis. A més, la disminució de la IL-6 en múscul esquelètic podria estar implicada en la regulació del substrat utilitzat per aquest teixit, estant alhora relacionat amb la disminució de l'oxidació d'AG anteriorment esmentada. Des d'aquest punt de vista, Al-Khalili i col·laboradors (2006) ja havien demostrat, utilitzant cèl·lules musculars humanes, que la IL-6 era capaç de promoure directament la diferenciació del múscul esquelètic i regular la utilització de substrats, estimulants l'emmagatzematge de glicogen i l'oxidació lipídica.

Com s'ha indicat anteriorment, a més de les diferents aproximacions farmacològiques per a fer front a la diabetis mellitus de tipus 2, un control de l'estat nutricional sembla ser essencial. Els resultats presentats en aquesta tesi recolzen la idea que la utilització de nutracèutics provinents dels àcids grassos marins podria ser beneficiosa per als pacients diabètics. De fet, el tractament amb EPA sembla millorar la sensibilitat a la insulina, principalment per l'augment de l'expressió de GLUT4, l'increment del contingut proteic d'AMPK, i l'augment de la captació de glucosa observada en els miotubs en cultiu. Això, a més, va acompanyat d'uns resultats referents al metabolisme lipídic que semblen indicar un canvi en la preferència del substrat energètic utilitzat, veient una major acumulació de lípids i una disminució en la seva oxidació, fet on possiblement intervenen els canvis induïts en els PPARs. Tenint en compte que la DMT2 és alhora una malaltia inflamatòria, és també interessant destacar que les dades presentades suggereixen una disminució de la inflamació mesurada a través de l'expressió de dos dels seus principals mediadors, com són la IL-6 i el TNF- α .

2. EFECTE DELS NUTRACÈUTICS SOBRE LA CAQUÈXIA CANCEROSA

La caquèxia cancerosa és una síndrome que es caracteritza per una important i progressiva pèrdua de pes corporal de l'hoste com a conseqüència de la desaparició dels dipòsits de greix i de la disminució de la massa muscular, i va acompanyada també d'anorèxia, nàusees, anèmia, astènia, alteracions de l'homeòstasi hormonal i immunodepressió (Strain, 1979). Els components principals d'aquest estat patològic són l'anorèxia i les anormalitats metabòliques (Argilés *et al.*, 1997). Com s'ha esmentat anteriorment, existeixen diferents estratègies terapèutiques focalitzades en aquests dos factors. En aquesta tesi ens hem centrat en la utilització de nutracèutics per al tractament de la caquèxia associada a processos neoplàsics.

Al nostre grup de recerca ja s'havien realitzat estudis basats en el potencial terapèutic de diferents nutracèutics sobre la caquèxia cancerosa, com ara el tirosol o l'oleuropeïna (presents a l'oli d'oliva). També es realitzaren assajos amb la curcumina (present a la mostaça...) o el resveratrol (present al vi...), dels quals es va observar un efecte antitumoral en rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 (Carbó *et al.*, 1999; Busquets *et al.*, 2001). Per tant, seguint amb aquesta línia de recerca, vàrem escollir un ventall de nutracèutics per avaluar la seva possible potencialitat en el tractament de la caquèxia associada al càncer, donant una major importància a la seva capacitat per atenuar la pèrdua de pes i el desgast muscular associats a aquesta síndrome.

2.1 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DEL RESVERATROL

Un dels nutracèutics estudiats en aquest treball ha estat el resveratrol, compost fenòlic present al vi. Estudis previs havien demostrat que el resveratrol presenta entre les seves propietats la de prevenir diferents tipus de patologies com ara el càncer (Jang *et al.*, 1997; Carbó *et al.*, 1999). A més, s'havia suggerit que era capaç d'aturar el desgast muscular associat a aquesta malaltia. Tisdale i col·laboradors varen observar que el tractament amb resveratrol a la dosi de 1 mg/kg en ratolins portadors del tumor MAC16, atenuava la pèrdua de pes i la degradació proteica en múscul esquelètic, principalment mitjançant la inhibició d'NF- κ B, factor de transcripció important en la inducció de l'expressió del proteasoma i de la degradació proteica (Wyke *et al.*, 2004). El nostre grup de recerca va testar la mateixa dosi de resveratrol però en un model tumoral diferent (l'hepatoma ascític Yoshida AH-130), observant, sorprenentment, que aquest compost no tenia cap efecte sobre la caquèxia associada al nostre model tumoral (Busquets *et al.*, 2005). Malgrat no obtenir l'efecte esperat però, en base als antecedents estudiats per d'altres autors sobre aquest compost, vàrem incloure com a un dels objectius d'aquesta tesi, aclarir finalment si el resveratrol tenia potencial anticaquètic. Per tal de verificar els efectes del nutracèutic sobre la proteòlisi vàrem realitzar una primera aproximació *in vitro*, en el model d'hipertèrmia puntual en cèl·lules musculars C2C12. Aquest model es pot relacionar amb la caquèxia, ja que provoca un augment de la proteòlisi muscular principalment protagonitzada per la sobreactivació del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, fet que s'observa també en la síndrome caquètica (Hasselgren *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2005). Posteriorment, vàrem testar aquest compost en un model tumoral diferent al dels estudis previs del grup. En aquest cas, vam emprar ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis. Vàrem escollir aquest model perquè, de forma similar a l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, provoca una progressiva pèrdua de pes i desgast tissular, particularment en múscul esquelètic (Busquets *et al.*, 2004). A més, aquest model és adequat per a l'estudi dels mecanismes involucrats en el creixement tumoral i posseeix una tendència hemorràgica, provocant múltiples metàstasis pulmonars de forma espontània (Sugiura *et al.*, 1955). Una altra avantatge és que el creixement tumoral és més llarg; per tant, a diferència dels portadors de l'hepatoma de Yoshida AH-130, aquest model ens permetrà administrar el tractament durant un període de temps més llarg.

Així doncs, vàrem sotmetre les cèl·lules musculars C2C12 al model d'hipertèrmia puntual durant 6h i les vàrem incubar amb resveratrol a diferents dosis (100, 10 i 1 μ M). Els resultats van mostrar un augment significatiu de la proteòlisi provocada a causa de l'augment de temperatura durant 6h i també vàrem observar una tendència del resveratrol per atenuar aquest augment a les dues dosis més baixes. Vàrem pensar que la manca d'un efecte significatiu es podia deure a que l'increment de la proteòlisi havia estat de gairebé el 50%, possiblement una taxa massa elevada per detectar una reversió en tant poc temps. A

continuació vàrem dissenyar un nou experiment afegint dues condicions experimentals més per tal d'allargar el temps de tractament: una en la que incubàvem els miotubs amb resveratrol durant 24h a 37°C, i una altra en la que els sotmetíem a la hipertèrmia durant 6h i els retornàvem a 37°C fins a les 24h. Vàrem repetir les dues dosis que en l'experiment anterior semblava que tenien efecte (10 i 1 µM), i en vàrem afegir una inferior (0.1 µM) ja que havíem augmentat el temps d'exposició al producte. En aquest cas, vàrem veure un augment significatiu de la proteòlisi per efecte de la temperatura, però alhora la capacitat del resveratrol per a disminuir la degradació de proteïnes a totes les dosis, efecte observat principalment als grups sotmesos a la hipertèrmia. Aquests resultats, ens suggerien que el resveratrol és capaç d'exercir el seu efecte directament sobre les cèl·lules musculars, i que a les dosis testades podia atenuar la sobreactivació de la proteòlisi provocada per la hipertèrmia.

Aquestes observacions ens van conduir a realitzar una segona aproximació *in vivo*, en aquest cas emprant ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis. En aquest assaig vàrem administrar el resveratrol intraperitonealment a les dosis de 5 i 25 mg/kg pc en animals portadors de tumor i de 5 mg/kg pc en animals controls (sense tumor). Vàrem escollir aquestes dosis perquè eren lleugerament superiors a les testades anteriorment pel nostre grup. No vàrem observar cap efecte del tractament amb resveratrol ni el pes, ni en la ingesta, ni en els pesos dels diferents òrgans i teixits estudiats. En el cas dels animals portadors de tumor vàrem veure com, per efecte d'aquest, disminuïa el pes corporal i la ingesta (28, 22 i 22% en el grup tumor, tumor tractat amb 5 i 25 mg/kg pc respectivament) fet esperat ja que aquest model tumoral presenta anorèxia associada a la síndrome caquètica. La manca d'efecte del resveratrol sobre l'anorèxia coincidia amb resultats previs del nostre grup obtinguts en el models de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130 (Carbó *et al.*, 1999; Busquets *et al.*, 2005). De forma similar, s'havia observat que el resveratrol era incapaç de prevenir l'anorèxia causada per endotoxines bacterianes (Lugarini *et al.*, 2002). Cert és, que els resultats no són totalment els esperats, ja que el resveratrol és un inhibidor de la ciclooxigenasa (COX2), enzim involucrat en mecanismes de control de la ingesta (Banerjee *et al.*, 2002b).

Els resultats obtinguts en aquest experiment coincideixen amb els estudis previs realitzats al nostre grup i no recolzen la idea de que el resveratrol sigui capaç de prevenir el desgast muscular associat a caquèxia. Tot i que els experiment *in vitro* i *in vivo* sovint no són extrapolables, aquest fet ens va sorprendre, ja que els resultats obtinguts en miotubs ens suggerien el contrari. Per tant, podem dir que el resveratrol a les dosis administrades i en el nostre model tumoral no presenta cap efecte anticaquètic remarcable.

Els resultats referents al creixement tumoral no van mostrar canvis per efecte del tractament. Malgrat no obtenir resultats satisfactoris sobre el creixement del tumor, el resveratrol sí va mostrar un efecte significatiu sobre les metàstasis en aquest model

experimental. Aquest compost va provocar una important disminució en el nombre de nòduls tumorals secundaris observant un resultat similar a ambdues dosis de 5 i 25 mg/kg pc (36 i 40% respectivament). En relació al pes d'aquestes metàstasis, l'efecte de resveratrol va ser evident, induint una disminució del seu pes, tot i ser aquest efecte més marcat a la dosi més alta (74%) respecte a la dosi inferior (45%).

Com s'ha esmentat anteriorment, estudis previs indicaven que el resveratrol era capaç de suprimir el creixement tumoral; és més, Tseng i col·laboradors (2004) varen descriure que el resveratrol era capaç de reduir el creixement tumoral en gliomes RT-2 de rates possiblement mitjançant la supressió de l'angiogènesi i, per tant, induint un efecte citotòxic en el creixement de la massa tumoral. Resultats similars havien estat obtinguts en el nostre laboratori utilitzant el model tumoral de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130, on l'administració d'1mg/kg pc de resveratrol provocava una disminució del 25% del creixement tumoral (Carbó *et al.*, 1999). Bove i col·laboradors (2002), tot i observar una disminució del creixement per efecte del resveratrol en cèl·lules tumorals mamàries 4T1, no observaren canvis en el creixement tumoral utilitzant un model de ratolí. Tenint en compte tots aquests resultats, és raonable pensar que l'acció del resveratrol sobre el creixement del tumor primari possiblement depèn del model experimental utilitzat. Sí que es podria suggerir, en base als nostres resultats i tenint en compte els obtinguts per altres autors, que el resveratrol posseeix un efecte antimetastàtic. Així, Kimura i Okuda (2000; 2001) varen observar una inhibició de les metàstasis pulmonars en ratolins portadors de tumor, i resultats semblants els obtingueren Scarlatti i col·laboradors (2003) veient que el resveratrol induïa una inhibició del creixement en cèl·lules tumorals mamàries MDA-MB-231 (una línia altament invasiva) possiblement per la inducció d'apoptosi. Utilitzant la mateixa línia cel·lular, Hsieh i col·laboradors (1999) van suggerir un efecte del resveratrol sobre la proliferació cel·lular. Alguns dels mecanismes que podrien explicar l'efecte antimetastàtic del resveratrol serien la disminució de l'angiogènesi en el nòduls tumorals secundaris (Cao *et al.*, 2002; 2005) o bé que l'efecte del resveratrol podria estar relacionat amb el TNF- α , ja que estudis previs realitzats per Kowalski i col·laboradors (2005) varen observar la capacitat del resveratrol per disminuir l'expressió gènica del TNF- α en macròfags induïts per LPS, comportant-se el resveratrol com un agent antiinflamatori (Afaq *et al* 2003; Pervaiz, 2003). Així, l'efecte antimetastàtic podria estar relacionat amb la resposta inflamatòria envers el tumor i indubtablement associada als elevats nivells de citoquines.

2.2 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DE LA GENISTEÏNA

La genisteïna, una de les isoflavones principals de la soja, posseeix diferents propietats d'entre les quals hi destaca la seva capacitat per oferir protecció davant determinats tipus de càncer, com són els de mama, colon i pell (Barnes, 1995; Kazi *et al.*, 2003), així com la capacitat d'inhibir el creixement de diverses línies tumorals humanes (Yu

et al., 2004; Russo *et al.*, 2006). S'ha suggerit que els mecanismes pels quals realitza aquests efectes poden ser la inhibició de la proliferació de les cèl·lules tumorals (Fotsis *et al.*, 1995; Aggarwal *et al.*, 2006), la inhibició de l'angiogènesi (Fotsis *et al.*, 1993), la inhibició de la invasió de cèl·lules tumorals i metàstasi (Li *et al.*, 1999), i per les seves propietats antioxidants.

Seguint el plantejament de l'estudi anterior, vàrem realitzar una primera aproximació *in vitro* per tal de determinar el possible efecte de la genisteïna sobre la degradació proteica muscular. Per dur-la a terme, vàrem incubar cèl·lules musculars de la línia C2C12 amb diferents dosis de genisteïna (50, 10 i 5 μ M) i les vàrem sotmetre a una hipertèrmia puntual durant 6 hores per tal d'induir la proteòlisi i comprovar així si el tractament era capaç de revertir-la. Donat que altres autors havien realitzat tractaments amb genisteïna de llarga durada, vàrem decidir incorporar dues noves situacions al disseny: una preincubació amb genisteïna de 24 hores i una altra de 48 hores abans de sotmetre les cèl·lules a la hipertèrmia, a més de les que no rebrien cap pretractament. Un cop realitzat l'experiment, vàrem poder observar el bon funcionament del model d'hipertèrmia, augmentant la proteòlisi un 30%, i l'acció de la genisteïna sent capaç d'atenuar aquest efecte a les dues dosis més baixes en aquells grups no pretractats. Per tant, aquests resultats ens suggereixen que la genisteïna és capaç d'actuar directament sobre les cèl·lules musculars i d'atenuar l'activació de la proteòlisi provocada per l'augment de la temperatura d'incubació. Aquests resultats es podrien relacionar amb altres estudis realitzats en cèl·lules tumorals humanes de pròstata (LNCaP) i mama (MCF-7), que tot i ser models cel·lulars diferents a la línia C2C12 utilitzada en el nostre assaig, també es va observar com el tractament amb genisteïna provocava la inhibició de l'activitat semblant a la tripsina de la subunitat 20S del proteasoma (Kazi *et al.*, 2003); aquesta subunitat forma part del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, màxim responsable de la degradació de proteïnes durant la caquèxia (Lecker *et al.*, 1999a).

Donades les dades prometedores obtingudes en el model *in vitro* ens vàrem plantejar realitzar un experiment pilot *in vivo* utilitzant rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130. Aquest és un tumor de ràpid creixement que causa a les rates portadores, una ràpida pèrdua de pes corporal i del contingut proteic del múscul esquelètic, així com altres importants alteracions metabòliques (Baccino *et al.*, 1984). En comparació amb el model tumoral del carcinoma pulmonar de Lewis, aquest és de creixement més ràpid, provoca la caquèxia en menys temps i ens permet manipular més fàcilment als animals i alhora obtenir més quantitat de teixit per a possibles anàlisis posteriors. Vàrem inocular el tumor i vam tractar les rates amb tres dosis diferents de genisteïna (10, 5 i 2.5 mg/kg pc) durant 7 dies. Per a l'elecció de les dosis, ens vàrem basar en estudis previs d'altres autors en els que, utilitzant dosis similars, havien detectat l'efecte d'aquesta isoflavona a nivell de metabolisme lipídic i d'inflamació (Zhao *et al.*, 2005; Orgaard *et al.*, 2008). El tractament amb genisteïna no va provocar canvis en cap dels paràmetres estudiats referents ni al pes de l'animal i ni als

seus òrgans i teixits, a excepció del pes del múscul tibialis i del teixit adipós que varen disminuir de forma significativa. Aquest últim resultat no ens va sorprendre ja que la genisteïna ha estat avaluada en diversos estudis d'obesitat en els que s'ha descrit la seva capacitat per a disminuir l'expressió gènica de l'enzim LPL en ratolins (Naaz *et al.*, 2003). A més, Kim i col·laboradors (2004) varen observar que la genisteïna era capaç d'activar PPAR α en hepatòcits, i per altra banda un efecte similar es va detectar sobre el factor de transcripció PPAR γ (Dang *et al.*, 2003), ambdós canvis relacionats amb un augment de l'oxidació d'AG. Altres estudis en adipòcits de rata van mostrar que la genisteïna era capaç d'inhibir la lipogènesi i induir la lipòlisi (Szkudelska *et al.*, 2000). Per tant, aquests estudis ens podrien explicar, juntament amb la disminució de la ingesta que observem a la dosi més baixa de genisteïna, la disminució de la massa del TAB. Existeix força controvèrsia pel que fa a l'efecte de la genisteïna sobre la ingesta, ja que Lephart i col·laboradors (2004) varen observar en rates que una dieta rica en isoflavones augmentava la ingesta, antecedent davant el qual, en situació de caquèxia, podríem pensar que la genisteïna podria millorar l'estat de l'animal, però, pel contrari, altres autors han observat una disminució de la ingesta per efecte de la genisteïna en ratolins als que se'ls hi va administrar aquest compost durant 15 dies (Penza *et al.*, 2006).

