



FACULTADE DE MEDICINA  
E ODONTOLOXÍA

Traballo de  
fin de grao

**Caquexia tumoral: Identificación de  
marcadores e dianas moleculares.**

**Caquexia tumoral: Identificación de  
marcadores y dianas moleculares.**

**Autor:** Miguel Franco Álvarez

**Titora:** Rosa M.<sup>a</sup> Señarís Rodríguez

**Departamento:** Fisioloxía

*Xuño de 2021*



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma

IL-1: Interleuquina 1

IL-6: Interleuquina 6

SNPs: Polimorfismo de nucleótido único

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta

PTHrp: Proteína relacionada con la hormona paratiroidea

ATP: Adenosín trifosfato

BAT: Tejido adiposo marrón

WAT: Tejido adiposo blanco

UCP: Proteína desacoplante

FOXO: Forkhead box protein O

MURF-1: Muscle RING-finger protein-1

MAFbx: Muscle Atrophy F-box gene

ACTRIIB: Receptor de activina tipo II B

PGC1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1  $\alpha$

AMPK: AMP-activated protein kinase

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1

PIF: Factor inductor de la proteólisis

LMF: Lipid-mobilising factor

ATGL: Adipo-triglicérido lipasa

HSL: Lipasa sensible a hormonas

MGL: Monoacilglicerol lipasa

FFA: Free Fatty Acids

PPAR- $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

ZAG: zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein

CIDEA: Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A

POMC: Proopiomelanocortin

AgRP: Agouti related peptide

NPY: Neuropeptido Y

MC4R: Receptor de melanocortina 4

$\alpha$ -MSH: Hormona estimulante de melanocitos

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

GDF-15: Growth/differentiation factor 15

PCR: Proteína C reactiva

miRNA: microRNA

TLR4: Toll like receptor 4

Modelo LLC: Ratones inoculados con células Lewis Lung Carcinoma de ratón.

Modelo C26: Ratones inoculados con células de adenocarcinoma de colon C26 de ratón.

Modelo Hepatoma Ascítico Yoshida AH-130: Ratas inoculadas intraperitonealmente con células hepatoma ascítico Yoshida-130 de rata.

Modelo MAC16: Ratones implantados con fragmentos de adenocarcinoma de colon murino 16.

Modelo B16: Ratones inoculados con células de melanoma murino B16.

Modelo C26c20: Ratones implantados de forma heterotópica con adenocarcinoma de colon murino C26c20.

Modelo CT26: Ratones inoculados con células de adenocarcinoma de colon de ratón CT26.

Modelo Walker 256: Ratas a las que se le trasplantan en tejido subcutáneo células de carcinoma mamario Walker256 de rata.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. FACTORES INFLAMATORIOS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. LA CAQUEXIA COMO UN ESTADO HIPERMETABÓLICO.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. CAMBIOS EN EL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. CAMBIOS EN EL TEJIDO ADIPOSO.....</b>	<b>10</b>
<b>2.5. COMUNICACIÓN INTERTISULAR .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6. REGULACIÓN NEUROENDOCRINA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1. BIOMARCADORES DE CAQUEXIA TUMORAL.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1.1. MEDIADORES DE LA CAQUEXIA.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1.2. MARCADORES DE DEGRADACIÓN PROTEICA.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1.3. MARCADORES DE PÉRDIDA DEL TEJIDO GRASO.....</b>	<b>24</b>
<b>5.1.4. ESTUDIOS ÓMICOS.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1.5. RNAs NO CODIFICANTES.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1.6. MARCADORES GENÉTICOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2. DIANAS TERAPÉUTICAS .....</b>	<b>29</b>
<b>5.2.1. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.2. BLOQUEO DE LA DEGRADACIÓN PROTEICA.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.3. BLOQUEO DE LA LIPÓLISIS Y EL BROWNING DEL TEJIDO ADIPOSO.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.4. CORREGIR LA HOMEOSTASIS A NIVEL CENTRAL.....</b>	<b>37</b>
<b>6. RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>42.</b>

## 1. RESUMEN

La caquexia es un trastorno metabólico multifactorial caracterizado por la pérdida involuntaria de peso, principalmente a expensas de tejido muscular y adiposo, que afecta a de forma global más de la mitad de los pacientes con cáncer. La inflamación a nivel sistémico, la liberación de sustancias por parte del tumor y otros factores neuroendocrinos contribuyen a la creación de un estado metabólico caracterizado por un elevado gasto energético, donde predominan procesos catabólicos como proteólisis y lipólisis con un claro reflejo clínico. En la actualidad no se dispone de biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz ni de tratamientos efectivos, especialmente en fases avanzadas de la enfermedad, por lo que resulta esencial desvelar los eventos biológicos que subyacen a la caquexia asociada a cáncer. En este trabajo trataremos de abordar la identificación de biomarcadores y dianas moleculares desde la perspectiva teórica partiendo de la fisiopatología y los estudios actuales.

**PALABRAS CLAVE:** Caquexia tumoral, cáncer, biomarcadores, dianas.

### ABSTRACT

Cachexia is a multifactorial metabolic disorder characterized by involuntary weight loss, mainly at the expense of muscle and adipose tissue, that affects more than half of cancer patients. Systemic inflammation, release of substances by the tumor and other neuroendocrine factors contribute to create a metabolic state characterized by a high energy expenditure, where catabolic processes such as proteolysis and lipolysis predominate with a clear clinical reflex. Presently, no biomarkers are available for early diagnosis or effective treatments, particularly in advanced stages of the disease, so it is essential to uncover the biological events underlying cancer-associated cachexia. In this work we will try to address the identification of biomarkers and molecular targets from a theoretical perspective based on the physiopathology and the current studies.

**KEYWORDS:** Cancer cachexia, cancer, biomarkers, targets.

## 1. INTRODUCCIÓN

Independientemente de la estirpe implicada, la génesis de un cáncer da comienzo con la proliferación celular anómala en el seno de un tejido. Aunque la progresión de la enfermedad difiere en cada tipo de neoplasia e incluso en cada paciente, podemos afirmar que una vez alcanzado un estadio avanzado la mayoría de los individuos manifiestan un síndrome sistémico caracterizado por la pérdida involuntaria de peso que conocemos como caquexia tumoral o caquexia asociada a cáncer. Lo que antiguamente era atribuido a complicaciones relacionadas con la enfermedad como hemorragias o infecciones, se entiende hoy como un trastorno metabólico multifactorial ligado directamente a las interacciones entre el organismo y el tumor (1). De hecho, la caquexia no es una manifestación exclusiva de la enfermedad tumoral, sino que aparece en múltiples trastornos crónicos como la infección por VIH/SIDA, la EPOC, la Insuficiencia Cardíaca y otras enfermedades inflamatorias (2).

A pesar de la importancia clínica, los criterios diagnósticos de caquexia han sido acordados recientemente (Tabla 1). Así, se define la caquexia tumoral como un síndrome multifactorial caracterizado por una pérdida progresiva de masa muscular con o sin pérdida de tejido adiposo que no puede ser revertida totalmente mediante soporte nutricional convencional y que lleva a un deterioro funcional paulatino (3). De acuerdo con esta definición propuesta por *Fearon et al* como respuesta a la falta de consenso en los estudios previos, se entiende la enfermedad como un continuum con tres etapas clínicamente identificables: precaquexia, caquexia y caquexia refractaria (Tabla 2). Estas características nos permiten distinguir la caquexia tumoral de otros fenómenos como la desnutrición (donde no se observa primariamente afectación del tejido muscular y los cambios pueden revertirse con un aporte nutricional adecuado) o la anorexia (reducción de la ingesta calórica), que con frecuencia aparece junto a la caquexia conformando el denominado síndrome de anorexia-caquexia (4). Aunque la presencia de anorexia empeora de forma evidente el pronóstico de estos pacientes, sabemos que la caquexia puede progresar por sí sola en ausencia de anorexia (5). A pesar de que en la caquexia tumoral se afecta tanto tejido adiposo como muscular, la pérdida de este último representa el verdadero eje del problema y se asocia en mayor medida a un peor pronóstico y calidad de vida (3).

Las consecuencias de este trastorno ponen de manifiesto su relevancia. De forma global, la mitad de los pacientes oncológicos sufre caquexia, según lo cual y basándonos en la prevalencia estimada a cinco años de cáncer en España, arroja una cifra cercana a los 400.000 casos de caquexia tumoral en nuestro país (7). En algunos tumores la incidencia se dispara, especialmente en aquellos que suelen diagnosticarse en estadios avanzados o interfieren con la función digestiva, como páncreas o estómago, donde la cifra se aproxima al 90% (8). El inicio del proceso caquético en estos pacientes ensombrece el pronóstico y reduce drásticamente la supervivencia (3), además de empeorar la respuesta al tratamiento e incrementar su toxicidad, lo que obliga en muchos casos a recortar las posibilidades terapéuticas (9). El aumento de la susceptibilidad a infecciones y otras complicaciones clínicas como la insuficiencia cardíaca (por afectación del tejido muscular diafragmático y del miocardio) suponen un gran impacto. De forma general la literatura médica atribuye a la caquexia tumoral un 20% de la mortalidad en pacientes con cáncer, situándola como un factor de riesgo independiente (10).

La falta de un diagnóstico claro (la medición de la pérdida de masa muscular resulta complicada en la práctica diaria) conlleva en muchos casos un diagnóstico a la vieja usanza, esto es, basado en la velocidad de pérdida de peso o en el IMC y en consecuencia tardío. Una vez alcanzada la

fase refractaria o final, la muerte se vuelve inexorable sin que exista respuesta alguna a las intervenciones terapéuticas (9). El problema se agrava en el caso de pacientes obesos, donde la pérdida de tejido muscular pasa muchas veces desapercibida. En consecuencia, es necesaria la búsqueda de biomarcadores que reflejen los cambios precoces, ya que en la gran mayoría de los casos el diagnóstico se realiza en etapas irreversibles, así como tratamientos capaces de modificar la enfermedad, pues las opciones paliativas de las que disponemos apenas inciden sobre el curso clínico (11). En ambos casos resulta crucial estudiar la fisiopatología subyacente a fin de hallar dianas moleculares que desvelen tratamientos eficaces.

El cáncer como tal constituye una enfermedad inflamatoria sistémica ligada de forma primordial a su desarrollo y mantenimiento (12). El sistema inmune del individuo reconoce la presencia de células anómalas y despliega mecanismos para combatir su crecimiento (13). A su vez, la liberación de citocinas y otros factores humorales por parte del propio tumor ejerce efectos deletéreos sobre el huésped. Por esta razón, los estadios avanzados o tumores más agresivos como pulmonares o pancreáticos se asocian con un mayor grado de inflamación sistémica (14). La interacción de estas sustancias a nivel molecular es compleja, con múltiples órganos y vías implicadas y relaciones poco esclarecidas, si bien el resultado final responde a un patrón concreto: el desequilibrio total en la homeostasis energética, con un claro predominio del catabolismo, así como una resistencia a los factores anabólicos, circunstancia que de mantenerse acaba por consumir las reservas metabólicas del paciente. Por tanto, en la patogénesis de la caquexia subyace el estado inflamatorio, además de otras moléculas señalizadoras algunas de las cuales todavía no se conocen. Lo que podía verse como una simple complicación relacionada con el crecimiento neoplásico, se convierte en una maniobra de reprogramación del metabolismo del huésped en todas sus dimensiones.

Definición de caquexia (Fearon et al, EPCRC)
Pérdida de peso >5% en los últimos 6 meses (en ausencia de simple inanición)
BMI <20 y cualquier grado de pérdida de peso >2%
Masa muscular apendicular esquelética (MMAE) consistente con sarcopenia (varón <7,26kg/m <sup>2</sup> ; mujer <5,45kg/ m <sup>2</sup> ) y cualquier grado de pérdida de peso >2%

PRECAQUEXIA	CAQUEXIA	CAQUEXIA REFRACTARIA
Pérdida de peso ≤ 5% Anorexia y cambios metabólicos	Pérdida de peso > 5% o IMC <20 y pérdida de peso >2% o sarcopenia y pérdida de peso >2% Frecuente disminución de la ingesta e inflamación sistémica	Grados variables de caquexia Enfermedad cancerosa procatabólica y que no responde a tratamiento Bajo Estado Funcional Supervivencia estimada < 3m

Estadios clínicos de la caquexia tumoral (Fearon, 2011)



## 2.1 FACTORES INFLAMATORIOS

La inflamación sistémica es el principal motor de los cambios metabólicos que se observan en la caquexia tumoral y que definen en última instancia el estado hipermetabólico que la caracteriza. Aunque la pérdida del tejido muscular representa el hecho central de la caquexia, los procesos metabólicos y factores implicados acaban por afectar a múltiples tejidos, actuando a varios niveles y constituyendo una red de efectos que parte de la reacción del organismo frente al tumor. Podemos dividir los factores moleculares en aquellos derivados del tumor y aquellos procedentes del huésped. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$  son las principales citocinas implicadas, aunque sus niveles no se correlacionan con la aparición de la enfermedad en todos los casos (15).

El TNF-  $\alpha$  (el primer mediador identificado, denominado en su momento caquectina) puede producir por sí solo caquexia y pérdida de peso al ser inyectado en modelos animales sanos provocando múltiples alteraciones metabólicas (16). Se han estudiado diversos modelos tumorales capaces de secretar TNF- $\alpha$ , pero la fuente potencial en humanos todavía está por conocer, aunque algunos trabajos apuntan a macrófagos activados o adipocitos como origen del mismo (15). Sus niveles aparecen elevados en plasma en el curso de algunos tipos de cáncer (16, 17)

Los niveles de IL-1 se encuentran aumentados en pacientes caquéticos con cánceres gastroesofágicos (19). Aunque su papel no ha sido esclarecido por completo y quizás dependa de otras citocinas, se han descrito ciertos polimorfismos en el gen de la IL-1 $\beta$  que incrementan sus niveles circulantes y conllevan peor pronóstico en la caquexia asociada a cáncer (20). De forma similar, ciertos SNPs en los genes de la IL-6 o IL-10 asociados a una mayor producción de dichas citocinas se han correlacionado con una mayor prevalencia de caquexia en tumores gástricos o pancreáticos (20). Visto en conjunto, las evidencias que detallan cómo la variabilidad genética del paciente influye en la aparición de la caquexia pueden ayudar a entender por qué unos sujetos con el misma carga y tipo de tumor desarrollan caquexia y otros no, aunque el significado clínico o funcional de las variables detectadas no se conoce con total profundidad. Más estudiada ha sido la implicación de la IL-6 en la patogenia de la enfermedad, cuyas concentraciones también se elevan en estos pacientes, existiendo además una clara correlación con la pérdida de peso y una reducción en la supervivencia (21). Varios tipos tumorales son capaces de secretar IL-6 y su producción puede amplificarse por la propia respuesta inmune del huésped, aunque solo la administración de dosis suprafisiológicas consigue reproducir la caquexia (22).

La disminución en la expresión de citocinas antiinflamatorias como la IL-4, IL-10 e IL-12 ocurre de forma paralela al incremento de los factores proinflamatorios, poniendo de relieve el fallo en los mecanismos de compensación con los que cuenta el sistema inmune (23).

En cuanto a las moléculas secretadas por el tumor, además de algunas citocinas, destacan aquellas que ponen en marcha programas catabólicos en tejidos como el muscular o el adiposo. Miembros de la superfamilia TGF- $\beta$  como activina, miostatina o el propio TGF- $\beta$  promueven la pérdida de músculo esquelético y moléculas como el PTHrp suscitan incrementos en el gasto energético mediante sus acciones sobre el tejido adiposo (24, 25). Los mecanismos fisiopatológicos que emplean para tal fin serán abordados posteriormente.

## 2.2 CAQUEXIA COMO UN ESTADO HIPERMETABÓLICO

El gasto energético total del organismo depende de tres factores: el metabolismo basal, el gasto inducido por el procesamiento del alimento y las calorías consumidas por la actividad física. Durante la enfermedad tumoral los mecanismos encargados de mantener la homeostasis energética pueden verse alterados y las vías empleadas para tal fin actúan de forma sinérgica generando déficits calóricos marcados (26).

Un claro ejemplo de ineficiencia energética en el contexto que tratamos es el aumento de la actividad de los ciclos sustrato, capaz de aumentar el consumo hasta 300 kcal por día (27). Los tumores no emplean oxígeno para el metabolismo glucídico, sino que tienden al proceso fermentativo en lo que se conoce como efecto Warburg, transformando la glucosa en ácido láctico. En la versión oncológica del ciclo de Cori el lactato procedente de la glicólisis tumoral es transformado en el hígado empleando 6 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Tras esto, la glucosa obtenida es captada por las células tumorales para ingresar de nuevo en el ciclo. Algunos estudios hablan de un aumento de la actividad en este ciclo de hasta un 50% (28). De forma análoga, el glicerol procedente de la lipólisis puede destinarse a la gluconeogénesis hepática y parte de los ácidos grasos pueden ser reesterificados durante la lipogénesis (29) creando así ciclos fútiles, es decir, sin más efecto que el de consumir energía. Además, los procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis se encuentran potenciados en pacientes con cáncer que muestran pérdida de peso (26)

Se ha observado en distintos modelos de caquexia tumoral que ciertos cambios en el tejido adiposo contribuyen en gran manera a incrementar el gasto energético basal. Como un evento temprano las células del tejido adiposo blanco (WAT) pueden adquirir algunas características del tejido adiposo marrón (BAT), conocidas como adipocitos beige, una forma intermedia entre ambas. Se conoce al fenómeno como browning (30). El BAT es un tejido caracterizado por su alta actividad metabólica, determinada por la gran cantidad de mitocondrias y presencia de la proteína de membrana UCP-1, cuya expresión condiciona un desacoplamiento del gradiente de protones obtenido durante la respiración mitocondrial hacia un proceso termogénico, a diferencia de la que sería su actividad normal, la síntesis de ATP. La consecuencia directa de la presencia de UCP-1 es la termogénesis, gracias a la cual el WAT funciona a modo de radiador disipando calor, pero la activación del programa termogénico y la caída en la síntesis de ATP contribuyen a elevar el gasto energético del individuo, favoreciendo la progresión de la caquexia (26). Algunos estudios con modelos murinos de cáncer han observado incluso la activación del BAT interescapular en ratones portadores de tumores caquectizantes, cuya actividad contribuye a agravar el estado hipermetabólico (31).

La pérdida de energía se manifiesta también en las mitocondrias de células musculares mediante la expresión de proteínas UCP-2 y UCP-3, disminuyendo así la síntesis de ATP al destinar la energía obtenida a procesos de termogénesis (32). También se ha visto en modelos caquéticos una mayor expresión y actividad en las bombas de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA), las cuales consumen ATP para exportar el ion al citosol generando una sobrecarga de calcio (33). En definitiva, numerosos fenómenos metabólicos concurren para establecer un estado de ineficiencia energética que determina el curso de la enfermedad.

### 2.3 CAMBIOS EN EL TEJIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

Numerosas vías moleculares participan en los mecanismos de degradación del tejido muscular contribuyendo así a la pérdida de proteínas miofibrilares, cuya traducción clínica será la atrofia muscular, fatiga y progresivo deterioro físico. En un individuo sano la homeostasis en este tejido viene dada por el equilibrio dinámico entre la síntesis y degradación proteica, un estado definido a su vez por redes de factores anabólicos y catabólicos respectivamente. En la caquexia tumoral se observa un marcado incremento de la degradación proteica, que suele combinarse con una disminución en la síntesis y alteraciones en los procesos regenerativos que afectan a las células progenitoras (34).

La degradación proteica puede llevarse a cabo mediante tres vías: el sistema Ubiquitina-Proteasoma, la autofagia y la escisión dependiente de calpaínas. La acción del sistema ubiquitina-proteasoma se inicia con la unión de ubiquitina a una enzima activadora (E1), permitiendo transferir a una enzima conjugadora (E2) que posibilita la unión de esta a una ubiquitina-ligasa (E3). La ligasa reconoce sustratos de forma específica y transfiere la ubiquitina a la proteína diana. A continuación, la proteína marcada es desplegada y degradada mediante un proceso que consume energía. El Sistema Ubiquitina-Proteasoma se encuentra hiperactivado en modelos caquéticos a través de la expresión de ligasas E3 específicas de músculo esquelético, particularmente MURF-1 y Atrogin-1/MAFbx. Las ligasas E3 median la ruptura del sarcómero y la inhibición de la síntesis proteica (35). Concretamente MURF1 dirige su acción de forma directa contra proteínas miofibrilares como la cadena pesada de miosina, cadena ligera y cMyBP-C catalizando su ubiquitinación (36). Mientras tanto, Atrogin1/MAFbx induce la pérdida de la cadena pesada de la miosina de forma indirecta dirigiendo su acción contra proteínas reguladoras de la síntesis (37). La expresión aumentada de estas ligasas se debe a su vez a la activación de factores de transcripción FOXO, que comprenden tres isoformas de las cuales FOXO1 y FOXO3 se encuentran sobreexpresadas en modelos caquéticos y su inhibición consigue prevenir la atrofia en modelos animales de caquexia tumoral (38). Diversas citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, TWEAK o PIF incrementan la expresión de FOXO mediante la vía de señalización dependiente del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Figura 1); pudiendo algunas citocinas como IL-6 o TNF- $\alpha$  generar bucles que realimentan la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de más factores proinflamatorios (39). Ahora bien, la expresión de genes relacionados con atrofia en el músculo esquelético puede verse también en otros trastornos como la denervación o la insuficiencia renal, de modo que el programa transcripcional responde a varias señales independientemente de la causa.

Otra vía que contribuye de forma importante al catabolismo proteico en modelos de caquexia tumoral es la del receptor ACTRIIB (Activin Receptor Type II-B), el cual reconoce moléculas pertenecientes a la familia de TGF- $\beta$  como miostatina, GDF-11 o activina A (24). Su activación deriva en una mayor degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasoma, una disminución en la síntesis por inhibición de la fosforilación de Akt, así como un incremento en la apoptosis vía MAPK (10, 24). La miostatina (GDF-8) funciona en circunstancias normales como un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético que expresa la estirpe celular miogénica y deleciones de este gen en modelos animales provocan sendas caídas en los niveles del factor y un aumento muy llamativo de la masa muscular debido a fenómenos tanto de hiperplasia como hipertrofia por acción sobre células satélite (40). Tras unirse al receptor ACTRIIB situado en la superficie de las células musculares, la miostatina induce la desfosforilación de los factores de transcripción FOXO (24), permitiendo así su entrada al núcleo y regulando al alza la transcripción de componentes del sistema ubiquitina proteasoma

(Figura 1), como las ligasas Atrogin1 y MURF1, que una vez se expresan promueven el catabolismo muscular (24). La inhibición farmacológica de la señalización mediante el receptor ACTRIIB consigue revertir la caquexia y la atrofia muscular en modelos animales (41)

La actividad de los factores de transcripción FOXO puede ser inhibida por PGC1 $\alpha$  (Peroxisoma proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ ), un importante coactivador transcripcional que además de controlar la biogénesis mitocondrial parece jugar un papel protector en el proceso catabólico proteico y atrofia del tejido muscular en diversos contextos como la sarcopenia o la denervación (42). Al mismo tiempo, la inhibición de miostatina regula al alza la actividad de PGC1 $\alpha$  en músculo esquelético, incrementando el metabolismo oxidativo, inhibiendo la actividad transcripcional de FOXO e incrementando los niveles de AMPK (24).

