

III. RESULTADOS

CAPITULO I

**ESTUDIO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN
EL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN MODELOS
EXPERIMENTALES DE CAQUEXIA**

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

La caquexia es un complejo conjunto de alteraciones asociado a diferentes estados patológicos, y que ocurren a diferentes niveles. Los síntomas que presentan los pacientes con caquexia son el producto del conjunto de alteraciones que sufre el organismo en presencia de la patología. Estas alteraciones tienen su origen en los cambios de la expresión de diferentes genes, o en cambios en la actividad del producto de distintos genes. Si buscamos la causa de estas alteraciones, nos encontramos con que gran número de ellas vienen dadas por cambios en la regulación de los diferentes genes, lo que a su vez se traduce en un cambio de la actividad de los distintos factores de transcripción. Teniendo esto en mente, los objetivos de este capítulo son:

- 1.- Analizar la actividad de unión al DNA de los factores de transcripción AP-1 (*activator protein-1*), NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) y Sp-1 en el músculo gastrocnemius (GSN) de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130.
- 2.- Determinar en el músculo GSN de animales portadores del hepatoma ascítico Yoshida AH-130, la expresión del mRNA y la proteína del factor miogénico MyoD, uno de los factores miogénicos implicados en la diferenciación y la regeneración del músculo esquelético, y la expresión de Id3, una de las proteínas encargadas de la inhibición de MyoD.
- 3.- Determinar la expresión del mRNA codificante para MyoD en el músculo GSN de ratones portadores del carcinoma pulmonar de Lewis, así como los niveles de proteína para este mismo factor en los músculos GSN y EDL (*extensor digitorum longus*).
- 4.- Determinar la expresión de MyoD y la actividad de unión al DNA de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B en el músculo GSN de ratones portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich.
- 5.- Analizar los niveles de MyoD en el músculo esquelético de pacientes con cáncer de páncreas.
- 6.- Determinar la expresión del mRNA y proteína del factor miogénico MyoD y los niveles de I κ B α (inhibidor de NF- κ B), en el músculo GSN de ratas tratadas de forma aguda con lipopolisacárido (LPS).

Para el desarrollo de estos objetivos (1-4), utilizamos tres modelos tumorales distintos, los cuales inducen una importante y marcada caquexia.

El primero de ellos es el hepatoma ascítico Yoshida AH-130 de rata. Analizamos la actividad de unión al DNA y la expresión de los distintos factores de transcripción en tres etapas de crecimiento tumoral: día 2, donde podemos observar la respuesta primaria del huésped al proceso invasivo; día 4, donde observamos un crecimiento exponencial del tumor; y día 7, cuando el tumor llega a la fase estacionaria de su crecimiento.

El segundo modelo es el carcinoma pulmonar de Lewis, un modelo de ratón, en el que el tumor es implantado en una de las patas traseras del animal; en este caso, los animales fueron sacrificados a los 15 días de crecimiento tumoral.

El tercero, también un modelo de ratón, es el hepatoma ascítico de Ehrlich, que se implanta en la cavidad peritoneal; los animales fueron sacrificados a los 10 días de crecimiento tumoral.

Para el objetivo 5 analizamos muestras de músculo esquelético de pacientes con cáncer de páncreas, cedidas por el grupo del Dr. Fearon (*Department of Surgery, Royal Infirmary of Edinburgh, Scotland, Unnited Kingdom*).

Para el objetivo 6 utilizamos ratas Wistar macho de 100-120 g, que fueron tratadas con una dosis única de 3 mg de LPS por Kg de peso. Los animales fueron sacrificados a las 3, 9 y 24 horas posteriores a la administración del LPS.

1. Análisis de la actividad de unión al DNA de NFκB, AP-1, C/EBP y Sp-1 en el músculo esquelético de ratas portadoras del tumor Yoshida AH-130.

La implantación del hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en ratas, provoca una importante pérdida de peso en tejidos y órganos en los animales (tabla 1, 2 y 3) así como una activación del sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina y de la apoptosis en el músculo esquelético (García-Martínez *et al.*, 1993; Llovera *et al.*, 1994; van Royen *et al.*, 2000).

	Control (4)	Tumor día 2 (5)
GSN (mg)	567±8	528±7**
Soleus (mg)	38±2	36±1
Tibialis (mg)	186±1	168±4**
EDL (mg)	41±1	40±1
TAB (mg)	603±23	782±75
Corazón (mg)	362±23	354±11
Higado (mg)	4920±340	4463±109
Carcasa (g)	92,2±2	88,4±1
Ganancia de peso (g)	11,8±0,8	12,1±0,4
Ingesta total (g)	34,4±1,1	32,4±0,7

Tabla 1. Efecto del hepatoma ascítico Yoshida AH-130, a día 2 de crecimiento tumoral. Los datos están presentados como media ± s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis. GSN = gastrocnemius, TAB = tejido adiposo blanco (dorsal), EDL = *extensor digitorum longus*. Ingesta total: cantidad de pienso consumido durante los 2 días de experimento. Ganancia de peso: diferencia entre el peso final sin tumor y el peso inicial. Significatividad estadística de las diferencias: **, p<0,01.