Al valorar l'efecte de la genisteïna sobre el creixement tumoral, vàrem detectar una disminució del volum acompanyat d'un augment del nombre de cèl·lules tumorals totals. Aquest resultat entra en controvèrsia amb d'altres estudis en els que s'havia vist l'efecte antitumoral d'aquest compost (Yu *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2006). Per altra banda, cal esmentar que també existeixen estudis en els que s'ha observat que la genisteïna potencia el creixement tumoral induït per agents carcinogènics com, per exemple, en els estudis de Day i col·laboradors (2001), on varen observar que la genisteïna potenciava el desenvolupament de càncer de mama induït per DMBA (7,12-dimetilbenzantracè).

Per tal de determinar si l'efecte de la genisteïna observat sobre el TAB anava associat a l'estat caquètic de l'animal o, si pel contrari, en animals controls (sense tumor) veuríem el mateix efecte, vàrem dissenyar un experiment en el que administràvem a rates control 10 mg/kg pc de genisteïna durant 7 dies, dosi a la qual en l'assaig anterior havíem vist l'efecte en el TAB sense l'afectació de cap altre teixit. Com era d'esperar, no vàrem observar canvis ni en el pes dels animals, ni ingesta, ni el pes de la resta d'òrgans i teixits però en aquesta ocasió, sorprenentment, tampoc vàrem veure l'efecte de la genisteïna en el TAB. Aquesta manca d'efecte, a una dosi del compost que prèviament havia exercit efecte, podria estar relacionada amb diferències en la metabolització del compost i/o en la seva biodisponibilitat en l'organisme. S'han estudiat poblacions que consumeixen una elevada quantitat de productes rics en isoflavones, i s'ha determinat que la concentració total de genisteïna al plasma sol ser 1 - 4.6 μM i que difícilment s'assoliran valors superiors a 10 μM a través de la dieta. Això es deu a que aquest compost està condicionat per un fort

aclariment al fetge i que, per tant, s'ha de tenir en compte que la dosi efectiva possiblement serà inferior a la dosi administrada (Orgaard *et al.*, 2008). La genisteïna pot ser absorbida i metabolitzada ràpidament en el tracte gastrointestinal, però s'ha vist que a mesura que s'augmenta la dosi, la seva concentració plasmàtica no augmenta de forma lineal sinó que existeix un punt de saturació en el que fins hi tot l'absorció es redueix. Tot i que la disminució de la biodisponibilitat a elevades dosis de genisteïna requereix més estudis, es creu que, a més de la reducció en l'absorció, també és deguda al primer pas de la seva ruta metabòlica on aquest compost és glucuronitzat (forma plasmàtica majoritària) (Zhou *et al.*, 2008).

Com s'ha esmentat anteriorment, s'ha descrit un efecte antitumoral d'aquest nutraceutic *in vitro*, però s'ha de tenir en compte que la concentració plasmàtica necessària per exercir aquest efecte és difícil d'assolir mitjançant el consum de soja de la dieta, o fins i tot administrant genisteïna. Per tant, la metabolització d'aquest compost en l'organisme ens podria estar determinant la discrepància observada en els nostres resultats *in vitro*, els quals suggereixen un efecte antiproteolític de la genisteïna, respecte els obtinguts en l'aproximació *in vivo*, on no s'observa cap efecte antitumoral. Alhora podríem dir que el fet de no veure una disminució de la massa del TAB en les rates control també es pot explicar pel fet que possiblement la genisteïna no estaria actuant de la mateixa manera en una rata control que en una altra que presenta greus alteracions metabòliques induïdes per tumor.

Val a dir que molts dels estudis realitzats fins ara mostren un efecte preventiu tant de la soja com de la genisteïna en front a malalties cardiovasculars o a determinats tipus de càncer com són el càncer de mama o de pròstata (Dixon *et al.*, 2002). Tenint en compte les múltiples controvèrsies existents en l'estudi del potencial terapèutic de la genisteïna, això estaria suggerint que aquest nutraceutic posseeix qualitats preventives més que curatives.

2.3 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DE L'EGCG

El galat d'epigallocatequina (EGCG) és considerat l'ingredient actiu principal i la catequina més abundant del te, i és un compost que ha estat diana de molts estudis científics amb l'objectiu d'estudiar els seus efectes terapèutics. Vàrem escollir aquest nutraceutic principalment degut a les seves propietats antioxidants. Aquesta catequina té la capacitat de participar en el segrest d'ions metàl·lics implicats en la formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) i també d'anions superòxid i radicals hidroxil que podrien malmetre el DNA cel·lular i iniciar reaccions de peroxidació. Els peròxids tenen un paper important en la carcinogènesi alterant el DNA, el creixement i la diferenciació cel·lular (Argilés i López-Soriano, 1998). Estudis previs han suggerit que els ROS podrien tenir un paper en la caquèxia cancerosa degut a que les vies de transducció de senyal sensibles als ROS semblen jugar un paper fonamental en la modulació dels nivells de TNF- α (Chandel *et al.*, 2000; Greiwe *et al.*, 2001), citoquina proinflamàtica que es troba augmentada en

situació de caquèxia. El nostre grup d'investigació va observar que el TNF- α té un efecte directe sobre la proteòlisi muscular, ja que activa l'expressió dels gens del sistema dependent d'ATP i ubiquitina (Llovera *et al.*, 1997).

Així doncs, tenint en compte aquesta propietat i les anteriorment descrites, vàrem decidir iniciar el plantejament experimental utilitzant un model *in vitro*, per tal de determinar si l'EGCG a diferents dosis (10, 5 i 0.5 μ M) era capaç d'atenuar l'augment de la proteòlisi en cèl·lules musculars C2C12 induïda per la hipertèrmia. Vàrem poder observar com l'EGCG, en situació basal, era capaç de disminuir la degradació de proteïnes; a més, en els grups sotmesos a la hipertèrmia es va veure una clara tendència a una disminuïda proteòlisi, sent únicament significativa a la dosi més baixa del grup sotmès a la hipertèrmia i retornat a les condicions normals. Per tant, podem dir que l'EGCG és capaç de disminuir la proteòlisi principalment en l'estat basal actuant directament sobre els miofibrils. La manca de significativitat estadística podria ser deguda al temps de tractament ja que, havent vist l'efecte de l'EGCG en les controls, podríem pensar que aquesta catequina necessita més temps per tal d'induir una disminució de la proteòlisi quan aquesta està activada. Aquests resultats podrien estar relacionats amb els estudis realitzats per Nam i col·laboradors (2001), on varen observar que aquesta catequina tenia la capacitat d'inhibir l'activitat del proteasoma, concretament exercint el seu efecte sobre la subunitat 20S inhibint la seva activitat semblant a la quimiotripsina en cèl·lules humanes a una concentració d'EGCG de 10 μ M (Nam *et al.*, 2001; Wan *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2004).

Els resultats obtinguts fins al moment, que ens suggerien una possible relació entre l'efecte del l'EGCG i el funcionament del sistema proteolític, juntament amb d'altres estudis en models de distròfia muscular, on s'observà que el tractament amb EGCG proporciona un cert grau de protecció per part d'aquest compost en el múscul en front a la necrosi massiva i, alhora, l'estimulació del múscul cap a un fenotip més resistent (Dorchies *et al.*, 2006), ens van conduir a l'estudi del possible potencial terapèutic d'aquesta catequina sobre la síndrome caquètica. Per a dur-ho a terme, vàrem dissenyar un experiment *in vivo* pilot tractant amb 3 dosis diferents d'EGCG durant 7 dies a rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130. Posteriorment, vàrem avaluar els canvis en el pes dels animals, la ingesta i el pes dels diferents òrgans i teixits i no vàrem observar cap diferència per efecte del tractament. També vàrem avaluar el creixement tumoral, on tampoc vàrem observar canvis induïts pel tractament, ni en el volum ni en el nombre de cèl·lules tumorals totals.

Les propietats anticancerígenes de l'EGCG s'han observat en cèl·lules tumorals de mama i de pròstata on el tractament amb EGCG va provocar l'aturada del cycle cel·lular en fase G1 i la inhibició de quinases dependents de ciclins per la inducció de factors com p27 o p21 (Park i Dong, 2003; Gupta *et al.*, 2004). Altres estudis van mostrar que, a més, l'EGCG era capaç d'inhibir l'activació d'NF- κ B el qual, en resposta als ROS, activa l'expressió de gens proinflamatoris i antiapoptòtics (Schoonbroodt *et al.*, 2000). Aquesta

polifacètica acció de l'EGCG s'atribueix a la combinació de la seva activitat antioxidant amb el seu efecte antiproliferatiu i el proapoptòtic (Gouni-Berthold *et al.*, 2004), així com també per la seva acció antiangiogènica i antimetastàsica (Adhami *et al.*, 2003; Fassina *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2008).

Cal dir que majoritàriament, tant al te com a la seva catequina predominant, se li han atribuït propietats en termes de prevenció més que curatius. L'EGCG, per les seves propietats antioxidants atenuant l'acció dels ROS, pot prevenir malalties com el càncer de pell, de mama, de pròstata i de pulmó (Mukhart i Ahmad 2000; Yang *et al.*, 2002), malalties cardiovasculars o l'envelliment, juntament amb malalties neurodegeneratives com el Parkinson o l'Alzheimer (Mandel i Youdim, 2004), totes elles relacionades, al menys en part, amb l'acció dels ROS. Tot i els resultats prometedors obtinguts *in vitro*, és possible doncs que la manca d'efecte del tractament en els animals portadors de tumor sigui deguda a que per a poder observar canvis, tant a nivell tumoral com de l'estat general de l'animal, és necessari realitzar un pretractament de llarga durada. En el nostre model tumoral i a les dosis testades l'EGCG no presenta propietats anticancerògenes. Una altra consideració a tenir en compte seria la biodisponibilitat d'aquest compost. Vàrem escollir l'administració oral ja que estudis realitzats per altres autors assolien mitjançant aquesta via, efectes d'aquest compost; a més la via oral és la més adient ja que els nutracèutics estan a la dieta. Val a dir que existeixen estudis que suggereixen que l'administració intragàstrica és menys eficaç que la intraperitoneal degut a que en el tracte gastrointestinal l'EGCG pot degradar-se i experimentar interaccions que facin disminuir l'absorció. Malgrat això, també s'ha observat que el consum perllongat de te verd o d'extractes que continguin EGCG podrien donar lloc a alguns dels efectes que apareixen en animals als que se'ls hi ha administrat EGCG intraperitonealment (Liao, 2001). És interessant assenyalar que a l'afegir llet al te s'indueix una disminució de la biodisponibilitat dels seus polifenols, que provoca una disminució de l'acció d'aquesta infusió *in vivo*, sense veure's afectada la seva capacitat antioxidant *in vitro* (Serafini *et al.*, 1996). Això només succeeix quan la quantitat de llet és molt elevada; si aquesta és només del 10% no afecta de forma rellevant a la seva biodisponibilitat (Van het Hof *et al.*, 1998). Existeixen dues hipòtesis per explicar aquest fet. La primera és per formació de complexos resistents a la hidròlisi gàstrica entre els polifenols i les proteïnes de la llet, fet que impedeix la seva absorció gastrointestinal. La segona és que els polifenols són solubles a pH àcid, al qual es troben de forma no ionitzada i s'absorbeixen amb facilitat; la llet, al produir un lleuger augment del pH, provoca la ionització dels polifenols i dificulta la seva absorció (Brown i Wright, 1963). Per tant, cal tenir en compte, abans de realitzar un tractament amb EGCG, les seves possibles interaccions amb altres components de la dieta que ens podrien estar interferint, fet que podria explicar les discrepàncies entre els nostres resultats obtinguts *in vitro* i *in vivo*.

2.4 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DE LA TEOFIL·LINA

Un dels alcaloides més estudiats en el camp de la Nutracèutica és la teofil·lina, actualment comercialitzada com a tractament contra l'asma bronquial i per a l'estimulació cardíaca. Està present en el te i en altres aliments com la xocolata. La teofil·lina ha estat objectiu de molts estudis científics per tal d'esbrinar les seves propietats i els seus mecanismes d'acció que, tot i no ser massa coneguts, s'ha vist que es caracteritza per ser un inhibidor de fosfodiesterases (PDE) no selectiu, explicant així el seu efecte broncodilatador provocant un augment d'AMPc i augmentant el GMPc amb la inhibició de PDE5 (Rabe *et al.*, 1995). El que ens va conduir a l'elecció d'aquest nutracèutic va ser principalment el seu efecte antiinflamatori (Barr *et al.*, 2003; Barnes, 2003). Entre totes les propietats que s'han anat estudiant d'aquest compost, cal destacar també la capacitat de la teofil·lina per a prevenir la translocació de NF- κ B al nucli, reduint així l'expressió de gens proinflamatoris en pacients amb MPOC (Tomita *et al.*, 1999).

Vist això, vàrem creure convenient l'estudi del potencial terapèutic de la teofil·lina sobre la caquèxia cancerosa i, basant-nos en els experiments anteriors presentats en aquesta tesi, vàrem realitzar una primera aproximació *in vitro* utilitzant novament el model d'hipertèrmia puntual en cèl·lules de la línia muscular C2C12. Vàrem incubar les cèl·lules amb 3 dosis diferents de teofil·lina (0.1, 0.05 i 0.01 mM) i vam observar que aquest nutracèutic era capaç de reduir significativament l'augment de la degradació proteica induïda per la temperatura en aquelles cèl·lules que havien estat sotmeses a les 6 hores d'hipertèrmia, sent aquest efecte més evident a la dosi de 0.1 mM. Aquests resultats suggereixen que la teofil·lina és capaç d'actuar directament sobre cèl·lules musculars i atenuar l'activació dels sistemes proteolítics, fet que si succeís *in vivo* podria arribar a disminuir el desgast muscular associat a la síndrome caquètica.

Per esbrinar si en l'animal sencer aquest nutracèutic mantindria les mateixes propietats que en el model *in vitro*, vàrem plantejar un experiment en el que vam administrar 3 dosis de teofil·lina (50, 25 i 10 mg/kg pc) durant 7 dies a rates portadores d'un tumor fortament caquètic (hepatoma ascític Yoshida AH-130). L'efecte del tractament no es va veure reflectit en el pes dels animals, però sí que observàrem un augment significatiu del pes del soleus i del cor en els animals tractats a la dosi més elevada. Aquests resultats suggerien que la teofil·lina, a la dosi de 50 mg/kg pc, era capaç d'induir una parcial reversió de la pèrdua de pes en aquests músculs i, per tant, podria estar atenuant el desgast tissular que pateixen aquests durant l'estat caquètic. Aquest resultat concorda amb els resultats obtinguts *in vitro*.

A l'avaluar l'efecte de la teofil·lina sobre el tumor, no vam observar canvis ni en el volum ni en el nombre de cèl·lules tumorals totals. Per tant, podríem dir que el tractament a les dosis testades i en el nostre model experimental no tindria un efecte antitumoral. Pel que fa a la possible activitat antitumoral de la teofil·lina, s'ha vist que aplicada localment

disminueix un 50% la inducció de tumors mitjançant la llum ultraviolada en ratolins (Zajdela *et al.*, 1978). Merimsky i col·laboradors (2005) també varen observar la capacitat de la teofil·lina per induir apoptosi en cèl·lules tumorals de pulmó.

En l'estudi del potencial antitumoral de la teofil·lina vàrem poder incorporar dues determinacions més, gràcies a la col·laboració amb el grup d'investigació del Dr Anker (Departament de Cardiologia, Charité Medical School, Berlín, Alemanya): l'activitat locomotora i la composició corporal. En primer lloc vàrem valorar l'activitat locomotora dels animals per mirar de determinar si el tractament estava augmentant la mobilitat i, per tant, millorava la qualitat de vida de l'animal, ja que una de les característiques principals de la caquèxia associada a càncer és l'astènia. Aquest símptoma està directament relacionat amb la pèrdua de massa muscular observada en els estats caquèctics. Vàrem dividir els animals en 3 grups: controls (sense tumor), portadors de tumor i portadors de tumor tractats amb 50 mg/kg pc de teofil·lina, dosi a la que anteriorment havíem observat els efectes més clars. Vam realitzar la mesura abans de la inoculació del tumor (moment en el qual començàvem el tractament) i 7 dies després. Com era d'esperar, en el primer resultat no es van observar diferències entre els grups ja que el creixement tumoral encara no s'havia iniciat. Pel que fa a la mesura final, vàrem veure el clar efecte del tumor disminuint el nombre de moviments dels animals portadors, perquè després d'una setmana de creixement tumoral el volum intraperitoneal de líquid ascític i la debilitat muscular interfereixen en el moviment de l'animal. La teofil·lina, però, no va ser capaç d'augmentar la mobilitat d'aquests animals, possiblement perquè es requereix un tractament de més llarga durada per assolir canvis en aquest nivell, fet impossible en el nostre model tumoral.