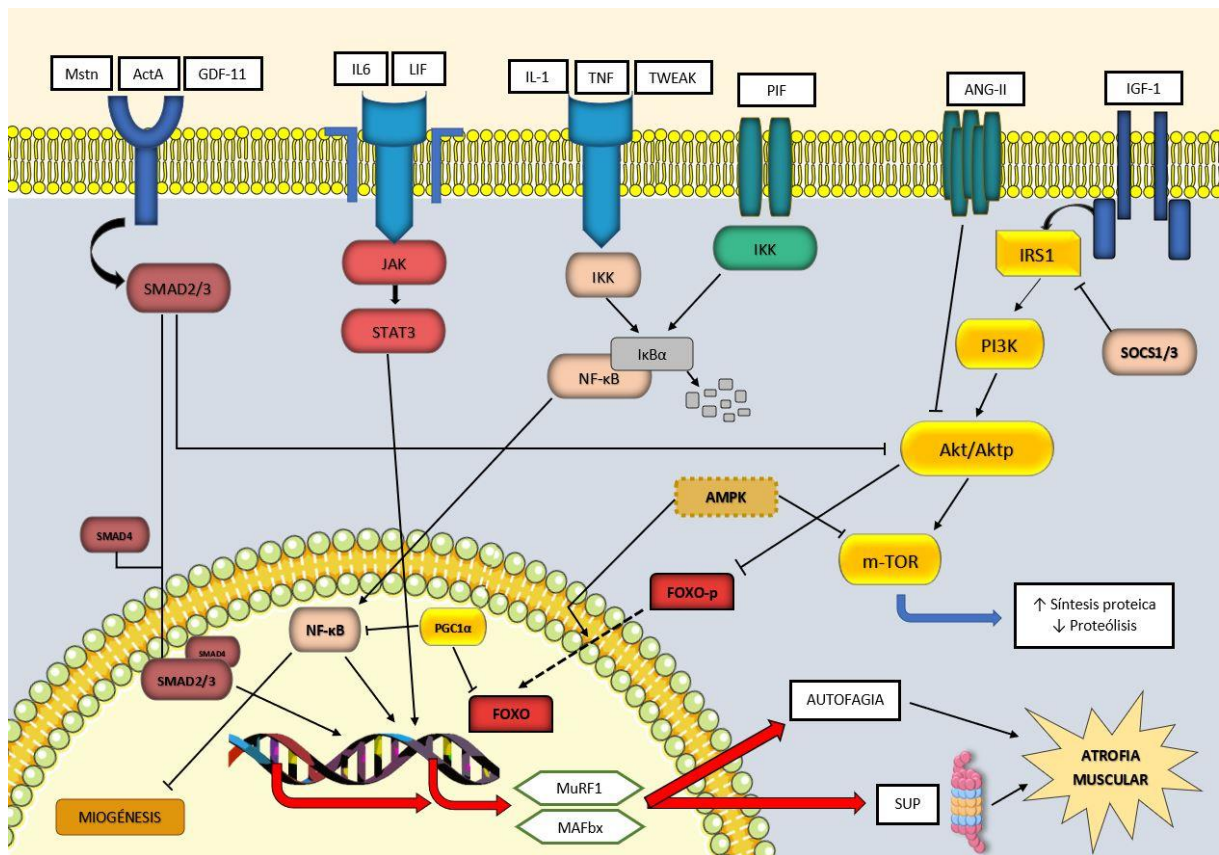


Figura 1 Factores y vías de señalización implicadas en la atrofia muscular asociada a caquexia tumoral. Mstn: miostatina, ActA: Activina A

La delección a nivel genético de las ligasas E3 Atrogin-1/MAFbx o MURF1 protege al músculo esquelético de la atrofia a nivel experimental (43), mientras que la activación específica de NF- $\kappa$ B la promueve (44). Las evidencias que implican al sistema Ubiquitina-Proteasoma en la caquexia tumoral son múltiples en modelos animales, pero limitadas en humanos. Varios autores han concluido que los elementos del sistema Ubiquitina-Proteasoma permanecen invariables o incluso con una expresión reducida en pacientes con cáncer, y los estudios longitudinales de transcriptómica que se han llevado a cabo tan solo encuentran una inhibición general del recambio proteico (45). Otras publicaciones concluyeron que sí existía sobreexpresión de las subunidades de proteasoma en músculos de pacientes con cáncer y

pérdida de peso (46). La interpretación más extendida para estos resultados tan dispares podría explicarse por el momento de la enfermedad en que se toman las muestras, ya que los estudios en humanos suelen llevarse a cabo en etapas finales de la caquexia, obviándose los estadios de cambios rápidos que sí pueden ser controlados en modelos animales.

La segunda vía involucrada en la pérdida de tejido muscular corresponde al proceso de autofagia, de interés creciente en la materia y que algunos estudios colocan como principal promotor de la proteólisis en pacientes con caquexia (47). En condiciones fisiológicas, la autofagia funciona en el tejido musculoesquelético como depurador de organelas y proteínas dañadas. En una cohorte de pacientes se observaron altos niveles de algunos factores mediadores de autofagia como Beclin1, ATG5 (proteína 5 de la autofagia) y MAP1LC3B (48) así como FOXO1, factor de transcripción que también promueve la autofagia (38). Por último, las proteasas dependientes de calcio, conocidas como calpaínas, se han asociado al inicio de la degradación de las miofibrillas musculares en caquexia, pero los hallazgos al respecto son escasos por ahora. Ya que el sistema ubiquitina-proteasoma solo degrada péptidos, siendo incapaz de desmontar las proteínas miofibrilares hasta que no han sido liberadas como miofilamentos (sustrato que sí pueden entrar a la cámara catalítica), se ha propuesto que el sistema de escisión por calpaínas podría funcionar como iniciador de la ruptura (49), aunque no parece que estén implicadas en la ruptura masiva de las proteínas sarcoplásmicas. Un posible mecanismo de atrofia muscular descrito en modelos animales de hepatoma AH-130 podría ser la regulación a la baja en la expresión de calpastatina, el inhibidor endógeno del sistema de las calpaínas (50).

Un campo emergente de estudio intenta desentrañar el papel de los miRNA (moléculas de RNA no codificantes con capacidad regulatoria a nivel postranscripcional) en la patogénesis de la caquexia tumoral, ya que estas moléculas no ejercen efectos tan solo a nivel local, sino que pueden ser transportadas a distancia contenidas en vesículas denominadas exosomas (51). Se ha comprobado en modelos animales cómo las moléculas miR-21 y miR-29a son secretadas por células tumorales y mediante su unión a receptores TLR7/8 desencadenan una respuesta inflamatoria que promueve las metástasis (52), o cómo miR-21 puede inducir respuestas de muerte celular en mioblastos a través de receptores TLR7 tras alcanzar tejido muscular mediante microvesículas procedentes de tumores pancreáticos o pulmonares (53). Asimismo, en ratones portadores de tumores LLC las moléculas Hsp70 y Hsp90 pueden ser liberadas mediante vesículas extracelulares y orquestar una respuesta inflamatoria a través de receptores TLR4 para causar atrofia del tejido muscular (54).

Las alteraciones en las vías anabólicas también contribuyen al mantenimiento y progresión de la caquexia. En modelos murinos y humanos se han encontrado bajos niveles de IGF-1 (55), importante factor promotor de la síntesis proteica vía mTOR (Figura 1). IGF-1 se une a su receptor tirosina-quinasa e induce la transfosforilación del receptor dimérico, lo que facilita el reclutamiento del factor IRS1, encargado de activar la vía de PI3K/Akt (56). La señalización de IGF-1/PI3K/Akt no solo aporta estímulo anabólico, sino que puede suprimir la transcripción de Atrogin-1 (57), ya que Akt mantiene a FOXO3 fosforilado, es decir, retenido en el citoplasma (58). Ahora bien, los supresores de la señalización SOCS-1 y SOCS-3, cuya expresión aumenta por acción de ciertas citocinas, promueven la degradación de IRS1 de tal modo que agotan la señal del receptor de insulina (59), lo que podría explicar la resistencia insulínica que aparece en los estados de caquexia tumoral y el defecto en las señales de la vía anabólica. Ahora bien, la actividad de Akt en tejido muscular no se encuentra reducida en todos los modelos de caquexia, ya que se los niveles de Akt fosforilado pueden permanecer

invariables aun con niveles de insulina o IGF-1 marcadamente reducidos (56), aunque se desconoce el motivo de dicha variabilidad.

Se ha comprobado en modelos LLC que la pérdida de tejido muscular y peso está acompañada del aumento de diversas citocinas proinflamatorias (60). Entre los factores responsables de los cambios a nivel muscular se encuentra una vez más TNF- $\alpha$ , que ejerce efectos catabólicos de forma directa vía NF- $\kappa$ B activando la expresión de ligasas E3 (10). Por otro lado, altera la expresión de proteínas involucradas en la regeneración muscular como MMP-14, afectando a la miogénesis (62) Adicionalmente esta citocina provoca la infiltración de neutrófilos y macrófagos en tejido muscular, lo que empeora aún más las manifestaciones de la caquexia (63). TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis), funciona como inductor de la autofagia y al ser administrada a miotubos promueve la ubiquitinación de la cadena pesada de miosina, aumenta la expresión de MURF1 y activa las caspasas en una cascada de señalización que implica al factor NF- $\kappa$ B (64). La IL-6, que inhibe la síntesis proteica de forma indirecta a través de la supresión de IGF-1 y la activación de AMPK (65), también participa en el proceso de atrofia muscular. TRAF6 (TNF $\alpha$  Receptor Adapter Factor) posee un papel central en la activación de señales de varias citocinas y su actividad se ha visto incrementada en modelos LLC, mientras que su inactivación atenúa la atrofia muscular (66). Aparece sobreexpresada en tejido muscular de pacientes con cáncer gástrico, relacionándose con la pérdida de peso y la expresión de ubiquitina (67). Entre las sustancias secretadas por el tumor destaca PIF (Factor inductor de la proteólisis), molécula que activa también el sistema Ubiquitina-Proteasoma vía NF- $\kappa$ B, promoviendo la degradación proteica al ser inyectada en modelos animales (68).

La Angiotensina II aparece implicada en el proceso precaquético reduciendo los niveles de Akt fosforilado y aumentando la actividad de las ligasas MURF1 y Atrogin1, lo que conduce a atrofia muscular, además de reducir los niveles circulantes de IGF-1 (69). Aparte de su efecto catabólico, la angiotensina II actúa directamente sobre células hipotalámicas alterando el balance entre factores orexigénicos y anorexigénicos, resultando en una falta de apetito (15). Sus niveles aparecen elevados en pacientes con caquexia y se correlacionan tanto con la sarcopenia como la supervivencia (63).

Pese al gran interés que pueden suscitar, son pocos los estudios que tratan de comparar los cambios observables en el músculo esquelético en etapas tempranas y tardías de la caquexia. Un análisis molecular comparativo en modelos C26 encontró mayor expresión de FOXO3a y Atrogin1 (pero no de MuRF1) en caquexia avanzada respecto a caquexia temprana, así como niveles bajos de PGC1 $\alpha$  en caquexia avanzada pero no en etapas iniciales. Estos hallazgos sugieren que las moléculas implicadas en la pérdida de tejido muscular podrían diferir según el momento de la enfermedad (70).

Por último, cabe señalar que el impacto de la caquexia sobre el tejido muscular no es igual para todas las fibras. La activación del factor de transcripción FOXO1 afecta mayoritariamente a las fibras tipo II (de contracción rápida o glucolíticas), mientras que la mayor abundancia de PGC1 $\alpha$  en las fibras oxidativas (Tipo I) las protege de la activación de FOXO3, también involucrado en las vías catabólicas (71). Así, en general, la caquexia afecta en mayor medida a la fibra tipo II, con un cambio observable a nivel histológico de fibras de tipo rápido a fibras de tipo lento, de forma similar al inducido por glucocorticoides (71).

## 2.4 CAMBIOS EN EL TEJIDO ADIPOSEO

La función de reserva del tejido adiposo reside en la capacidad de los triglicéridos para almacenar energía de una forma mucho más eficiente que los carbohidratos; energía que es liberada desde los depósitos tras el ejercicio o el ayuno prolongado mediante la hidrólisis que tiene lugar en los adipocitos. Pero la grasa no es un tejido inerte destinado únicamente al depósito de lípidos. Se integra en el sistema metabólico como un componente complejo y altamente organizado, con funciones paracrinas y endocrinas poco estudiadas (72). Además del tejido muscular, una buena parte del peso perdido en el transcurso de la caquexia responde a la depleción de tejido graso, aunque los estudios se han enfocado claramente en el primero. Sin embargo, la evidencia creciente sugiere que la pérdida de grasa aparece como un evento temprano en la patogénesis de la caquexia tumoral, precediendo a la destrucción de músculo esquelético y sucediendo de forma más rápida (73).

La lipólisis constituye la principal característica del tejido adiposo en el proceso de caquexia, independientemente de la desnutrición, aumentando hasta en un 40% en aquellos pacientes en los que se detecta hidrólisis completa sin reesterificación, así como un incremento del 20% en la oxidación de ácidos grasos libres respecto a individuos sanos (74). El incremento está condicionado principalmente por la acción de factores inflamatorios, pero también influyen la activación  $\beta$ -adrenérgica y la liberación de promotores de la movilización lipídica que serán comentados posteriormente (15). Como producto de la hidrólisis, podemos detectar altos niveles de glicerol y ácidos grasos libres en el suero de los pacientes caquéticos (74).

Las principales enzimas que contribuyen a la degradación de triglicéridos en el tejido adiposo son la ATGL (Adipo-triglicérido lipasa), la HSL (Lipasa sensible a hormonas) que se encuentra regulada por factores como insulina, catecolaminas o glucagón, y por último la MGL. Las tres enzimas actúan de forma secuencial para la hidrólisis de los triglicéridos (75), siendo la ATGL responsable del paso inicial y la más activa en situación basal. La activación de la HSL constituye un paso limitante en la lipólisis y está mediada por factores lipolíticos que actúan sobre receptores  $\beta$  adrenérgicos (acoplados a proteínas G). Su activación incrementa los niveles intracelulares de AMPc, que al unirse a la Proteína Kinasa A (PKA) provoca la disociación de las subunidades reguladoras de las subunidades catalíticas, aumentando así la actividad de la enzima. La PKA activada fosforila a la HSL en múltiples lugares y pone en marcha la lipólisis (76). Frente a la activación  $\beta$  existen receptores  $\alpha$ -2 que contrarrestan su acción y sientan un equilibrio inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa. Además de la  $\beta$ -adrenérgica existe otra vía de activación de la HSL mediante PKG exclusiva de los primates. En este caso, la señal proviene de los llamados péptidos natriuréticos (sintetizados principalmente en el corazón), cuyo receptor activa a la enzima guanilato ciclasa para generar GMPc (77). Por último, en situaciones no catabólicas, la insulina destaca como un potente inhibidor de la lipólisis, mediante una cascada que implica a PI3K y cuyo objetivo es disminuir los niveles de AMPc a través de su hidrólisis a 5'AMP (en la Figura 2 se recogen las vías de señalización involucradas y los factores que participan en su activación durante la caquexia). Resulta notable que el tejido adiposo visceral sea más sensible al efecto lipolítico de las catecolaminas, pero menos al efecto antilipolítico de la insulina en comparación con el tejido adiposo subcutáneo (76).

Varios estudios apuntan a una mayor sensibilidad de la enzima HSL en respuesta a los agentes activadores, tanto catecolaminas como péptidos natriuréticos, en pacientes con cáncer que muestran pérdida de peso (77). Sustentando esta idea, existen ensayos que constatan aumentos del 50% en la expresión génica de la HSL y el 100% de la proteína en adipocitos de pacientes caquéticos (78), pero se ha observado que los niveles séricos de hormonas con efecto activador



sobre la HSL permanecen inalterados en estos pacientes (79). Este hallazgo lleva a pensar que los factores que condicionan una mayor lipólisis han de explicarse por cambios a nivel de la transducción de señales o nivel post-receptor. En este sentido se han observado aumentos marcados de la expresión del receptor ADRB1 ( $\beta$ -1 adrenérgico) en adipocitos de pacientes con caquexia tumoral existiendo una correlación significativa con la tasa lipolítica (79).

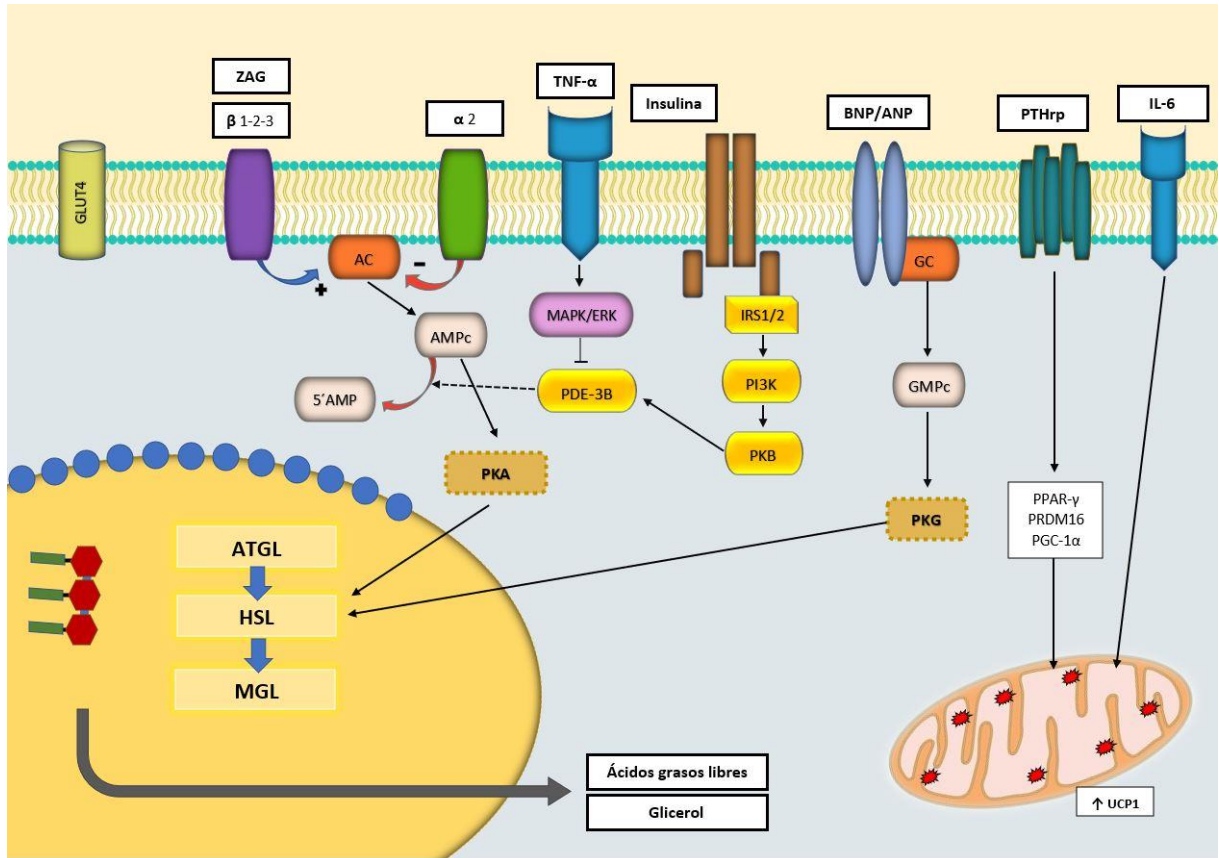


Figura 2 Factores y vías de señalización que participan en la activación de la lipólisis durante la caquexia tumoral.

Un estudio llevado a cabo por *Das et al* puso de manifiesto la importancia de la ATGL en la patogenia de la caquexia asociada a cáncer, ya que la ablación del gen de esta enzima fue capaz de prevenir la lipólisis en modelos murinos C26 (80). Curiosamente, los investigadores observaron cómo la ausencia del gen ATGL no solo previno la degradación de tejido adiposo, sino que ayudó a preservar la masa muscular disminuyendo la activación del sistema ubiquitina-proteasoma en miocitos; efectos que la ablación de HSL también reproduce, aunque en menor medida.

El aumento de la sensibilidad en la respuesta de la HSL a hormonas lipolíticas junto con el aumento de su expresión explica el incremento de la lipólisis en la caquexia tumoral, pero cabe preguntarse qué elementos median su activación. Los factores inflamatorios que surgían en respuesta a la presencia tumoral son en parte responsables del fenómeno, pero en menor medida en comparación con la inducción de la atrofia muscular. Se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  aumenta la actividad de la HSL en el tejido adiposo blanco en estudios in vitro, además de



reducir el número de receptores de insulina y transportadores GLUT-4 en la membrana de los adipocitos (encargado de incorporar la glucosa que servirá como sustrato para la lipogénesis) (81). La activación de la lipólisis por parte del TNF- $\alpha$  ocurre por la vía MAPK/ERK, que además conduce a la fosforilación de PPAR- $\gamma$ , inhibiendo la diferenciación de preadipocito a adipocito y afectando a la adipogénesis (82). Además, el TNF- $\alpha$  disminuye la actividad de la lipoproteinlipasa, de modo que los triglicéridos absorbidos en la dieta no pueden ser hidrolizados y captados por los adipocitos para su posterior almacenamiento (83). Aunque las células del tejido graso tienen capacidad para secretar TNF- $\alpha$ , los estudios con microarray en modelos de caquexia no respaldan que los adipocitos constituyan la fuente de esta citocina, apuntando más bien a macrófagos que infiltran el tejido durante el proceso (15). Ahora bien, parece probable que la activación de vías de señalización relacionadas con la inflamación (en particular NF- $\kappa$ B) y la activación del inflammasoma en los propios adipocitos contribuyan a la activación de las vías catabólicas, tal y como se ha comprobado en modelos experimentales (84).

La búsqueda de factores secretados por el tumor con actividad lipolítica llevó al descubrimiento de LMF (Lipid Mobilizing Factor) a partir de modelos murinos de cáncer y en orina de pacientes caquéticos. LMF resultó ser un homólogo de la secuencia aminoácida de la proteína plasmática ZAG (Zinc-alpha-2-glycoprotein), secretada en grandes cantidades por el tejido adiposo y en mayor medida en pacientes caquéticos, correlacionándose con la pérdida de peso (85). ZAG promueve la pérdida de grasa por varias vías. Por un lado, activa a la HSL mediante los receptores  $\beta$ -3 (igual que las catecolaminas), por una vía dependiente de AMPc, pero también aumenta la expresión de proteína UCP-1 en tejido adiposo marrón con el consecuente aumento del gasto energético basal que conlleva (7857). Curiosamente su acción sobre el músculo esquelético ofrece cierta vía de salvamento, ya que estimula la síntesis proteica y frena la degradación tisular, pero también induce la expresión de UCP-2 y UCP-3 en miocitos (78).

La adipogénesis comprende el proceso en el cual se reclutan nuevos adipocitos (preadipocitos) seguido de una etapa de maduración. Esta secuencia requiere una activación ordenada de factores de transcripción que determinan la expresión de marcadores específicos en cada estadio. En las etapas iniciales se observa la expresión de C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ ) y C/EBP $\delta$ , que inducen a su vez la expresión de PPAR- $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . Estos últimos factores funcionan como reguladores en el proceso de diferenciación final (86). Ya desarrollados los adipocitos, la actividad del factor de transcripción SREBP-1c (Sterol-Responsive Element-Binding Protein 1c) media la activación de vías lipogénicas para que la célula comience a almacenar sustrato (86).

Un estudio llevado a cabo por *Bing et al* analizó los cambios moleculares en el tejido adiposo blanco de modelos animales de caquexia tumoral (ratones portadores de MAC16), observando reducciones importantes en la expresión de factores adipogénicos como C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1c, con una caída muy marcada en caso de C/EBP $\alpha$  (87). En el mismo ensayo se demostró un incremento pronunciado de los niveles de ARNm de ZAG y una supresión de la proteína GLUT-4, así como la inducción de PGC-1 $\alpha$ . La sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  en adipocitos blancos especializados en el almacenamiento de energía induce la expresión de UCP-1, proteínas de la cadena respiratoria y enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos, es decir, su presencia confiere cierto fenotipo de adipocito marrón (88).