	Control (4)	Tumor día 4 (5)
GSN (mg)	598±10	518±10***
Soleus (mg)	41±1	39±1
Tibialis (mg)	194±4	166±3***
EDL (mg)	49±1	43±2*
TAB (mg)	625±34	699±59
Corazón (mg)	444±18	424±18
Higado (mg)	5665±610	5337±135
Carcasa (mg)	103,2±1	93,4±2**
Ganancia de peso (g)	23,8±1,5	14,7±1,9
Ingesta total (g)	72,1±0,2	65,5±2,9

Tabla 2. Efecto del hepatoma ascítico Yoshida AH-130, a día 4 de crecimiento tumoral. Los datos están presentados como media ± s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis. GSN = gastrocnemius, TAB = tejido adiposo blanco (dorsal), EDL = *extensor digitorum longus*. Ingesta total: cantidad de pienso consumido durante los 4 días de experimento. Ganancia de peso: diferencia entre el peso final sin tumor y el peso inicial. Significatividad estadística de las diferencias: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

	Control (5)	Tumor día 7 (6)
GSN (mg)	673±9	523±19***
Soleus (mg)	47±2	36±1***
Tibialis (mg)	217±2	165±3***
EDL (mg)	54±1	41±1***
TAB (mg)	897±121	491±73*
Corazón (mg)	427±12	330±16**
Higado (mg)	5886±306	5329±169
Carcasa (mg)	110,7±1	80,1±2***
Ganancia de peso (g)	44,7±2,1	-5,9±3,7***
Ingesta total (g)	137,9±0,5	97,3±2,8***

Tabla 3. Efecto del hepatoma ascítico Yoshida AH-130, a día 7 de crecimiento tumoral. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis. GSN = gastrocnemius, TAB = tejido adiposo blanco (dorsal), EDL = *extensor digitorum longus*. Ingesta total: cantidad de pienso consumido durante los 7 días de experimento. Ganancia de peso: diferencia entre el peso final sin tumor y el peso inicial. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

La pérdida de peso en tejidos y órganos se hizo más marcada, a medida que el tumor crecía en la cavidad abdominal. Los GSN de los animales portadores de tumor a día 2 presentaron una pérdida de peso con respecto al control de un 7%, los de los animales portadores de tumor a día 4 un 13%, y los de los animales portadores de tumor de día 7 un 22%.

Es a día 7 cuando encontramos una pérdida de peso generalizada en músculos y órganos, y una muy importante diferencia en el peso de la carcasa (casi un 28% menos que los controles).

La pérdida de peso también se hizo evidente en otros músculos; en los primeros estadios del crecimiento tumoral (día 2), la pérdida de peso en músculos sólo se hizo evidente en los músculos GSN y tibialis (un 10% más pequeños que sus controles), dos músculos de tipo mixto; a día 4, además de observar la disminución en los músculos mixtos, pudimos observar una disminución significativa del EDL (un 12% más pequeños que en el grupo control), un músculo blanco provisto principalmente de fibras de tipo II; a día 7 fue donde encontramos el mayor desgaste, ya que observamos una disminución del peso de todos los músculos independiente del tipo de fibra que lo formen.

Otro músculo que se encuentra afectado por el crecimiento tumoral es el músculo cardíaco; hemos observado una disminución en el peso del corazón de un 2% a día 2 de crecimiento tumoral, un 5% a día 4, y un 23% a día 7.

El tejido adiposo blanco también presentó una disminución de un 45% con respecto sus controles en los animales portadores de tumor a día 7, aunque a día 2 y 4 no presentaba cambios.

Si analizamos la ingesta, podemos observar que los animales con tumor comían menos que los animales control; esta diferencia se hizo significativa a día 7 de crecimiento tumoral, aunque los animales portadores de tumor a día 4 comían un 10% menos que los controles.

1.1. Actividad de unión al DNA del factor de transcripción NF- κ B, en el músculo esquelético de ratas portadoras de tumor.

Decidimos estudiar este factor de transcripción porque fue uno de los primeros en ser relacionados con el desgaste muscular asociado a la caquexia, concretamente en un modelo de sepsis (Penner *et al.*, 2001). Resultados obtenidos *in vitro* por distintos grupos de investigación demuestran su relación en la inhibición tanto de la expresión como de los niveles de la proteína para el factor miogénico MyoD (Salía *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Coletti *et al.*, 2002; Langen *et al.*, 2004;), e incluso lo postulan como el factor clave en el desgaste muscular asociado a la caquexia (Guttridge *et al.*, 2000). NF- κ B puede ser activado por TNF- α , que es una de las citoquinas implicadas en el desarrollo de la caquexia y todas sus alteraciones (Tessitore *et al.*, 1987; Costelli *et al.*, 1993). Sin embargo, cuando analizamos la actividad de unión al DNA de este factor de transcripción, no observamos ninguna diferencia en el transcurso del crecimiento tumoral (figura 1).