Seguidament, vàrem realitzar la determinació de la composició corporal en els mateixos grups en els que havíem mesurat l'activitat locomotora. En aquest estudi vàrem valorar l'increment de greixos, massa magra, aigua i fluids corporals des del moment de l'inòcul fins a una setmana després. Vàrem poder observar els efectes clars de la presència del tumor, provocant la disminució significativa de tots els paràmetres. Malgrat aquesta situació, vàrem observar que el grup tractat amb teofil·lina presentava una certa recuperació ja que l'increment de greixos i fluids era significativament superior al grup tumor; de fet, l'increment de fluids era equivalent al grup control. A més, tot i no assolir la significança estadística, s'observà que la massa magra i l'aigua seguien la mateixa tendència que els altres dos paràmetres per efecte del tractament. Com ja s'ha esmentat anteriorment, la caquèxia està caracteritzada principalment per una important i progressiva pèrdua de pes corporal deguda a la desaparició dels dipòsits de greix i a la disminució de la massa muscular (Fearon *et al.*, 2006); a més, tot i que l'anorèxia és un component important de la caquèxia, no explica totalment el desgast que presenten els pacients, ja que els patrons de pèrdua de pes i composició corporal difereixen dels de la inanició, i els seus efectes catabòlics no es poden contrarestar mitjançant l'administració extra de calories. Així doncs,

tenint en compte aquestes alteracions presents en l'hoste, els nostres resultats podrien suggerir un efecte beneficiós de la teofil·lina per a fer front a les alteracions de la composició corporal.

Els resultats obtinguts *in vitro* en cèl·lules musculars, així com l'augment del pes del soleus i del cor en els animals portadors de tumor, i finalment la marcada tendència de recuperació de la massa magra obtinguda en l'estudi de la composició corporal, ens van conduir a esbrinar si aquests canvis es veien reflectits a nivell molecular. Prèviament ja s'havia descrit que durant la caquèxia l'expressió d'alguns gens dels sistemes proteolítics, principalment els del sistema dependent d'ATP i ubiquitina, es troba augmentada (Llovera *et al.*, 1995). Per tal de determinar els possibles mecanismes d'actuació de la teofil·lina en la recuperació muscular, vàrem valorar l'expressió d'alguns d'aquests gens en els animals portadors de tumor i tractats a la dosi de 50 mg/kg pc de l'experiment pilot. Aquesta valoració la vàrem realitzar tant en soleus com en cor, ja que el desgast tissular present en la síndrome caquètica 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 (Tabet *et al.*, 2006). En concordança amb el que havíem vist fins al moment, l'acció de la teofil·lina es va veure reflectida en canvis en l'expressió d'alguns gens del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, observant una disminució significativa de l'expressió de la ubiquitina i de Murf, i una clara tendència a disminuir de l'enzim conjugador d'ubiquitina (E2) en el soleus. En el cor va disminuir significativament l'expressió de les subunitats del proteasoma C2 i C8 i també es va veure una tendència a disminuir l'expressió d'ubiquitina, d'E2 i de Murf. Pel que fa als sistemes proteolítics dependent de calci i el lisosomal, només vàrem detectar una tendència a disminuir l'expressió de m-calpaina i catepsina B respectivament en el cor.

Aquests resultats ens suggereixen que la teofil·lina podria estar disminuint la degradació proteica a través de la inhibició de l'expressió dels gens dels sistemes proteolítics, principalment els del sistema dependent d'ATP i ubiquitina, el que suggeriria un potencial efecte anticaquètic. El nostre grup de recerca va descriure que, almenys durant el creixement tumoral, la degradació proteica està associada amb un increment de l'activitat i de l'expressió del sistema dependent d'ATP i ubiquitina i, després de realitzar un tractament crònic amb un anticòs anti-TNF- α i observar que disminuïa l'expressió del gen de la ubiquitina, el que indicava que aquesta activació era mediada pel TNF- α (García-Martínez *et al.*, 1993; Llovera *et al.*, 1996a). Per això, vàrem valorar els nivells circulants d'aquesta citoquina procaquètica juntament amb els d'una citoquina antiinflamatòria, la IL-10, per tal d'esbrinar si en el nostre model tumoral la teofil·lina era capaç d'induir canvis en l'estat inflamatori associat a la caquèxia. El que vàrem observar va ser una clara disminució en els nivells de TNF- α , resultat que concorda amb estudis previs realitzats per Semmler i col·laboradors (1993) en els que s'havia observat que baixes dosis de teofil·lina

proporcionaven efectes antiinflamatoris reduint els nivells de TNF- α en pacients amb MPOC. Paral·lelament, Mascali i col·laboradors (1996) mostraren un augment de la IL-10 per efecte de la teofil·lina en cèl·lules mononuclears sanguínies. Però, pel contrari, nosaltres no vàrem observar cap canvi en els nivells d'aquesta darrera citoquina.

Sembla ser, doncs, que la teofil·lina és capaç d'actuar directament sobre cèl·lules musculars disminuint la degradació proteica, i que l'augment del pes d'alguns dels músculs estudiats podria estar relacionat amb la disminució de l'expressió dels gens del sistema proteolític dependent d'ATP i ubiquitina, fet possiblement associat a la disminució dels nivells de TNF- α . Per tant, aquestes observacions suggereixen que la teofil·lina podria ser un candidat terapèutic contra la caquèxia.

2.5 ESTUDI DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DEL DAS

El sulfur d'al·lil (DAS) és un nutracèutic que forma part dels components organosulfurats de l'all, els quals presenten la majoria dels efectes beneficiosos que aporta aquest aliment. D'entre les seves múltiples propietats ja descrites, les que ens varen conduir a estudiar el possible potencial anticancerògen del DAS varen ser les seves propietats antitumorals, interferint en nombrosos esdeveniments moleculars relacionats amb el càncer, com són la proliferació i diferenciació cel·lular, l'angiogènesi, la inhibició de la mutagènesi o l'eliminació de radicals lliures (Milner, 2006). També vàrem tenir en compte les seves propietats antioxidants, ja que s'ha vist que el DAS és capaç d'augmentar l'activitat de la superòxid dismutasa, la catalasa o la glutatió peroxidasa, i d'inhibir la peroxidació lipídica (Liu *et al.*, 2001). Per altra banda, Green i col·laboradors (2003) varen observar la seva capacitat per atenuar la producció de ROS durant el desenvolupament de càncer de mama en models animals. I per últim, un altre efecte clau que caracteritza a aquests compost liposoluble és l'efecte antiinflamatori. S'ha observat com DADS i DATS, molècules similars al DAS, disminueixen la producció de l'òxid nítric induïda per LPS en macròfags, acció que sembla ser que exerceixen mitjançant la inhibició de l'expressió de l'òxid nítric sintasa i de la ciclooxigenasa-2 (Chang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006)

Una vegada escollit el compost, i en concordança amb el plantejament d'experiments anteriors, vàrem començar realitzant una primera aproximació *in vitro* en el model d'hipertèrmia puntual en cèl·lules C2C12 per tal de determinar si el DAS era capaç d'exercir un efecte directe sobre cèl·lules musculars i interferir en l'activació de la proteòlisi. Vàrem sotmetre els miotubs a diferents condicions de temps i temperatura d'incubació i a 4 dosis diferents de DAS (1, 0.5, 0.25 i 0.1 mM), i vàrem observar en aquells que havíem pretractat durant 24h un efecte del DAS disminuint significativament la degradació proteica de les cèl·lules sotmeses a la hipertèrmia i en situació basal, principalment a la dosi de 0.25 mM. Un cop més, els resultats *in vitro* en suggerien un efecte directe sobre cèl·lules musculars atenuant l'activació de la proteòlisi, el que ens va fer plantejar l'estudi del DAS en caquèxia.

Per tal d'aprofundir en les nostres investigacions, vàrem dissenyar novament un experiment pilot *in vivo* amb rates portadores de l'hepatoma ascític de Yoshida AH-130. Vàrem testar 3 dosis de DAS (150, 100 i 25 mg/kg pc), escollides en base a estudis realitzats per altres autors, en els que s'havien vist que aquestes dosis administrades intragàstricament manifestaven efectes diversos. Vàrem tractar els animals durant una setmana en paral·lel al creixement tumoral, i posteriorment vàrem analitzar diferents paràmetres. No vàrem obtenir canvis en el pes dels animals, però si vàrem observar que a la dosi de 150 mg/kg pc bevien significativament més, possiblement degut a un lleuger efecte tòxic a la dosi més elevada, ja que aquesta mateixa dosi també va provocar una disminució del pes dels ronyons i de la carcassa. Quan vàrem analitzar el pes de la resta d'òrgans i teixits, vàrem observar un augment significatiu del tibialis i del cor i una tendència a augmentar de la resta de músculs a la dosi de 100 mg/kg pc.

Així doncs, els resultats ens suggerien un lleuger efecte atenuador del desgast muscular provocat per la caquèxia associada al càncer, sense mostrar cap efecte directe en el creixement tumoral. Estudis *in vitro* realitzats en cèl·lules tumorals canines havien mostrat la capacitat del DAS per a suprimir la seva proliferació (Sundaram i Milner 1993). Knowles i col·laboradors (2001) també mostraren efectes similars del DAS i els seus derivats en cèl·lules humanes de càncer de colon, pell i pulmó. En diferents línies cel·lulars tumorals humanes, el tractament amb OSCs liposolubles provoquen l'aturada del cicle cel·lular. S'han descrit diferents mecanismes pels quals podrien tenir lloc aquests efectes com, per exemple, mitjançant un augment de Bax i una disminució de Bcl-2 (Thomson *et al.*, 2003), o un augment de p53 (Nakagawa *et al.*).

Per a completar l'experiment anterior, vàrem voler esbrinar si en animals control (sense tumor) el DAS seria capaç d'exercir un efecte més clar. En aquesta ocasió vàrem tractar els animals a la dosi a la qual havíem observat els efectes més prometedors (100 mg/kg pc). Els resultats ens van mostrar un augment significatiu de la ingesta per efecte de tractament. Pel que fa al pes dels músculs, els efectes varen ser més evidents, observant-se un augment significatiu dels pes del gastrocnemius (6%), del tibialis (8%), i de l'EDL (10%) i una tendència a augmentar del soleus (10%). Aquest augment dels músculs concordava amb l'augment de la carcassa també observat en els animals controls tractats.

A continuació, vàrem voler esbrinar si l'efecte del DAS es veia reflectit a nivell molecular, és a dir, si l'augment del pes dels músculs era degut a canvis en l'expressió d'alguns gens dels principals sistemes proteolítics, sent el sistema dependent d'ATP i ubiquitina el màxim responsable del desgast muscular associat a la síndrome caquètica. Vàrem realitzar aquest estudi mitjançant la tècnica de la PCR a temps real en els animals control i portadors de tumor tractats a la dosi de 100 mg/kg. Vàrem observar com l'expressió de gairebé tots els gens estava augmentada degut a la presència de tumor, fet ja anteriorment observat pel nostre grup (Llovera *et al.*, 1995). En relació amb el que havíem

pogut observar en l'assaig anterior en animals controls, tant la ubiquitina com la subunitat C8 com Murf, així com també els gens relacionats amb els sistema proteolític dependent de calci i amb el sistema lisosomal, varen disminuir la seva expressió significativament per efecte del tractament. Com era d'esperar, la manifestació de l'efecte del DAS en l'expressió gènica en animals portadors de tumor no va ser tan clara però si vàrem veure una molt marcada disminució de l'expressió de Murf.

Finalment, tenint en compte l'estat inflamatori associat a la caquèxia, i la relació entre l'augment dels nivells de TNF- α i la sobreexpressió dels gens proteolítics, vàrem valorar els nivells d'aquesta citoquina juntament amb els de la IL-10 (citoquina antiinflamatòria). Sorprenentment, i a diferència d'altres autors que havien pogut observar la capacitat del DAS per inhibir l'alliberació de citoquines proinflamatòries i inhibir l'activitat d'NF- κ B (Chang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006), nosaltres no vàrem observar canvis en els nivells de les citoquines estudiades.

Arribat a aquest punt, veiem que el tractament amb DAS en controls i portadors de tumor a la mateixa dosi i durant el mateix temps no presenta els mateixos efectes. Hem vist com el DAS és capaç de provocar un augment del pes dels músculs en animals control, i que aquest efecte podria estar relacionat amb la disminució de l'expressió gènica dels diferents components dels sistemes proteolítics. Malgrat això, en els animals portadors de tumor aquests efectes no són tant evidents, possiblement degut a que per a la recuperació d'aquests, la durada del tractament hauria de ser més llarga.

En aquesta situació, per suggerir un efecte anticaquètic del DAS caldria modificar certs paràmetres del disseny experimental. Per aquesta raó, i vist els bons resultats obtinguts en animals control, ens vàrem proposar realitzar un experiment *in vivo* en un altre model tumoral que el nostre grup ja havia utilitzat anteriorment. Vàrem testar el DAS a la dosi de 100 mg/kg pc en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis, un model també altament caquètic que ens permetria tractar els animals durant un període de temps més elevat ja que el creixement tumoral el podríem mantenir fins a 14 dies després de la seva inoculació. A més, vàrem realitzar un pretractament dels animals de 14 dies més per tal d'intentar fer més evidents els efectes d'aquest nutracèutic. En aquesta ocasió, tot i observar un augment de la ingesta en animals portadors de tumor per efecte del tractament i, fins i tot un lleuger augment en el guany pes corporal, no observàrem canvis significatius en cap dels músculs estudiat. Així com tampoc en el pes del tumor, fet que coincidia amb els resultats obtinguts en el model tumoral en rates.

Com s'ha esmentat anteriorment, aquest model tumoral genera metàstasis pulmonars espontànies; per tant, vàrem analitzar els possibles efectes del tractament en la seva formació. Vàrem observar, tot i no obtenir una significança estadística, una tendència a disminuir el pes d'aquestes metàstasi. Això podria estar relacionat amb els resultats obtinguts anteriorment per Singh i col·laboradors (2008) en els que veien una disminució de

les metàstasis pulmonars associat a una inhibició de l'angiogènesi per efecte del DATS (trisulfur d'al·lil) (un compost altament similar al DAS) en un model de càncer de pròstata en ratolí.

Per tant, tenint tots aquests resultats en consideració, observem diverses controvèrsies pel que fa el potencial antitumoral del DAS. Vàrem observar uns resultats prometedors *in vitro* disminuint la degradació proteica i un augment de pes dels músculs del animals control. Fet possiblement associat a la disminució de l'expressió dels gens dels sistemes proteolítics, principalment del dependent d'ATP i ubiquitina. Tot i així, l'efecte del DAS no es mostra tan evident en rates portadores de l'hepatoma ascític de Yoshida AH-130, en les que sí observem un efecte antitumoral a l'augmentar el pes d'alguns dels músculs, però aquest no es veu clarament reflectit en els nivells d'expressió dels gens dels sistemes proteolítics. A més, a l'ampliar la durada del tractament en el model tumoral de ratolins no observem efectes similars als anteriorment obtinguts en rata. En els animals portadors de tumor ja s'ha descrit que els nivells de TNF- α es troben elevats i que aquesta citocina està implicada en l'activació del sistema proteolític principal, així doncs, la manca d'efecte en els nivells circulats de TNF- α podrien estar relacionats amb el fet de no observar cap efecte clar a nivell muscular. Pel fet d'observar l'efecte en controls i pels estudis realitzats per altres autors sobre les propietats antioxidants, antiinflamatòries així com les antitumorals, podríem suggerir que el DAS té un efecte més aviat preventiu que terapèutic tot i mostrar cert caràcter antitumoral.

VI. CONCLUSIONS

1. L'àcid eicosapentaenoic (EPA) incrementa la captació de glucosa en les cèl·lules musculars, i indueix un augment de l'expressió gènica de GLUT4 en múscul esquelètic i del contingut proteic d'AMPK en teixit adipós en el model de diabetis de tipus 2 Goto-Kakizaki. Aquests efectes, juntament amb la disminució dels nivells circulants d'insulina, suggereixen que el tractament amb aquest àcid gras ω -3 pot millorar la sensibilitat a la insulina.
2. L'EPA afavoreix l'acumulació de lípids al teixit adipós i disminueix l'oxidació d'àcids grassos en músculs EDL i teixit adipós aïllat.
3. El tractament de les rates diabètiques amb EPA indueix una disminució de l'expressió gènica tant de TNF- α com de IL-6 en múscul esquelètic i teixit adipós, fet que suggereix una millora de l'estat inflamatori associat a la diabetis.
4. Els canvis que l'EPA indueix en les rates diabètiques a nivell tant del metabolisme glucídic com lipídic, juntament amb la disminució de l'expressió gènica de PPAR δ i IL-6, indicarien una preferència cap a la utilització de glucosa en comptes d'àcids grassos com a substrat energètic preferent.
5. Els nutracèutics resveratrol, genisteïna, galat d'epigallocatequina, teofil·lina i sulfur d'al·lil presenten la capacitat d'actuar directament en cèl·lules musculars C2C12 induint una disminució de la proteòlisi en el model d'hipertèrmia puntual.
6. El tractament amb resveratrol presenta un efecte antimetastàtic en ratolins portadors del carcinoma pulmonar de Lewis.
7. La teofil·lina provoca un augment del pes del múscul soleus i del cor associat amb la disminució de l'expressió dels gens dels sistemes proteolítics en les rates portadores de l'hepatoma ascític Yoshida AH-130. A més, produeix una disminució dels nivells circulants de TNF- α . Aquests efectes, juntament amb els canvis observats en la composició corporal, fan d'aquest compost un candidat pel tractament de la caquèxia.
8. El tractament amb DAS provoca un augment en el pes dels músculs associat a una disminució de l'expressió dels gens dels sistemes proteolítics tant en les rates portadores de tumor com en els animals control, indicant un efecte anticaquètic d'aquest nutracèutic.