En lo que respecta a la insulina, principal factor antilipolítico, son varios los estudios que apuntan a un fenómeno de resistencia que dificulta la acción señalizadora, aunque se desconoce si esta asociación responde a una consecuencia de la caquexia o forma parte de la patogenia. Este fenómeno podría deberse a la acción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-6, las cuales pueden estimular la expresión de SOCS-1 y SOCS-3 (Supresor Of Cytokine Signalling) que median la degradación de IRS-1 e IRS-2, moléculas vitales para la señalización del receptor insulínico (59, 89).

El tejido adiposo blanco es el principal componente de la grasa, distribuyéndose en depósitos subcutáneos y viscerales con una función esencial de almacén energético, mientras que el tejido adiposo marrón representa una minúscula parte en comparación con este y su cometido se dirige hacia el gasto energético, función determinada por la expresión de proteínas UCP. Los orígenes celulares de ambas formas son muy distintos. Los preadipocitos marrones expresan marcadores genéticos de músculo y surgen a partir de progenitores Myf5+, es decir, guardan parentesco con los miocitos (90). En adultos suelen aparecer depósitos cerca de la aorta y en región supraclavicular que son activados mediante exposición crónica al frío o tratamiento con fármacos  $\beta$ -agonistas (91). Por otro lado, como explicamos anteriormente, ante ciertos estímulos los adipocitos blancos pueden sufrir una transformación celular diferenciándose hacia adipocitos beige o también llamados brite (brown in white), proceso denominado browning. Cabe señalar que no todos los depósitos de grasa tienen la misma capacidad para desarrollar células beige. En modelos murinos en los que se induce el browning podemos ver cómo en el tejido adiposo blanco inguinal se desarrollan numerosos adipocitos beige, mientras que el tejido adiposo blanco epididimal apenas responde al estímulo (92). El fenómeno de browning constituye, tras la lipogénesis, la segunda contribución del tejido adiposo al proceso de caquexia tumoral, siendo en buena medida responsable del aumento del gasto energético total gracias a la expresión de proteínas UCP1 en sus mitocondrias y el aumento del consumo mediante mecanismos de termogénesis (93).

Diversos estudios apuntan a que el browning representa un hallazgo constante en varios modelos experimentales de caquexia tumoral y en algunos pacientes caquéticos (94), siendo detectable en algunos casos en estadios de precaquexia sin que exista aun pérdida de tejido muscular (30). Se trata de un fenómeno independiente de la temperatura ambiental y cuya aparición está ligada a la presencia de ciertos mediadores inflamatorios y factores secretados por el tumor (30).

Para el desarrollo de células beige en tejido adiposo blanco es necesario activar un programa de expresión génica especial, donde destacan los factores PPAR- $\gamma$ , PRDM16 y PGC-1 $\alpha$  (95). El factor de transcripción PPAR- $\gamma$  constituye un elemento indispensable para la diferenciación y supervivencia de adipocitos blancos y marrones, cuya activación induce la expresión de UCP-1 y otros genes relacionados con la biogénesis mitocondrial (como CPT-1M y Elovl3), a la vez que inhibe la expresión de genes propios de la grasa blanca (95). En cuanto a PRDM16, un regulador transcripcional necesario y suficiente para la transformación a adipocitos beige, se ha comprobado que modelos LLC KO para PRDM16 de forma específica en tejido adiposo reducen drásticamente su potencial termogénico, inhibiendo el browning y mejorando la pérdida de grasa en el transcurso de la caquexia tumoral (25).

La forma y vías por las que un tumor es capaz de inducir el browning son cuestiones apenas resueltas. La PTHrp (Parathiroyd hormone- related protein), un polipéptido implicado en la

homeostasis del calcio secretado por algunos tumores ha sido propuesto como agente inductor del fenómeno de browning, promoviendo la expresión de genes termogénicos y relacionados con el metabolismo energético, como UCP-1, Dio2 y PGC-1 $\alpha$  (26). En pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal y pulmonar con síntomas de caquexia se encontraron elevados niveles de PTHrp, correlacionándose con el incremento del gasto energético basal y una mayor pérdida de tejido (25). Además de la secreción de moléculas como PTHrp, la activación  $\beta$ -adrenérgica junto con la inflamación sistémica podrían participar en la activación del browning (30). La IL-6 parece jugar también un papel importante, siendo capaz de impulsar la expresión de proteínas UCP-1 (30, 31). Modelos KO para IL-6 en tumores o su neutralización con anticuerpos afecta negativamente al desarrollo del browning y reduce la pérdida de tejido adiposo (30).

Recientemente se ha descubierto cómo algunas neoplasias pueden promover el browning a través de circRNA (ARN no codificante implicado en la regulación de la expresión génica). Concretamente en pacientes con cáncer gástrico se observó como exosomas procedentes de células tumorales podían liberar ciRS-133 que alcanzaban preadipocitos, activando el programa de diferenciación hacia células beige a través de la regulación positiva de PRDM16 y el secuestro de miR-133 (96).

Tal y como explicamos previamente, la lipólisis constituye un evento crucial en la caquexia tumoral y su incremento ha sido demostrado *in vivo* (78). En sujetos normales el músculo esquelético funciona como el principal lugar de oxidación de los ácidos grasos, de modo que en individuos con un peso estable los adipocitos apenas contribuyen a su metabolismo. El control sobre qué sustrato energético es empleado por la célula viene regulado por el complejo piruvato deshidrogenasa (CPD), cuya inactivación conduce a una oxidación preferencial de ácidos grasos sobre la glucosa. La inactivación del CPD corre a cargo de las Piruvato Deshidrogenasa Quinasas (PDK), encargadas de fosforilar la subunidad E1 en respuesta a la expresión de PPAR- $\gamma$  (97). Un estudio reciente que examinó biopsias de tejido graso de pacientes afectados de neoplasias gastrointestinales observó que el factor CIDEA (Cell death Inducing DNA fragmentation factor- $\alpha$ -like Effector A), parecía implicado en la regulación del actividad del CPD (98). Aumentos en la expresión de CIDEA se correlacionan con una mayor expresión de PDK, lo que disminuye la actividad del CPD y conduce a los adipocitos a una oxidación preferencial de ácidos grasos sobre glucosa (98), de modo que el metabolismo lipídico se reprograma para consumir el exceso de ácidos grasos que pueden detectarse en individuos caquéticos. Además, CIDEA es capaz de interactuar con la subunidad  $\beta$ 1 de AMPK y evitar la formación del complejo proteico hasta desestabilizarlo, habiéndose demostrado una regulación al alza de CIDEA en tejido adiposo de modelos caquéticos (99). Esta hipótesis puede aclarar la falta de actividad de AMPK en la caquexia tumoral, pese a la situación de baja reserva energética, lo que conduce a una mayor lipólisis y lipogénesis y por tanto mayor gasto energético (99).

## 2.5 COMUNICACIÓN INTERTISULAR

La caquexia tumoral afecta a múltiples tejidos del organismo de forma simultánea. Con todo, músculo esquelético y tejido graso constituyen los centros metabólicos esenciales alrededor de los cuales acontecen los eventos definitorios de la enfermedad, pero la interacción entre ambos durante el proceso de caquexia no se conoce por completo. Ambos tejidos tienen la capacidad de liberar señales que, de manera recíproca, participan en la regulación de la masa muscular y grasa. Por ejemplo, los adipocitos blancos pueden liberar TNF, cuyas consecuencias sobre el catabolismo muscular ya conocemos. De forma análoga el músculo esquelético puede secretar IL-6 e IL-15, factores que influyen en la lipólisis del tejido graso (61).

Los estudios de *Das et al* en modelos de caquexia tumoral donde la ablación de la enzima ATGL derivó en un falta de activación de la proteólisis en músculo esquelético, despertaron la atención sobre esta vía de comunicación intertisular. En líneas generales, se postula que los ácidos grasos liberados desde el tejido adiposo en grandes cantidades ejercen un efecto lipotóxico sobre el músculo esquelético (100). Los miotubos expuestos a ácidos grasos saturados y ceramidas incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno y la expresión de proteínas inflamatorias, pudiendo inducir la apoptosis de los miocitos (80). Otro fenómeno acompañante que ha sido descrito en pacientes con cáncer y pérdida de peso es la aparición de numerosas gotas lipídicas intramiocelulares, como reflejo de una infiltración de tejido adiposo en músculo (100). Asimismo, al neutralizar la acción PTH-rp (molécula sin actividad directa sobre los miocitos) inhibimos el browning y conseguimos reducir tanto la pérdida de tejido adiposo como muscular, hallazgo que nos habla de vías de comunicación todavía no comprendidas que podrían conectar el browning del tejido adiposo con la atrofia muscular (25). Profundizar en las vías de comunicación intertisular excede los objetivos de este trabajo, pero la mera idea resulta útil para comprender las intrincadas conexiones metabólicas que se ven involucradas en la enfermedad y sus posibles implicaciones terapéuticas (Figura 3).

Dentro de los múltiples tejidos que orquestan la reacción inflamatoria sistémica propia de la caquexia podemos hablar de dos órganos con funciones amplificadoras. Por un lado, el hígado contribuye al estado hipermetabólico al recibir la señal de citocinas como la IL-6, que activa la respuesta de fase aguda de forma mantenida promoviendo el catabolismo tisular (15) o el TNF- $\alpha$  que incrementa los niveles de cardiolipina en las mitocondrias hepáticas causando un mayor gasto energético (96). Por otro lado, el hipotálamo, que de nuevo detecta la señal de TNF- $\alpha$  e IL-6 procedente de la circulación sistémica y responde con la producción de más mediadores proinflamatorios a nivel local que alteran el equilibrio en los centros de regulación del apetito y activa el eje hipófiso-adrenal contribuyendo de tal modo a la atrofia muscular (102).

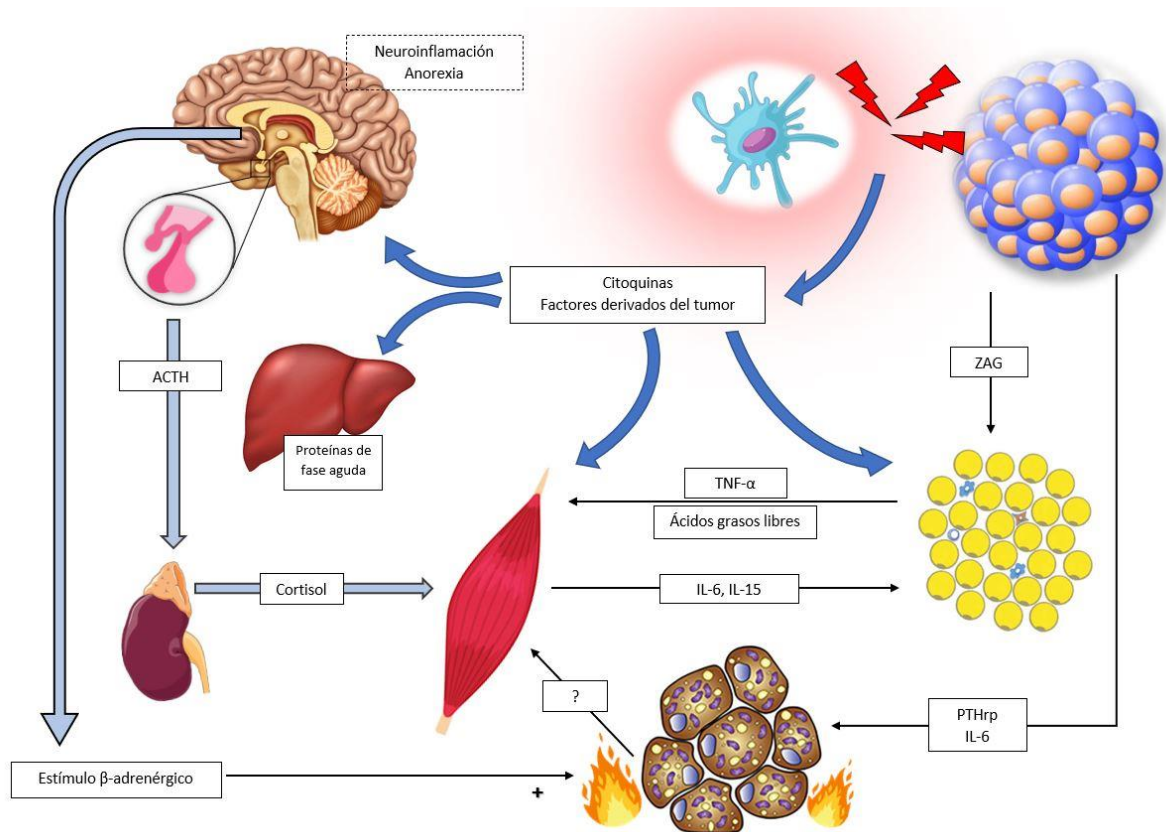


Figura 3 Señales moleculares entre los distintos tejidos que participan en la fisiopatología de la caquexia tumoral.

## 2.6 REGULACIÓN NEUROENDOCRINA

Hasta ahora hemos abordado la caquexia tumoral desde una perspectiva puramente fisiopatológica, sin ahondar en otras circunstancias biológicas que resultan determinantes en la evolución de la enfermedad. Pero eventos como los trastornos depresivos, alteraciones digestivas o efectos adversos de la terapia antitumoral pueden agravar el curso clínico de la caquexia de forma independiente. Sin embargo, la anorexia, un síntoma percibido de forma popular como predictor de mal pronóstico, comparte orígenes etiológicos con la caquexia y además actúa de forma sinérgica con esta, empeorando el estado metabólico y nutricional de los pacientes. Así, hoy en día se habla del Síndrome de Anorexia-Caquexia para identificar una entidad extremadamente frecuente en el ámbito de la oncología médica y de aparición casi constante en estadios avanzados de la enfermedad tumoral (4).

El control de la homeostasis energética en el organismo corre a cargo del hipotálamo, donde determinadas áreas integran información periférica y ejecutan respuestas coordinadas con el fin de ajustar el balance de gasto energético e ingesta. En regiones concretas como son el núcleo arcuato y paraventricular, así como el hipotálamo ventromedial encontramos poblaciones neuronales que ejercen efectos antagónicos sobre la ingesta y el gasto (Figura 4). Por un lado, las neuronas anorexigénicas POMC (Proopiomelanocortin) y CART (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript) y por otro lado las orexigénicas AgRP (Agouti-related Peptide) y NPY (Neuropéptido Y) (103). Las neuronas POMC liberan en sus proyecciones  $\alpha$ -

MSH y conforman junto con las poblaciones AgRP-NPY el sistema melanocortina, cuyo funcionamiento sienta las bases de la regulación energética: la activación de neuronas POMC libera  $\alpha$ -MSH que disminuye la ingesta e incrementa el gasto energético a través de su unión a receptores MC3R y MC4R, siendo este último el más ampliamente distribuido (104). La estimulación crónica de los receptores MC4R es capaz de producir anorexia, pérdida de peso y un incremento marcado en el gasto metabólico principalmente a través de la termogénesis (104). En cambio, la acción de AgRP-NPY determina una reducción del gasto y estimula la ingesta a través de su acción antagonista sobre receptores MC4R a la vez que inhibe la actividad de neuronas POMC (105). Son las señales periféricas que alcanzan el hipotálamo aquellas que ajustan el equilibrio entre estos factores. Mientras que la ghrelina estimula el apetito activando la secreción de AgRP, hormonas como la insulina, leptina o GLP-1 inhiben la ingesta actuando a este mismo nivel (103).

En el contexto de la enfermedad tumoral la falta de apetito y la saciedad precoz son síntomas frecuentes en la evolución clínica. Los estudios sugieren que el estado inflamatorio mantenido es responsable de la activación de vías anorexigénicas junto con la inhibición de vías orexigénicas, lo que provoca una marcada reducción de la ingesta (106). Bajo esta circunstancia subyacen alteraciones funcionales en aquellas áreas del SNC involucradas en la homeostasis energética y que participan en la aparición de anorexia, la reducción del aporte energético y el aumento del catabolismo tisular. Para *Burfeind et al* el hipotálamo funciona a modo de receptor y amplificador de la inflamación sistémica, de modo que los factores inflamatorios que alcanzan esta región cerebral ya bien sea mediante transportadores o a través de órganos circunventriculares no solo ejercen efectos neuroinflamatorios a nivel local, sino que pueden inducir la síntesis de citocinas en el propio hipotálamo (106). Se han observado incluso ciertas alteraciones en el sistema melanocortina capaces de explicar la aparición de caquexia en modelos murinos. Por ejemplo, ratones KO para el receptor MC4R se mostraron resistentes al desarrollo de caquexia (107), pero no así tras la delección genética de MC3R, hallazgo que estudios posteriores confirmaron mediante el uso de antagonistas de MC4R (108).

Algunos estudios hablan de un defecto fundamentalmente en las señales orexigénicas centrales observado en modelos murinos (109). En ratones portadores de tumores caquectizantes se han hallado bajos niveles de leptina e insulina, situaciones bajo las cuales aumenta tanto la expresión del receptor de leptina como la expresión de NPY en hipotálamo. Es decir, la respuesta periférica frente al estado de déficit energético se conserva, así como la respuesta hipotalámica; por lo que el defecto de señalización debe localizarse en puntos inferiores de la cascada, bien en el transporte o liberación de NPY o incluso por interferencia de ciertos factores con el receptor diana del neuropéptido (109).

Respecto a los factores inflamatorios que actúan a nivel central destacan la IL-1 y TNF- $\alpha$  como los agentes con mayor poder anorexigénico, detectándose niveles elevados de ambas citocinas en el LCR de modelos murinos con tumores. En relación con la IL-1, a nivel central predomina en su forma IL-1 $\beta$ , encontrándose receptores para esta citocina en poblaciones neuronales POMC y CART (110). La inyección intraventricular de IL-1 incrementa de forma rápida la frecuencia de disparos de estas células y estimula la liberación de  $\alpha$ -MSH, consiguiéndose un efecto máximo al ser inyectada en el hipotálamo ventromedial (111). En cambio, la administración de antagonistas del receptor de IL-1 en esta misma región disminuye la anorexia en modelos murinos (112). Pero la IL-1 no solo ejerce acción anorexigénica a nivel central, sino que también es capaz de activar el eje hipófisis-adrenal promoviendo así la lipólisis y degradación proteica (113). Esto no sucede sin embargo al administrar IL-1 intraventricular en

ratones adrenalectomizados o en modelos KO para el receptor de glucocorticoides (114), lo que apuntala a esta vía como un mecanismo central para el mantenimiento de la caquexia.

De forma similar, TNF- $\alpha$  posee cierto protagonismo a nivel hipotalámico, puesto que la mera inyección intraventricular en ratones es suficiente para provocar anorexia y aumento del gasto energético a expensas de la termogénesis, cuya activación viene mediada por el estímulo de los receptores  $\beta 3$  en el tejido adiposo marrón (102, 115). Tras ser administrado periféricamente en ratones, se comprobó cómo el aumento de sus niveles periféricos se correlacionaba con una mayor expresión de mRNA de POMC en hipotálamo, así como una menor expresión de AgRP (111), consiguiendo inclinar el balance energético hacia un estado de mayor gasto y reducir la ingesta. A estos hallazgos se sumaba un descenso concomitante de los niveles de ghrelina, cuya administración previa a la infusión de TNF- $\alpha$  conseguía revertir la disminución de la ingesta que provocaba dicho factor (111). Sin embargo, tanto el efecto anorexigénico de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$  en modelos donde estas citocinas son administradas mediante inyección intraventricular de forma continua acaba generando taquifilaxia (114), por lo que cabe pensar que otros factores puedan tomar relevo en el mantenimiento y amplificación del estado catabólico persistente que caracteriza a la caquexia tumoral.

Varios estudios sugieren la existencia de una disfunción de circuitos serotoninérgicos en la anorexia asociada a cáncer, en parte por sus estrechas conexiones con las estructuras hipotalámicas implicadas en la regulación del apetito. Por un lado, se conoce desde hace décadas el efecto anorexigénico de la serotonina interfiriendo con el proceso de traducción de elementos que intervienen en la secreción de NPY (114). Asimismo, se ha observado cómo modelos murinos tumorales con disminución en la ingesta muestran un aumento de la disponibilidad del neurotransmisor a nivel hipotalámico, con un incremento en la densidad de receptores HT1 $\beta$  en núcleo paraventricular y supraóptico (116). Si bien no disponemos de métodos para cuantificar los niveles de serotonina en pacientes, sí existen estudios que vinculan niveles anormalmente altos de triptófano (precursor de la serotonina) en LCR a la presencia de anorexia en pacientes con cáncer (117). IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 estimulan la liberación y producción de serotonina en hipotálamo (118, 119), por lo que su acción podría explicar la aparición de anorexia en estados inflamatorios mantenidos como la caquexia asociada a cáncer.

Otros factores que actúan a nivel central son LIF, citocina secretada por el propio tumor capaz de inducir la pérdida de tejido adiposo y activar neuronas POMC del núcleo arcuato sin generar taquifilaxia como sí ocurría con el TNF- $\alpha$  (120); PTHrp, que al ser administrado periféricamente disminuye la ingesta y el vaciamiento gástrico mediante la activación de urocortinas 2 y 3 y la inhibición de la motilidad gastroduodenal (121) provocando un balance energético negativo; o la esfingosina-1-fosfato, lípido bioactivo producido por algunos tumores que promueve el gasto energético y la anorexia mediante la activación mantenida de STAT3 y las neuronas del sistema melanocortina que expresan en gran cantidad el receptor S1PR1 (122)

A nivel periférico y de forma general, parece conservarse la respuesta de aquellos factores que tratan de compensar el desbalance energético. La ghrelina, el principal factor orexigénico intestinal, se secreta desde células gástricas y se eleva en periodos preprandiales estimulando la ingesta a corto plazo y el peso corporal a largo plazo. Por lo común, los pacientes caquéticos presentan altos niveles de ghrelina (123), un mecanismo compensatorio que parece fallar por resistencia a nivel hipotalámico, donde no se ven aumentos en la acción de péptidos orexigénicos centrales, probablemente debido a los mecanismo de resistencia que abordamos con anterioridad en el caso del NPY. La administración de ghrelina en modelos murinos de caquexia tumoral consigue mejorar la ingesta y el peso, revirtiendo con éxito la pérdida de masa

magra (124). Es posible que este efecto sobre el músculo esté mediado por la vía anabólica de IGF-1, secretada a nivel hepático en respuesta a la liberación de GHRH hipotalámica, por lo que frena el aumento de la degradación proteica. Además de los mencionados, otro efecto de la ghrelina es la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias (124).

Otras hormonas como la adiponectina, resistina o la obestatina podrían estar implicadas en las alteraciones metabólicas que suceden en la caquexia tumoral, aunque su relación con la fisiopatología no ha sido estudiada en profundidad y su utilidad como marcadores será tratada posteriormente.

Por lo tanto, podemos concluir que en el contexto de la inflamación sistémica crónica que caracteriza a la caquexia tumoral, las áreas hipotalámicas asociadas a la regulación de la homeostasis energética responden de forma parcial pero defectuosa a la señal compensatoria de factores periféricos como la ghrelina, siendo incapaces de restituir el déficit metabólico. Además de amplificar la respuesta, el hipotálamo activa vías catabólicas como el eje adrenal que perpetúa los procesos de lipólisis y proteólisis, acentuando la atrofia tisular iniciada por los factores inflamatorios in situ.