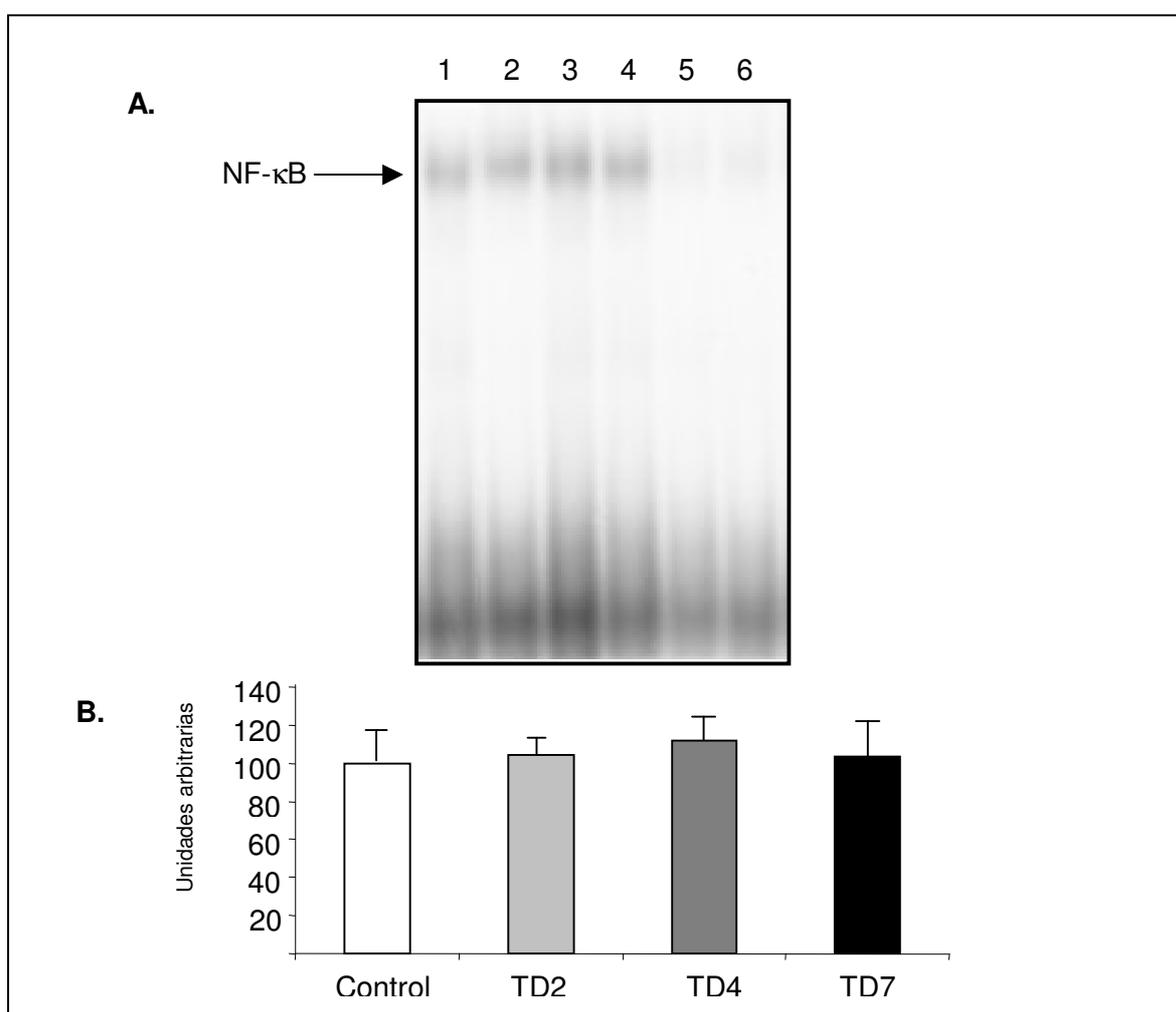


Figura 1. Actividad de unión al DNA para el factor de transcripción NF- κ B en músculo GSN de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Panel A: EMSA representativo para el factor de transcripción NF- κ B. Los carriles son: control (1), TD2 (tumor de día 2)(2), TD4 (tumor de día 4)(3), TD7 (tumor de día 7)(4), control mutante (5) y sonda libre (6). Panel B: análisis densitométrico de los resultados. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m.

1.1.1. Expresión de la proteína I κ B α .

Para confirmar la actividad de unión al DNA de NF- κ B, decidimos determinar por Western blot los niveles de expresión de una de las proteínas que normalmente lo inhiben: I κ B α . En la figura 2 podemos observar como los niveles de I κ B α no varían en el transcurso del crecimiento tumoral, dato que confirma los resultados obtenidos para la actividad de unión al DNA de NF- κ B.