VII. BIBLIOGRAFIA

A

Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, Wang H, Saji M, Carathers M, Ringel MD, Skipworth RJ, Fearon KC, Hollingsworth ME, Muscarella P, Burghes AH, Rafael-Fortney JA, Guttridge DC. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell*, 8: 421-32 (2005)

Acharyya S, Guttridge DC. Cancer cachexia signaling pathways continue to emerge yet much still points to the proteasome. *Clin Cancer Res*, 13: 1356-61 (2007)

Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr*, 133: 2417S-2424S (2003)

Afaq F, Adhami VM, Ahmad N. Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 186: 28-37 (2003)

Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev*, 16: 111-24 (1996)

Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw*, 7: 93-124 (1996)

Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 71: 1397-421 (2006)

Agteresch HJ, Rietveld T, Kerkhofs LG, van den Berg JW, Wilson JH, Dagnelie PC. Beneficial effects of adenosine triphosphate on nutritional status in advanced lung cancer patients: a randomized clinical trial. *J Clin Oncol*, 20: 371-8 (2002)

Agusti A, Morla M, Sauleda J, Saus C, Busquets X. NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax*, 59: 483-7 (2004)

Ahlberg J, Berkenstam A, Henell F, Glaumann H. Degradation of short and long lived proteins in isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, temperature, and proteolytic inhibitors. *J Biol Chem*, 10: 5847-54 (1985)

Ahmed S, Marotte H, Kwan K, Ruth JH, Campbell PL, Rabquer BJ, Pakozdi A, Koch AE. Epigallocatechin-3-gallate inhibits IL-6 synthesis and suppresses transsignaling by enhancing soluble gp130 production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 14692-7 (2008)

Ahrén B. Novel combination treatment of type 2 diabetes DPP-4 inhibition + metformin. *Vasc Health Risk Manag*, 4: 383-94 (2008)

Akamizu T, Kangawa K. Emerging results of anticatabolic therapy with ghrelin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10: 278-83 (2007)

Akashi YJ, Palus S, Datta R, Halem H, Taylor JE, Thoene-Reineke C, Dong J, Thum T, Culler MD, Anker SD, Springer J. No effects of human ghrelin on cardiac function despite profound effects on body composition in a rat model of heart failure. *Int J Cardiol*, 22 (2008)

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, 262: 5592-5595 (1987)

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 366: 1059-62 (2005)

Alekel DL, StGermain A, Pererson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 72: 844-852 (2000)

Aleman MR, Santolaria F, Batista N, de La Vega M, Gonzalez-Reimers E, Milena A, Llanos M, Gomez-Sirvent JL. Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition? *Cytokine*, 19: 21-6 (2002)

- Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Lonnqvist F, Koistinen HA, Krook A.** Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol*, 20: 3364-75 (2006)
- Anderson PJ, Critchley JA, Chan JCN, Cockram CS, Lee ZSK, Thomas GN, Tomlinson B.** Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25: 1782-1788 (2001)
- Anderson RA, Polansky MM.** Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem*, 50: 7182-7186 (2002)
- Anker SD, Coats AJ.** How to recover from renaissance? the significance of the results of recover, renaissance, renewal and attach. *Int J Cardiol*, 86: 123-30 (2002)
- Anker SD, Negassa A, Coats AJ, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN, Yusuf S.** Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet*, 361: 1077-83 (2003)
- Ansari MS, Ansari S.** Lycopene and prostate cancer. *Future Oncol*, 1: 425-30 (2005)
- Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E & Holm C.** Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem*, 273: 215-221 (1998)
- Araki E, Lipes MA, Patti ME.** Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 372: 186-90 (1994)
- Argilés JM, Azcon-Bieto J.** The metabolic environment of cancer. *Mol Cell Biochem*, 81: 3-17 (1988)
- Argilés JM, López-Soriano FJ.** Oxidation of branched-chain amino acids in tumor-bearing rats. *Biochem Soc Trans*, 17: 1044-5 (1989)
- Argilés JM, García-Martínez C, Llovera M, López-Soriano FJ.** The role of cytokines in muscle wasting: its relation with cancer cachexia. *Med Res Rev*, 12: 637-52 (1992)
- Argilés JM, López-Soriano J, López-Soriano FJ.** Cytokines and diabetes. the final step? Involvement of TNF-alpha in both type I and 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 26: 447-9 (1994)
- Argilés JM, Álvarez B, López-Soriano FJ.** The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev*, 17: 477-98 (1997)
- Argilés JM, López-Soriano.** El cáncer y su prevención, la importancia de la alimentación. Ed. Universitat de Barcelona (1998)
- Argilés JM & López-Soriano FJ.** Host metabolism: a target in clinical oncology? *Med Hypotheses*, 51: 411-5 (1998a)
- Argilés JM, López-Soriano FJ, Pallarés-Trujillo.** Ubiquitin and disease. *Molecular Biology Intelligence Unit*. Landes Company. Austin, Texas, USA. (1998b)
- Argilés JM, López-Soriano FJ.** Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 1: 245-51 (1998c)
- Argilés JM, López-Soriano FJ.** The role of cytokines in cancer cachexia. *Med Res Rev*, 19: 223-48 (1999)
- Argilés JM, Meijssing SH, Pallares-Trujillo J, Guirao X, López-Soriano FJ.** Cancer cachexia: a therapeutic approach. *Med Res Rev*, 21: 83-101 (2001)
- Argiles JM, Almendro V, Busquets S, Lopez-Soriano FJ.** The pharmacological treatment of cachexia. *Curr Drug Targets*, 5: 265-77 (2004)

- Argilés JM i Novartis Consumer Health S.A.** Nutrición y cáncer, 100 conceptos clave. Barcelona, Glosa (2005)
- Argilés JM.** Cancer-associated malnutrition. *Eur J Oncol Nurs*, 2: S39-50 (2005)
- 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*, 25: 49-65 (2005)
- Argilés JM, Busquets S, Moore-Carrasco R, Figueras M, Almendro, López-Soriano FJ.** Targets in clinical oncology: the metabolic environment of the patient. *Front Biosci*, 12: 3024-51 (2007a)
- Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S.** Emerging drugs for cancer cachexia. *Expert Opin Emerg Drugs*, 12: 555-70 (2007b)
- Arnés L, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML.** Effect of exendin-4 treatment upon glucose uptake parameters in rat liver and muscle, in normal and type 2 diabetic state. *Regul Pept*, Sep 5 (2008)
- Arpaci F, Yilmaz MI, Ozet A, Ayta H, Ozturk B, Komurcu S, Ozata M.** Low serum leptin level in colon cancer patients without significant weight loss. *Tumori*, 88: 147-9 (2002)
- Aschner Chávez M, Izquierdo J, Sole J, Tarazona A, Pinzón JB, Rios M.** Prevalence of the metabolic syndrome in a rural and urban population in Colombia. *Diab Res Clin Pract*, 57: 532 (2002)
- Attaix D, Taillandier D, Temparis S, Larbaud D, Aourousseau E, Combaret L, Voisin L.** Regulation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in muscle wasting. *Reprod Nutr Dev*, 34: 583-97 (1994)
- Attaix D, Mosoni L, Dardevet D, Combaret L, Mirand PP, Grizard J.** Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 1962-73 (2005)
- Azcón-Bieto J i Talon M.** Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana de España SAU ISBN, 84-486-0258-7 (2000)
- B
- Babcock TA, Novak T, Ong E, Jho DH, Helton WS, Espot NJ.** Modulation of LPS-stimulated macrophage tumor necrosis factor- α production by α -3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10. *J Surg Res*, 107: 135-139 (2002)
- Baccino FM, Tessitore L, Bonelli G.** Control of protein degradation and growth phase in normal and neoplastic cells. *Toxicol Pathol*, 12: 281-7 (1984)
- Balazs C, Kiss E.** Immunological aspects of the effect of pentoxifylline (Trental) (a brief review). *Acta Microbiol Immunol Hung*, 41: 121-6 (1994)
- Balducci L, Hardy C.** Cancer and malnutrition--a critical interaction: a review. *Am J Hematol*, 18: 91-103 (1985)
- Balentine DA, Harbowy ME and Graham HN.** Tea: the Plant and its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage in Caffeine. Ed. *G Spiller* (1998)
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV.** Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)- ζ and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology*, 138: 4721-4731 (1997)
- Banerjee SK, Maulik SK.** Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J*, 1: 4 (2002a)
- Banerjee S, Bueso-Ramos C, Aggarwal BB.** Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol. Role of nuclear factor- κ B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9. *Cancer Res*, 62: 4945-54 (2002b)

- Baracos VE.** Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms. *Annu Rev Nutr*, 26: 435-61 (2006)
- Barber MD, Ross JA, Voss AC, Tisdale MJ & Fearon KC.** The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 81: 80-6 (1999)
- Barnes PJ.** Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons. *Proc Am Thorac Soc*, 2: 334-9 (2005)
- Barnes PJ.** Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 813-818 (2003)
- Barnes S.** Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*, 125: 777S-83S (1995)
- Barnes S, Kim H, DarleyUsmar V, Patel R, Xu J, Boersma B, Luo M.** Beyond ER alpha and ER beta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *J Nutr*, 130: 656S-657S (2000)
- Barr RG, Rowe BH, Camargo CA Jr.** Methylxanthines for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: meta-analysis of randomised trials. *BMJ*, 327: 643 (2003)
- Bartlett DL, Charland S, Torosian MH.** Growth hormone, insulin, and somatostatin therapy of cancer cachexia. *Cancer*, 73: 1499-504 (1994)
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B.** Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*, 17: 4-12 (2006)
- Bauhofer A, Witte K, Celik I, Pummer S, Lemmer B, Lorenz W.** Sickness behaviour, an animal equivalent to human quality of life, is improved in septic rats by G-CSF and antibiotic prophylaxis. *Langenbecks Arch Surg*, 386: 132-40 (2001)
- Beck SA, Tisdale MJ.** Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res*, 47: 5919-23 (1987)
- Beck SA, Mulligan HD, Tisdale MJ.** Lipolytic factors associated with murine and human cancer cachexia. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1922-6 (1990)
- Begg RW.** Tumor-host relations. *Adv Cancer Res*, 5: 1-54 (1958)
- Bennegard K, Lindmark L, Eden E, Svaninger G, Lundholm K.** Flux of amino acids across the leg in weight-losing cancer patients. *Cancer Res*, 44: 386-93 (1984)
- Bhandari BK, Feliers D, Duraisamy S, Stewart JL, Gingras AC, Abboud HE, Choudhury GG, Sonenberg N, Kasinath BS.** Insulin regulation of protein translation repressor 4E-BP1, an eIF4E-binding protein, in renal epithelial cells. *Kidney Int*, 59: 866-75 (2001)
- Billiau A, Vandekerckhove F.** Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur J Clin Invest*, 21: 559-73 (1991)
- Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster SG, Miller SC, Webster C.** Plasticity of the differentiated state. *Science*, 230: 758-66 (1985)
- Blitzer JR, Rollins N, Blackwell A.** Children who starve themselves: anorexia nervosa. *Psychosom Med*, 23: 369-83 (1961)
- Block E.** The chemistry of garlic and onions. *Sci Am*, 252: 114-9 (1985)
- Bloomgarden ZT.** Approaches to treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 31: 1697-703 (2008)
- Blough E, Dineen B, Esser K.** Extraction of nuclear proteins from striated muscle tissue. *Biotechniques*, 23: 202-4 (1999)

- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD.** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3: 1014-9 (2001)
- Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN.** Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem*, 275: 14501-8 (2000)
- Borchardt RT, Huber JA.** Catechol-o-methyltransferase: structure-activity relationship for inhibition by flavonoids. *J Med Chem*, 18: 120-122 (1975)
- Borek C.** Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr*, 131: 1010S-5S (2001)
- Borek C.** Garlic reduces dementia and heart-disease risk. *J Nutr*, 136: 810S-812S (2006)
- Borradaile NM, de Dreu LE, Wilcox LJ, Edwards JY, Huff MW.** Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J*, 366: 531-539 (2002)
- Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS.** The major green tea polyphenol, (-) epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr*, 138: 1677-83 (2008)
- Bove K, Lincoln DW, Tsan MF.** Effect of resveratrol on growth of 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 291: 1001-1005 (2002)
- Bozzetti F, Ammatuna M, Migliavacca S, Bonalumi MG, Facchetti G, Pupa A, Terno G.** Total parenteral nutrition prevents further nutritional deterioration in patients with cancer cachexia. *Ann Sur*, 205: 138-43 (1987)
- Brand CL, Rolin B, Jorgensen PN, Svendsen I, Kristensen JS, Holst JJ.** Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 37: 985-993 (1994)
- Brennan MF.** Total parenteral nutrition in the cancer patient. *N Engl J Med*, 305: 375-82 (1981)
- Brown PJ, Wright WB.** An investigation of the interactions between milk proteins and tea polyphenols. *J Chromatogr*, 11: 504-14 (1963)
- Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-20 (2001)
- Bruera E, Macmillan K, Kuehn N, Hanson J, MacDonald RN.** A controlled trial of megestrol acetate on appetite, caloric intake, nutritional status, and other symptoms in patients with advanced cancer. *Cancer*, 66: 1279-82 (1990)
- Brunmair B, Staniek K, Dorig J, Szocs Z, Stadlbauer K, Marian V, Gras F, Anderwald C, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C.** Activation of PPAR-delta in isolated rat skeletal muscle switches fuel preference from glucose to fatty acids. *Diabetologia*, 49: 2713-22 (2006)
- Busquets S, Alvarez B, Llovera M, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM.** Branched-chain amino acids inhibit proteolysis in rat skeletal muscle: mechanisms involved. *J Cell Physiol*, 184: 380-4 (2000)
- Busquets S, 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*, 167: 33-8 (2001)
- 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*, 191: 283-9 (2002)
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, Argilés JM, López-Soriano FJ.** Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res*, 15: 6725-31 (2004)

Busquets S, Fuster G, Ametller E, Olivan M, Figueras M, Costelli P, Carbó N, Argilés JM, López-Soriano FJ. Resveratrol does not ameliorate muscle wasting in different types of cancer cachexia models. *Clin Nutr*, 26: 239-44 (2007)

Byerley LO, Heber D, Bergman RN, Dubria M & Chi J. Insulin action and metabolism in patients with head and neck cancer. *Cancer*, 67: 2900-6 (1991)

C

Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr*, 25: 79-99 (2006)

Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc*, 61: 345-58 (2002)

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 75: 197-202 (2006)

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res*, 52: 885-97 (2008)

Cao Y, Cao R, Brakenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived diphenols. *J Nutr Biochem*, 13: 380-390 (2002)

Cao Y, Fu ZD, Wang F, Liu HY, Han RJ. Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants. *Asian Nat Prod Res*, 7: 205-213 (2005)

Carbó N, Costelli P, Tessitore L, Bagby GJ, López-Soriano FJ, Baccino FM, Argilés JM. Anti-tumour necrosis factor-alpha treatment interferes with changes in lipid metabolism in a tumour cachexia model. *Clin Sci (Lond)*, 87: 349-55 (1994)

Carbó N, Costelli P, Baccino FM, Lopez-Soriano FJ, Argilés JM. Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model. *Biochem Biophys Res Commun*, 254: 739-43 (1999)

Carbó N, López-Soriano J, Costelli P, Busquets S, Alvarez B, Baccino FM, Quinn LS, López-Soriano FJ, Argilés JM. Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. *Br J Cancer*, 83: 526-31 (2000)

Carbó N, López-Soriano J, Costelli P, Alvarez B, Busquets S, Baccino FM, Quinn LS, López-Soriano FJ, Argilés JM. Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. *Biochim Biophys Acta*, 1526: 17-24 (2001)

Carbó N, Busquets S, van Royen M, Alvarez B, López-Soriano FJ, Argilés JM. TNF-alpha is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. *Br J Cancer*, 18: 1012-6 (2002)

Carlson N, Rechsteiner M. Microinjection of ubiquitin: intracellular distribution and metabolism in HeLa cells maintained under normal physiological function. *J Cell Biol*, 104: 537-46 (1987)

Cary PD, King DS, Crane-Robinson C, Bradbury EM, Rabbini L, Goodwin G and Johns E. Structural studies on two high-mobility-group proteins from call thymus HMG-14 and HMG-20 (ubiquitin) and their interaction with DNA. *Eur J Biochem*, 112: 577-80 (1980)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Correctable visual impairment among persons with diabetes--United States, 1999-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 55: 1169-72 (2006)

Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol*, 165: 1013-21 (2000)

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*, 26: 2442-2450 (2003)

- Chang HP, Chen YH.** Differential effects of organosulfur compounds from garlic oil on nitric oxide and prostaglandin E2 in stimulated macrophages. *Nutrition*, 21:530-6 (2005)
- Chen S, Guttridge DC, Tang E, Shi S, Guan K, Wang CY.** Suppression of tumor necrosis factor-mediated apoptosis by nuclear factor kappaB-independent bone morphogenetic protein/Smad signaling. *J Biol Chem*, 19: 39259-63 (2001)
- Chiang HL, Dice JF.** Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J Biol Chem*, 15: 6797-805 (1988)
- Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR.** Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, 410: 944-948 (2001)
- Chlebowski RT, Bulcavage L, Grosvenor M, Oktay E, Block JB, Chlebowski JS, Ali I, Elashoff R.** Hydrazine sulfate influence on nutritional status and survival in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 8: 9-15 (1990)
- Chopra IJ, Solomon DH, Chopra U, Wu SY, Fisher DA & Nakamura Y.** Pathways of metabolism of thyroid hormones. *Recent Prog Horm Res*, 34: 521-67 (1978)
- Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM.** Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr*, 133: 3268S-3274S (2003)
- Chung IY, Nam-Kung EK, Lee NM, Chang HS, Kim DJ, Kim YH, Park CS.** The downregulation of Bcl-2 expression is necessary for theophylline-induced apoptosis of eosinophil. *Cell Immunol*, 203: 95-102 (2000)
- Ciechanover A and Schwartz AL.** How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system? *Trends Biochem Sci*, 14: 483-8 (1989)
- Ciechanover A, Orian A and Schwartz AL.** Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *BioEssays*, 22: 442-51 (2000)
- Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, Chang CJ, Shamooh H, Rossetti L.** Oral vanadyl sulphate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 95: 2501-2509 (1995)
- Constantin D, Constantin-Teodosiu D, Layfield R, Tsintzas K, Bennett AJ, Greenhaff PL.** PPAR δ agonism induces a change in muscle fuel metabolism and activation of an atrophy programme, but does not impair mitochondrial function. *J Physiol*, 15: 381-90 (2007)
- Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ.** Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med*, 200: 689-695 (2004)
- Costelli P, Carbo N, Tessitore L, Bagby GJ, López-Soriano FJ, Argilés JM, Baccino FM.** Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J Clin Invest*, 92: 2783-9 (1993)
- Costelli P, Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is unable to reverse cachexia in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Cancer Lett*, 95: 33-8 (1995a)
- Costelli P, Llovera M, García-Martínez C, Carbó N, López-Soriano FJ and Argilés JM.** Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer Lett*, 91: 73-8 (1995b)
- Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Moore-Carrasco R, Crepaldi S, Grieco G, Autelli R, Bonelli G, Pacelli F, López-Soriano FJ, Argilés JM, Doglietto GB, Baccino FM, Rossi Fanelli F.** Skeletal muscle wasting in tumor-bearing rats is associated with MyoD down-regulation. *Int J Oncol*, 26: 1663-8 (2005)
- Cravo ML, Glória LM, Claro I.** Metabolic responses to tumour disease and progression: tumour-host interaction. *Clin Nutr*, 19: 459-65 (2000)

- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M & Hemmings BA.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378: 785-789 (1995)
- Culpitt SV, de Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Rogers DF, Barnes PJ.** Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 165: 1371-1376 (2002)
- Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J.** Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *Biochem J*, 337: 575-83 (1999)
- Cuthbertson DJ, Babraj JA, Mustard KJ, Towler MC, Green KA, Wackerhage H, Leese GP, Baar K, Thomason-Hughes M, Sutherland C, Hardie DG, Rennie MJ.** 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta-D-ribofuranoside acutely stimulates skeletal muscle 2-deoxyglucose uptake in healthy men. *Diabetes*, 56: 2078-84 (2007)
- Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD.** Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature*, 4: 823-6 (1985)
- D**
- Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CW.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem*, 278: 962-7 (2003)
- Das UN.** *A Perinatal Strategy for Preventing Adult Diseases: The Role of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids.* Kluwer, Boston (2002)
- Das UN.** Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J*, 1: 420-39 (2006)
- Davis JN, Singh B, Bhuiyan M, Sarkar FH.** Genistein-induced upregulation of p21WAF1, downregulation of cyclin B, and induction of apoptosis in prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, 32: 123-31 (1998)
- Davis SR.** An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products, the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses*, 48: 95-100 (2005)
- Day JK, Besch-Williford C, McMann TR, Hufford MG, Lubahn DB, MacDonald RS.** Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type, but not ER alpha KO, mice. *Nutr Cancer*, 39: 226-32 (2001)
- Dear TN, Boehm T.** Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn11 during development. *Mech Dev*, 89: 201-9 (1999)
- Deboer MD, Zhu X, Lefebvre PR, Inui A, Hu Z, Han G, Mitch WE, Taylor JE, Halem HA, Dong JZ, Datta R, Culler MD, Marks DL.** Ghrelin treatment of chronic kidney disease: improvements in lean body mass and cytokine profile. *Endocrinology*, 149: 827-35 (2007)
- DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP.** The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30: 1000-1007 (1981)
- DeFronzo, RA, Bonadonna RC, Ferannini E.** Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabet Care*, 15: 318-368 (1992)
- Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D.** N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev*, 44: 289-99 (2004)
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B.** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively

regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*, 5: 32048-54 (1999)

Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol*, 169: 453-9 (2001)

Demacker PN. The metabolic syndrome: definition, pathogenesis and therapy. *Eur J Clin Invest*, 37: 85-9 (2007)

Dewick PM. The isoflavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed.), *The Flavonoids, Advances in Research Since 1986*. Chapman and Hall, London, pp. 117-238 (1994)

Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 150: 1453-1455 (1994)

Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiol metabolism, *Biochem. Pharmacol*, 64: 1019-1026 (2002)

Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol*, 148: 293-300 (2003)

Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry*, 60: 205-11 (2002)

Dona M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A, Garbisa S. Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 170: 4335-4341 (2003)

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*, 14: 343-7 (1978)

Dorchies OM, Wagner S, Vuadens O, Waldhauser K, Buetler TM, Kucera P, Ruegg UT. Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290: C616-25 (2006)

Drucker DJ. The glucagon-like peptides. *Endocrinology*, 142: 521-527 (2001)

Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*, 113: 115-23 (2004)

Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in the polycystic ovary syndrome. *Diabetes*, 38: 1165-74 (1989)

Dworzak F, Ferrari P, Gavazzi C, Maiorana C, Bozzetti F. Effects of cachexia due to cancer on whole body and skeletal muscle protein turnover. *Cancer*, 82: 42-8 (1998)

E

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283: 1544-1548 (1999)

Emilie D, Wijdenes J, Gisselbrecht C, Jarrousse B, Billaud E, Blay JY, Gabarre J, Gaillard JP, Brochier J, Raphael M. Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect on lymphoma growth and on B clinical symptoms. *Blood*, 84: 2472-9 (1994)

Eriksson P, Nilsson L, Karpe F & Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18: 20-26 (1998)

Erisman MD, Linnoila RI, Hernandez O, DiAugustine RP & Lazarus LH. Human lung small-cell carcinoma contains bombesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 2379-83 (1982)

Etgen GJ, Valasek KM, Broderick CL, Miller AR. In vivo adenoviral delivery of recombinanthuman protein kinase C-zeta stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, 274: 22139-22142 (1999)

Evans RD, Argilés JM and Williamson DH. Metabolic effects of tumor necrosis factor- α (cachectin) and interleukin 1. *Clin Sci*, 77: 357-64 (1989)

F

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. Cannabinoids ablate release of TNF α in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia*, 41: 161-8 (2003)

Farva D, Goji LA, Joseph PK, Augusti KT. Effects of garlic oil on streptozotocin-diabetic rats maintained on normal and high fat diets. *Indian J Biochem Biophys*, 23:24-27 (1986)

Fassina G, Vene R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, Albini A. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clinical Cancer Res*, 10: 4865-4873 (2004)

Fearon KC, Hansell DT, Preston T, Plumb JA, Davies J, Shapiro D, Shenkin A, Calman KC, Burns HJ. Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer. *Cancer Res*, 48: 2590-5 (1988)

Fearon KC, Von Meyenfeldt MF, Moses AG, Van Geenen R, Roy A, Gouma DJ, Giacosa A, Van Gossom A, Bauer J, Barber MD, Aaronson NK, Voss AC, Tisdale MJ. 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*, 52: 1479-86 (2003)

Fearon KC, Voss AC, Hustead DS. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr*, 83: 1345-50 (2006)

Ferre P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53: S43-50 (2004)

Figueras M, Busquets S, Carbó N, Almendro V, Argilés JM, López-Soriano FJ. Cachexia results in an increase in TNF- α receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue. *Int J Oncol*, 27: 855-60 (2005)

Figueras M, Busquets S, Carbó N, Barreiro E, Almendro V, Argilés JM, López-Soriano FJ. Interleukin-15 is able to suppress the increased DNA fragmentation associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett*, 2: 201-6 (2004)

Fischer JE, Hasselgren PO. Cytokines and glucocorticoids in the regulation of the "hepato-skeletal muscle axis" in sepsis. *Am J Surg*, 161: 266-71 (1991)

Flakoll PJ, Carlson MG, Cherrington AD. Acción fisiológica de la insulina. Le Roith D, Taylor SI, Olefsky JM eds. *Diabetis Mellitus*, Fundamentos y clínica. 2^o edición. México, Mc Mc Graw Hill, (2003)

Florini JR, Prinz PN, Vitiello MV, Hintz RL. Somatomedin-C levels in healthy young and old men: relationship to peak and 24-hour integrated levels of growth hormone. *J Gerontol*, 40: 2-7 (1985)

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*, 237: 356-359 (2002)

Foster AC, Chen C. Melanocortin-4 receptor antagonists as potential therapeutics in the treatment of cachexia. *Curr Top Med Chem*, 7(11): 1131-6 (2007)

Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 2690-4 (1993)

Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr*, 125: 790S-7S (1995)

Foukas LC, Daniele N, Ktori C, Anderson KE, Jensen J, Shepherd PR. Direct effects of caffeine and theophylline on p110 and other phosphoinositide 3-kinases: differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. *J Biol Chem*, 277: 37124-37130 (2002)

Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*, 47: 443-67 (1985)

Fujimoto-Ouchi K, Tamura S, Mori K, Tanaka Y, Ishitsuka H. Establishment and characterization of cachexia-inducing and non-inducing clones of murine colon 26 carcinoma. *Int J Cancer*, 61: 522-8 (1995)

Fulks RM, Li JB, Goldberg AL. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem*, 250: 290-8 (1975)

Fuschauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia*, 46: 1594-03 (2003)

G

García-Martínez C, Agell N, Llovera M, López-Soriano FJ, Argilés JM. Tumour necrosis factor- α increases the ubiquitination of rat skeletal muscle proteins. *FEBS Lett*, 323: 211-4 (1993)

García-Martínez C, Llovera M, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM. Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased by tumour necrosis factor- α . *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 201: 682-6 (1994a)

García-Martínez C, López-Soriano FJ, Argilés JM. Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle. *Cancer Lett*, 76: 1-4 (1994b)

Gaullier JM, Halse J, Høy K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr*, 7: 1118-1125 (2004)

Gehr G, Braun T, Lesslauer W. Cytokines, receptors, and inhibitors. *Clin Investig*, 70: 64-9 (1992)

Geng Z, Rong Y, Lau BHS. S-Allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med*, 23: 345-350 (1997)

Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 106: 453-8 (2000)

Giovannone B, Scaldaferrì ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetis Metab Res Rev*, 16: 434-41 (2000)

Goldberg AL and Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*, 357: 375-9 (1992)

Goldberg RM, Loprinzi CL, Mailliard JA, O'Fallon JR, Krook JE, Ghosh C, Hestorff RD, Chong SF, Reuter NF, Shanahan TG. Pentoxifylline for treatment of cancer anorexia and cachexia? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 13: 2856-9 (1995)

Goldspink G, Scutt A, Martindale J, Jaenicke T, Turay L & Gerlach GF. Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle. *Biochem Soc Trans*, 19: 368-73 (1991)

Goldstein B J, Li PM, Ding WD, Ahmad F, Zhang WR. In *Vitamins and Hormones-Advances in Research and Applications* Vol. 54 (ed. Litwack, J.) 67-96 Academic, San Diego, (1998)

Goncalves CG, Ramos EJ, Romanova IV, Suzuki S, Chen C, Meguid MM. Omega-3 fatty acids improve appetite in cancer anorexia, but tumor resecting restores it. *Surgery*, 139: 202-8 (2006)

Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH. Inactivation of NF- κ B by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene*, 22: 4702-9 (2003)

- Gong P, Hu B, Cederbaum AI.** Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Arch Biochem Biophys*, 432: 252-60 (2004)
- Gordon J N, Trebble T M, Ellis RD, Duncan HD, Johns T, Goggin PM.** Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut*, 54: 540-5 (2005)
- Goto Y, Kakizaki, M.** The spontaneous-diabetes rat: a model for noninsulin dependent diabetes mellitus. *Proc Jpn Acad*, 57: 381-4 (1981)
- Gouni-Berthold I, Sachinidis A.** Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Curr Pharmaceuti Design*, 10: 1261-1271 (2004)
- Graham NH.** Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med*, 21: 334-350 (1992)
- Green M, Thomas R, Gued L, Sadrud-Din S.** Inhibition of DES-induced DNA adducts by diallyl sulfide: implications in liver cancer prevention. *Oncol Rep*, 10: 767-71 (2003)
- Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, Semenkovich CF.** Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. *FASEB J*, 15: 475-82 (2001)
- Grimaldi PA.** Regulatory role of peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta) in muscle metabolism. A new target for metabolic syndrome treatment? *Biochimie*, 87: 5-8 (2005)
- Grunfeld, C, Soued M, Adi S, Moser AH, Dinarello CA, Feingold KR.** Evidence for two classes of cytokines that stimulate hepatic lipogenesis: relationships among tumor necrosis factor, interleukin-1 and interferon-alpha. *Endocrinology*, 127: 46-54 (1990)
- Gulve EA, Mabuchi K, Dice JF.** Regulation of myosin and overall protein degradation in mouse C2 skeletal myotubes. *J Cell Physiol*, 147: 37-45 (1991)
- Guo NL, Lu DP, Woods GL, Reed E, Zhou GZ, Zhang LB, Waldman RH.** Demonstration of the anti viral activity of garlic extract against human cytomegalovirus in vitro. *Chin Med J*, 106: 93-96 (1993)
- Gupta S, Hussain T, Mukhtar H.** Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 410: 177-185 (2004)
- Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY & Baldwin AS Jr.** NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*, 289: 2363-6 (2000)
- Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess MH, Le Bon AM.** Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction. *Mutat Res*, 495: 135-45 (2001)
- H**
- Haag M.** Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry*, 48: 195-203 (2003)
- Haas AL and Riley DA.** The dynamics of ubiquitin pools within skeletal muscle. In: The ubiquitin system. Schlesinger and Hershko Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp. 178-85 (1988)
- Haffner S M, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M.** Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in non-diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, 339: 229-234 (1998)
- Han J, Thompson P, Beutler B.** Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med*, 72: 391-4 (1990)
- Harmon AW, Patel YM, Harp JB.** Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. *Biochem J*, 367: 203-208 (2002)

- Harris JC, Cottrell SL, Plummer S, Lloyd D.** Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl Microbiol Biotechnol*, 57: 282-6 (2001)
- Hashimoto R, Yaita M, Tanaka K, Hara Y, Kojo S.** Inhibition of radical reaction of apolipoprotein B 100 and α -tocopherol in human plasma by green tea catechins. *J Agric Food Chem*, 48: 6380-6383 (2000)
- Hasselgren PO and Fischer JE.** Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg*, 233: 9-17 (2001)
- Hayashi T, Faustman D.** Defective function of the proteasome in autoimmunity: involvement of impaired NF- κ B activation. *Diabetes Technol Ther*, 2: 415-28 (2000)
- Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, Hunziker W, Weber P, Martin I, Bendik I.** The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, 145: 848-859 (2004)
- Helliwell TR, Wilkinson A, Griffithst RD, McClelland P, Palmer TEA and Bone JM.** Muscle fiber atrophy in critically ill patients is associated with the loss of myosin filaments and the presence of lysosomal enzymes and ubiquitin. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 24: 507-17 (1998)
- Hengge UR, Baumann M, Maleba R, Brockmeyer NH, Goos M.** Oxymetholone promotes weight gain in patients with advanced human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. *Br J Nutr*, 75: 129-38 (1996)
- Hershko A.** The ubiquitin pathway for protein degradation. *Trends Biochem Sci*, 16: 265-8 (1991)
- Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ.** Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res*, 1: 2359-65 (1998)
- Hirsch D, Stahl A, Lodish HF.** A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 8625-9 (1998)
- Ho CT, Chen Q, Shu H, Zhang KQ, Rosen RT.** Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese Teas. *Prev Med*, 21: 520-525 (1992)
- Hodgson JM, Puddey IB, Croft KD, Burke V, Mori VB, Cacceta R, Beilin L.** Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation. *Am J Clin Nutr*, 71: 1103-1107 (2000)
- Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, Spiegelman BM.** Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*, 134: 264-70 (1994)
- Holmes-McNary M, Baldwin AS.** Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I κ B kinase. *Cancer Res*, 60: 3477-3483 (2000)
- Horton ES.** Can newer therapies delay the progression of type 2 diabetes mellitus? *Endocr Pract*, 14: 625-38 (2008)
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM.** Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259: 87-91 (1993)
- Hotamisligil GS.** Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27: S535 (2003)
- Hotamisligil GS.** Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: S23-7 (2000)
- Hsieh TC, Burfeind P, Laud K, Backer JM, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Wu JM.** Cell cycle effects and control of gene expression by resveratrol in human breast carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Int J Oncol*, 15: 245-252 (1999)

Hsing AW, Chokkalingam AP, Gao YT, Madigan MP, Deng J, Gridley G, Fraumeni JF. Allium vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study. *J Natl Cancer Inst*, 94: 1648-1651 (2002)

Hsueh WA, Law RE. Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am J Med*, 105: 4S-14S (1998)

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity. *Cell*, 88: 131-141 (1997)

Hwang JL, Hodis HN, Sevanian A. Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract. *J Agric Food Chem*, 49: 308-314 (2001)

Hyltander A, Korner U, Lundholm KG. Evaluation of mechanisms behind elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours. *Eur J Clin Invest*, 23: 46-52 (1993)

I

Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 2646-51 (1996)

Ichiyama T, Hasegawa S, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Theophylline inhibits NF- κ B activation and I κ B α degradation in human pulmonary epithelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 364: 558-561 (2001)

Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1127: 141-146 (1992)

Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, Barnes PJ. A molecular mechanism of action of theophylline: induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8921-8926 (2002)

J

Jacobi SK, Gabler NK, Ajuwon KM, Davis JE, Spurlock ME. Adipocytes, myofibers, and cytokine biology: new horizons in the regulation of growth and body composition. *J Anim Sci*, 84 :E140-9 (2006)

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong H, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220 (1997)

Jasani B, Donaldson LJ, Ratcliffe JG, Sokhi GS. Mechanism of impaired glucose tolerance in patients with neoplasia. *Br J Cancer*, 38: 287-92 (1978)

Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*, 26: 179-207 (1992)

Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest*, 104: 447-457 (1999)

Johnson P. Calpains (intracellular calcium-activated cysteine proteinases): structure-activity relationships and involvement in normal and abnormal cellular metabolism. *Int J Biochem*, 22: 811-22 (1990)