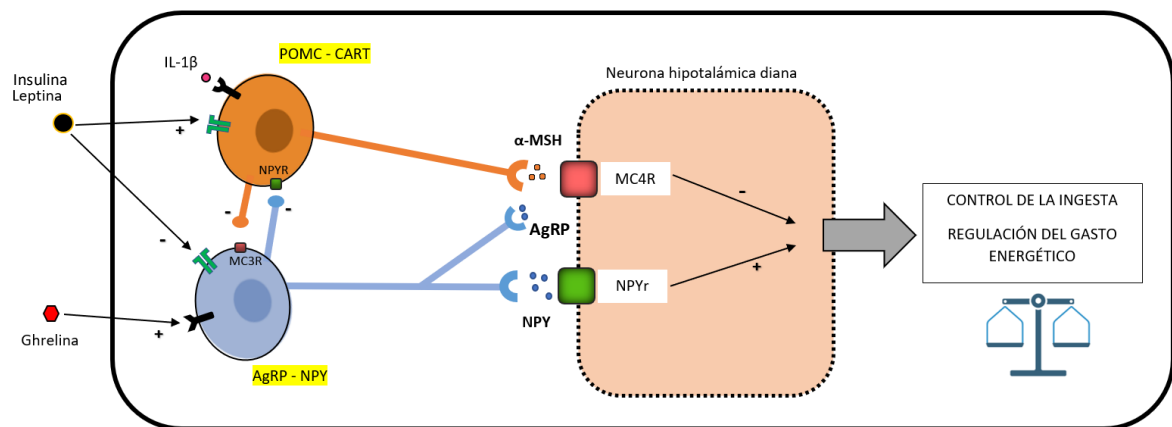


Figura 4 Vías neuroendocrinas que regulan la homeostasis energética a nivel hipotalámico. La activación de neuronas POMC/CART induce la liberación de α-MSH sobre neuronas que ajustan el balance energético determinando un aumento del gasto y disminución de la ingesta.



### 3. OBJETIVOS

En la actualidad resulta indiscutible la importancia clínica de la caquexia tumoral, tanto su impacto en la mortalidad como en la calidad de vida de los pacientes oncológicos. Si bien estos datos respaldan los avances sobre el conocimiento de la enfermedad, en la práctica no se dispone de marcadores que permitan un diagnóstico precoz y los tratamientos existentes se limitan a la corrección de los síntomas, es decir, la única medida eficaz consiste en la curación del cáncer. En este trabajo pretendemos realizar una revisión bibliográfica sobre la búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas, tanto aquellos que han sido propuestos a nivel preclínico como aquellos con potencial traslacional en un futuro y abordar su relación con las bases fisiopatológicas de la enfermedad. Asimismo, trataremos de dar respuesta a algunas cuestiones como qué terapias disponibles en la actualidad han demostrado eficacia o el reto diagnóstico que supone la enfermedad en la práctica clínica. Para ello, trataremos de cubrir los avances más significativos que han surgido estos últimos años e integrar en el marco teórico previo los descubrimientos más recientes.

### 4. MÉTODOS

Se lleva a cabo una búsqueda bibliográfica mediante la base de datos de la U. S. National Library of Medicine (PubMed), la Biblioteca Cochrane y el buscador Google Scholar. Se emplean diferentes combinaciones de palabras clave para guiar la búsqueda: “cachexia markers”, “cachexia biomarker”, “cachexia target”, “cachexia therapy” o “cachexia treatment”.

Se incluyen artículos de estudios experimentales, revisiones narrativas, revisiones sistemáticas, ensayos clínicos y metaanálisis. Dado el gran número de publicaciones obtenidas, se seleccionan aquellos de mayor relevancia en el campo y en especial aquellos que han sido publicados en la última década, con el objetivo de aportar una visión actualizada. Se excluyen estudios de baja fiabilidad científica u obsoletos y aquellos sin interés acorde a los objetivos del trabajo. Se consultan también datos del Global Cancer Observatory y las guías ASCO sobre manejo de caquexia tumoral.

Tras revisar la literatura seleccionada se presentan en el apartado de resultados y discusión los hallazgos más relevantes en el campo de estudio.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 BIOMARCADORES EN CAQUEXIA TUMORAL

Aunque los avances recientes en la fisiopatología de la caquexia tumoral nos permiten entender con mayor profundidad la complejidad del problema, no se ha conseguido trasladar los resultados de forma exitosa a los campos prácticos de la oncología médica. La presentación clínica de la caquexia es heterogénea (15) y depende en gran medida de factores cuya relevancia no conocemos por completo, como el índice de masa corporal del que partía el paciente, la alimentación y la actividad física (3). Aunque se han estudiado aquellas formas de cáncer con mayor incidencia de caquexia (8), no resulta sencillo predecir qué pacientes una vez diagnosticados de su patología oncológica desarrollarán un cuadro de caquexia tumoral o incluso detectar en qué casos el proceso ha dado comienzo. Por lo tanto, el escenario más habitual en el ámbito clínico actual es el de un diagnóstico tardío y basado en la mera pérdida de peso, es decir, descriptivo. Con todo, la definición actual propuesta por *Fearon et al* basándose en la pérdida de masa muscular no parece una herramienta aplicable al contexto asistencial general, ya que la medición de este parámetro requiere de pruebas poco accesibles (125).

Debido a que las opciones terapéuticas en la actualidad son, en general, muy limitadas, un objetivo primordial es la obtención de métodos diagnósticos sensibles y específicos que permitan detectar las fases tempranas de la enfermedad (precaquexia), o al menos reducir en la medida de lo posible el retraso diagnóstico y poder plantear intervenciones efectivas antes de alcanzar el estado de caquexia refractaria. Pese a todo la evolución clínica del síndrome puede ser demasiado rápida, mostrando los pacientes un deterioro acelerado que empobrece el pronóstico de manera importante.

Múltiples estudios han intentado relacionar la concentración de distintos factores con el desarrollo de caquexia, pero hasta el momento no se ha conseguido identificar un marcador que de forma individual posea la validez necesaria para detectar los estadios de precaquexia y caquexia establecida. El fracaso se debe, en gran medida, al carácter multifactorial de la enfermedad y la dificultad para seleccionar individuos en fases tempranas. Sin embargo, sabemos que en la caquexia tumoral existe una cierta cronología, es decir, los cambios suceden en etapas de duración variable que se solapan entre sí (73). Dado que las alteraciones metabólicas se inician antes de la pérdida de masa magra y de la atrofia muscular, debemos enfocar los esfuerzos en elementos específicos de las rutas metabólicas implicadas y quizá también en los factores que ponen en marcha la caquexia (en la Tabla 1 se recogen los más relevantes). Los fracasos en la obtención de biomarcadores individuales apuntan a una estrategia combinada como mejor opción, como pueden ser el uso de paneles diagnósticos que reúnan los mejores marcadores para cada fenotipo o el uso integrado de modelos de inteligencia artificial.

#### 5.1.1 MEDIADORES DE LA CAQUEXIA

La relevancia que poseen las citocinas proinflamatorias en el desarrollo de la caquexia tumoral ha llevado a que estas sean postuladas como marcadores diagnósticos. Las revisiones existentes al respecto muestran una baja evidencia sobre la asociación entre los niveles de TNF- $\alpha$  sérico

y la pérdida de peso en cáncer (125), ya que no se correlaciona con la supervivencia ni parece un factor indispensable para la aparición de caquexia tumoral. En la caquexia asociada a cáncer de páncreas, sí parece existir cierta correlación negativa entre los niveles de esta citocina y el peso e IMC de los pacientes (126). Ahora bien, los estudios adolecen de una falta de homogeneidad ya que la medición del TNF- $\alpha$  en plasma resulta dificultosa por su vida media corta. Una alternativa consiste en medir el receptor soluble TNF-R1 como un marcador más estable de la actividad del sistema TNF (127).

En modelos LLC o melanoma B16 se han evidenciado valores elevados tanto de TNF como de IL-6 y en pacientes con cánceres gastrointestinales los niveles en plasma de IL-6 escalan progresivamente acorde al estadio tumoral (128). Un estudio que recolectó pacientes con distintos tipos de tumores constató cómo la IL-6 aumentaba lentamente al comienzo de la enfermedad mientras que sus niveles ascendían rápidamente hacia estadios avanzados (129). A diferencia del TNF- $\alpha$ , la IL-6 sí funciona como predictor de supervivencia en pacientes con cáncer en estadio avanzado (130), aunque su relación con una baja masa muscular no ha sido del todo investigada, observándose mayor asociación con la pérdida de tejido graso. A pesar de ello, la IL-6 parece un buen candidato como marcador de la inflamación sistémica asociada a cáncer (125). La IL-1 ha sido también estudiada por su asociación con la inflamación sistémica asociada a cáncer (13). En tumores malignos gastrointestinales y pulmonares no microcíticos en estadios avanzados se ha visto que sus niveles reflejan mejor la clínica de pérdida de peso y sarcopenia que los niveles de IL-6 (131).

Niveles elevados de activina A, factor que ejerce su acción a través de la unión al receptor ACTIIB, pueden detectarse en modelos animales de caquexia y su expresión aumenta en tejido tumoral (41). Estudios en pacientes oncológicos que presentan pérdida de peso también demuestran valores elevados de Activina A. Dichos valores se asocian a pérdida de peso a expensas de masa magra (40) y en algunos tipos de cáncer funciona como factor pronóstico de supervivencia (132). La miostatina (GDF-8) comparte receptor con la activina A y actúa también como una miocina que regula negativamente la masa muscular (24). Aunque su expresión en miocitos se encuentra aumentada en caquexia tumoral, estudios en pacientes con cáncer medular de tiroides, pulmonar y colorrectal han hallado niveles bajos en plasma de pacientes caquéticos respecto a pacientes no caquéticos (132). *Breibart et al* demostraron que en pacientes con cáncer que exhibían pérdida de peso se detectaba una menor concentración del pro-dominio de miostatina (fragmento de la promiostatina que se separa del ligando), lo que traducía un descenso en su producción y podía verse como un mecanismo compensatorio para frenar la pérdida de tejido muscular en fenotipos de caquexia no dependientes de miostatina (133).

Otro factor perteneciente a la familia TGF- $\beta$  es GDF-15 (Macrophage Inhibiting Factor 1). Se ha comprobado en pacientes con pérdida de peso asociada a cáncer que ascensos importantes en los niveles de GDF-15 se asocian a reducciones en la ingesta y pérdida de peso reversible, a expensas tanto de masa magra como de grasa (134, 135), además de predecir una menor supervivencia (135), por lo que este factor podría tener utilidad como marcador pronóstico. Aunque su acción sobre músculo esquelético no es del todo conocida, el cultivo de miotubos con GDF-15 incrementa la expresión de marcadores de proteólisis y su sobreexpresión conduce a atrofia del tejido muscular (136).

PTH-rp puede ser secretado por varios tumores y parece estar implicado en la patogénesis de la caquexia. Sus niveles circulantes aparecen elevados en modelos murinos LLC que, al ser tratados con anticuerpos contra PTH-rp consiguen revertir parcialmente la pérdida de tejido

muscular y adiposo (25). Aquellos pacientes con cáncer donde detectamos PTH-rp en plasma muestran menor masa magra y mayor gasto energético que aquellos donde el factor es indetectable (137). Del mismo modo los niveles en plasma se correlacionan con el estadio tumoral, un bajo estado funcional (PS) y elevación de la PCR (Proteína C reactiva) (137), además de predecir la pérdida de peso, por lo que PTH-rp podría constituir otro marcador de gran interés en el futuro.

En cuanto a los marcadores inflamatorios se han estudiado los niveles de Proteína C reactiva (PCR) en pacientes con cáncer, encontrando correlaciones con el hipermetabolismo, la pérdida de peso acelerada y una menor supervivencia en pacientes con tumores sólidos (14). Tanto la Proteína C reactiva como la IL-6 se emplean en la práctica clínica formando parte de los criterios diagnósticos de Evans para caquexia (tumoral o no tumoral) cuando alcanzan valores mayores de 5.0 mg/l la PCR y 4.0 pg/ml en el caso de la IL-6 (138).

### 5.1.2 MARCADORES DE DEGRADACIÓN PROTEICA

El proceso catabólico que afecta a miocitos durante la caquexia tumoral provoca la liberación de miofilamentos por rotura del sarcómero que posteriormente, pueden ser procesados por el sistema ubiquitina-proteasoma. En modelos animales portadores de tumores caquectizantes se ha observado una reducción selectiva en la expresión proteica de la cadena pesada de miosina, coincidiendo con una mayor actividad del sistema ubiquitina-proteasoma (139). El hecho de que exista cierta especificidad en la degradación de proteínas miofibrilares podría ser de utilidad a la hora de medir estos factores. Sin embargo, aunque existen estudios que hablan de alteraciones en la permeabilidad del sarcolema durante la caquexia por acción de factores circulantes (140), para algunos investigadores no parece viable que estos cambios permitan la fuga de proteínas marcadoras de daño muscular. Sí sería posible en cambio la liberación de moléculas más pequeñas como la mioglobina, que aparece detectable en el plasma de pacientes con atrofia muscular (141).

Por lo tanto, la mayoría de los marcadores de músculo esquelético o cardíaco son proteínas intactas que acceden a circulación por alguna razón, normalmente por disrupción de la membrana celular (así ocurre con la creatin-kinasa durante la isquemia). El problema en este aspecto es encontrar proteínas que reflejen únicamente el proceso de atrofia muscular y evitar la interferencia con otras proteínas resultado de la degradación de otros tejidos. Se han propuesto como marcadores con posible utilidad los neoepítomos, productos de la modificación de una molécula existente con una nueva afinidad por anticuerpos que no reconocen a la proteína previa (142). Los neoepítomos reflejan modificaciones postraduccionales que pueden aportar especificidad en la patología a estudio, en este caso los mecanismos propios de la caquexia tumoral; y pueden ser medidos mediante inmunoadsorción. Así, a diferencia de los marcadores clásicos, no reflejan tan solo un estado, sino más bien un proceso, lo que permite detectar de forma temprana alteraciones metabólicas de curso progresivo. Ahora bien, los fragmentos generados por la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma son demasiado pequeños, lo que los vuelve indetectables para los inmunoensayos rutinarios (143).

Entre las moléculas que han sido estudiadas como marcadores de caquexia se encuentra la 3-metilhistidina, generada por la metilación postraduccionale de residuos histidina en la actina y miosina que son liberados al plasma durante la destrucción de dichas proteínas (142). Sin

embargo, este marcador no es específico de músculo esquelético (144) y por ello no resulta útil. De forma similar, los fragmentos de colágeno III y VI se encuentran aumentados en pacientes con cáncer y se correlacionan con la pérdida de peso (142), pero también pueden elevarse tras el ejercicio o la inmovilización prolongada (144). A diferencia del colágeno IV, los fragmentos de colágeno III reflejan de forma adecuada la masa magra por su expresión limitada a los tejidos que la constituyen. Los niveles de actina 14 KDa detectados en biopsias de pacientes con estados hipercatabólicos se correlacionan con el nivel de proteólisis (145) y podría constituir un marcador de utilidad en la atrofia muscular. En un estudio con pacientes diagnosticados de cánceres del tracto digestivo superior se identificó que los niveles intramusculares de  $\beta$ -dystroglicano servían como un marcador de pérdida de peso, mientras que los bajos niveles de la cadena pesada de miosina y la distrofina se asociaron a menor supervivencia (146). En este último caso, la desaparición de ambas proteínas estructurales reflejaría el grado de compromiso de la integridad celular.

Por último, cabe esperar el hallazgo de marcadores asociados a la actividad del sistema proteolítico de calpaínas en la caquexia tumoral, capaz de generar fragmentos proteicos de mayor tamaño que los resultantes del sistema ubiquitina-proteasoma y que ya han sido explorados en otras patologías. Por ejemplo, se ha observado cómo en la lesión axonal difusa la escisión de la alfa-espectrina por la vía dependiente de calpaínas genera fragmentos específicos que pueden detectarse en líquido cefalorraquídeo (147).

La orina de pacientes caquéticos contiene, en general, mayor cantidad de especies proteicas en comparación con pacientes con cáncer sin caquexia. La búsqueda de marcadores en orina llevó a la identificación de PIF (62), una glicoproteína de 24 KDa que puede detectarse en pacientes con cáncer de mama, ovario, páncreas o colon entre otros (148) y en pacientes con caquexia tumoral (62). LMF es un factor lipolítico de 43 KDa sintetizado en tejido adiposo y también por parte del tumor que fue detectado en orina de pacientes con cáncer que mostraban pérdida de peso (149). Más recientemente, el uso de espectrometría de masas ha permitido identificar moléculas candidatas a marcadores, destacando cuantitativamente distintas especies de miosina en orina sin un incremento de la creatina-quinasa (150).

### 5.1.3 MARCADORES DE PÉRDIDA DEL TEJIDO GRASO

Aunque la depleción de tejido graso no se considera un criterio indispensable de caquexia, la búsqueda de marcadores que reflejen cambios metabólicos en los adipocitos podría aportar herramientas diagnósticas tempranas, ya que las alteraciones en el tejido graso suelen preceder a la atrofia muscular (78).

Las adipocinas son proteínas secretadas por el tejido adiposo con capacidad para regular el metabolismo lipídico tanto de forma paracrina como endocrina (151). En circunstancias normales contribuyen principalmente a la homeostasis energética, pero su producción puede verse alterada bajo circunstancias que afecten al tejido adiposo como en el caso de la caquexia. La leptina refleja de forma adecuada los depósitos de grasa, pero lo hace de forma tardía y depende de otros muchos factores como la edad (sus niveles se encuentran altos en ancianos) o el sexo (más alta en mujeres), además del TNF- $\alpha$  y los glucocorticoides (152, 153). Se han constatado niveles de leptina bajos en pacientes con cánceres gastrointestinales y de pulmón avanzados que además mostraban atrofia del tejido adiposo (154, 155), mientras que en

cánceres de mama y ginecológicos era más frecuente la hiperleptinemia, si bien esta se correlacionaba más con altos niveles de hormonas distintas para cada tipo de tumor en lugar de la caquexia en sí (156). Además, su medición puede correlacionarse con la pérdida de apetito y la resistencia a la insulina (157).

Respecto a la ghrelina, hormona que incrementa el apetito y el tejido adiposo, sus niveles parecen aumentar en pacientes caquéticos (158), reflejando la preservación de este mecanismo compensatorio que, como hemos abordado previamente, parece fracasar a nivel central. Un estudio en una cohorte de pacientes con cánceres de varios tipos concluyó que los valores de leptina, ghrelina y obestatina resultaban sensibles y específicos a la hora de detectar la aparición de caquexia (159).

El aumento de la lipólisis característico de la caquexia tumoral provoca un ascenso de los niveles de ácidos grasos libres y glicerol que pueden detectarse en plasma (78). Se han propuesto rangos para los valores de glicerol en pacientes caquéticos, logrando intervalos precisos que colocan a este factor como un buen candidato a biomarcador de caquexia tumoral (160). Para su medición ha de tenerse en cuenta que el glicerol liberado desde tejido adiposo visceral se dirige a circulación portal para ser aclarado en el hígado, de modo que el valor medido finalmente corresponde al glicerol producido menos el aclarado (161).

Ciertas moléculas lipídicas poseen actividad biológica, siendo capaces de participar en procesos de señalización tanto intra como intercelular. Alteraciones en la acción de los biolípidos pueden afectar a la comunicación entre órganos y ya han sido descritas en otras enfermedades de gran relevancia como la diabetes o el propio cáncer (162). Los estudios en pacientes caquéticos han mostrado una disminución en los niveles de lisofosfatidilcolina (producto de degradación del fosfolípido de membrana fosfatidilcolina) y en la calidad de los ácidos grasos libres, correlacionándose con otros parámetros inflamatorios y la pérdida de peso (163). Pero en la literatura existen pocos estudios de lipidómica que indaguen en la expresión diferencial de moléculas en el plasma de estos pacientes. Una publicación reciente buscó comparar modelos animales pre-caquéticos y caquéticos y analizar el plasma de pacientes caquéticos y no caquéticos mediante plataformas de lipidómica. El estudio reveló una disminución en varias especies de lisofosfatidilcolina y el aumento de esfingolípidos, incluyendo esfingomielinas, ceramidas, hexosilceramida y lactosil-ceramidas tanto en modelos animales como humanos (162). La marcada elevación de ceramidas resultó constante en las muestras de individuos caquéticos, probablemente debido a un mayor recambio a nivel hepático. Además, las ceramidas no solo pueden incrementar el gasto energético a través de ciclos de recirculación fútiles, sino que son capaces de inducir resistencia insulínica y causar atrofia de miotubos en modelos in vitro (164). Los cambios en el perfil de triacilglicéridos en pacientes caquéticos muestran un descenso de las especies que contienen ácidos grasos (18:3) y (20:5), con un aumento en el ratio de ácidos grasos saturados-insaturados (18). Al considerar la lipidómica desde una perspectiva traslacional, la creación de huellas metabólicas podría aportar una valiosa herramienta diagnóstica, pues tal y como evidencian los estudios, el plasma de estos pacientes contiene una expresión molecular diferenciable.

Una vez sabemos que el fenómeno de browning puede aparecer como un evento temprano en el desarrollo de la caquexia (30), cabe plantearse la posibilidad de emplear su detección como marcador diagnóstico. La detección del browning en tejido adiposo puede realizarse mediante la medición del gradiente de hemoglobina con imágenes optoacústicas multiespectrales, ya que el grado de oxigenación será diferente según la densidad de adipocitos marrones y su actividad metabólica (165). Otro método de bajo coste y de fácil implementación es la espectroscopia de

reflectancia difusa, que permite cuantificar el browning en los tejidos de forma directa (166). Los métodos tradicionales para su detección, basados en PET y RM, resultan menos sensibles y poco eficientes.

Finalmente, otras moléculas pueden funcionar como marcadores a nivel local pero no son detectables en plasma. Es el caso de ZAG (zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein), factor capaz de inducir lipólisis y browning del tejido adiposo, cuyos niveles circulantes no se correlacionan con la pérdida de peso o atrofia del tejido graso, pero sí su expresión en tejido adiposo subcutáneo (167).

#### 5.1.4 ESTUDIOS ÓMICOS

Los avances en biología molecular han permitido en los últimos años el desarrollo de una ciencia “ómica”, esto es, el estudio a gran escala de moléculas implicadas en las funciones de una célula, tejido u organismo. La aplicación de esta herramienta al campo de la caquexia tumoral ha permitido desvelar nuevas vías involucradas en la fisiopatología y promete aportar nuevos biomarcadores o dianas terapéuticas.

Los estudios metabolómicos cobran especial importancia, ya que son capaces de revelar el panel de metabolitos celulares, tanto intermediarios como productos de vías metabólicas. Mediante estos factores podemos estudiar los procesos biológicos que determinan un estado metabólico como la caquexia, pudiendo intuir los procesos genéticos, transcripcionales o proteómicos que subyacen, así como la influencia del medio. Estos estudios pueden realizarse de forma dirigida, lo que permite una cuantificación sensible, o de forma no dirigida, lo que posibilita el hallazgo de metabolitos previamente desconocidos.

La huella metabólica de la caquexia tumoral muestra bajos niveles de glucosa y altos niveles de lactato en suero, lo que refleja el empleo de vías no oxidativas por parte del tumor y en sí no es específico de caquexia. A ello podemos sumar los altos niveles de glicerol y ácidos grasos libres en el plasma de pacientes con cánceres esofágicos, pancreáticos y gastrointestinales principalmente (160). Estudios más recientes de la metabolómica en suero y orina de pacientes caquéticos mediante espectroscopia  $^1\text{H}$  NMR revelan 45 metabolitos y 18 vías asociadas a la caquexia tumoral (168). El análisis permitió establecer un modelo diagnóstico basado en los 15 parámetros más discriminativos, que a su vez derivó en un modelo matemático dependiente de tres metabolitos (carnosina, leucina y fenilacetato) válido a la hora de identificar población en riesgo de desarrollar caquexia entre pacientes oncológicos.

Estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que las mediciones aisladas de ciertos parámetros pueden resultar erróneas. En este sentido resulta revelador el estudio llevado a cabo por *Fujiwara et al*, quienes detectaron una gran variación circadiana en marcadores séricos en pacientes con cáncer de páncreas y caquexia, donde únicamente los niveles de paraxantina permanecían bajos de forma constante (169).

La proteómica también ha sido aplicada al campo de la caquexia asociada a cáncer. *Ebhardt et al* cuantificaron el proteoma de biopsias musculares procedente de individuos diagnosticados de caquexia tumoral y lo compararon con el de pacientes con cáncer sin caquexia, con la sarcopenia relacionada con la edad y con sujetos sanos. Tres módulos destacaron como factores afectados en sujetos caquéticos: el complejo Fo, la cadena transportadora de electrones y fibras

contráctiles. Los resultados muestran cómo la disfunción mitocondrial y de las fibras contráctiles aportan una huella proteica específica para la caquexia tumoral, colocando a ATP5A como un buen candidato a la hora de identificar a pacientes caquéticos (62). El uso de espectrometría de masas iTRAQ (etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta) seguida de cromatografía líquida permitió estudiar amplios perfiles proteómicos en músculo esquelético y cardíaco en modelos de adenocarcinoma de colon murino C26, mostrando un incremento de las principales proteínas del Disco-Z y de los niveles solubles de múltiples proteínas de fibras musculares (miosinas, troponinas, tropomiosinas, actina, titina, filamina y miomimesina); como evidencia de la desintegración del sarcómero y una reducción de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, principalmente en vías mitocondriales (170). Otros estudios trataron de analizar el proteoma directamente en plasma, comparando muestras de individuos caquéticos y no caquéticos, obteniendo una baja expresión de CNDP1, APOA4 y DACH1, junto con una mayor expresión de NARS2, ATP13A4 y BCL3 (171). En otro ensayo proteómico que comparó los perfiles de atrofia caquética y atrofia por desuso (172) se encontró comparativamente un mayor nivel de SAA-1 (Amiloide Sérico A-1) en caquexia respecto a la atrofia por desuso, así como una reducción de PON1 en plasma. La proteína SAA-1, probablemente producida por el propio tumor, es capaz de inducir atrofia en miotubos vía TLR y podría servir como marcador (173). Debemos tener en cuenta que en un paciente oncológico la atrofia muscular no se debe en exclusiva al proceso de caquexia, sino que otras condiciones como la reducción de la actividad física y el desuso influyen en la sarcopenia. La proteómica pone de relieve diferencias significativas en ambos mecanismos que deben ser investigadas en mayor profundidad, dada la relevancia clínica y pronóstica que implica distinguir si la pérdida de tejido muscular que constatamos se debe en mayor o menor medida a la caquexia.

Estudios de transcriptómica en músculos de pacientes afectados de cánceres gastrointestinales revelan la expresión diferencial de 74 genes que se correlacionan positivamente con la pérdida de peso y 9 que lo hacen de forma negativa (174). La expresión de CaMKII $\beta$  se correlaciona con la pérdida de peso y de forma menos significativa lo hacen los niveles de dicha proteína. La expresión de TIE1 también ha sido postulada como marcador y aunque se desconoce en gran medida su acción, sabemos que podría funcionar como un mecanismo compensador de la pérdida de miocitos a través de su interacción con PI3K activando la vía anabólica de Akt (174).

La combinación de transcriptómica y metabolómica permite indagar acerca de los efectos que tiene el secretoma tumoral sobre el metabolismo tisular, comparando modelos de tumor caquetizante con tumores no caquetizantes (175). En cultivos de miotubos humanos los tumores caquetizantes provocaban un rápido aumento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos grasos y un descenso en aquellos vinculados a la glucólisis y de forma llamativa un incremento en los niveles de acilcarnitina. En definitiva, el uso combinado de los estudios genómicos, transcriptómicos y metabolómicos permite desentrañar la expresión diferencial de posibles marcadores y quizá perfilar fenotipos moleculares de caquexia. De tal modo que su utilidad no solo reside en una capacidad diagnóstica más sofisticada, sino en la posibilidad de diseñar terapias dirigidas.

Biomarcador	Niveles	Utilidad	Muestra	Tipo de cáncer	Referencias
TNF- $\alpha$	↑	No correlación con pérdida de peso No correlación con supervivencia	Plasma	Varios	126



IL-6	↑	Correlación masa magra Predice supervivencia	Plasma	CPNM, GI	128, 130
IL-1	↑	Correlación con pérdida de peso	Plasma	GI, CPNM	131
Activina A	↑	Correlación con pérdida de masa magra Se asocia a menor supervivencia	Plasma	GI, CP	132
Miostatina	↓	Correlación negativa con el peso corporal	Plasma	TIR, PUL, CCR	133
GDF-15 (MIF-1)	↑	Correlación con pérdida de peso Se asocia a menor supervivencia	Plasma	PUL	134, 135
PTHrp	↑	Correlación con baja masa magra	Plasma	PUL, CCR	137
Proteína C reactiva	↑	Correlación con masa magra	Plasma	Varios	14, 132
Colágeno VI	↑	Correlación con pérdida de peso en individuos sanos	Suero	CCyC	142
β-distroglicano	↑	Correlación con pérdida de peso	Tejido musc.	GI	146
MHC	↓	Se asocia a menor supervivencia	Tejido musc.	GI	146
Distrofina	↓	Se asocia a menor supervivencia	Tejido musc.	GI	146
PIF	↑	Correlación con pérdida de peso	Orina	CM, CO, CP, CCR	148
LMF	↑	Correlación con pérdida de peso	Orina	CP	149
Leptina	↓	Correlación con estado nutricional	Suero	GI, CPNM	155, 156
Ghrelin	↑	Se asocia a menor supervivencia	Suero	Varios	158
FFA y Glicerol	↑	Correlación con pérdida de peso	Plasma	GI	160
Browning	↑	Detección precoz	Tejido	Varios modelos preclínicos	30
ZAG	↑	Correlación con pérdida de peso y atrofia del tejido graso	TCS	GI	167

Tabla 1. Marcadores de mayor relevancia: niveles en pacientes/modelos experimentales y su correlación con la pérdida de peso y la supervivencia. CPNM: Cáncer pulmonar no microcítico. GI: gastrointestinal. CP: Cáncer pancreático. TIR: Tiroideo. PUL: Cáncer pulmonar. CCR: Cáncer colorrectal. CM: Cáncer de mama. CO: Cáncer de ovario. CCyC: Cáncer de cabeza y cuello. MHC: Myosin Heavy Chain. TCS: Tejido celular subcutáneo.

#### 5.1.4 RNAs NO CODIFICANTES

Los estudios recientes colocan a los ncRNA como actores fundamentales en la comunicación en estados fisiológicos y patológicos. En el caso de los miRNAs, moléculas de 17-22 nucleótidos, ejercen su acción regulatoria sobre múltiples procesos biológicos a través de su unión al extremo terminal 3' de su ARN mensajero diana (176), promoviendo su degradación o inhibiendo su traducción; es decir, controlando la expresión de proteínas. Los miRNA pueden ser incluidos en microvesículas formadas a partir de la membrana celular que son liberadas posteriormente al plasma, otorgándoles una forma de transporte que confiere gran estabilidad. Ahora bien, las células también pueden liberar miRNAs en forma de micropartículas libres que una vez circulantes, pueden unirse a otras moléculas como HDL o proteínas transportadoras de RNA, por ejemplo, Ago2 (177). Algunos miRNA como miR21 ya son usados en oncología como marcadores de mal pronóstico (51).

Estudiando lugares de unión a factores de transcripción específicos de cada tejido podemos catalogar los miRNAs según el lugar de procedencia, como en el caso de los miRNAs (49). La literatura sobre los miRNAs en caquexia tumoral crece de forma imparable y ya son múltiples las moléculas propuestas como marcadores. El miR-206 ha sido asociado a atrofia muscular (178). *Lee et al* describieron hasta 9 miRNAs expresados en músculo de modelos LLC y aún más complejo fue el estudio llevado a cabo por *Fernandez et al*, quienes estudiando miRNAs y sus mRNAs diana llegaron a identificar 18 miRNAs ligados a la regulación de 131 mRNAs.

En definitiva, se necesitan validar métodos de detección de miRNA no invasivos, en concreto de miRNAs circulantes, puesto que los estudios avalan a estas moléculas como buenos candidatos a marcadores de caquexia tumoral. Tanto miR-21 como mir-29a prometen al respecto (53) y miR-203 que ya ha sido testado en pacientes con cáncer colorrectal metastásico (181).

### 5.1.5 MARCADORES GENÉTICOS

Podemos afirmar al igual que acontece en otros trastornos, que existen genotipos que predisponen al desarrollo de caquexia tumoral. Los estudios basados en polimorfismos han revelado variaciones en los genes de distintas citocinas proinflamatorias que una vez analizados, se han asociado a una mayor incidencia de la enfermedad. A diferencia de otros genes cuyas variaciones pueden dar productos de función desconocida, disponemos de secuencias de una amplia variedad de polimorfismos relacionados con estas citocinas. Así, se ha descrito en cánceres gastroesofágicos el polimorfismo 174CC en el gen de la IL-6 como una variante asociada a mayor inflamación sistémica, al igual que el 511-CC en el gen de la IL-1 $\beta$  y el 1082-GG en el gen de la IL-10 (182).

Se han definido incluso SNPs asociados a fenotipos de paciente caquético. Baja masa esquelética y pérdida de peso se relacionan con polimorfismos en el receptor de leptina, ACT1IRB, TNF y ACE (183). En cambio, dos SNPs, uno en FOXO1 y otro en FOXO3, solo se asociaron a la pérdida de peso (183). Estos perfiles génicos podrían ser de una utilidad vital en el futuro, pues la capacidad de trazar las características metabólicas de un paciente diagnosticado de un tumor caqueticizante podría predecir la evolución basándonos en marcadores conocidos e incluso ayudar a definir la terapéutica óptima para cada sujeto, esto es, medicina de precisión.

### 5.2 DIANAS TERAPÉUTICAS

La búsqueda de terapias contra la caquexia tumoral apenas ha aportado hasta la fecha herramientas efectivas que modifiquen el curso de la enfermedad en los pacientes. Sin embargo, los avances en su estudio han permitido desentrañar con cierta profundidad las vías metabólicas responsables, así como algunos factores precipitantes, lo que augura en un futuro próximo la aparición de tratamientos con intención de revertir la evolución natural del proceso (Tabla 2).

Acorde a las guías ASCO sobre manejo de caquexia tumoral, el tratamiento de la caquexia en la actualidad ha de basarse en el pronóstico del paciente, ofreciendo medidas nutricionales y farmacológicas de soporte, teniendo en cuenta que la intervención más efectiva consiste en eliminar la causa subyacente, es decir, curar el cáncer. Ahora bien, este objetivo resulta inalcanzable cuando el diagnóstico se realiza en fases avanzadas o la enfermedad progresa sin impedimento. Pero una vez sabemos de qué manera la caquexia tumoral afecta al pronóstico, supervivencia y respuesta al tratamiento de los pacientes oncológicos (3), el objetivo ideal sólo puede dirigirse a revertir la pérdida de peso y la masa muscular.

Las terapias disponibles hoy en día en pacientes caquéticos consisten en su mayoría en medidas paliativas que se prescriben valorando el riesgo y el beneficio. La intervención nutricional y consejo dietético, a priori la estrategia fundamental, no consigue disminuir la mortalidad, tan solo mejora la calidad de vida y la ingesta (184). Los estimulantes del apetito, clásicamente megestrol y medroxiprogesterona, incrementan la ingesta calórica a través de su efecto sobre el neuropéptido Y (185, 186) y poseen efectos secundarios propios de las terapias hormonales. Además, la medroxiprogesterona reduce in vitro la producción de citocinas proinflamatorias por parte de células mononucleares de pacientes con cáncer (186). En un ensayo con 332 pacientes diagnosticados de síndrome de anorexia-caquexia se comprobó que la terapia combinada de megestrol y medroxiprogesterona junto con talidomida, ácido eicosapentanoico y L-carnitina era más efectiva que la monoterapia (187).

Dada la naturaleza inflamatoria de la caquexia asociada a cáncer, se han ensayado terapias antiinflamatorias como dexametasona o prednisona, que probadas en varios ensayos clínicos demuestran aumentar el apetito, pero no el peso, aparte de los efectos secundarios derivados de su uso prolongado (188); los esteroides androgénicos con efecto anabolizante como testosterona y análogos sintéticos o los moduladores selectivos del receptor de andrógenos como enobosarm, que conservan el efecto anabólico y evitan los efectos secundarios de los agentes esteroideos (188). Los cannabinoides pueden ayudar a incrementar el apetito, y aunque su eficacia ha sido demostrada en pacientes con SIDA, no han sido aprobados todavía como un tratamiento estándar de la caquexia tumoral (189). En cuanto al ejercicio, desde la perspectiva experimental, un metaanálisis reciente no encontró diferencias en la masa corporal total y masa muscular de modelos animales caquéticos a pesar de la gran heterogeneidad de los estudios (190), con una falta de evidencia en humanos debido a la escasez de ensayos clínicos.

En esencia, la terapéutica actual de la caquexia tumoral adolece de una falta de medidas farmacológicas efectivas. Como veremos, el hecho de actuar sobre una diana molecular concreta no consigue revertir la enfermedad, pues las citocinas y demás factores implicados actúan a múltiples niveles, desde músculo, tejido graso, a nivel central y demás órganos, generando cascadas de señalización difíciles de trazar, con intercomunicaciones que impiden bloquear de forma directa el sistema actuando sobre un único punto. En consecuencia, la estrategia terapéutica debe dirigirse bien a varias señales de forma simultánea o bien apuntar a los puntos de regulación maestros.

### 5.2.1 CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IFN- $\gamma$  son las principales citocinas implicadas y los mecanismos por los cuales causan caquexia ya han sido abordados previamente.

La talidomida suprime la síntesis de TNF- $\alpha$  por parte de monocitos y aunque su tratamiento no está exento de efectos adversos, un ensayo clínico aleatorizado concluyó que el fármaco es capaz de atenuar la pérdida de peso y masa magra en pacientes con cáncer de páncreas avanzado (191), pero los estudios muestran de forma general resultados dispares, por lo que no se recomienda su uso en la práctica clínica (192). El empleo de fármacos anti-TNF arroja resultados favorables en estudios preclínicos pero pobres en ensayos clínicos. Así, tanto el etanercept (proteína de fusión recombinante compuesta por el receptor p75 del TNF y la porción Fc de la IgG1 humana) como el infliximab (anticuerpo monoclonal contra TNF- $\alpha$ ) no han mostrado beneficios como tratamiento de la caquexia tumoral (193) pero sí en modelos animales, en los que mejora la ingesta y el peso (194).

Respecto a la IL-6, debemos entender las dos vías de señalización que posee para comprender los efectos de su bloqueo farmacológico. Por un lado, existe la señalización cis que ocurre tras la unión de la citocina al receptor transmembrana, asociándose posteriormente el complejo al correceptor gp130. Esta vía solo puede darse en aquellas células que expresan receptor de IL-6 en su membrana. Sin embargo, en la señalización trans la IL-6 se une en un primer momento al receptor soluble y luego ambos ubican a gp130, glucoproteína presente en numerosos tipos celulares (195). La primera vía de señalización resulta de forma general beneficiosa, pero la señalización trans se asocia en mayor medida a los efectos proinflamatorios de la citocina (196). En consecuencia, la verdadera diana molecular es esta última, y la inhibición exclusiva de la señalización cis carece de sentido. *Miller et al* demostraron de qué manera la señalización trans de la IL-6 se asocia a la pérdida de peso, reducción de masa muscular y tejido adiposo en modelos in vivo de caquexia asociada a cáncer y otro estudio posterior vinculaba su acción al incremento en el flujo autofágico en miotubos tratados con esta citoquina (197). El bloqueo de la IL-6 con tocilizumab (anticuerpo monoclonal que actúa sobre la señalización cis y trans de la IL-6) prolonga la supervivencia y mejora la pérdida de peso en modelos animales LLC, de modo que ha sido propuesto como terapia en pacientes caquéticos con niveles elevados de IL-6 (198). Clazakizumab (anticuerpo monoclonal contra la IL-6) ha sido evaluado en pacientes con cáncer pulmonar no microcítico y caquexia, consiguiendo atenuar la pérdida de masa magra (199), aunque en el momento actual no existen ensayos en fase III. Son necesarios más estudios evaluando moléculas con actividad contra la IL-6, teniendo en cuenta la amplia variedad farmacológica que pueden mostrar entre sí los distintos agentes de los que disponemos en la actualidad y la relevancia de la citocina en la patogenia de la caquexia tumoral.

El uso de antagonistas contra el receptor de IL-1 no consigue revertir la caquexia tumoral en modelos animales (200), lo que sugiere cierta dependencia de otros mediadores. En la actualidad, un ensayo clínico en pacientes con cáncer de páncreas busca testar el antagonista de IL-1 $\alpha$  (xilonix) junto con regímenes de quimioterapia estándar (201); y MABp1, un anticuerpo natural contra IL-1 $\alpha$  consiguió mejorar la masa magra en pacientes con cáncer colorrectal que perdían peso (202). Otra molécula con interés clínico es IP-1510, un antagonista del receptor de IL-1 que se mostró en ensayos preclínicos como un tratamiento potencialmente útil en caquexia tumoral y sobre el cual se precisan más estudios (203).

Sobre el bloqueo del IFN- $\gamma$  existen estudios en modelos murinos inoculados con células CHO/IFN-y que lograron mejorar la pérdida de peso a través de anticuerpos monoclonales contra esta citoquina (204), aunque su papel en la caquexia tumoral no parece imprescindible. También en modelos murinos LLC y de adenocarcinoma pancreático se probaron anticuerpos monoclonales contra la IL-20, resultando en una reducción de los síntomas de caquexia y del crecimiento tumoral (205). Aunque esta terapia consigue frenar la pérdida de tejido graso, no

evita la atrofia muscular, lo que traduce un efecto predominante vía lipólisis para la IL-20. Por otro lado, MIC-1 (GDF-15), una citocina producida por células malignas induce anorexia por acción a nivel central (134, 135) además de activar las lipasas ATGL y HSL en tejido adiposo en ratones caquéticos, efecto mediado por el receptor GFRAL (206). Al actuar sobre la vía de señalización de GDF-15/GFRAL mediante un anticuerpo monoclonal que impide la interacción de la molécula y el receptor conseguimos revertir la pérdida de peso y mejorar la atrofia muscular (206).

Otro punto de control terapéutico es la transducción de la señal y cascadas iniciadas por la acción de los agentes proinflamatorios. La actividad de STAT3 se vincula al desarrollo apropiado de las células satélite en músculo esquelético y su activación corre a cargo de JAK2 en la vía de señalización de la IL-6, regulando masa muscular, reparación tisular y crecimiento celular. La simple activación de STAT3 fue necesaria y suficiente para inducir atrofia muscular en modelos animales de caquexia y la inhibición de la señalización JAK/STAT consigue paliar la caquexia asociada a cáncer pulmonar y colorrectal (207). Pese al gran número de moléculas dirigidas contra STAT3 de las que se dispone y los ensayos clínicos que se están llevando a cabo, no existe en la actualidad evidencia suficiente sobre su utilidad en la caquexia tumoral. El bloqueo de JAK2 se ha estudiado en modelos animales inoculados con células adenocarcinoma C26c20, que induce la lipólisis dependiente de LIF e IL-6 (ambos factores emplean JAK en la transducción de la señal), consiguiendo reducir la caquexia y la pérdida de tejido adiposo, aumentar la supervivencia y no alterar el tamaño tumoral (208). Este hallazgo se correlaciona con una reducción de STAT3 fosforilado tanto en tejido hipotalámico como en tejido adiposo. Ahora bien, su efecto no es duradero ya que otras vías que participan en el proceso permanecen inalteradas. Otra cascada de señalización que activa la IL-6 implica a MEK/ERK y para la cual disponemos de varios fármacos como selumetinib, inhibidor de MEK que disminuye la producción de IL-6 y revierte la atrofia muscular en pacientes con colangiocarcinoma avanzado (209) y sin embargo acentúa la pérdida de peso en modelos LLC pese a reducir el tamaño tumoral y los niveles de IL-6 (210). A diferencia de otras terapias proanabólicas, existe bajo riesgo de crecimiento tumoral ya que actuar sobre la vía ERK/MEK implica efectos antitumorales. En consecuencia, la inhibición simultánea de MEK y PI3K/Akt podría ayudar a reducir el tumor y preservar la masa muscular. Otro fármaco relacionado, sunitinib, que en modelos C26 contrarresta la activación de STAT3 e inhibe la atrofia muscular asociada a MuRF1 (211).

El receptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), y sus ligandos S100B y HMGB1 (High Mobility Group Box 1) funcionan como reguladores de la miogénesis y regeneración muscular mediante la vía de señalización p38-MAPK (212). Citocinas proinflamatorias y otros factores promotores de caquexia inducen la activación de RAGE en músculo esquelético, que no se expresa en miocitos sanos, y en consecuencia la hiperactivación de RAGE supone un aumento de la degradación del tejido muscular a través del eje p38 MAPK/miogenina/atrogin-1 (60). La reexpresión de RAGE en los miocitos de modelos caquéticos parece ser temprana, pues precede a la pérdida de tejido muscular y peso y es simultánea a la activación del sistema ubiquitina-proteasoma, así como la regulación al alza de miogenina. Asimismo, la activación crónica de RAGE por sus ligandos (incluyendo S100B y HMGB1) conduce a su vez a la activación de distintas vías catabólicas y a la inhibición de la vía anabólica Akt, por lo que disminuye la síntesis e incrementa la degradación proteica. Por lo tanto, el bloqueo de RAGE podría servir como diana farmacológica e impedir la atrofia muscular en fases tempranas de la caquexia tumoral (60).

El empleo de terapias combinadas ofrece ventajas en cuanto a resultados. El bloqueo de citocinas a distintos niveles de señalización o la inhibición simultánea de varios factores podría potenciar y prolongar el efecto anticaquético de la terapia farmacológica, como es el caso del OHR/AVR118, un ácido peptidonucleico con acción anti-TNF y anti-IL6 capaz de estabilizar el peso, la masa muscular y el rendimiento físico de pacientes con cáncer avanzado (213).

Los estudios en líneas celulares murinas y modelos animales sobre la función de la IL-15 durante los procesos de caquexia y sarcopenia han puesto en valor su efecto protector contra la atrofia mediada por la inflamación y su capacidad para promover la miogénesis. En respuesta a la señal del TNF- $\alpha$ , los miotubos secretan IL-15 tratando de mitigar la respuesta inflamatoria, por lo que esta citoquina podría funcionar como agente atenuante de la atrofia mediada por otras moléculas proinflamatorias (214). En efecto, el tratamiento de modelos experimentales de caquexia con IL-15 conlleva una mejora en la masa muscular y rendimiento, aunque por el momento no contamos con datos clínicos (215). El uso de agentes antiinflamatorios no esteroideos como meloxicam permitió contrarrestar el catabolismo proteico inducido por PIF en modelos murinos de adenocarcinoma además de reducir el tamaño tumoral (216), si bien una revisión sistemática concluyó que el beneficio resultante del empleo de antiinflamatorios no esteroideos no resulta suficiente para implementarlos como un tratamiento estándar (217).