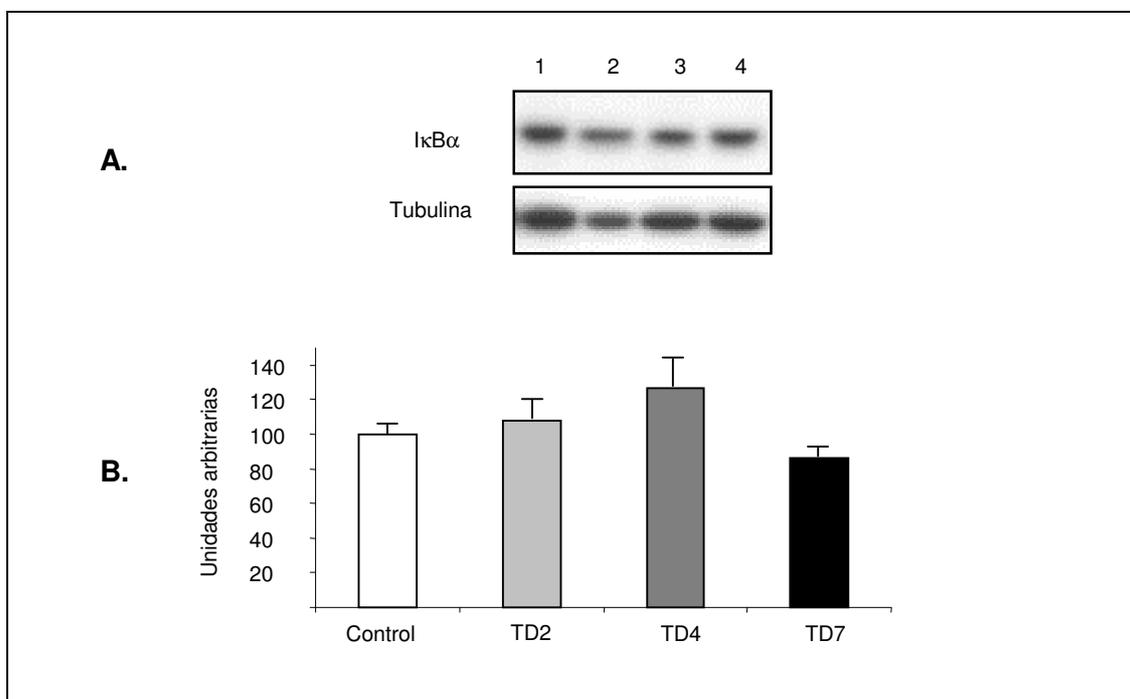


Figura 2. Niveles de I κ B α en músculo GSN de ratas controles y portadoras de tumor. Panel A: Western blot representativo de la expresión de I κ B α en ratas control y portadoras de tumor a día 2, 4 y 7 de crecimiento tumoral. La carga de proteína es corregida con la expresión de la tubulina. Los carriles son: control (1), TD2 (2), TD4 (3) y TD7 (4). Panel B: análisis densitométrico de la expresión de I κ B α . Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m.

1.2. Actividad de unión al DNA del factor de transcripción AP-1 en el músculo esquelético de ratas portadoras de tumor.

Este factor de transcripción también ha sido relacionado con el desgaste muscular asociado a la sepsis (Penner *et al.*, 2001); por esta razón, analizamos su actividad de unión al DNA durante el transcurso del crecimiento tumoral. En la figura 3 podemos observar como la actividad de unión al DNA para AP-1 a día 2 de crecimiento tumoral no presenta cambios, pero aumenta significativamente a día 4 para luego volver a sus niveles basales a día 7 de crecimiento tumoral.