Jones MG, Hughes J, Tregova A, Milner J, Tomsett AB, Collin HA. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J Exp Bot*, 55: 1903-18 (2004)

Jung KH, Choi HS, Kim DH, Han MY, Chang UJ, Yim SV, Song BC, Kim CH, Kang SA. Epigallocatechin gallate stimulates glucose uptake through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway in L6 rat skeletal muscle cells. *J Med Food*, 11: 429-34 (2008)

K

- Kahn CR.** New concepts in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Adv Intern Med*, 41: 285-321 (1996)
- Kalkan Yildirim H, Delen Akcay Y, Guvenc U, Yildirim Sozmen E.** Protection capacity against low density lipoprotein oxidation and antioxidant potential of some organic and non-organic wines. *Int J Food Sci Nutr*, 55: 351-362 (2004)
- Kalra EK.** Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS Pharm Sci*, 5: E25 (2003)
- Kang WS, Lim IH, Yuk DY.** Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thromb Res*, 96: 229-237 (1999)
- Kanzaki M, Soda K, Gin PT, Kai T, Konishi F, Kawakami M.** Erythropoietin attenuates cachectic events and decreases production of interleukin-6, a cachexia-inducing cytokine. *Cytokine*, 7: 234-9 (2005)
- Kao YH, Hiipakka RA, Liao S.** Modulation of obesity by a green tea catechin. *Am J Clin Nutr*, 72: 1232-1234 (2000a)
- Kao YH, Hiipakka RA, Liao S.** Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology*, 141: 980-987 (2000b)
- Kardinal CG, Loprinzi CL, Schaid DJ, Hass AC, Dose AM, Athmann LM, Mailliard JA, McCormack GW, Gerstner JB, Schray MF.** A controlled trial of cyproheptadine in cancer patients with anorexia and/or cachexia. *Cancer*, 65: 2657-62 (1990)
- Kaul D, Sikand K, Shukla AR.** Effect of green tea polyphenols on the genes with atherosclerotic potential. *Phytother Res*, 18: 177-179 (2004)
- Kawamura I, Morishita R, Tomita N, Lacey E, Aketa M, Tsujimoto S, Manda T, Tomoi M, Kida I, Higaki J, Kaneda Y, Shimomura K, Ogihara T.** Intratumoral injection of oligonucleotides to the NF kappa B binding site inhibits cachexia in a mouse tumor model. *Gene Ther*, 6: 91-7 (1999)
- Kawamura I, Morishita R, Tsujimoto S, Manda T, Tomoi M, Tomita N, Goto T, Ogihara T, Kaneda Y.** Intravenous injection of oligodeoxynucleotides to the NF-kappaB binding site inhibits hepatic metastasis of M5076 reticulosarcoma in mice. *Gene Ther*, 8: 905-12 (2001)
- Kazi A, Daniel KG, Smith DM, Kumar NB, Dou QP.** Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. *Biochem Pharmacol*, 66: 965-76 (2003)
- Kersten S.** Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, 2: 282-6 (2001)
- Kesavulu MM, Kameswararao B, Apparao Ch, Kumar EG, Harinarayan CV.** Effect of omega-3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*, 28: 20-6 (2002)
- Kettelhut IC, Wing SS, Goldberg AL.** Endocrine regulation of protein breakdown in skeletal muscle. *Diabetes Metab Rev*, 4: 751-72 (1988)
- Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y.** Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Biol Med*, 400: 589-597 (1997)
- Khanum F, Anilakumar KR, Viswanathan KR.** Anticarcinogenic properties of garlic: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44: 479-88 (2004)
- Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI.** PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 114: 823-7 (2004)

- Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI.** Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest*, 108: 437-46 (2001)
- Kim S, Shin HJ, Kim SY, Kim JH, Lee YS, Kim DH, Lee MO.** Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPARalpha. *Mol Cell Endocrinol*, 220: 51-58 (2004)
- Kimura Y, Okuda H.** Effects of naturally occurring stilbene glucosides from medicinal plants and wine, on tumour growth and lung metastases in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Pharm Pharmacol*, 52: 1287-1295 (2000)
- Kimura Y, Okuda H.** Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastases to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinomabearing mice. *J Nutr*, 131: 1844-1849 (2001)
- Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL.** Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J Biol Chem*, 273: 1982-1989 (1998)
- Klein S, Simes J, Blackburn GL.** Total parenteral nutrition and cancer clinical trials. *Cancer*, 58: 1378-86 (1986)
- Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM.** Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*, 22: 2185-97 (2008)
- Knowles LM, Milner JA.** Diallyl disulfide induces ERK phosphorylation and alters gene expression profiles in human colon tumor cells. *J Nutr*, 133: 2901-2906 (2003)
- Knowles LM, Milner JA.** Possible mechanism by which allyl sulfides suppress neoplastic cell proliferation. *J Nutr*, 131: 1061S-6S (2001)
- Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T.** Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep*, 57: 390-4 (2005)
- Kralovic RC, Zepp FA, Cenedella RJ.** Studies of the mechanism of carcass fat depletion in experimental cancer. *Eur J Cancer*, 13: 1071-9 (1977)
- Kuhn DJ, Burns AC, Kazi A, Dou QP.** Direct inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway by ester bond-containing green tea polyphenols is associated with increased expression of sterol regulatory element-binding protein 2 and LDL receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1682: 1-10 (2004)
- Kumar GS, Das UN.** Effect of prostaglandins and their precursors on the proliferation of human lymphocytes and their secretion of tumor necrosis factor and various interleukins. *Prostaglandins Leukot Essen Fatty Acids*, 50: 331-334 (1994)
- Kumar SG, Das UN, Kumar KV, Madhavi N.** Effect of n-6 and n-3 fatty acids on the proliferation and secretion of TNF and IL-2 by human lymphocytes in vitro. *Nutrition Res*, 12: 815-823 (1992)
- Kumara-Siri MH, Lee K, Surks MI.** Regulation of thyrotropin secretion in rats bearing the Walker 256 carcinoma. *Endocrinology*, 109: 1760-8 (1981)
- Kumi-Diaka J, Sanderson NA, Hall A.** The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU145 and LNCaP. *Biol Cell*, 92: 595-604 (2000)
- Kurzer M, Meguid MM.** Cancer and protein metabolism. *Surg Clin North Am*, 66: 969-1001 (1986)
- Kusunoki M, Tsutsumi K, Hara T, Ogawa H, Nakamura T, Miyata T, Sakakibara F, Fukuzawa Y, Suga T, Kato K, Hirooka Y, Nakaya Y.** Ethyl icosapentate (omega-3 fatty acid) causes accumulation of lipids in skeletal muscle but suppresses insulin resistance in OLETF rats. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty. *Metabolism*, 52: 30-4 (2003)

L

- Lainscak M & Keber I.** Patients' knowledge and beta blocker treatment improve prognosis of patients from a heart failure clinic. *Eur J Heart Fail*, 8: 187-90 (2006)
- Landis-Piwowar KR, Milacic V, Chen D, Yang H, Zhao Y, Chan TH, Yan B, Dou QP.** The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers. *Drug Resist Updat*, 9: 263-73 (2006)
- Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ.** Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*, 130: 43-52 (1992)
- Lardeux BR, Mortimore GE.** Amino acid and hormonal control of macromolecular turnover in perfused rat liver. Evidence for selective autophagy. *J Biol Chem*, 25: 14514-9 (1987)
- Lau BH, Yamasaki T, Gridley DS.** Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions. *Mol Biother*, 3: 103-107 (1991)
- Laurence WVD, John DF.** Garlic extract prevents acute platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries. *Am Heart J*, 117: 973-975 (1989)
- Lawson DH, Richmond A, Nixon DW, Rudman D.** Metabolic approaches to cancer cachexia. *Annu Rev Nutr*, 2: 277-301 (1982)
- Le Roith D, Zick Y.** Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, 24: 588-597 (2001)
- Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL.** Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, 129: 227S-237S (1999a)
- Lecker SH, Solomon V, Price SR, Kwon YT, Mitch WE, Goldberg AL.** Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *J Clin Invest*, 104: 1411-20 (1999b)
- Lee DH, Goldberg AL.** Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 8: 397-403 (1998)
- Lee SJ.** Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20: 61-86 (2004)
- Lephart ED, Porter JP, Lund TD, Bu L, Setchell KD, Ramoz G, Crowley WR.** Dietary isoflavones alter regulatory behaviors, metabolic hormones and neuroendocrine function in Long-Evans male rats. *Nutr Metab (Lond)*, 1: 16 (2004)
- Levin L, Gevers W.** Metabolic alterations in cancer. Part II. Protein and fat metabolism. *S Afr Med J*, 59: 553-6 (1981)
- Lewis SE, Kelly FJ, Goldspink DF.** Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscles of the rat. *Biochem J*, 217: 517-26 (1984)
- Li D, Yee JA, McGuire MH, Murphy PA, Yan L.** Soybean isoflavones reduce experimental metastasis in mice. *J Nutr*, 129: 1075-8 (1999)
- Li JB, Goldberg AL.** Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *Am J Physiol*, 231: 441-8 (1976)
- Li Y, Sarkar FH.** Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res*, 8: 2369-77 (2002)
- Liao S.** The medical action of androgens and green tea epigallocatechin gallate. *HKMJ*, 7: 369-374 (2001)

- Lillioja S, Mott DM, Howard BV, Bennett PH, Yki-Jarvinen H, Freymond D, Nyomba BL, Zurlo F, Swinburn B, Bogardus C.** Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N Engl J Med*, 318: 1217-1225 (1988)
- Lim YC, Park HY, Hwang HS, Kang SU, Pyun JH, Lee MH, Choi EC, Kim CH.** (-)-Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) inhibits HGF-induced invasion and metastasis in hypopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett*, 271: 140-52 (2008)
- Lissoni P, Barni S, Tancini G, Brivio F, Tisi E, Zubelewicz B, Braczkowski R.** Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *J Biol Regul Homeost Agents*, 8: 126-9 (1994)
- Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G, Barni S, Ardizzoia A, Brivio F, Zubelewicz B, Chatikhine V.** Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer*, 32A: 1340-3 (1996)
- Lissoni P, Tancini G, Barni S, Paolorossi F, Ardizzoia A, Conti A, Maestroni G.** Treatment of cancer chemotherapy-induced toxicity with the pineal hormone melatonin. *Support Care Cancer*, 5: 126-9 (1997)
- Liu CT, Sheen LY, Lii CK.** Does garlic have a role as an antidiabetic agent? *Mol Nutr Food Res*, 51: 1353-64 (2007)
- Liu KL, Chen HW, Wang RY, Lei YP, Sheen LY, Lii CK.** DATS reduces LPS-induced iNOS expression, NO production, oxidative stress, and NF-kappaB activation in RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, 54: 3472-8 (2006)
- Liu L, Yeh YY.** Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride syntheses in cultured rat hepatocytes. *Lipids*, 36: 395-400 (2001)
- Liu SN, Shen ZF.** A new target for diabetes therapy: advances in the research of glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Yao Xue Xue Bao*, 42: 1227-31 (2007)
- Llovera M, García-Martínez C, Agell N, Marzabal M, López-Soriano FJ, Argilés JM.** Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett*, 338: 311-8 (1994)
- Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM.** Muscle wasting associated with cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer*, 61: 138-41 (1995)
- Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, Costelli P, Tessitore L, Baccino FM, Agell N, Bagby GJ, López-Soriano FJ, Argilés JM.** Anti-TNF treatment reverts increased muscle ubiquitin gene expression in tumour-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 221: 653-5 (1996a)
- Llovera M, García-Martínez C, Costelli P, Agell N, Carbó N, López-Soriano FJ, Argilés JM.** Muscle hypercatabolism during cancer cachexia is not reversed by the glucocorticoid receptor antagonist RU38486. *Cancer Lett*, 99: 7-14 (1996b)
- 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*, 230: 238-41 (1997)
- Llovera M, García-Martínez C, López-Soriano J, Carbó N, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM.** Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*, 142: 183-9 (1998a)
- Llovera M, Carbó N, López-Soriano J, García-Martínez C, Busquets S, Alvarez B, Agell N, Costelli P, López-Soriano FJ, Celada A, Argilés JM.** Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer Lett*, 133: 83-7 (1998b)
- Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ, Authier FJ, Gherardi RK, Argilés JM.** Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients. *Int J Mol Med*, 2: 69-73 (1998c)

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science*, 288: 2379-2381 (2000)

López-Soriano J, López-Soriano FJ, Bagby GJ, Williamson DH, Argilés JM. Anti-TNF treatment does not reverse the abnormalities in lipid metabolism of the obese Zucker rat. *Am J Physiol*, 272: E656-60 (1997)

López-Soriano J, Carbó N, Tessitore L, López-Soriano FJ, Argilés JM. Leptin and tumor growth in rats. *Int J Cancer*, 81: 726-9 (1999)

López-Soriano J, Chiellini C, Maffei M, Grimaldi PA, Argilés JM. Roles of skeletal muscle and peroxisome proliferator-activated receptors in the development and treatment of obesity. *Endocr Rev*, 27: 318-29 (2006)

Loprinzi CL, Michalak JC, Schaid DJ, Mailliard JA, Athmann LM, Goldberg RM, Tschetter LK, Hatfield AK, Morton RF. Phase III evaluation of four doses of megestrol acetate as therapy for patients with cancer anorexia and/or cachexia. *J Clin Oncol*, 11: 762-7 (1993a)

Loprinzi CL, Schaid DJ, Dose AM, Burnham NL, Jensen MD. Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate. *J Clin Oncol*, 11: 152-4 (1993b)

Lorite MJ, Thompson MG, Drake JL, Carling G, Tisdale MJ. Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. *Br J Cancer*, 78: 850-6 (1998)

Lugarini F, Hrupka BJ, Schwartz GJ, Plata-Salaman CR, Langhans W. A role for cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283: R862-R868 (2002)

Luiken JJ, Koonen DP, Willems J, Zorzano A, Becker C, Fischer Y, Tandon NN, Van Der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF. Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*, 51: 3113-9 (2002)

Lundholm K, Körner U, Gunnebo L, Sixt-Ammilon P, Fouladiun M, Daneryd P, Bosaeus I. Insulin treatment in cancer cachexia: effects on survival, metabolism, and physical functioning. *Clin Cancer Res*, 1: 2699-706 (2007)

Luo GJ, Sun X, Hasselgren PO. Hyperthermia stimulates energy-proteasome-dependent protein degradation in cultured myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278: R749-56 (2000)

Lusis AJ, Attie AD, Reue K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nat Rev Genet*, 9: 819-30 (2008)

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*, 407: 233-241 (2000)

M

Maassen JA. Mitochondria, body fat and type 2 diabetes: what is the connection? *Minerva Med*, 99: 241-51 (2008)

Magnusson I, Rothman DL, Katz ID, Shulman RD, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in Type II diabetes mellitus: a ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest*, 90: 1323-1327 (1992)

Mandel S, Youdim MB. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Rad Biol Med*, 37: 304-317 (2004)

Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol*, 164: 6509-6519 (2000)

Mantovani G, Macciò A, Esu S, Lai P, Santona MC, Massa E, Dessì D, Melis GB, Del Giacco GS. 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*, 33: 602-7 (1997)
- Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribel U, Watanabe T, Drucker DJ, Wagtmann N.** Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6874-6879 (2000)
- Mascali JJ, Cvietusa P, Negri J, Borish L.** Anti-inflammatory effects of theophylline: modulation of cytokine production. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 77: 34-8 (1996)
- Masuno H, Yoshimura H, Ogawa N & Okuda H.** Isolation of a lipolytic factor (toxohormone-L) from ascites fluid of patients with hepatoma and its effect on feeding behavior. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 20: 1177-85 (1984)
- Matsui S, Sandberg AA, Negoro S, Sean BK and Goldstein G.** Isopeptidase: a novel eukaryotic enzyme that cleaves isopeptide bonds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 1535-9 (1982)
- Matsuura B, Kanno S, Minami H, Tsubouchi E, Iwai M, Matsui H, Horiike N, Onji M.** Effects of antihyperlipidemic agents on hepatic insulin sensitivity in perfused Goto-Kakizaki rat liver. *J Gastroenterol*, 39: 339-45 (2004)
- Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimura I.** Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26: 29-33 (2004)
- Matthews W, Driscoll J, Tanaka k, Ichihara A and Goldberg AL.** Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2597-601 (1989)
- Matthys P, Dijkmans R, Proost P, Van Damme J, Heremans H, Sobis H and Billiau A.** Severe cachexia in mice inoculated with interferon-gamma-producing tumor cells. *Int J Cancer*, 49: 77-82 (1991)
- McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R.** Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*, 209: 501-14 (2006)
- McGrath JA, Goldspink DF.** Glucocorticoid action on protein synthesis and protein breakdown in isolated skeletal muscles. *Biochem J*, 206: 641-5 (1982)
- Meguid MM, Yang ZJ, Gleason JR.** The gut-brain brain-gut axis in anorexia: toward an understanding of food intake regulation. *Nutrition*, 12: S57-62 (1996)
- Meijer L, Flajolet M, Greengard P.** Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol Sci*, 9: 471-480 (2001)
- Merimsky O, Hirsh L, Dantes A, Land-Bracha A, Suh BS, Amsterdam A.** Induction of apoptosis in non-small lung carcinoma cell line (H1299) by combination of anti-asthma drugs with gemcitabine and cisplatin. *Int J Oncol*, 26: 475-82 (2005)
- MerzDemlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS.** Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 71: 1462-1469 (2000)
- Mider GB.** Some aspects of nitrogen and energy metabolism in cancerous subjects: a review. *Cancer Res*, 11: 821-9 (1951)
- Miller GJ.** Lipoproteins and thrombosis: effects of lipid lowering. *Curr Opin Lipidol*, 6: 38-42 (1995)
- Milner JA.** Mechanisms by which garlic and allyl sulfur compounds suppress carcinogen bioactivation. Garlic and carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 492: 69-81 (2001)
- Milner JA.** Preclinical perspectives on garlic and cancer. *J Nutr*, 136: 827S-831S (2006)
- Mitch WE, Goldberg AL.** Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med*, 335: 1897-905 (1996)