### 5.2.2 BLOQUEO DE LA DEGRADACIÓN PROTEICA

Como sabemos, la activación del sistema ubiquitina proteasoma incrementa la proteólisis en el músculo esquelético, y aunque su implicación en la caquexia tumoral está bien estudiada en modelos animales, su importancia en estudios humanos no es del todo clara.

Existen inhibidores de la proteólisis como bortezomib y MG132, que suprimen la vía NF- $\kappa$ B, impidiendo la degradación del supresor I $\kappa$ B $\alpha$ , pero no funcionan de forma específica en el sistema proteolítico de tejido muscular y por ello no están exentos de efectos secundarios (218). Además, su acción no es suficiente para revertir la caquexia, probablemente debido a la persistencia en la activación de otras vías responsables como la autofagia y el sistema de calpaínas (219). Carfilzomib, otro inhibidor del proteasoma, es capaz de inhibir la proteólisis muscular y la apoptosis, atenuando la caquexia y aumentando la supervivencia en modelos animales C26 al ser administrado de forma precoz (220).

TRAF6, que pertenece a la familia de receptores asociados a TNF implicados en numerosas cascadas de señalización, puede actuar como una ligasa E3 de ubiquitina y está asociada al sistema de autofagia (66), de modo que su expresión se ha vinculado a procesos de atrofia muscular y el bloqueo de su actividad ha demostrado prevenir la pérdida de tejido muscular en modelos experimentales (66).

Aunque actualmente se desconoce qué moléculas activan TLR4, su expresión en músculo esquelético se encuentra ligada a los procesos catabólicos que se pueden observar en ciertos tipos de cáncer, siendo responsable de la activación del sistema ubiquitina-proteasoma y la vía autofágica lisosomal, además de promover la síntesis de citocinas como IL-6 y TNF- $\alpha$  (221). La activación de TLR4 se asocia igualmente a mayor resistencia insulínica y su bloqueo consigue mejorar los marcadores clínicos de caquexia en modelos experimentales LLC (222)

La intervención farmacológica sobre ACTRIIB, un receptor serina-treonina quinasa que une miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ , resulta de gran interés en la actualidad por su potencial clínico. El bloqueo del receptor con un señuelo es suficiente no solo para frenar el proceso de caquexia en varios modelos animales de caquexia asociada a cáncer, sino que permite revertir la pérdida de tejido muscular esquelético y cardíaco, además de prolongar la supervivencia de forma espectacular (41), lo que pone de manifiesto su importancia en la patogenia y el impacto de la caquexia sobre la mortalidad. Su inhibición no tuvo efectos sobre la pérdida de tejido graso ni sobre el tamaño del tumor en este estudio, pero en otros ensayos con modelos experimentales de atrofia muscular inducida por cáncer o quimioterapia sí consiguió preservar la masa grasa, masa ósea y de forma parcial el tejido miocárdico (223, 224), lo que podría explicarse por los fenómenos de intercomunicación tisular. Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor de la señalización ACVR2B-Fc contra el receptor parece estimular el crecimiento muscular a través de la vía mTOR (225), aumentar los niveles de IGF-1, revertir la pérdida de tejido óseo y mejorar el metabolismo oxidativo en modelos de cáncer colorrectal avanzado (224), poniendo de manifiesto el carácter multiorgánico del proceso.

Se han estudiado incluso terapias combinadas con el receptor soluble de miostatina más formoterol (agonista  $\beta$ 2 que estimula la síntesis e inhibe la degradación proteica) con resultados prometedores, consiguiendo una reversión completa de la atrofia muscular en modelos animales (226). El potencial traslacional de estos hallazgos está siendo evaluado en varios ensayos clínicos.

Conocido el rol de la angiotensina II sobre el músculo esquelético a través del receptor AT1, inhibiendo la síntesis y acentuando la degradación proteica (5, 6), se han ensayado terapias con fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina con éxito en modelos preclínicos, ayudando a mejorar la pérdida de peso (227); pudiendo llegar a atenuar la caquexia según se observó en un estudio en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y colorrectal (228). En el caso del telmisartán, un antagonista del receptor de angiotensina, su efecto incluye la inhibición de la expresión de IL-6 dependiente de TNF- $\alpha$  mediante la activación de PPAR- $\gamma$  (229). Está descrito un eje renina-angiotensina alternativo que implica a la enzima ACE2, donde la angiotensina-II es transformada en angiotensina-(1-7), la cual emplea el receptor MasR y contrarresta la atrofia provocada por la acción de la angiotensina-II (230). Los estudios sugieren que la expresión del receptor AT1 se encuentra elevada en modelos preclínicos y clínicos de caquexia tumoral, y que la potenciación del eje alternativo que representa la angiotensina-(1-7) mediante un agonista del receptor MasR ayuda a mitigar la atrofia celular, incrementar la masa muscular y el tamaño de las fibras preservando las de tipo II glucolíticas, reducir la pérdida de peso y frenar el crecimiento tumoral en ratones portadores de tumores caquexizantes (231).

Varios estudios con modelos experimentales de caquexia tumoral han demostrado la utilidad de los nuevos fármacos betabloqueantes a la hora de prevenir la atrofia de tejido muscular esquelético y cardíaco (232). Un ensayo clínico investigó el uso de espindolol en pacientes con caquexia asociada a cáncer pulmonar no microcítico y colorrectal, teniendo en cuenta el triple efecto farmacológico  $\beta$ 2 agonista (anabólico),  $\beta$ 1 antagonista (anticatabólico) y con acción sobre receptores 5HT1 $\alpha$  a nivel central (estimulando el apetito), consiguiendo revertir la pérdida de peso, aumentar la fuerza de agarre y mantener la masa grasa (233). Por ello, los efectos del sistema adrenérgico no deben considerarse tan solo a nivel muscular, sino también en el tejido

adiposo donde influye sobre la lipólisis y el fenómeno de browning, de tal manera que el bloqueo en estos puntos ayudaría a disminuir el incremento en el gasto energético característico de la caquexia.

En la atrofia muscular que tiene lugar, el sistema ubiquitina proteasoma y el sistema de calpaínas actúan de forma sinérgica sobre la proteólisis, de tal modo que la escisión proteica mediante calpaínas no solo aporta sustratos de menor tamaño al proteasoma, incluso podría activarlo y funcionar como iniciador de la caquexia (234). Por este motivo, se considera a las calpaínas como un punto de control crítico en el proceso de catabolismo proteico, mostrándose como una diana potencialmente efectiva en fases tempranas de la enfermedad. Así, la administración de inhibidores de las calpaínas (inhibidor de las calpaínas IV y calpeptina) en modelos murinos CT26 logra incrementar el peso corporal y la masa muscular (235), mientras que la calpastatina, un inhibidor endógeno, se mostró menos efectiva.

Una estrategia alternativa es actuar sobre las vías anabólicas. Wnt7a activa la vía Akt/mTOR en miotubos humanos a través de su receptor Frizzled7, una señal independiente de IGF-1 que elude la posible resistencia insulínica (236), de tal modo que previene la atrofia inducida por caquexia y además mejora la activación y diferenciación de las células satélite. Wnt7a puede administrarse en forma de plásmido mediante electroporación, demostrando prevenir la caquexia en modelos experimentales C26 (237).

Por último, destacaremos el potencial terapéutico de los miRNA, cuyo bloqueo específico puede impedir señales promotoras de la atrofia tisular, como en el caso del miR-203, que podría constituir una diana de interés acorde a un estudio en pacientes con sarcopenia asociada a cáncer colorrectal metastásico (238).

### 5.2.3 BLOQUEO DE LA LIPÓLISIS Y EL BROWNING

El incremento de la lipólisis constituye la contribución más evidente del tejido adiposo en la caquexia asociada a cáncer y su inhibición farmacológica se postula como un objetivo terapéutico que mejoraría no solo la pérdida de tejido adiposo, sino que también podría proteger al músculo esquelético frente a su degradación (80). De igual modo, basándonos en aquellos estudios que sitúan a la lipólisis como punto de arranque de la caquexia, podemos plantear que su bloqueo en etapas tempranas podría tener un gran impacto en el desarrollo de eventos posteriores.

Durante la caquexia tumoral, las principales enzimas implicadas en la hidrólisis de los triglicéridos son la ATGL y HSL, siendo esta última limitante (80). Dado que la ausencia de ATGL protege frente al desarrollo de la misma, su bloqueo con fármacos como la atglistatina (inhibidor competitivo y específico de la ATGL) podría funcionar como terapia (239), aunque no existen estudios al respecto. De forma análoga, el bloqueo selectivo de la HSL podría prevenir frente al desarrollo de caquexia (78). Otra estrategia que puede compensar el aumento de la lipólisis consiste en mejorar la resistencia insulínica existente, un fenómeno que precede a la pérdida de peso en ciertos modelos de caquexia, sin olvidar los efectos anabólicos que



conllevaría a otros niveles como en músculo esquelético. Si bien el uso de insulina no parece viable una vez se constató que, a pesar de mejorar parámetros como el peso o la ingesta, estimulaba el crecimiento tumoral en modelos animales (240), el empleo de fármacos antidiabéticos sí se plantea como una opción viable. La metformina puede suprimir el incremento de la lipólisis dependiente de catecolaminas y TNF (241) además de reducir la actividad proteolítica (242). La rosiglitazona, fármaco que funciona como análogo de PPAR- $\gamma$  incrementando la sensibilidad insulínica, reduce la pérdida de peso y aumenta la supervivencia en modelos experimentales de caquexia en estadios tempranos, pero no tardíos (243).

Recientemente se ha especulado sobre el papel de AMPK y su interacción con Cidea en el tejido adiposo, estudiando terapias dirigidas a prevenir la pérdida de grasa (99). AMPK es una serina-treonina quinasa que funciona como un regulador maestro de la homeostasis energética celular, activándose en respuesta a descensos en los niveles energéticos. Su activación supone una disminución en la lipólisis y su inhibición la incrementa. En modelos murinos de caquexia se ha detectado una falta de actividad de AMPK que se atribuye en parte a la inducción anómala de la proteína Cidea (99), un regulador negativo de su actividad cuyos niveles aparecen aumentados en el tejido adiposo blanco de pacientes caquéticos (98). Mediante el empleo de un péptido capaz de bloquear la interacción entre AMPK y Cidea (ACIP), *Rohm et al* consiguieron prevenir la degradación de AMPK y por tanto evitar el aumento de la lipólisis en ratones portadores de tumores caquectizantes (trasplantados con células SW-480 de cáncer de colon), consiguiendo ganancia de peso y el aumento de los depósitos grasos.

El hallazgo de browning en el tejido adiposo blanco de individuos caquéticos permitió entender mecanismos alternativos que explican el aumento del gasto energético e investigar las consecuencias de su inhibición. El bloqueo de PTHrp evita la aparición de las células brite y la pérdida de grasa, además de frenar el estado hipermetabólico inducido por el tumor y proteger al tejido muscular frente a la atrofia (25). De nuevo nos remitimos a la comunicación intertisular como explicación al efecto resultante en tejido muscular, el cual carece de receptores para PTH/PTHrp y es su acción sobre adipocitos la que posteriormente y de forma indirecta produce afectación muscular. En pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón y colorrectal se ha comprobado que los niveles de PTHrp se relacionan con el incremento del gasto energético basal y una mayor pérdida de tejido (25), lo cual abre una ventana terapéutica basada en el bloqueo farmacológico de PTHrp. Ahora bien, el fenómeno del browning también puede impedirse a través del bloqueo  $\beta 3$  (30), pues el sistema catecolaminérgico se encuentra implicado en su aparición. Un estudio retrospectivo en pacientes tratados con estatinas postuló una asociación inversa entre el uso de estos fármacos y la presencia de tejido adiposo marrón activo (244). Un ensayo clínico posterior comprobó que la fluvastatina reducía la expresión de genes relacionados con la termogénesis en tejido adiposo marrón humano (244). Adicionalmente, se ha descubierto que la atorvastatina puede inhibir el receptor TLR4, que además de sus efectos en músculo esquelético mencionados previamente se encuentra vinculado también a la aparición del browning y procesos catabólicos en tejido adiposo (222), consiguiendo atenuar los marcadores de caquexia cuando se administran en modelos LLC. Otro ensayo empleó simvastatina en modelos Yoshida AH-130, obteniendo resultados similares con una reducción en la pérdida de peso corporal y preservando la masa muscular (245); pero este mismo fármaco ha mostrado el efecto contrario en el mismo modelo animal, acentuando la

pérdida de tejido muscular de forma diferente a la miopatía típica que pueden causar (245), por lo cual se requiere más investigación al respecto.

DIANA	Terapia	Efectos	Estudio	Referencias
TNF- $\alpha$	Talidomida	Reduce la pérdida de peso y masa magra	CP	191
	Infliximab Etanercept	No reducen pérdida de tejido muscular ni restauran la masa magra	Varios tumores	193
IL-6	Tocilizumab	Aumenta supervivencia y reduce pérdida de peso	Modelos LLC	198
	Clazakizumab	Reduce pérdida de masa magra	CPNM	199
TNF- $\alpha$ + IL-6	OHR/AVR118	Estabiliza peso y masa muscular	CP	213
IL-1r	Xilonix	Sin resultados todavía	CP	201
	IP-1510	Aumenta el peso	GC	203
	MABp1	Aumenta la masa magra	CCR	202
GFRAL	3P10	Reduce pérdida de peso y mejora atrofia muscular	Modelos animales	206
JAK2	Tofacitinib	Disminuye pérdida de tejido adiposo y aumenta supervivencia	Modelos Adenocarcinoma C26c20	208
MEK	Selumetinib	Reduce la atrofia muscular	CGC	209
STAT3	Sunitinib	Reduce la atrofia muscular	Modelos adenocarcinoma C26	211
Proteasoma	Bortezomib	No previene la atrofia muscular	Modelos AH-130	219
	Carfilzomib	Aumenta la supervivencia	Modelos adenocarcinoma C26	220
TLR4	Atorvastatina	Aumenta supervivencia y disminuye el browning	Modelos LLC	222
ACTIIRB	sActRIIB	Disminuye pérdida de tejido muscular e incrementa la supervivencia	Modelos adenocarcinoma C26	41
	ACVR2B-Fc	Estimula crecimiento muscular, aumenta IGF-1, reduce pérdida de hueso	Modelos de caquexia inducida por QMT	224
AT1R	IECAs	Disminución de la pérdida de peso	CPNM, CCR	228
MasR	AVE 0991	Aumenta masa muscular y reduce pérdida de peso	Modelos adenocarcinoma C26	231
Receptor B	Espindolol	Revierde pérdida de peso y mantiene masa magra	CPNM, CCR	233
Calpaínas	Inhibidor IV Calpeptina	Reversión parcial de la pérdida de peso y masa muscular	Modelos adenocarcinoma CT26	235
Receptor insulina	Insulina	Aumenta peso e ingesta. Incrementa tamaño tumoral.	Modelos de sarcoma	240
	Metformina	Disminuye lipólisis y proteólisis	Modelos animales Walker 256	242
	Rosiglitazona	Disminuye pérdida de peso e incrementa la supervivencia	Modelos Hepatoma Yoshida AH-139	243
CIDEA	ACIP	Reduce la lipólisis. Incrementa el peso y la masa magra	Modelos SW-480 cáncer de colon	99
PTHrp	Anti-PTHrp Ab	Reduce la pérdida muscular y grasa	Modelos LLC	25

Receptor ghrelina	Ghrelina Anamorelina	Aumento del apetito, masa magra y peso corporal	CPNM, GI	248, 249, 250
MC4R	Antagonistas MC4R	Reducen la anorexia, aumentan masa magra y grasa y disminuyen gasto energético	Modelos C26 adenocarcinoma	251
5-HT2A R	Ciproheptadina	Aumentan apetito. No aumentan peso	Pacientes con cáncer avanzado	252

Tabla 2. Estrategias terapéuticas contra la caquexia tumoral según las dianas moleculares estudiadas y su posible utilidad clínica. Se incluyen ensayos con modelos experimentales y pacientes según diagnóstico (CPNM: Cáncer pulmonar no microcítico. GI: gastrointestinal. CP: Cáncer pancreático. CCR: Cáncer colorrectal. CGC: Colangiocarcinoma).

#### 5.2.4 CORREGIR LA HOMEOSTASIS A NIVEL CENTRAL

Las alteraciones funcionales que se observan en varias zonas del sistema nervioso central relacionadas con la homeostasis energética en modelos experimentales de cáncer no solo explican la aparición de anorexia en el curso de la enfermedad, sino también el aumento del catabolismo en los distintos tejidos. De tal modo, las intervenciones farmacológicas a este nivel pueden resultar beneficiosas en pacientes con caquexia tumoral.

La ghrelina, mediador orexigénico secretado por estómago y páncreas, estimula la secreción de GH con mayor potencia que la GHRH (246), aumenta los niveles de IGF-1 estimulando el crecimiento muscular, posee efectos antiinflamatorios a través de la inducción de IL-10 (247) e inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, impidiendo la expresión de las ligasas MuRF1 y MAFBx (246). AL ser administrada en modelos animales portadores de tumores caquetizantes consigue mejorar el apetito, la masa grasa y el peso corporal (248). Existen en la actualidad numerosos ensayos clínicos con ghrelina o análogos como la anamorelina (cuya vida media es muy superior), que demuestran mejorar la masa magra, el apetito, la calidad de vida y el estado funcional de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (249) y en cánceres gastrointestinales (250). En base a estos dos últimos ensayos la anamorelina ha sido aprobada recientemente como tratamiento de la caquexia tumoral en Japón.

Otra diana molecular con interés es el receptor de melanocortina 4 (MCR4), que participa en la señalización anorexigénica inhibiendo la acción del Neuropeptido Y. En estudios preclínicos que han empleado antagonistas del receptor MC4R administrados oralmente se ha logrado prevenir la anorexia, la pérdida de masa magra y el gasto energético basal (251). Dado que no existen ensayos en humanos, se precisan más estudios para evaluar el potencial terapéutico del receptor de melanocortina 4 en la caquexia.

Finalmente, el bloqueo serotoninérgico juega un papel relevante dada la implicación que posee en la fisiopatología de la anorexia asociada al cáncer. La ciproheptadina, bloqueante de los receptores 5HT2A, demuestra efectos estimulantes del apetito en modelos animales y ha sido testada en un ensayo clínico en pacientes oncológicos, demostrando capacidad para aumentar el apetito, pero no así el peso (252), de modo que el interés por esta vía terapéutica ha decaído con el tiempo.

## 6. RESUMEN DE RESULTADOS

A pesar de los avances que han tenido lugar en el conocimiento de la caquexia tumoral, incluso la cuestión fundamental permanece sin una respuesta definitiva. ¿Por qué surge la caquexia? Al igual que sucede con el propio cáncer, la heterogeneidad que caracteriza a la enfermedad dificulta su estudio y la profundidad que requiere su comprensión impide el desarrollo de estrategias diagnósticas o terapéuticas. Los distintos estudios avalan esta hipótesis y apuntan a abordar la caquexia tumoral como fenotipos moleculares, no solo basados en el tipo de tumor que define el cuadro, sino individualizando mediante estudios de genómica y metabólica la huella concreta de la enfermedad, a fin de diseñar una estrategia terapéutica que ataque de forma específica a los factores responsables. Para ello, cabe esperar que los avances en campos de investigación como la genética u oncología, o el desarrollo de nuevas técnicas puedan impulsar durante los próximos años una comprensión más profunda de la enfermedad.

El objetivo primordial de cara al diagnóstico es la obtención de herramientas válidas para detectar la caquexia en fases tempranas en pacientes oncológicos, ya que pese a la escasez de medidas farmacológicas disponibles en la actualidad, las intervenciones en fases precoces parecen resultar beneficiosas (9). Hasta el momento ningún marcador de forma aislada se ha mostrado útil a la hora de diagnosticar caquexia tumoral, por lo que el empleo combinado de parámetros parece la única estrategia viable. Si bien disponemos de numerosos factores candidatos, no existen ensayos en pacientes que estudien su utilidad como biomarcadores. Los estudios preclínicos sugieren que los cambios metabólicos en el tejido adiposo anteceden a la atrofia del tejido muscular (67) e incluso el browning de los adipocitos blancos aparece como un evento inicial que contribuye al desarrollo de la enfermedad (27), de modo que su detección podría servir como indicio de etapas precoces de la caquexia tumoral. En cualquier caso, el desarrollo de estudios ómicos facilita la identificación de biomarcadores dentro de las complejas redes moleculares que definen la caquexia, llegando a aportar modelos matemáticos que ayudan a reconocer a población de riesgo (168).

Por ahora, son numerosos los ensayos clínicos que tratan de estudiar fármacos con resultados prometedores en estudios preclínicos. Como hemos visto, las terapias aprobadas en la actualidad poseen efectos muy limitados y tanto la intervención nutricional como el ejercicio, a priori intervenciones fundamentales, suponen medidas sin un claro beneficio para las que se requieren más ensayos clínicos, particularmente en el caso del ejercicio físico dada la escasez de estudios aleatorizados en pacientes. El bloqueo de citocinas como la IL-6, la inhibición del receptor ACTRIIB o el desarrollo de terapias contra miRNAs arrojan esperanzas; mientras que el papel de otros elementos como el fenómeno del browning y sus implicaciones precisan de más estudios clínicos con el objetivo de desentrañar el potencial terapéutico de su bloqueo farmacológico. Por otra parte, el estudio de la anorexia asociada a cáncer y su estrecha conexión fisiopatológica con la propia caquexia tiene su reflejo en un hito reciente, la aprobación de un análogo de la ghrelina como tratamiento estándar de la enfermedad en Japón. La intervención farmacológica sobre el receptor MC4R, a falta de ensayos clínicos, se erige también como una diana con potencial terapéutico a la hora de paliar la anorexia en pacientes con cáncer.

Finalmente, debemos señalar que la investigación preclínica y clínica llevada a cabo en el campo de la caquexia tumoral no solo aporta el conocimiento necesario para dar solución a este problema, pues conocer en profundidad las alteraciones metabólicas que la caracterizan puede contribuir al avance contra otras enfermedades tan prevalentes como la diabetes o la obesidad.

## 7. CONCLUSIONES

La caquexia tumoral constituye una entidad clínica frecuente con una gran impacto en la mortalidad de los pacientes oncológicos. Su diagnóstico suele ser tardío y basado en métodos descriptivos.

En la actualidad se han propuesto varios biomarcadores basados en la fisiopatología de la enfermedad. Además de los factores causales se han estudiado mRNAs y metabolitos con posible utilidad diagnóstica. Ningún biomarcador de forma aislada es efectivo a la hora de detectar el proceso, aunque los estudios ómicos permiten crear perfiles específicos. Se precisan ensayos clínicos para testar los candidatos que parecen efectivos en estudios preclínicos.