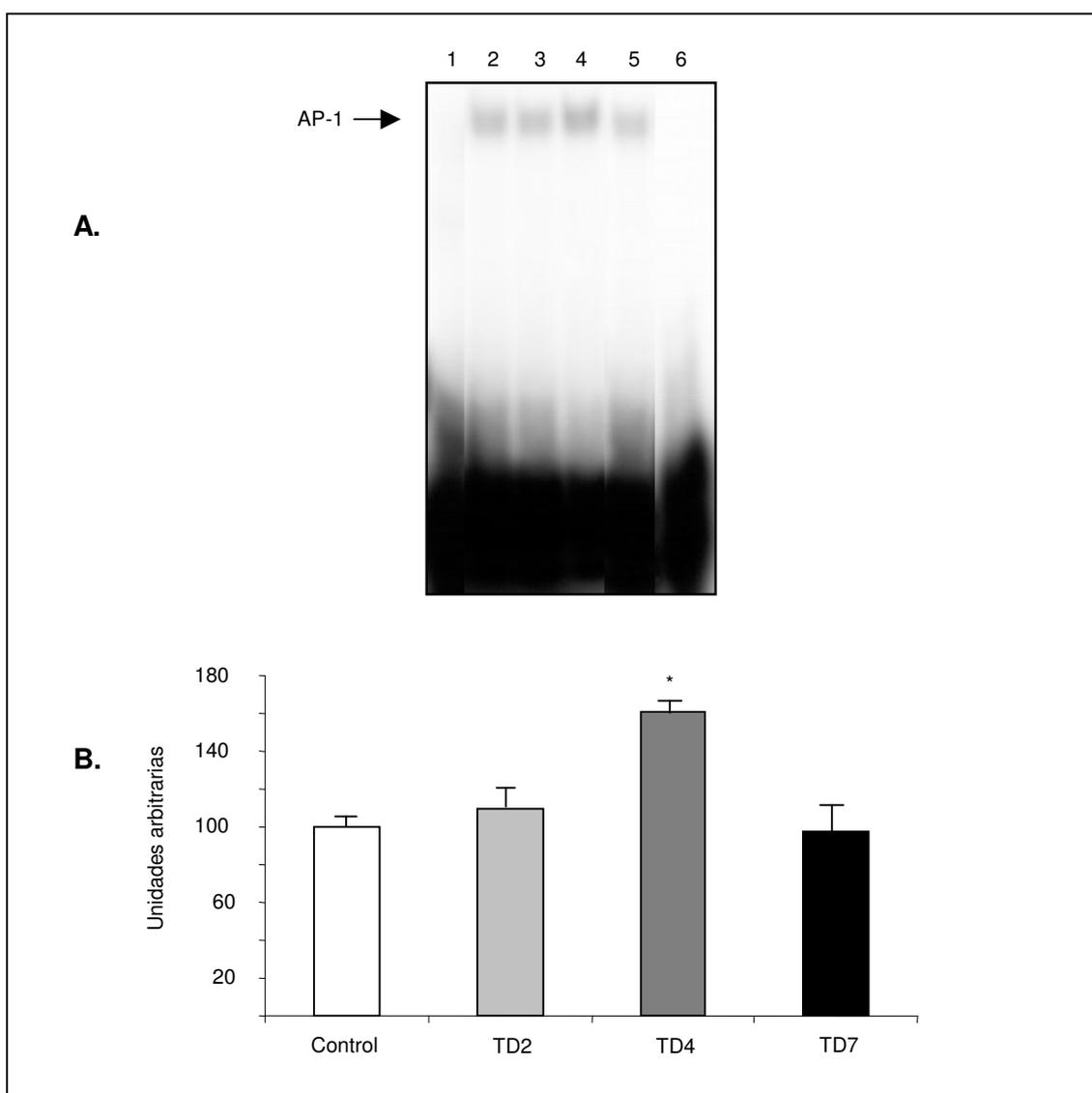


Figura 3. Actividad de unión al DNA del factor de transcripción AP-1 en músculo GSN de ratas control y portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Panel A: EMSA representativo para AP-1; los carriles son: sonda libre (1), control (2), TD2 (3), TD4 (4), TD7 (5) y sonda mutante (6). Panel B: análisis densitométrico de la actividad de unión al DNA para AP-1. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$.

1.3. Actividad de unión al DNA del factor de transcripción C/EBP en el músculo esquelético de ratas portadoras de tumor.

Este factor de transcripción, importante en la regulación de algunas de las subunidades del proteasoma y de otros sistemas proteolíticos (Hata *et al.*, 1989; Hopitzan *et al.*, 2000; Marinovic *et al.*, 2000), además de estar fuertemente activado en el músculo GSN de ratas con sepsis (Penner *et al.*, 2002), no presentó diferencias significativas, en los músculos GSN de ratas portadoras de tumor a día 7 (figura 4).