- Mitch WE, Medina R, Griebler S, May RC, England BK, Price SR, Bailey JL, Goldberg AL.** Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. *J Clin Invest*, 93: 2127-33 (1994)
- Mitchelson F.** Pharmacological agents affecting emesis. A review (Part I). *Drugs*, 43: 295-315 (1992)
- Miura Y, Chiba T, Miura S, Tomita II, Umegaki K, Ikeda M, Tomita T.** Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans. *J Nutr Biochem*, 11: 216-222 (2000)
- Moldawer LL, Copeland EM.** Proinflammatory cytokines, nutritional support and the cachectic syndrome. *Cancer*, 79: 11 (1988)
- Moller DE.** Potential role of TNF α in the pathogenesis of insulin resistance and type II diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, 11: 212-217 (2000)
- Moller DE.** New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 414 (2001)
- Monk JP, Phillips G, Waite R, Kuhn J, Schaaf LJ, Otterson GA, Guttridge D, Rhoades C, Shah M, Criswell T, Caligiuri MA, Villalona-Calero MA.** Assessment of tumor necrosis factor alpha blockade as an intervention to improve tolerability of dose-intensive chemotherapy in cancer patients. *J Clin Oncol*, 20: 1852-9 (2006)
- 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*, 30: 1239-45 (2007)
- Mori K, Fujimoto-Ouchi K, Ishikawa T, Sekiguchi F, Ishitsuka H, Tanaka Y.** Murine interleukin-12 prevents the development of cancer cachexia in a murine model. *Int J Cancer*, 67: 849-55 (1996)
- Mori Y, Murakawa Y, Katoh S, Hata S, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y, Nobukata H, Ishikawa T, Shibutani Y.** Influence of highly purified eicosapentaenoic acid ethyl ester on insulin resistance in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 46: 1458-64 (1997)
- Morrison SD.** Contributions of reduced hunger and premature satiety to cancerous hypophagia in rats. *Cancer Res*, 44: 1041-3 (1984)
- Morrison SD.** Tumor development on the host. In: LIOTTA (Ed.) Netherlands, *Kluwer Academic Publishers* (1989)
- Movassat J, Bailbé D, Lubrano-Berthelier C, Picarel-Blanchot F, Bertin E, Mourot J, Portha B.** Follow-up of GK rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294: E168-75 (2008)
- Mu J, Brozinick JT, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ.** A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*, 7: 1085-1094 (2001)
- Mukhtar H, Ahmad N.** Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Amer J Clin Nutr*, 71: 1698S-1702S (2000)
- Muller JM, Brenner U, Dienst C, Pichlmaier H.** Preoperative parenteral feeding in patients with gastrointestinal carcinoma. *Lancet*, 1: 68-71 (1982)
- Murialdo G, Filippi U, Costelli P, Fonzi S, Bo P, Polleri A, Savoldi F.** Urine melatonin in alcoholic patients: a marker of alcohol abuse? *J Endocrinol Invest*, 14: 503-7 (1991)

N

Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*, 144: 3315-20 (2003)

Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol*, 3: 146-51 (2003)

Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 22: 891-897 (2001)

Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Phys Renal Phys*, 290: F625-F631 (2006)

Nakahara W, Fukuoka F. Toxohormone. *Jpn Med J*, 1: 6 (1948)

Nakamura N, Hamazaki T, Kobayashi M, Ohta M, Okuda K. Effects of eicosapentaenoic acids on remnant-like particles, cholesterol concentrations and plasma fatty acid composition in patients with diabetes mellitus. *In Vivo*, 12: 311-4 (1998)

Nam S, Smith DM, Dou QP. Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 276: 13322-30 (2001)

Nance CL, Shearer WT. Is green tea good for HIV-1 infection? *J Allergy Clin Immunol*, 112: 851-53 (2003)

Nawrocki AR, Scherer PE. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 4: 281-89 (2004)

Neri B, Garosi VL, Intini C. Effect of medroxyprogesterone acetate on the quality of life of the oncologic patient: a multicentric cooperative study. *Anticancer Drugs*, 8: 459-65 (1997)

Nettleton JA. Omega 3 fatty acids: Comparison of plant and seafood source in human nutrition. *J AM Diet Assoc*, 3: 331-337 (1991)

Ng B, Wolf RF, Weksler B, Brennan MF, Burt M. Growth hormone administration preserves lean body mass in sarcoma-bearing rats treated with doxorubicin. *Cancer Res*, 53: 5483-6 (1993)

Ng EH, Lowry SF. Nutritional support and cancer cachexia. Evolving concepts of mechanisms and adjunctive therapies. *Hematol Oncol Clin North Am*, 5: 161-84 (1991)

Nishiyama N, Moriguchi T, Saito H. Beneficial effects of aged garlic extract on learning and memory impairment in the senescence-accelerated mouse. *Exp Gerontol*, 32: 149-160 (1997)

Nordestgaard BG, Agerholm-Larson B, Stender S. Effect of exogenous hyperinsulinaemia on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *Diabetologia*, 40: 512-520 (1997)

Norton JA, Moley JF, Green MV, Carson RE, Morrison SD. Parabolic transfer of cancer anorexia/cachexia in male rats. *Cancer Res*, 45: 5547-52 (1985)

Norton JA, Peacock JL, Morrison SD. Cancer cachexia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 7: 289-327 (1987)

Nyska A, Herbert RA, Chan PC, Haseman JK, Hailey JR. Theophylline-induced mesenteric periarteritis in F344/N rats. *Arch Toxicol*, 72: 731-7 (1998)

O

Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanias G, Rossetti L. Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest*, 108: 1079-1085 (2001)

- Odedra BR, Millward DJ.** Effect of corticosterone treatment on muscle protein turnover in adrenalectomized rats and diabetic rats maintained on insulin. *Biochem J*, 204: 663-72 (1982)
- Odedra BR, Bates PC, Millward DJ.** Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem J*, 214: 617-27 (1983)
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM.** Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 295: 1549-55 (2006)
- Ohaeri OC.** Effect of garlic oil on the levels of various enzyme in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. *Biosci Rep*, 21: 19-24 (2001)
- Ohta K, Yamashita N.** Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 14-21 (1999)
- Okuda Y, Kawashima K, Sawada T, Tsurumaru K, Asano M, Suzuki S, Soma M, Nakajima T, Yamashita K.** Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 232: 487-491 (1997)
- 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 [1-¹⁴C]triolein. *Biochem J*, 1 : 233-6 (1986)
- Ollis TE, Meyer BJ, Howe PR.** Australian food sources and intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Ann Nutr Metab*, 43: 346-355 (1999)
- Opara EI, Meguid MM, Yang ZJ, Chai JK, Veerabagu M.** Tumor necrosis factor-alpha and total parenteral nutrition-induced anorexia. *Surgery*, 118:756-60 (1995)
- Orgaard A, Jensen L.** The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp Biol Med*, 233: 1066-80 (2008)
- Oudart H, Calgari C, Andriamampandry M, Le Maho Y, Malan A.** Stimulation of brown adipose tissue activity in tumor-bearing rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 73:1625-31 (1995)
- Özkaynak E, Finley D, Solomon MJ and Varshavsky A.** The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J*, 6: 1429-39 (1987)
- P
- Padilla GV.** Psychological aspects of nutrition and cancer. *Surg Clin North Am*, 66: 1121-35 (1986)
- Pareja López A, Urrego Álvarez RA, Giraldo López A, Correa Londoño G, Márquez Fernández ME.** Estudio *in vitro* del efecto Clastogénico del Fenoterol y la Teofilina en Linfocitos Humanos. *Acta Farm*, 24: 498-503 (2005)
- Park AM, Dong Z.** Signal transduction pathways: targets for green and black tea polyphenols. *J Biochem Mol Biol*, 36: 66-77 (2003)
- Park KA, Kweon S, Choi H.** Anticarcinogenic effect and modification of cytochrome P4502E1 by dietary garlic powder in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *J Biochem Mol Biol*, 35: 615-622 (2002)
- Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, Gavin LA, Grunfeld C.** Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 8313-7 (1986)
- Pauwels RA, Joos GF.** Characterization of the adenosine receptors in the airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 329: 151-160 (1995)
- Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E, Dela F, Pedersen BK.** 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*, 124: 495-502 (2003)

Penforinis A, Borot S, Raccah D. Therapeutic approach of type 2 diabetes mellitus with GLP-1 based therapies. *Diabetes Metab*, 2: S78-90 (2008)

Penner CG, Gang G, Wray C, Fischer JE, Hasselgren PO. The transcription factors NF-kappaB and AP-1 are differentially regulated in skeletal muscle during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*, 281:1331-6 (2001)

Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, Tanini A, Brandi ML, Alonso-Magdalena P, Nadal A, Ottobrini L, Parolini O, Bignotti E, Calza S, Maggi A, Grigolato PG, Di Lorenzo D. Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology*, 147: 5740-51 (2006)

Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *Fed Am Soc Exp Biol J*, 17: 1975-1985 (2003)

Peters JM. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci*, 19: 377-82 (1994)

Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*, 54: 885-909 (1992)

Pinto JT, Rivlin RS. Antiproliferative effects of allium derivatives from garlic. *J Nutr*, 131: 1058S-60S (2001)

Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*, 47: 170-84 (2004)

Pi-Sunyer FX. The effects of pharmacologic agents for type 2 diabetes mellitus on body weight. *Postgrad Med*, 120: 5-17 (2008)

Plata-Salaman CR. Regulation of hunger and satiety in man. *Dig Dis*, 9: 253-68 (1991)

Pomposelli JJ, Flores EA, Bistrain BR. Role of biochemical mediators in clinical nutrition and surgical metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 12: 212-8 (1988)

Q

Quinn LS, Haugk KL, Grabstein KH. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology*, 136: 3669-72 (1995)

R

Rabe KF, Magnussen H, Dent G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. *Eur Respir J*, 8: 637-642 (1995)

Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem*, 14: 326-332 (2003)

Ramírez I, Kryski AJ, Ben-Zeev O, Schotz MC, Severson DL. Characterization of triacylglycerol hydrolase activities in isolated myocardial cells from rat heart. *Biochem J*, 15: 229-36 (1985)

Ramos EJ, Middleton FA, Laviano A, Sato T, Romanova I, Das UN, Chen C, Qi Y, Meguid MM. Effects of omega-3 fatty acid supplementation on tumor-bearing rats. *J Am Coll Surg*, 199: 716-23 (2004)

Rapaport FT, Terashima T, Tsukuda K, Kono K, Takayama T, Malinowski K. Suppression of lectin, alloantigen, and xenoantigen-induced T-cell proliferation by Genistein. *Transplant Proc*, 29: 1261-4 (1997)

Reaven GM. Banting lecture. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37: 1595-607 (1988)

Reaven GM. The insulin Resistance syndrome: definition and dietary Approaches to treatment. *Annu Rev Nutr*, 25: 391-406 (2005)

- Rechsteiner M.** Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu Rev Cell Biol*, 3: 1-30 (1987)
- Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, Kaul M, Withington S, Treacher D, Eckart J, Willatts S, Bouza C, Krausch D, Stockenhuber F, Eiselstein J, Daum L, Kempeni J.** Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med*, 24: 733-42 (1996)
- Reuter BK, Wallace JL.** Phosphodiesterase inhibitors prevent NSAID enteropathy independently of effects on TNF-alpha release. *Am J Physiol*, 277: G847-54 (1999)
- Ribon V, Saltiel AR.** Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, 324: 839-845 (1997)
- Ribon V, Johnson JH, Camp HS, Saltiel AR.** Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 14751-14756 (1998)
- Rimando AM, Nagmani R, Feller DR, Yokoyama W.** Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J Agric Food Chem*, 53: 3403-3407 (2005)
- Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, Harrison SD.** Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes*, 52: 588-95 (2003)
- Rivett AJ.** Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J*, 291: 1-10 (1993)
- Rizzuto R, Pozzan T.** When calcium goes wrong: genetic alterations of a ubiquitous signaling route. *Nat Genet*, 34: 135-141 (2003)
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL.** Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 9: 761-71 (1994)
- Rodríguez T, Busquets S, Alvarez B, Carbó N, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM.** Protein turnover in skeletal muscle of the diabetic rat: activation of ubiquitin-dependent proteolysis. *Int J Mol Med*, 1: 971-7 (1998)
- Ruan H, Lodish HF.** Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 447-455 (2003)
- Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA.** Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol*, 276: E1-E18 (1999)
- 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*, 92: 876-81 (2005)
- Russell ST, Tisdale MJ.** Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on expression of a lipid mobilizing factor in adipose tissue in cancer cachexia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 72: 409-14 (2005)
- Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, Tisdale MJ.** Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-alpha2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1636: 59-68 (2004)
- Russo P, Tedesco I, Russo M, Russo GL, Venezia A, Cicala C.** Effects of de-alcoholated red wine and its phenolic fractions on platelet aggregation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 11: 25-29 (2001)
- Russo A, Cardile V, Lombardo L, Vanella, L, Acquaviva R.** Genistein inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *J Nutr Biochem*. 17: 103-108 (2006)

S

- Saez S.** Adrenal function in cancer: relation to the evolution. *Eur J Cancer*, 7: 381-7 (1971)
- Saido TC, Nagao S, Shiramine M, Tsukaguchi M, Yoshizawa T, Sorimachi H, Ito H, Tsuchiya T, Kawashima S, Suzuki K.** Distinct kinetics of subunit autolysis in mammalian m-calpain activation. *FEBS Lett*, 346: 263-7 (1994)
- Sakai T, Kogiso M.** Soy isoflavones and immunity. *J Med Invest*, 55: 167-73 (2008)
- Sakamoto K, Aschenbach WG, Hirshman MF, Goodyear LJ.** Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E1081-8 (2003)
- Salituro GM, Pelaez F, Zhang BB.** Discovery of a small molecule insulin receptor activator. *Recent Prog Horm Res*, 56: 107-26 (2001)
- Saltiel AR, Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806 (2001)
- Samis JA, Elce JS.** Immunogold electron-microscopic localization of calpain I in human erythrocytes. *Thromb Haemost*, 25: 250-3 (1989)
- Sánchez-Muniz FJ, Varela Gallego P, Bastida Codina S, González Lorenzo JM.** Enfermedad cardiovascular. Hipertensión arterial. Dislipemia. En Cuidados farmacológicos y nutricionales en el paciente de edad avanzada. Ed. Carbajal A y Varela P. 1-47 (2001)
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL.** Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 30: 399-412 (2004)
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM.** PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 16260-5 (2006)
- Sano J, Inami, S, Seimiya K, Ohba T, Sakai S, Takano T, Mizuno K.** Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease. *Circul J*, 68: 665-670 (2004)
- Sarkar FH, Li Y.** Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev*, 21: 265-80 (2002)
- Scarlatti F, Sala G, Somenzi G, Signorelli P, Sacchi N, Ghidoni R.** Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling. *FASEB J*, 17: 2339-41 (2003)
- Schimmack G, Defronzo RA, Musi N.** AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab*, 8: 591-602 (2006)
- Schlesinger MJ.** The ubiquitin system and the heat shock response. In: Stress Proteins. Schlesinger, Santoro, Garaci, eds. *Springer-Verlag, Berlín Heidelberg*. Pp, 81-88 (1990)
- Schoonbroodt S, Piette J.** Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem Pharmacol*, 60: 1075-1083 (2000)
- Schulze PC, Kratzsch J, Linke A, Schoene N, Adams V, Gielen S, Erbs S, Moebius-Winkler S, Schuler G.** Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 5: 33-40 (2003)
- Semmler J, Gebert U, Eisenhut T, Moeller J, Schönharting MM, Alléra A, Endres S.** Xanthine derivatives: comparison between suppression of tumour necrosis factor- α production and inhibition of cAMP phosphodiesterase activity. *Immunology*, 78: 520-5 (1993)

- Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A.** In vivo antioxidant effect of green tea in man. *Eur J Clin Nutr*, 50: 28-32 (1996)
- Shah P, Vella A, Basu R, Schwenck WF, Rizza RA.** Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 4053-59 (2000)
- Shaw JH, Wolfe RR.** Glucose, fatty acid, and urea kinetics in patients with severe pancreatitis. The response to substrate infusion and total parenteral nutrition. *Ann Surg*, 204: 665-72 (1986)
- Sheela CG, Kumud K, Augusti KT.** Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Med*, 61: 356-357 (1995)
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL.** Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*, 6: 77-86 (2000)
- Shoelson SE, White MF, Kahn CR.** Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alfa-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J Biol Chem*, 263: 4852-60 (1998)
- Shulman GI.** Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 106: 171-176 (2000)
- Singer P, Honigsmann G, Schliack V.** Negative correlation of eicosapentaenoic acid and lipid accumulation in hepatocytes of diabetics. *Biomed Biochim Acta*, 43: S438-42 (1984)
- Singh SV, Powolny AA, Stan SD, Xiao D, Arlotti JA, Warin R, Hahm ER, Marynowski SW, Bommareddy A, Potter DM, Dhir R.** Garlic constituent diallyl trisulfide prevents development of poorly differentiated prostate cancer and pulmonary metastasis multiplicity in TRAMP mice. *Cancer Res*, 68: 9503-11 (2008)
- Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ Jr, Backer JM, Ullrich A, White MF, et al.** The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J*, 12: 1929-360 (1993a)
- Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B, Schlessinger J.** The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science*, 260: 1953-5 (1993b)
- Slawik M, Vidal-Puig AJ.** Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes Nutr*, 2: 41-5 (2007)
- Smith HJ, Lorite MJ, Tisdale MJ.** Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2 C12 myoblasts: modulation by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res*, 59: 5507-5513 (1999)
- Smith HJ, Tisdale MJ.** Signal transduction pathways involved in proteolysis-inducing factor induced proteasome expression in murine myotubes. *Br J Cancer*, 89: 1783-8 (2003)
- Smith HJ, Khal J, Tisdale MJ.** Downregulation of ubiquitin-dependent protein degradation in murine myotubes during hyperthermia by eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 332: 83-8 (2005)
- Smith KL, Tisdale MJ.** Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. *Br J Cancer*, 67: 680-5 (1993)
- Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K.** Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*, 15: 721-32 (1997)
- Spornins VL, Mott AW, Barany G, Wattenberg LW.** Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse. *Nutr Cancer*, 8: 211-215 (1986)
- Spiegelman BM, Flier JS.** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104: 531-543 (2001)