Los tratamientos disponibles hoy en día no afectan al curso de la enfermedad. Actualmente existen numerosos ensayos clínicos basados en dianas moleculares. Ningún fármaco es efectivo en todos los modelos de caquexia, por lo que el tratamiento multimodal o las terapias dirigidas se erigen como las opciones más efectivas

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Factores y vías de señalización implicadas en la atrofia muscular asociada a caquexia tumoral.....	7
Figura 2. Factores y vías de señalización que participan en la activación de la lipólisis durante la caquexia tumoral.....	11
Figura 3. Señales moleculares entre los distintos tejidos que participan en la fisiopatología de la caquexia tumoral.....	16
Figura 4. Vías neuroendocrinas que regulan la homeostasis energética a nivel hipotalámico.....	19
Tabla 1. Marcadores de mayor relevancia: niveles en pacientes/modelos experimentales y su correlación con la pérdida de peso y la supervivencia..	28
Tabla 2. Estrategias terapéuticas contra la caquexia tumoral según las dianas moleculares estudiadas y su posible utilidad clínica.....	38

## 6. REFERENCIAS

1. Petruzzelli M, Wagner EF. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes Dev.* 2016 Mar 1;30(5):489-501.
2. von Haehling S, Anker SD. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers—update 2014. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014 Dec;5(4):261–3.
3. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology.* 2011 May;12(5):489-95.
4. Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin.* 2002 Apr;52(2):72–91.
5. Al-Zoughbi W, Huang J, Paramasivan GS, Till H, Pichler M, Guertl-Lackner B et al. Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol* 2014; 41: 281–295.
6. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2013 Oct;45(10):2191-9.
7. Global Cancer Observatory [Internet]. Gco.iarc.fr. 2021 [cited 20 March 2021]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
8. DeWys WD. Weight loss and nutritional abnormalities in cancer patients: incidence, severity and significance. *Clinics in Oncology.* 1986 vol. 5, no. 2, p. 251–261.
9. Baracos V, Martin L, Korc M, Guttridge D, Fearon K. Cancer-associated cachexia. *Nature Reviews Disease Primers.* 2018;4(1).
10. Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer.* 2014 Nov; 14(11):754-62.
11. Penet M, Bhujwala ZM. Cancer Cachexia, Recent Advances, and Future Directions. *The Cancer Journal.* 2015 Mar;21(2):117-22.
12. Onesti JK, Guttridge DC. Inflammation Based Regulation of Cancer Cachexia. Coletti D, editor. *BioMed Research International.* 4 de mayo de 2014; 2014:168407.
13. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 1;454(7203):436–44.
14. Shrotriya S, Walsh D, Nowacki AS, Lorton C, Aktas A, Hullihen B, et al. Serum C-reactive protein is an important and powerful prognostic biomarker in most adult solid tumors. *PLoS One.* 2018;13(8):e0202555.
15. Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways. *Cell Metabolism.* 2012 Aug;16(2):153-66.
16. Oliff A, Defeo-Jones D, Boyer M, Martinez D, Kiefer D, Vuocolo G, et al. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell.* 1987 Aug;50(4):555-63.
17. Bilir C, Engin H, Can M, Likhan S, Demirtas D, Kuzu F, et al. Increased serum tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 expression in patients with non-metastatic triple-negative breast cancer. *Oncology Letters.* 2015 Jun;9(6):2819-24.
18. Riccardi D, das Neves R, de Matos-Neto E, Camargo R, Lima J, Radloff K et al. Plasma Lipid Profile and Systemic Inflammation in Patients With Cancer Cachexia. *Frontiers in Nutrition.* 2020;7.
19. Deans DAC, Wigmore SJ, Gilmour H, Paterson-Brown S, Ross JA, Fearon KCH. Elevated tumour interleukin-1 $\beta$  is associated with systemic inflammation: a marker of reduced survival in gastro-oesophageal cancer. *Br J Cancer.* 2006 Dec;95(11):1568-75.

20. Tan BHL, Ross JA, Kaasa S, Skorpen F, Fearon KCH. Identification of possible genetic polymorphisms involved in cancer cachexia: a systematic review. *J Genet*. 2011 Apr;90(1):165-77.
21. Scott H, McMillan D, Crilly A, McArdle C, Milroy R. The relationship between weight loss and interleukin 6 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1996 Jun;73(12):1560-2.
22. Carson JA, Baltgalvis KA. Interleukin 6 as a Key Regulator of Muscle Mass during Cachexia. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2010 Oct;38(4):168-76.
23. Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. *European Journal of Pharmacology*. 2011 Sep;668:S81-S86.
24. Han HQ, Zhou X, Mitch WE, Goldberg AL. Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Oct;45(10):2333-47. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9306-11.
25. Kir S, White JP, Kleiner S, Kazak L, Cohen P, Baracos VE, et al. Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* 2014;513:100-4.
26. Hall KD, Baracos VE. Computational modeling of cancer cachexia. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2008 May;11(3):214-21.
27. Edén E, Edström S, Bennegård K, Scherstén T, Lundholm K. Glucose Flux in Relation to Energy Expenditure in Malnourished Patients with and without Cancer during Periods of Fasting and Feeding. *Cancer Res*. 1 de abril de 1984;44(4):1718-24.
28. Holroyde CP, Skutches CL, Boden G, Reichard GA. Glucose metabolism in cachectic patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. diciembre de 1984;44(12 Pt 1):5910-3.
29. Rohm M, Zeigerer A, Machado J, Herzig S. Energy metabolism in cachexia. *EMBO reports*. 2019;20(4).
30. Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, et al. A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell Metabolism*. 2014 Sep;20(3):433-47.
31. Tsoli M, Moore M, Burg D, Painter A, Taylor R, Lockie SH, et al. Activation of Thermogenesis in Brown Adipose Tissue and Dysregulated Lipid Metabolism Associated with Cancer Cachexia in Mice. *Cancer Res*. 2012 Sep 1;72(17):4372-82.
32. Constantinou C, Fontes de Oliveira CC, Mintzopoulos D, Busquets S, He J, Kesarwani M, et al. Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. *Int J Mol Med*. enero de 2011;27(1):15-24.
33. Fontes-Oliveira CC, Busquets S, Toledo M, Penna F, Paz Aylwin M, Sirisi S, et al. Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: altered energetic efficiency? *Biochim Biophys Acta*. marzo de 2013;1830(3):2770-8.
34. Arneson PC, Doles JD. Impaired Muscle Regeneration in Cancer-Associated Cachexia. *Trends in Cancer*. 2019 Oct 1;5(10):579-82.
35. Palus S, von Haehling S, Springer J. Muscle wasting: an overview of recent developments in basic research. *Int J Cardiol*. 2014 Oct 20;176(3):640-4.
36. Drescher C, Konishi M, Ebner N, Springer J. Loss of muscle mass: current developments in cachexia and sarcopenia focused on biomarkers and treatment. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015 Dec;6(4):303-11.
37. Lagirand-Cantaloube J, Cornille K, Csibi A, Batonnet-Pichon S, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Inhibition of Atrogin-1/MAFbx Mediated MyoD Proteolysis Prevents Skeletal Muscle Atrophy In Vivo. *PLoS One* [Internet]. 2009 Mar 25 [cited 2021 Mar 29];4(3).
38. Reed SA, Sandesara PB, Senf SM, Judge AR. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *The FASEB Journal*. 2012 Mar 1;26(3):987-1000.



39. Murakami M, Harada M, Kamimura D, Ogura H, Okuyama Y, Kumai N, et al. Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Rep.* 2013 Mar 28;3(3):946–59.
40. Loumaye A, de Barse M, Nachit M, Lause P, Frateur L, van Maanen A, et al. Role of Activin A and myostatin in human cancer cachexia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 May;100(5):2030–8.
41. Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell.* 2010 Aug 20;142(4):531–43.
42. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 31;103(44):16260–5.
43. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001 Nov 23;294(5547):1704–8.
44. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HGW, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 2004 Oct 15;119(2):285–98.
45. Gallagher IJ, Stephens NA, MacDonald AJ, Skipworth RJE, Husi H, Greig CA, et al. Suppression of Skeletal Muscle Turnover in Cancer Cachexia: Evidence from the Transcriptome in Sequential Human Muscle Biopsies. *Clin Cancer Res.* 2012 May 15;18(10):2817–27.
46. Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2005 Oct 1;37(10):2196–206.
47. Tardif N, Klaude M, Lundell L, Thorell A, Rooyackers O. Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients. *Am J Clin Nutr.* 2013 Dec;98(6):1485–92.
48. Johns N, Hatakeyama S, Stephens NA, Degen M, Degen S, Frieauff W, et al. Clinical classification of cancer cachexia: phenotypic correlates in human skeletal muscle. *PLoS One.* 2014;9(1):e83618.
49. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 2008 Apr;86(14 Suppl):E19-35.
50. Pin F, Minero VG, Penna F, Muscaritoli M, De Tullio R, Baccino FM, et al. Interference with Ca(2+)-Dependent Proteolysis Does Not Alter the Course of Muscle Wasting in Experimental Cancer Cachexia. *Front Physiol.* 2017 Apr 19;8:213–213.
51. Donzelli S, Farneti A, Marucci L, Ganci F, Sacconi A, Strano S, et al. Non-coding RNAs as Putative Biomarkers of Cancer-Associated Cachexia. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:257.
52. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 31;109(31):E2110-2116.
53. He WA, Calore F, Londhe P, Canella A, Guttridge DC, Croce CM. Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 25;111(12):4525–9.
54. Zhang G, Liu Z, Ding H, Zhou Y, Doan HA, Sin KWT, et al. Tumor induces muscle wasting in mice through releasing extracellular Hsp70 and Hsp90. *Nat Commun.* 2017 Sep 19;8(1):589.
55. Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Penna F, Reffo P, Bonetto A, et al. IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Sep;291(3):R674-683.
56. Penna F, Bonetto A, Muscaritoli M, Costamagna D, Minero VG, Bonelli G, et al. Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? *Int J Cancer.* 2010 Oct 1;127(7):1706–17.
57. Satchek JM, Ohtsuka A, McLary SC, Goldberg AL. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Oct;287(4):E591-601.

58. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004 Apr 30;117(3):399–412.
59. Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2004 Jun;24(12):5434–46.
60. Chiappalupi S, Sorci G, Vukasinovic A, Salvadori L, Sgheddu R, Coletti D, et al. Targeting RAGE prevents muscle wasting and prolongs survival in cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2020;11(4):929–46.
61. Argilés JM, López-Soriano J, Almendro V, Busquets S, López-Soriano FJ. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev*. 2005 Jan;25(1):49–65. Penafuerte CA, Gagnon B, Sirois J, Murphy J, MacDonald N, Tremblay ML. Identification of neutrophil-derived proteases and angiotensin II as biomarkers of cancer cachexia. *Br J Cancer*. 2016 Mar 15;114(6):680–7.
62. Ebbhardt HA, Degen S, Tadini V, Schilb A, Johns N, Greig CA, et al. Comprehensive proteome analysis of human skeletal muscle in cachexia and sarcopenia: a pilot study. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2017;8(4):567–82.
63. Penafuerte CA, Gagnon B, Sirois J, Murphy J, MacDonald N, Tremblay ML. Identification of neutrophil-derived proteases and angiotensin II as biomarkers of cancer cachexia. *Br J Cancer*. 2016 Mar 15;114(6):680–7
64. Bhatnagar S, Mittal A, Gupta SK, Kumar A. TWEAK causes myotube atrophy through coordinated activation of ubiquitin-proteasome system, autophagy, and caspases. *J Cell Physiol*. 2012 Mar;227(3):1042–51.
65. Narsale AA, Carson JA. Role of IL-6 In Cachexia – Therapeutic Implications. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014 Dec;8(4):321–7.
66. Paul PK, Kumar A. TRAF6 coordinates the activation of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in atrophying skeletal muscle. *Autophagy*. 2011 May;7(5):555–6.
67. Sun Y-S, Ye Z-Y, Qian Z-Y, Xu X-D, Hu J-F. Expression of TRAF6 and ubiquitin mRNA in skeletal muscle of gastric cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012 Sep 26;31:81.
68. Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*. 1996 Feb 22;379(6567):739–42.
69. Sukhanov S, Semprun-Prieto L, Yoshida T, Tabony AM, Higashi Y, Galvez S, et al. Angiotensin II, Oxidative Stress and Skeletal Muscle Wasting. *Am J Med Sci*. 2011 Aug;342(2):143–7.
70. Sun R, Zhang S, Lu X, Hu W, Lou N, Zhao Y, et al. Comparative molecular analysis of early and late cancer cachexia-induced muscle wasting in mouse models. *Oncol Rep*. 2016 Dec;36(6):3291–302.
71. Wang Y, Pessin JE. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013 May;16(3):243–50.
72. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013 Apr 20;9(2):191–200.
73. Fouladiun M, Körner U, Bosaeus I, Daneryd P, Hyltander A, Lundholm KG. Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer*. 2005 May 15;103(10):2189–98.
74. Legaspi A, Jeevanandam M, Starnes HF, Brennan MF. Whole body lipid and energy metabolism in the cancer patient. *Metabolism*. 1987 Oct;36(10):958–63.
75. Das SK, Hoefler G. The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia. *Trends Mol Med*. 2013 May;19(5):292–301.

76. Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005 Dec;19(4):471–82.
77. Rydén M, Arner P. Fat loss in cachexia--is there a role for adipocyte lipolysis? *Clin Nutr.* 2007 Feb;26(1):1–6.
78. Agustsson T, Rydén M, Hoffstedt J, van Harmelen V, Dicker A, Laurencikiene J, et al. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res.* 2007 Jun 1;67(11):5531–7.
79. Cao D, Wu G, Yang Z, Zhang B, Jiang Y, Han Y, et al. Role of beta1-adrenoceptor in increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Sci.* 2010 Jul;101(7):1639–45.
80. Das SK, Eder S, Schauer S, Diwokoy C, Temmel H, Guertl B, et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science.* 2011 Jul 8;333(6039):233–8.
81. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett.* 2008 Jan 9;582(1):117–31.
82. Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, et al. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol.* 1996 Nov 1;10(11):1457–66.
83. Fried SK, Zechner R. Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *J Lipid Res.* 1989 Dec;30(12):1917–23.
84. Neves RX, Rosa-Neto JC, Yamashita AS, Matos-Neto EM, Riccardi DMR, Lira FS, et al. White adipose tissue cells and the progression of cachexia: inflammatory pathways. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016 May;7(2):193–203.
85. 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.* 2004 Feb 27;1636(1):59–68.
86. Guo L, Li X, Tang Q-Q. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)  $\beta$ . *J Biol Chem.* 2015 Jan 9;290(2):755–61.
87. Bing C, Russell S, Becket E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P, et al. Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *British Journal of Cancer.* 2006 Oct;95(8):1028–37.
88. Bouillaud F, Ricquier D, Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, et al. Acquisition of Brown Fat Cell Features by Human White Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry.* 2003 Aug 29;278(35):33370–6.
89. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, et al. Insulin resistance-inducing cytokines differentially regulate SOCS mRNA expression via growth factor- and Jak/Stat-signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol.* 2004 Apr;181(1):129–38.
90. Obregon M-J. Changing white into brite adipocytes. Focus on ‘BMP4 and BMP7 induce the white-to-brown transition of primary human adipose stem cells’. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014 Mar 1;306(5):C425–427.
91. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1509–17.
92. Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat-generation. *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):546–59.
93. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JMA, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013 Dec 12;5(5):1196–203.
94. Shellock FG, Riedinger MS, Fishbein MC. Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1986;111(1):82–5.
95. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci Rep.* 2013 Sep 6;33(5).

96. Zhang H, Zhu L, Bai M, Liu Y, Zhan Y, Deng T, et al. Exosomal circRNA derived from gastric tumor promotes white adipose browning by targeting the miR-133/PRDM16 pathway. *Int J Cancer*. 2019 May 15;144(10):2501–15.
97. Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab (Lond)*. 2014 Feb 12;11:10.
98. Laucinkiene J, Stenson BM, Arvidsson Nordström E, Agustsson T, Langin D, Isaksson B, et al. Evidence for an important role of CIDEA in human cancer cachexia. *Cancer Res*. 2008 Nov 15;68(22):9247–54.
99. Rohm M, Schäfer M, Laurent V, Üstünel BE, Niopek K, Algire C, et al. An AMP-activated protein kinase-stabilizing peptide ameliorates adipose tissue wasting in cancer cachexia in mice. *Nat Med*. 2016 Oct;22(10):1120–30.
100. Stephens NA, Skipworth RJE, MacDonald AJ, Greig CA, Ross JA, Fearon KCH. Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011 Jun;2(2):111–7.
101. Peyta L, Jarnouen K, Pinault M, Coulouarn C, Guimaraes C, Goupille C, et al. Regulation of hepatic cardiolipin metabolism by TNF $\alpha$ : Implication in cancer cachexia. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Nov;1851(11):1490–500.
102. Arruda AP, Milanski M, Romanatto T, Solon C, Coope A, Alberici LC, et al. Hypothalamic Actions of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Provide the Thermogenic Core for the Wastage Syndrome in Cachexia. *Endocrinology*. 2010 Feb 1;151(2):683–94.
103. Burfeind KG, Michaelis KA, Marks DL. The central role of hypothalamic inflammation in the acute illness response and cachexia. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 Jun;54:42–52.
104. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*. 1997 Jan 9;385(6612):165–8.
105. Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S. POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79:209–36.
106. Laviano A, Seelaender M, Rianda S, Silverio R, Rossi Fanelli F. Neuroinflammation: a contributing factor to the pathogenesis of cancer cachexia. *Crit Rev Oncog*. 2012;17(3):247–51.
107. Marks DL, Ling N, Cone RD. Role of the central melanocortin system in cachexia. *Cancer Res*. 2001 Feb 15;61(4):1432–8.
108. Wisse BE, Frayo RS, Schwartz MW, Cummings DE. Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats. *Endocrinology*. 2001 Aug;142(8):3292–301.
109. Bing C, Taylor S, Tisdale MJ, Williams G. Cachexia in MAC16 adenocarcinoma: suppression of hunger despite normal regulation of leptin, insulin and hypothalamic neuropeptide Y. *J Neurochem*. 2001 Dec;79(5):1004–12.
110. Ericsson A, Liu C, Hart RP, Sawchenko PE. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol*. 1995 Oct 30;361(4):681–98.
111. Scarlett JM, Jobst EE, Enriori PJ, Bowe DD, Batra AK, Grant WF, et al. Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. *Endocrinology*. 2007 Sep;148(9):4217–25.
112. Laviano A, Gleason JR, Meguid MM, Yang ZJ, Cangiano C, Rossi Fanelli F. Effects of intra-VMN mianserin and IL-1ra on meal number in anorectic tumor-bearing rats. *J Investig Med*. 2000 Jan;48(1):40–8.
113. Braun TP, Zhu X, Szumowski M, Scott GD, Grossberg AJ, Levasseur PR, et al. Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Exp Med*. 2011 Nov 21;208(12):2449–63.
114. Van Norren K, Dwarkasing JT, Witkamp RF. The role of hypothalamic inflammation, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonin in the cancer anorexia-cachexia syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017 Sep;20(5):396–401.

115. Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. Involvement of stomach ghrelin and hypothalamic neuropeptides in tumor necrosis factor-alpha-induced hypophagia in mice. *Regul Pept.* 2007 Apr 5;140(1-2):94-100.
116. Dwarkasing JT, Boekschoten MV, Argilès JM, van Dijk M, Busquets S, Penna F, et al. Differences in food intake of tumour-bearing cachectic mice are associated with hypothalamic serotonin signalling. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015 Mar;6(1):84-94.
117. Cangiano C, Cascino A, Ceci F, Laviano A, Mulieri M, Muscaritoli M, et al. Plasma and CSF tryptophan in cancer anorexia. *J Neural Transmission.* 1990 Oct 1;81(3):225-33.
118. Shintani F, Kanba S, Nakaki T, Nibuya M, Kinoshita N, Suzuki E, et al. Interleukin-1 beta augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *J Neurosci.* 1993 Aug;13(8):3574-81.
119. Dwarkasing JT, Marks DL, Witkamp RF, van Norren K. Hypothalamic inflammation and food intake regulation during chronic illness. *Peptides.* 2016 Mar;77:60-6.
120. Chesnokova V, Melmed S. Leukemia inhibitory factor mediates the hypothalamic pituitary adrenal axis response to inflammation. *Endocrinology.* 2000 Nov;141(11):4032-40.
121. Asakawa A, Fujimiya M, Niijima A, Fujino K, Kodama N, Sato Y, et al. Parathyroid hormone-related protein has an anorexigenic activity via activation of hypothalamic urocortins 2 and 3. *Psychoneuroendocrinology.* 2010 Sep;35(8):1178-86.
122. Silva VRR, Micheletti TO, Pimentel GD, Katashima CK, Lenhare L, Morari J, et al. Hypothalamic S1P/S1PR1 axis controls energy homeostasis. *Nat Commun.* 2014 Sep 25;5:4859.
123. Garcia JM, Garcia-Touza M, Hijazi RA, Taffet G, Epner D, Mann D, et al. Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):2920-6.
124. Akamizu T, Kangawa K. Ghrelin for cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2010 Dec;1(2):169-76.
125. Loumaye A, Thissen J-P. Biomarkers of cancer cachexia. *Clin Biochem.* 2017 Dec;50(18):1281-8.
126. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res.* 2001 Apr;21(2B):1355-8.
127. Ueland T, Kjekshus J, Frøland SS, Omland T, Squire IB, Gullestad L, et al. Plasma Levels of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor Type I During the Acute Phase Following Complicated Myocardial Infarction Predicts Survival in High-Risk Patients. *Journal of the American College of Cardiology.* 2005 Dec 6;46(11):2018-21.
128. Batista ML, Oliván M, Alcantara PSM, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, et al. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine.* 2013 Feb;61(2):532-9.
129. Iwase S, Murakami T, Saito Y, Nakagawa K. Steep elevation of blood interleukin-6 (IL-6) associated only with late stages of cachexia in cancer patients. *Eur Cytokine Netw.* 2004 Dec;15(4):312-6.
130. Suh S-Y, Choi YS, Yeom CH, Kwak SM, Yoon HM, Kim DG, et al. Interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts survival in patients with advanced cancer. *Support Care Cancer.* 2013 Nov 1;21(11):3071-7.
131. Scheede-Bergdahl C, Watt HL, Trutschnigg B, Kilgour RD, Haggarty A, Lucar E, et al. Is IL-6 the best pro-inflammatory biomarker of clinical outcomes of cancer cachexia? *Clin Nutr.* 2012 Feb;31(1):85-8.
132. Loumaye A, Barsy M de, Nachit M, Lause P, Maanen A van, Trefois P, et al. Circulating Activin A predicts survival in cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* 2017;8(5):768-77.