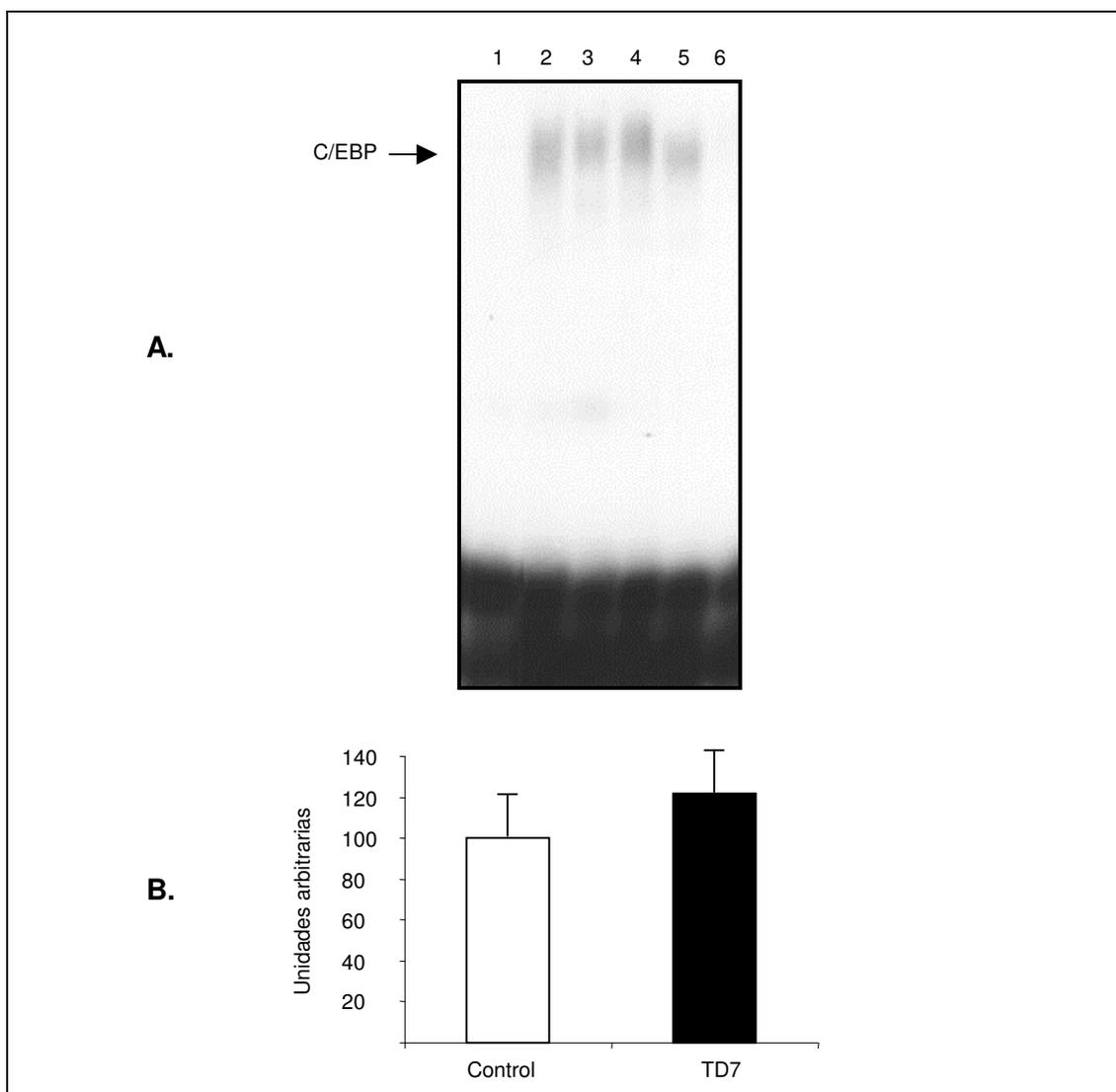


Figura 4. Actividad de unión al DNA del factor de transcripción C/EBP en el músculo GSN de ratas portadoras del tumor Yoshida AH-130 a día 7. Panel A: EMSA representativo para C/EBP; los carriles son: sonda libre (1), control (2-3), TD7 (4-5) y sonda mutante (6). Panel B: Análisis densitométrico de la actividad de unión al DNA para C/EBP. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m.

1.4. Actividad de unión al DNA del factor de transcripción Sp-1 en el músculo GSN de ratas portadoras del tumor Yoshida AH-130.

Sp-1 es un factor de transcripción implicado en la diferenciación de células musculares en cultivo (Lehtinen *et al.*, 1996), además de estar involucrado en la regulación del transportador de glucosa GLUT1 (Sanchez-Feutrie *et al.*, 2003 y 2004). También se ha descrito que Sp-1 está fuertemente disminuido durante la miogénesis, y que uno de los mecanismos por el cual Sp-1 disminuye en miotubos es porque MyoD ejerce un efecto represor sobre este factor de transcripción (Viñals *et al.*, 1997). Utilizando la técnica de *microarray* se ha demostrado que Sp-1 es una diana de IGF-I (Li *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en nuestro modelo tumoral demuestran que la actividad de este factor se mantiene inalterada en los músculos GSN de las ratas portadoras de tumor a día 7 (figura 5).