- Spinella F, Rosanò L, Decandia S, Di Castro V, Albinì A, Elia G, Natali PG, Bagnato A.** Antitumor effect of green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate in ovarian carcinoma cells: evidence for the endothelin-1 as a potential target. *Exp Biol Med*, 231: 1123-7 (2006)
- Srivastava MD, Srivastava BI, Brouhard B.** Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology*, 40: 179-85 (1998)
- Stagg GV, Millin DJ.** The nutritional and therapeutic value of tea-a review. *J Sci Food Agric*, 26: 1439-1459 (1975)
- Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF.** Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell*, 2: 477-88 (2002)
- Stansbie D, Brownsey RW, Crettaz M, Denton RM.** Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J*, 15: 413-6. (1976)
- Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-Miller JM, Taylor PW.** Modulation of beta lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int J Antimicrobial Agents*, 23: 462-467 (2004)
- Steiner M, Lin RS.** Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31: 904-908 (1998)
- Steiner M, Li W.** Aged garlic extract, a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. *J Nutr*, 131: 980S-984S (2001)
- Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD.** Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol*, 139: 1-15 (1994)
- Stephens JM, Pekala PH.** Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 266: 21839-45 (1991)
- Stovroff MC, Fraker DL, Swedenborg JA, Norton JA.** Cachectin/tumor necrosis factor: a possible mediator of cancer anorexia in the rat. *Cancer Res*, 15: 4567-72 (1988)
- Strain AJ.** Cancer cachexia in man: a review. *Invest Cell Pathol*, 2: 181-93 (1979)
- Strasser F, Luftner D, Possinger K, Ernst G, Ruhstaller T, Meissner W, Ko YD, Schnelle M, Reif M, Cerny T.** Comparison of orally administered cannabis extract and delta-9-tetrahydrocannabinol in treating patients with cancer-related anorexia-cachexia syndrome: a multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial from the Cannabis-In-Cachexia-Study-Group. *J Clin Oncol*, 24: 3394-400 (2006)
- Strassmann G, Fong M, Freter CE, Windsor S, D'Alessandro F, Nordan RP.** Suramin interferes with interleukin-6 receptor binding in vitro and inhibits colon-26-mediated experimental cancer cachexia in vivo. *J Clin Invest*, 92: 2152-9 (1993)
- Sugiura K, Stock CC.** Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer Res*, 15: 38-51 (1955)
- Sugiura K.** Studies in a spectrum of mouse and rat tumors. *Cancer Res*, 3: 18-27 (1955)
- Sun CQ, O'Connor CJ, Robertson A.** Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 36: 9-17 (2003)
- Sundaram SG, Milner JA.** Impact of organosulfur compounds in garlic on canine mammary tumor cells in culture. *Cancer Lett*, 74: 85-90 (1993)
- Sutherland J, Mc Kinnley B, Eckel RH.** The metabolic syndrome and inflammation. *Metabolic Syndr Rel Diord*, 2: 82-104 (2004)

Suzuki K, Koike H, Matsui H, Ono Y, Hasumi M, Nakazato H, Okugi H, Sekine Y, Oki K, Ito K, Yamamoto T, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *Int J Cancer*, 99: 846-52 (2002)

Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*, 33: 462-464 (1990)

Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 75: 265-71 (2000)



Tabet JY, Meurin P, Ben Driss A, Logeart D, Héliès-Toussaint C, Tartière JM, Cohen-Solal A, Grynberg A, Bourdel-Marchasson I. Heart failure and cachexia. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 99: 1203-9 (2006)

Takeyama Y, Nakanishi H, Uratsuji Y, Kishimoto A, Nishizuka Y. Calcium-protease activator associated with brain microsomal-insoluble elements. *FEBS Lett*, 1: 110-4 (1986)

Tanaka Y, Eda H, Tanaka T, Udagawa T, Ishikawa T, Horii I, Ishitsuka H, Kataoka T, Taguchi T. Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice. *Cancer Res*, 50: 2290-5 (1990)

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 85-96 (2006)

Temparis S, Asensi M, Taillandier D, Aurousseau E, Larbaud D, Obled A, Béchet D, Ferrara M, Estrela JM, Attaix D. Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res*, 1: 5568-73 (1994)

Tessitore L, Bonelli G, Baccino FM. Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia. *Biochem J*, 241: 153-9 (1987)

Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, Baccino FM. Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys*, 306: 52-8 (1993)

Thinakaran G, Ojala J, Bag J. Expression of c-jun/AP-1 during myogenic differentiation in mouse C2C12 myoblasts. *FEBS Lett*, 319: 271-6 (1993)

Thomson M, Ali M. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Curr Cancer Drug*, 3: 67-81 (2003)

Tiao G, Fagan JM, Samuels N, James JH, Hudson K, Lieberman M, Fischer JE and Hasselgren PO. Sepsis stimulates nonlysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle. *J Clin Invest*, 94: 2255-64 (1994)

Tiao G, Hobler S, Wang JJ, Meyer TA, Luchette FA, Fischer JE and Hasselgren PO. Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, 99: 163-8 (1997)

Tibaldi J. Initiating and intensifying insulin therapy in type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*, 121: S20-9 (2008)

Tijburg L, Wiseman S, Meijer G, Weststrate J. Effects of green tea, black tea and dietary lipophylic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis*, 135: 37-47 (1997)

Tisdale MJ. Newly identified factors that alter host metabolism in cancer cachexia. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 473-5 (1990)

Tisdale MJ. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition*, 17: 438-42 (2001)

- Tisdale MJ.** Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 2: 862-71 (2002)
- Tisdale MJ.** The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting. *J Support Oncol*, 3: 209-217 (2005)
- Todorov P, Cariuk P, Mc Devitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M.** Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*, 379: 739-42 (1996)
- Todorov PT, Field WN, Tisdale MJ.** Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). *Br J Cancer*, 80: 1734-7 (1999)
- Tomíška M, Tomisková M, Salajka F, Adam Z, Vorlíček J.** Palliative treatment of cancer anorexia with oral suspension of megestrol acetate. *Neoplasma*, 50: 227-33 (2003)
- Tomita K, Chikumi H, Tokuyasu H, Yajima H, Hitsuda Y, Matsumoto Y, Sasaki T.** Functional assay of NF- κ B translocation into nuclei by laser scanning cytometry: inhibitory effect by dexamethasone or theophylline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 359: 249-55 (1999)
- Trausch JS, Grenfell SJ, Handley-Gearhart PM, Ciechanover A and Schwart AL.** Immunofluorescent localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, to the nucleus and cytoskeleton. *Am J Physiol*, 264: C93-C102 (1993)
- Treadway JL, Mendys P, Hoover DJ.** Glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Exp Opin Invest Drugs*, 10: 439-454 (2001)
- Triplitt C, Glass L, Miyazaki Y, Wajcberg E, Gastaldelli A, De Filippis E, Cersosimo E, DeFronzo RA.** Comparison of glargine insulin versus rosiglitazone addition in poorly controlled type 2 diabetic patients on metformin plus sulfonylurea. *Diabetes Care*, 29: 2371-7 (2006)
- Trotta PP.** Cytokines: an overview. *Am J Reprod Immunol*, 25: 137-41 (1991)
- Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J.** ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur J pharmacol*, 440: 213-221 (2002)
- Tseng SH, Lin SM, Chen JC, Su YH, Huang HY, Chen CK, Lin PY, Chen Y.** Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res*, 10: 2190-2202 (2004)
- Tsuchida K.** Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 11: 487-94 (2008)
- U**
- Ueda M, Nishiumi S, Nagayasu H, Fukuda I, Yoshida KI, Ashida H.** Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 286-90 (2008)
- Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC, Kahn CR.** Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol Cell Biol*, 22: 965-77 (2002)
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY.** Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 313: 756-61 (1985)
- Unger J.** Current strategies for evaluating, monitoring, and treating type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*, 121: S3-8 (2008)
- Unger RH.** Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. *Diabetes*, 44: 863-870 (1995)
- Unson CG, Andreu D, Gurzenda EM, Merrifield RB.** Synthetic peptide antagonists of glucagons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 4083-4087 (1987)

Usami A, Ueki S, Ito W, Kobayashi Y, Chiba T, Mahemuti G, Oyamada H, Kamada Y, Fujita M, Kato H, Saito N, Kayaba H, Chihara J. Theophylline and dexamethasone induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in human eosinophils. *Pharmacology*, 77: 33-7 (2006)

V

Van Buren CT, Rudolph FB, Kulkarni A, Pizzini R, Fanslow WC, Kumar S. Reversal of immunosuppression induced by a protein-free diet: comparison of nucleotides, fish oil, and arginine. *Crit Care Med*, 18: S114-7 (1990)

Van Dam EM, Govers R, James DE. Akt activation is required at a late stage of insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Mol Endocrinol*, 19: 1067-77 (2005)

Van Eys J. Nutrition and cancer: physiological interrelationships. *Annu Rev Nutr*, 5: 435-61 (1985)

Van het Hof KH, Kivits GA, Weststrate JA, Tijburg LB. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr*, 52: 356-9 (1998)

Van Royen M, Carbó N, Busquets S, Álvarez B, Quinn LS, López-Soriano FJ, Argilés JM. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun*, 270: 533-7 (2000)

Varshavsky A. The N-end rule. *Cell*, 69: 725-35 (1992)

Vigano A, Watanabe S, Bruera E. Anorexia and cachexia in advanced cancer patients. *Cancer Surv*, 21: 99-115 (1994)

Vijay-Kumar S, Bugg CE and Cook WJ. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 194: 531-44 (1987)

W

Wada T, Sasaoka T, Funaki M, Hori H, Murakami S, Ishiki M, Haruta T, Asano T, Ogawa W, Ishihara H, Kobayashi M. Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5' phosphatase catalytic activity. *Mol Cell Biol*, 21: 1633-46 (2001)

Wagner JD, Zhang L, Shadoan MK, Kavanagh K, Chen H, Tresnasari K, Kaplan JR, Adams MR. Effects of soy protein and isoflavones on insulin resistance and adiponectin in male monkeys. *Metabolism*, 57: S24-31 (2008)

Wan SB, Chen D, Dou QP, Chan TH. Study of the green tea polyphenols catechin-3-gallate (CG) and epicatechin-3-gallate (ECG) as proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 12: 3521-7 (2004)

Wang W, Andersson M, Iresjö BM, Lönnroth C, Lundholm K. Effects of ghrelin on anorexia in tumor-bearing mice with eicosanoid-related cachexia. *Int J Oncol*, 28: 1393-400 (2006)

Wargovich MJ. Diallylsulfide and allylmethylsulfide are uniquely effective among organosulfur compounds in inhibiting CYP2E1 protein in animal models. *J Nutr*, 136: 832S-834S (2006)

Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med*, 113: 909-915 (1990)

Watanabe J, Kawabata J, Niki R. Isolation and identification of acetyl-CoA carboxylase inhibitors from green tea (*Camellia sinensis*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 62: 532-534 (1998)

Waterhouse C, Jeanpretre N, Keilson J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. *Cancer Res*, 39: 1968-72 (1979)

- Watzl B, Scuderi P, Watson RR.** Marijuana components stimulate human peripheral blood mononuclear cell secretion of interferon-gamma and suppress interleukin-1 alpha in vitro. *Int J Immunopharmacol*, 13: 1091-7 (1991)
- Weber P, Brown S, Mueller L.** ¹H-NMR resonance assignments and secondary structure identification of human ubiquitin. *Biochemistry*, 26: 7282-90 (1987)
- Wei H, Wei L, Frenkel K, Bowen R, Barnes S.** Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer*, 20: 1-12 (1993)
- Wen J, Zhang Y, Chen X, Shen L, Li GC, Xu M.** Enhancement of diallyl disulfide-induced apoptosis by inhibitors of MAPKs in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol*, 68: 323-31 (2004)
- Weston CR, Davis RJ.** Signaling specificity- a complex affair. *Science*, 292: 2439-2440 (2001)
- Whitehouse AS i Tisdale MJ.** Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kappaB. *Br J Cancer*, 89: 1116-22 (2003)
- Whitehouse AS, Khal J, Tisdale MJ.** Induction of protein catabolism in myotubes by 15 (S) hydroxyeicosatetraenoic acid through increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway. *Br J Cancer*, 89: 737-745 (2003)
- Whitehouse AS, Smith HJ, Drake JL, Tisdale MJ.** Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res*, 61: 3604-3609 (2007)
- 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*, 87: 53-8 (2000)
- Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Ross JA.** Down-regulation of the acute-phase response in patients with pancreatic cancer cachexia receiving oral eicosapentaenoic acid is mediated via suppression of interleukin-6. *Clin Sci (Lond)*, 92: 215-21 (1997)
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.** Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27: 1047-1053 (2004)
- Wilkinson KD.** Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Cell Dev Bio*, 11: 141-8 (2000)
- Winder WW, Hardie DG.** The AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol*, 277: E1-E10 (1999)
- Wing SS, Goldberg AL.** Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol*, 264: E668-76 (1993)
- Wojtaszewski JF, Nielsen P, Kiens B, Richter EA.** Regulation of glycogen synthase kinase-3 in human skeletal muscle: effects of food intake and bicycle exercise. *Diabetis*, 50: 265-9 (2001)
- Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ.** Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr*, 76: 1007-15 (2002)
- Wu LY, Juan CC, Ho LT, Hsu YP, Hwang LS.** Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem*, 52: 643-648 (2004)
- Wyke SM, Russell ST, Tisdale MJ.** Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NFkappaB activation. *Br J Cancer*, 91: 1742-50 (2004)

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112: 1821-30 (2003)

Y

Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270: 725-7 (1977)

Yamamoto N, Kawamura I, Nishigaki F, Tsujimoto S, Naoe Y, Inami M, Elizabeth L, Manda T, Shimomura K. Effect of FR143430, a novel cytokine suppressive agent, on adenocarcinoma colon26-induced cachexia in mice. *Anticancer Res*, 18: 139-44 (1998)

Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, Kim M. Chemistry and applications of green tea. Ed. New York: CRC Press (1997)

Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolism effects. *Nature*, 423: 762-9 (2003a)

Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, Nagai R, Kadowaki T. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 3: 243-54 (2003b)

Yang C, Watson RT, Elmendorf JS, Sacks DB, Pessin JE. Calmodulin antagonists inhibit insulin-stimulated GLUT4 (glucose transporter 4) translocation by preventing the formation of phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate in 3T3L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, 14: 317-26 (2000)

Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 25-54 (2002)

Yasui K, Hu B, Nakazawa T, Agematsu K, Komiyama A. Theophylline accelerates human granulocyte apoptosis not via phosphodiesterase inhibition. *J Clin Invest*, 100: 1677-1684 (1997)

Yellayi S, Zakroczymski MA, Selvaraj V, Valli VE, V Ghanta, Helderich WG, Cooke PS. The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *J Endocrinol*, 176: 267-74 (2003)

Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413: 131-138 (2001)

Yoshizawa S, Ueda T, Ishido Y, Miura K, Watanabe K, Hirao I. Nuclease resistance of an extraordinarily thermostable mini-hairpin DNA fragment, d(GCGAAGC) and its application to in vitro protein synthesis. *Nucleic Acids Res*, 22: 2217-21 (1994)

You WC, Blot WJ, Chang YS, Ershow A, Yang ZT, An Q, Henderson BE, Fraumeni JF, Wang TG. Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J Natl Cancer Inst*, 81: 162-164 (1989)

Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett*, 215: 159-166 (2004)

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkb. *Science*, 293: 1673-1677 (2001)

Z

Zacharay T. Approaches to treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 31: 8 (2008)

Zajdela F, Latarjet R. Ultraviolet light induction of skin carcinoma in the mouse; influence of cAMP modifying agents. *Bull Cancer*, 65: 305-13 (1978)

Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci*, 78: 2073-80 (2006)

Zeisel SH. Regulation of "nutraceuticals". *Science*, 285: 1853-5 (1999)

- Zhang B, Moller DE.** New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Chem Biol*, 4: 461–467 (2000)
- Zhang P, Noordine ML, Cherbuy C, Vaugelade P, Pascussi JM, Duée PH, Thomas M.** Different activation patterns of rat xenobiotic metabolism genes by two constituents of garlic. *Carcinogenesis*, 27: 2090-5 (2006)
- Zhao JH, Arao Y, Sun SJ, Kikuchi A, Kayama F.** Oral administration of soy-derived genistin suppresses lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation but does not induce thymic atrophy in the rat. *Life Sci*, 78: 812-9 (2006)
- Zhao SP, Xie XM.** Captopril inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha by human mononuclear cells in patients with congestive heart failure. *Clin Chim Acta*, 304: 85-90 (2001)
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108: 1167–1179 (2001)
- Zhou S, Hu Y, Zhang B, Teng Z, Gan H, Yang Z, Wang Q, Huan M, Mei Q.** Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats. *J Agric Food Chem*, 56: 8354-9 (2008)
- Zuniga-Guajardo S, Garfinkel PE, Zinman B.** Changes in insulin sensitivity and clearance in anorexia nervosa. *Metabolism*, 35: 1096-100 (1986)