133. Breitbart A, Scharf GM, Duncker D, Widera C, Gottlieb J, Vogel A, et al. Highly specific detection of myostatin prodomain by an immunoradiometric sandwich assay in serum of healthy individuals and patients. *PLoS One*. 2013;8(11):e80454.
134. Lerner L, Hayes TG, Tao N, Krieger B, Feng B, Wu Z, et al. Plasma growth differentiation factor 15 is associated with weight loss and mortality in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015 Dec;6(4):317–24.
135. Lerner L, Gyuris J, Nicoletti R, Gifford J, Krieger B, Jatoi A. Growth differentiating factor-15 (GDF-15): A potential biomarker and therapeutic target for cancer-associated weight loss. *Oncol Lett*. 2016 Nov;12(5):4219–23.
136. Patel MS, Lee J, Baz M, Wells CE, Bloch S, Lewis A, et al. Growth differentiation factor-15 is associated with muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease and promotes muscle wasting in vivo. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2016;7(4):436–48.
137. Hong N, Yoon H-J, Lee Y-H, Kim HR, Lee BW, Rhee Y, et al. Serum PTHrP Predicts Weight Loss in Cancer Patients Independent of Hypercalcemia, Inflammation, and Tumor Burden. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Mar;101(3):1207–14.
138. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008 Dec;27(6):793–9.
139. Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(3):370–8.
140. Acharyya S, Butchbach MER, Sahenk Z, Wang H, Saji M, Carathers M, et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: A regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell*. 2005 Nov 1;8(5):421–32.
141. Weber M-A, Kinscherf R, Krakowski-Roosen H, Aulmann M, Renk H, Künkele A, et al. Myoglobin plasma level related to muscle mass and fiber composition: a clinical marker of muscle wasting? *J Mol Med (Berl)*. 2007 Aug;85(8):887–96.
142. Nedergaard A, Karsdal MA, Sun S, Henriksen K. Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013 Mar;4(1):1–17.
143. Millward DJ, Bates PC. 3-Methylhistidine turnover in the whole body, and the contribution of skeletal muscle and intestine to urinary 3-methylhistidine excretion in the adult rat. *Biochem J*. 1983 Aug 15;214(2):607–15.
144. Sun S, Henriksen K, Karsdal MA, Byrjalsen I, Rittweger J, Armbrecht G, et al. Collagen Type III and VI Turnover in Response to Long-Term Immobilization. *PLOS ONE*. 2015 Dec 7;10(12):e0144525.
145. Workeneh BT, Rondon-Berrios H, Zhang L, Hu Z, Ayehu G, Ferrando A, et al. Development of a diagnostic method for detecting increased muscle protein degradation in patients with catabolic conditions. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Nov;17(11):3233–9.
146. Stephens NA, Skipworth RJE, Gallagher IJ, Greig CA, Guttridge DC, Ross JA, et al. Evaluating potential biomarkers of cachexia and survival in skeletal muscle of upper gastrointestinal cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015 Mar;6(1):53–61.
147. McGinn MJ, Kelley BJ, Akinyi L, Oli MW, Liu MC, Hayes RL, et al. Biochemical, structural, and biomarker evidence for calpain-mediated cytoskeletal change after diffuse brain injury uncomplicated by contusion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2009 Mar;68(3):241–9.
148. Tan BHL, Deans D a. C, Skipworth RJE, Ross JA, Fearon KCH. Biomarkers for cancer cachexia: is there also a genetic component to cachexia? *Support Care Cancer*. 2008 Mar;16(3):229–34.
149. 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*. 1998 Jun 1;58(11):2359–65.

150. Skipworth RJE, Stewart GD, Bhana M, Christie J, Sturgeon CM, Guttridge DC, et al. Mass spectrometric detection of candidate protein biomarkers of cancer cachexia in human urine. *Int J Oncol.* 2010 Apr;36(4):973–82.
151. Diakowska D, Markocka-Mączka K, Szelachowski P, Grabowski K. Serum Levels of Resistin, Adiponectin, and Apelin in Gastroesophageal Cancer Patients. *Disease Markers.* 2014;2014:1-8.
152. Russell CD, Ricci MR, Brolin RE, Magill E, Fried SK. Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Mar;280(3):E399-404.
153. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Massa E, Mudu MC, et al. Serum values of proinflammatory cytokines are inversely correlated with serum leptin levels in patients with advanced stage cancer at different sites. *J Mol Med (Berl).* 2001 Jul;79(7):406–14.
154. Bolukbas FF, Kilic H, Bolukbas C, Gumus M, Horoz M, Turhal NS, et al. Serum leptin concentration and advanced gastrointestinal cancers: a case controlled study. *BMC Cancer.* 2004 Jun 24;4(1):29.
155. Weryńska B, Kosacka M, GołECKI M, Jankowska R. [Leptin serum levels in cachectic and non-cachectic lung cancer patients]. *Pneumonol Alergol Pol.* 2009;77(6):500–6.
156. Tessitore L, Vizio B, Pesola D, Cecchini F, Mussa A, Argiles JM, et al. Adipocyte expression and circulating levels of leptin increase in both gynaecological and breast cancer patients. *Int J Oncol.* 2004 Jun;24(6):1529–35.
157. Smiechowska J, Utech A, Taffet G, Hayes T, Marcelli M, Garcia JM. Adipokines in patients with cancer anorexia and cachexia. *J Investig Med.* 2010 Mar;58(3):554–9.
158. Garcia JM, Garcia-Touza M, Hijazi RA, Taffet G, Epner D, Mann D, et al. Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):2920–6.
159. Mondello P, Lacquaniti A, Mondello S, Bolignano D, Pitini V, Aloisi C, et al. Emerging markers of cachexia predict survival in cancer patients. *BMC Cancer.* 2014 Nov 16;14(1):828.
160. Ebadi M, Mazurak V. Potential Biomarkers of Fat Loss as a Feature of Cancer Cachexia. *Mediators of Inflammation.* 2015 Apr 18;2015.
161. Horowitz JF. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 Oct;14(8):386–92.
162. Morigny P, Zuber J, Haid M, Kaltenecker D, Riols F, Lima JDC, et al. High levels of modified ceramides are a defining feature of murine and human cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020 Dec;11(6):1459–75.
163. Taylor LA, Arends J, Hodina AK, Unger C, Massing U. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Health Dis.* 2007 Jul 10;6:17.
164. Aburasayn H, Al Batran R, Ussher JR. Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016 Aug 1;311(2):E423-435.
165. Reber J, Willershäuser M, Karlas A, Paul-Yuan K, Diot G, Franz D, et al. Non-invasive Measurement of Brown Fat Metabolism Based on Optoacoustic Imaging of Hemoglobin Gradients. *Cell Metab.* 2018 Mar 6;27(3):689-701.e4.
166. Dev K, Dinish US, Chakraborty S, Bi R, Andersson-Engels S, Sugii S, et al. Quantitative in vivo detection of adipose tissue browning using diffuse reflectance spectroscopy in near-infrared II window. *J Biophotonics.* 2018 Dec;11(12):e201800135.
167. Mracek T, Stephens NA, Gao D, Bao Y, Ross JA, Rydén M, et al. Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients. *Br J Cancer.* 2011 Feb 1;104(3):441–7.
168. Yang Q, Zhao J, Hao J, Li B, Huo Y, Han Y, et al. Serum and urine metabolomics study reveals a distinct diagnostic model for cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018 Feb;9(1):71–85.

169. Fujiwara Y, Kobayashi T, Chayahara N, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, et al. Metabolomics Evaluation of Serum Markers for Cachexia and Their Intra-Day Variation in Patients with Advanced Pancreatic Cancer. *PLOS ONE*. 2014 Nov 20;9(11):e113259.
170. Shum AMY, Poljak A, Bentley NL, Turner N, Tan TC, Polly P. Proteomic profiling of skeletal and cardiac muscle in cancer cachexia: alterations in sarcomeric and mitochondrial protein expression. *Oncotarget*. 2018 Apr 24;9(31):22001–22.
171. Arner P, Henjes F, Schwenk JM, Darmanis S, Dahlman I, Iresjö B-M, et al. Circulating carnosine dipeptidase 1 associates with weight loss and poor prognosis in gastrointestinal cancer. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123566.
172. Lim S, Dunlap KR, Rosa-Caldwell ME, Haynie WS, Jansen LT, Washington TA, et al. Comparative plasma proteomics in muscle atrophy during cancer-cachexia and disuse: The search for atrokines. *Physiological Reports*. 2020;8(19):e14608.
173. Hahn A, Kny M, Pablo-Tortola C, Todiras M, Willenbrock M, Schmidt S, et al. Serum amyloid A1 mediates myotube atrophy via Toll-like receptors. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020 Feb;11(1):103–19.
174. Stephens NA, Gallagher IJ, Rooyackers O, Skipworth RJ, Tan BH, Marstrand T, et al. Using transcriptomics to identify and validate novel biomarkers of human skeletal muscle cancer cachexia. *Genome Med*. 2010 Jan 15;2(1):1.
175. Fukawa T, Yan-Jiang BC, Min-Wen JC, Jun-Hao ET, Huang D, Qian C-N, et al. Excessive fatty acid oxidation induces muscle atrophy in cancer cachexia. *Nat Med*. 2016 Jun;22(6):666–71.
176. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Jan;20(1):21–37.
177. Katsuda T, Kosaka N, Ochiya T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers. *Proteomics*. 2014 Mar;14(4–5):412–25.
178. Soares RJ, Cagnin S, Chemello F, Silvestrin M, Musaro A, De Pitta C, et al. Involvement of microRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions. *J Biol Chem*. 2014 Aug 8;289(32):21909–25.
179. Lee DE, Brown JL, Rosa-Caldwell ME, Blackwell TA, Perry RA, Brown LA, et al. Cancer cachexia-induced muscle atrophy: evidence for alterations in microRNAs important for muscle size. *Physiol Genomics*. 2017 May 1;49(5):253–60.
180. Fernandez GJ, Ferreira JH, Vechetti IJ Jr, de Moraes LN, Cury SS, Freire PP, et al. MicroRNA-mRNA Co-sequencing Identifies Transcriptional and Post-transcriptional Regulatory Networks Underlying Muscle Wasting in Cancer Cachexia. *Front Genet*. 2020 May 29;11:541–541.
181. Okugawa Y, Toiyama Y, Hur K, Yamamoto A, Yin C, Ide S, et al. Circulating miR-203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2019;10(3):536–48.
182. Tan BHL, Ross JA, Kaasa S, Skorpen F, Fearon KCH, European Palliative Care Research Collaborative. Identification of possible genetic polymorphisms involved in cancer cachexia: a systematic review. *J Genet*. 2011 Apr;90(1):165–77.
183. Johns N, Stretch C, Tan BHL, Solheim TS, Sørhaug S, Stephens NA, et al. New genetic signatures associated with cancer cachexia as defined by low skeletal muscle index and weight loss. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017 Feb;8(1):122–30.
184. Baldwin C, Spiro A, Ahern R, Emery PW. Oral nutritional interventions in malnourished patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Mar 7;104(5):371–85.
185. Tchekmedyian NS, Hickman M, Siau J, Greco FA, Keller J, Browder H, et al. Megestrol acetate in cancer anorexia and weight loss. *Cancer*. 1992 Mar 1;69(5):1268–74.
186. Argilés JM, Anguera A, Stemmler B. A new look at an old drug for the treatment of cancer cachexia: Megestrol acetate. *Clinical Nutrition*. 2013 Jun 1;32(3):319–24.



187. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Serpe R, Massa E, Dessì M, et al. Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment in 332 patients with cancer cachexia. *Oncologist*. 2010;15(2):200–11.
188. Advani SM, Advani PG, VonVille HM, Jafri SH. Pharmacological management of cachexia in adult cancer patients: a systematic review of clinical trials. *BMC Cancer*. 2018 Nov 27;18(1):1174.
189. Badowski ME, Yanful PK. Dronabinol oral solution in the management of anorexia and weight loss in AIDS and cancer. *Ther Clin Risk Manag*. 2018; 14:643–51.
190. Niels T, Tomanek A, Freitag N, Schumann M. Can Exercise Counteract Cancer Cachexia? A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Integr Cancer Ther*. 2020 Jan 1; 19:1534735420940414.
191. Gordon JN, Trebble TM, Ellis RD, Duncan HD, Johns T, Goggin PM. Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut*. 2005 Apr;54(4):540–5.
192. Wilkes EA, Selby AL, Cole AT, Freeman JG, Rennie MJ, Khan ZH. Poor tolerability of thalidomide in end-stage oesophageal cancer. *European Journal of Cancer Care*. 2011;20(5):593–600.
193. Miyamoto Y, Hanna DL, Zhang W, Baba H, Lenz H-J. Molecular Pathways: Cachexia Signaling—A Targeted Approach to Cancer Treatment. *Clin Cancer Res*. 2016 Aug 15;22(16):3999–4004.
194. Torelli GF, Meguid MM, Moldawer LL, Edwards CK, Kim HJ, Carter JL, et al. Use of recombinant human soluble TNF receptor in anorectic tumor-bearing rats. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277(3):R850–855.
195. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1237–47.
196. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Oct;26(5):475–87.
197. Pettersen K, Andersen S, Degen S, Tadini V, Grosjean J, Hatakeyama S, et al. Cancer cachexia associates with a systemic autophagy-inducing activity mimicked by cancer cell-derived IL-6 trans-signaling. *Scientific Reports*. 2017 May 17;7(1):2046.
198. Ando K, Takahashi F, Kato M, Kaneko N, Doi T, Ohe Y, et al. Tocilizumab, a Proposed Therapy for the Cachexia of Interleukin6-Expressing Lung Cancer. *PLOS ONE*. 2014 Jul 10;9(7):e102436.
199. Bayliss TJ, Smith JT, Schuster M, Dragnev KH, Rigas JR. A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2011 Dec;11(12):1663–8.
200. Costelli P, Llovera M, Carbó N, García-Martínez C, López-Sorianoq FJ, Argilés JM. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is unable to reverse cachexia in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Cancer Lett*. 1995 Aug 16;95(1–2):33–8.
201. MD AH. A Phase I Study of Onivyde and 5-FU in Combination With Xilonix for Advanced Pancreatic Cancer With Cachexia [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov); 2020 Dec [cited 2021 Apr 1]. Report No.: NCT03207724.
202. Hickish T, Andre T, Wyrwicz L, Saunders M, Sarosiek T, Kocsis J, et al. MABp1 as a novel antibody treatment for advanced colorectal cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2017 Feb;18(2):192–201.
203. Paspaliaris V, Langan B, DeAndrea R, Wood J, Tsouvelekas A, Demosthenes B. Phase I/II study of IP-1510 a novel interleukin-1 receptor antagonist in the management of cancer-related cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2(209–261):261.
204. Matthys P, Dijkmans R, Proost P, Van Damme J, Heremans H, Sobis H, et al. Severe cachexia in mice inoculated with interferon-gamma-producing tumor cells. *Int J Cancer*. 1991 Aug 19;49(1):77–82.

205. Lu S-W, Pan H-C, Hsu Y-H, Chang K-C, Wu L-W, Chen W-Y, et al. IL-20 antagonist suppresses PD-L1 expression and prolongs survival in pancreatic cancer models. *Nature Communications*. 2020 Sep 14;11(1):4611.
206. Suriben R, Chen M, Higbee J, Oeffinger J, Ventura R, Li B, et al. Antibody-mediated inhibition of GDF15–GFRAL activity reverses cancer cachexia in mice. *Nature Medicine*. 2020 Aug;26(8):1264–70.
207. Jaśkiewicz A, Domoradzki T, Pająk B. Targeting the JAK2/STAT3 Pathway—Can We Compare It to the Two Faces of the God Janus? *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Jan;21(21):8261.
208. Arora GK, Gupta A, Guo T, Gandhi AY, Laine A, Williams DL, et al. Janus kinase inhibitors suppress cancer cachexia-associated anorexia and adipose wasting in mice. *JCSM Rapid Communications*. 2020;3(2):115–28.
209. Prado CMM, Bekaii-Saab T, Doyle LA, Shrestha S, Ghosh S, Baracos VE, et al. Skeletal muscle anabolism is a side effect of therapy with the MEK inhibitor: selumetinib in patients with cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*. 2012 May 8;106(10):1583–6.
210. Au ED, Desai AP, Koniaris LG, Zimmers TA. The MEK-Inhibitor Selumetinib Attenuates Tumor Growth and Reduces IL-6 Expression but Does Not Protect against Muscle Wasting in Lewis Lung Cancer Cachexia. *Front Physiol*. 2016;7:682.
211. Pretto F, Ghilardi C, Moschetta M, Bassi A, Rovida A, Scarlato V, et al. Sunitinib prevents cachexia and prolongs survival of mice bearing renal cancer by restraining STAT3 and MuRF-1 activation in muscle. *Oncotarget*. 2015 Feb 20;6(5):3043–54.
212. Riuzzi F, Sorci G, Sgheddu R, Donato R. HMGB1-RAGE regulates muscle satellite cell homeostasis through p38-MAPK- and myogenin-dependent repression of Pax7 transcription. *J Cell Sci*. 2012 Mar 15;125(Pt 6):1440–54.
213. Chasen M, Hirschman SZ, Bhargava R. Phase II study of the novel peptide-nucleic acid OHR118 in the management of cancer-related anorexia/cachexia. *J Am Med Dir Assoc*. 2011 Jan;12(1):62–7.
214. O’Leary MF, Wallace GR, Bennett AJ, Tsintzas K, Jones SW. IL-15 promotes human myogenesis and mitigates the detrimental effects of TNF $\alpha$  on myotube development. *Sci Rep*. 2017 Oct 11;7(1):12997–12997.
215. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Therapeutic potential of interleukin-15: a myokine involved in muscle wasting and adiposity. *Drug Discov Today*. 2009 Feb;14(3–4):208–13.
216. Hussey HJ, Tisdale MJ. Effect of the specific cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on tumour growth and cachexia in a murine model. *International Journal of Cancer*. 2000;87(1):95–100.
217. Reid J, Hughes CM, Murray LJ, Parsons C, Cantwell MM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of cancer cachexia: a systematic review. *Palliat Med*. 2013 Apr;27(4):295–303.
218. Fielitz J. Cancer cachexia—when proteasomal inhibition is not enough. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016 Jun;7(3):239–45.
219. Penna F, Bonetto A, Aversa Z, Minero VG, Rossi Fanelli F, Costelli P, et al. Effect of the specific proteasome inhibitor bortezomib on cancer-related muscle wasting. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016 Jun;7(3):345–54.
220. Wang Q, Li C, Peng X, Kang Q, Deng D, Zhang L, et al. Combined treatment of carfilzomib and z-VAD-fmk inhibits skeletal proteolysis and apoptosis and ameliorates cancer cachexia. *Med Oncol*. 2015 Apr;32(4):100.
221. Zhang G, Liu Z, Ding H, Miao H, Garcia JM, Li Y-P. Toll-like receptor 4 mediates Lewis lung carcinoma-induced muscle wasting via coordinate activation of protein degradation pathways. *Sci Rep*. 2017 May 23;7(1): 2273.

222. Henriques F, Lopes MA, Franco FO, Knobl P, Santos KB, Bueno LL, et al. Toll-Like Receptor-4 Disruption Suppresses Adipose Tissue Remodeling and Increases Survival in Cancer Cachexia Syndrome. *Sci Rep*. 2018 Dec 21;8(1):18024.
223. Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 15;391(3):1548–54.
224. Barreto R, Kitase Y, Matsumoto T, Pin F, Colston KC, Couch KE, et al. ACVR2B/Fc counteracts chemotherapy-induced loss of muscle and bone mass. *Scientific Reports*. 2017 Oct 31;7(1):14470.
225. Huot JR, Pin F, Narasimhan A, Novinger LJ, Keith AS, Zimmers TA, et al. ACVR2B antagonism as a countermeasure to multi-organ perturbations in metastatic colorectal cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2020;11(6):1779–98.
226. Toledo M, Busquets S, Penna F, Zhou X, Marmonti E, Betancourt A, et al. Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: Additive effects of activin type II receptor inhibition and  $\beta$ -2 agonist. *Int J Cancer*. 2016 Apr 15;138(8):2021–9.
227. Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, Mitch WE, Higashi Y, Sukhanov S, et al. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Oct;45(10):2322–32.
228. Schanze N, Springer J. Evidence for an effect of ACE inhibitors on cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012 Jun;3(2):139.
229. Tian Q, Miyazaki R, Ichiki T, Imayama I, Inanaga K, Ohtsubo H, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 expression by telmisartan through cross-talk of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma with nuclear factor kappaB and CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Hypertension*. 2009 May;53(5):798–804.
230. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res*. 2009 Jul;32(7):533–6.
231. Murphy KT, Hossain MI, Swiderski K, Chee A, Naim T, Trieu J, et al. Mas Receptor Activation Slows Tumor Growth and Attenuates Muscle Wasting in Cancer. *Cancer Res*. 2019 Feb 15;79(4):706–19.
232. Lainscak M, Laviano A. ACT-ONE - ACTION at last on cancer cachexia by adapting a novel action beta-blocker. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016 Sep;7(4):400–2.
233. Stewart Coats AJ, Ho GF, Prabhaskar K, von Haehling S, Tilson J, Brown R, et al. Espindolol for the treatment and prevention of cachexia in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer or colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled, international multicentre phase II study (the ACT-ONE trial). *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016 Jun;7(3):355–65.
234. Costelli P, Tullio RD, Baccino FM, Melloni E. Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *British Journal of Cancer*. 2001 Apr;84(7):946–50.
235. Lin X-Y, Chen S-Z. Calpain inhibitors ameliorate muscle wasting in a cachectic mouse model bearing CT26 colorectal adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 2017 Mar;37(3):1601–10.
236. von Maltzahn J, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*. 2011 Dec 18;14(2):186–91.
237. Schmidt M, Poser C, von Maltzahn J. Wnt7a Counteracts Cancer Cachexia. *Molecular Therapy - Oncolytics*. 2020 Mar 27;16:134–46.
238. Okugawa Y, Toiyama Y, Hur K, Yamamoto A, Yin C, Ide S, et al. Circulating miR-203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2019;10(3):536–48.
239. Jin J, Huang S, Wang L, Leng Y, Lu W. Design and synthesis of Atglistatin derivatives as adipose triglyceride lipase inhibitors. *Chem Biol Drug Des*. 2017 Dec;90(6):1122–33.
240. Peacock JL, Norton JA. Impact of insulin on survival of cachectic tumor-bearing rats. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1988;12(3):260–4.

241. Zhang T, He J, Xu C, Zu L, Jiang H, Pu S, et al. Mechanisms of metformin inhibiting lipolytic response to isoproterenol in primary rat adipocytes. *J Mol Endocrinol*. 2009 Jan;42(1):57–66.
242. Oliveira AG, Gomes-Marcondes MCC. Metformin treatment modulates the tumour-induced wasting effects in muscle protein metabolism minimising the cachexia in tumour-bearing rats. *BMC Cancer*. 2016 Jul 7;16:418.
243. Trobec K, Palus S, Tschirner A, von Haehling S, Doehner W, Lainscak M, et al. Rosiglitazone reduces body wasting and improves survival in a rat model of cancer cachexia. *Nutrition*. 2014 Sep;30(9):1069–75.
244. Balaz M, Becker AS, Balazova L, Straub L, Müller J, Gashi G, et al. Inhibition of Mevalonate Pathway Prevents Adipocyte Browning in Mice and Men by Affecting Protein Prenylation. *Cell Metab*. 2019 Apr 2;29(4):901-916.e8.
245. Muscaritoli M, Costelli P, Bossola M, Grieco G, Bonelli G, Bellantone R, et al. Effects of simvastatin administration in an experimental model of cancer cachexia. *Nutrition*. 2003 Dec;19(11–12):936–9.
246. Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, et al. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol*. 2004 Apr;150(4):447–55.
247. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A. Ghrelin and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2013 Apr;28(4):521–6.
248. DeBoer MD, Zhu XX, Levasseur P, Meguid MM, Suzuki S, Inui A, et al. Ghrelin treatment causes increased food intake and retention of lean body mass in a rat model of cancer cachexia. *Endocrinology*. 2007 Jun;148(6):3004–12.
249. Takayama K, Katakami N, Yokoyama T, Atagi S, Yoshimori K, Kagamu H, et al. Anamorelin (ONO-7643) in Japanese patients with non-small cell lung cancer and cachexia: results of a randomized phase 2 trial. *Support Care Cancer*. 2016 Aug;24(8):3495–505.
250. Hamauchi S, Furuse J, Takano T, Munemoto Y, Furuya K, Baba H, et al. A multicenter, open-label, single-arm study of anamorelin (ONO-7643) in advanced gastrointestinal cancer patients with cancer cachexia. *Cancer*. 2019 Dec 1;125(23):4294–302.
251. Weyermann P, Dallmann R, Magyar J, Anklin C, Hufschmid M, Dubach-Powell J, et al. Orally available selective melanocortin-4 receptor antagonists stimulate food intake and reduce cancer-induced cachexia in mice. *PLoS One*. 2009;4(3):e4774.
252. Kardinal CG, Loprinzi CL, Schaid DJ, Hass AC, Dose AM, Athmann LM, et al. A controlled trial of cyproheptadine in cancer patients with anorexia and/or cachexia. *Cancer*. 1990 Jun 15;65(12):2657–62.