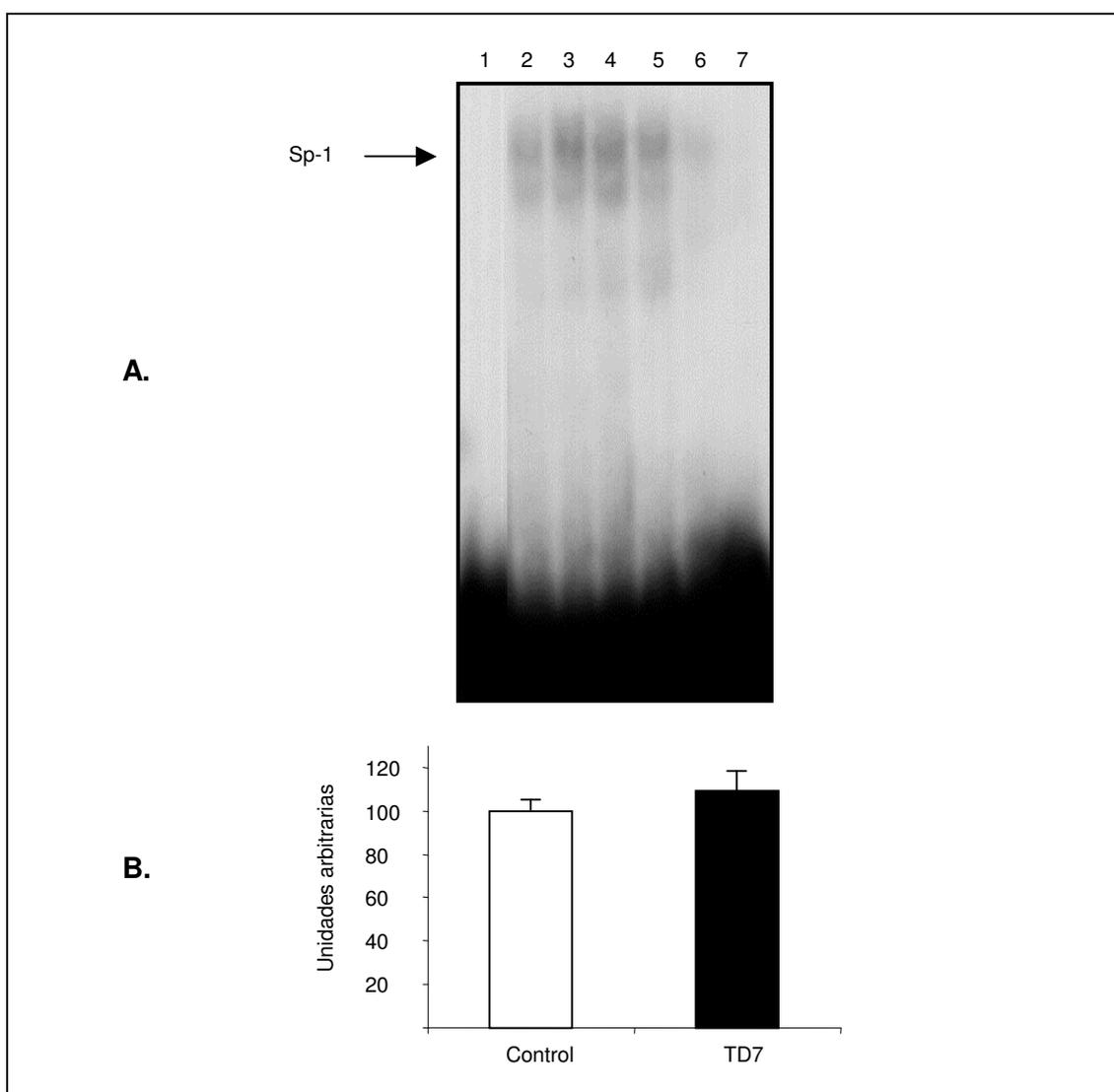


Figura 5. Actividad de unión al DNA del factor de transcripción Sp-1 en el músculo GSN de ratas portadoras del tumor Yoshida AH-130 a día 7. Panel A: EMSA representativo para Sp-1; los carriles son: sonda libre (1), control (2-3), TD7 (4-5), competencia sonda fría 1/100 (6) y competencia sonda fría 1/1000 (7). Panel B. Análisis densitométrico de la actividad de unión al DNA para Sp-1. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m.

2. Regulación del factor miogénico MyoD, en el músculo esquelético durante la caquexia.

MyoD es un miembro de la familia de factores de transcripción bHLH (*basic helix loop helix*). Este factor es fundamental para el correcto desarrollo del programa miogénico durante el desarrollo, además de estar involucrado en el proceso de regeneración de las fibras musculares dañadas (Lassar *et al.*, 1994; Black y Olson, 1998).

2.1. MyoD y crecimiento tumoral.

Se conoce muy poco sobre la regulación de MyoD durante el crecimiento tumoral. Estudios *in vitro* con células musculares derivadas de ratón implican a MyoD en la patogénesis de la caquexia y los autores de este estudio lo proponen como un mecanismo por el cual el músculo esquelético no podría recuperarse del daño causado por el crecimiento tumoral (Guttridge *et al.*, 2000).

2.1.1. Expresión del factor MyoD en los músculos gastrocnemius de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130.

En nuestro estudio hemos podido determinar que en el músculo esquelético de animales portadores de tumor, se presenta una importante disminución de la expresión tanto del mRNA como de la proteína para este factor miogénico. En el modelo tumoral de Yoshida AH-130, la expresión de MyoD comienza a disminuir desde el día 4 de crecimiento tumoral, y continúa bajando hasta el día 7 (figura 6).

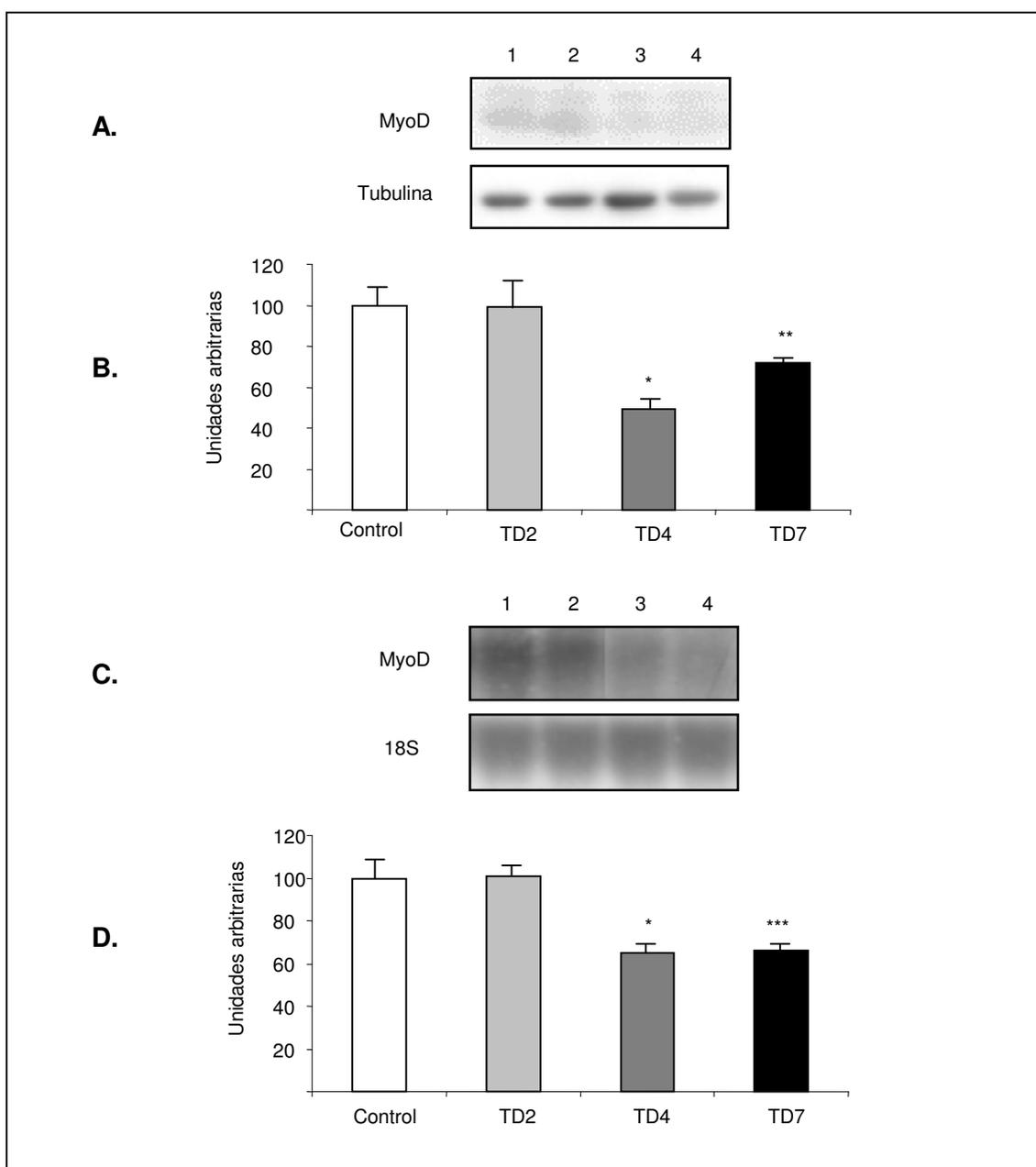


Figura 6. Expresión del factor miogenico MyoD en el músculo GSN de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Panel A. Western blot representativo de la expresión de MyoD en los músculos GSN; los carriles son: control (1), TD2 (2), TD4 (3) y TD7 (4). La carga de proteína fue corregida con la expresión de la tubulina. Panel B. Análisis densitométrico de la expresión de MyoD. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m. Panel C. Northern blot representativo de la expresión del factor MyoD; los carriles son: control (1), TD2 (2), TD4 (3) y TD7 (4). Panel D. Análisis densitométrico de los resultados, expresados como la media \pm s.e.m. y presentados como porcentaje del control. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

2.1.1.1. Expresión génica de Id3 en músculo gastrocnemius de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130.

Id3 es una de las proteínas encargadas de la inhibición de la familia de factores de transcripción bHLH (Langlands *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 1998). Analizando su expresión por RT-PCR, no observamos diferencias significativas en este modelo experimental de caquexia cancerosa (figura 7).

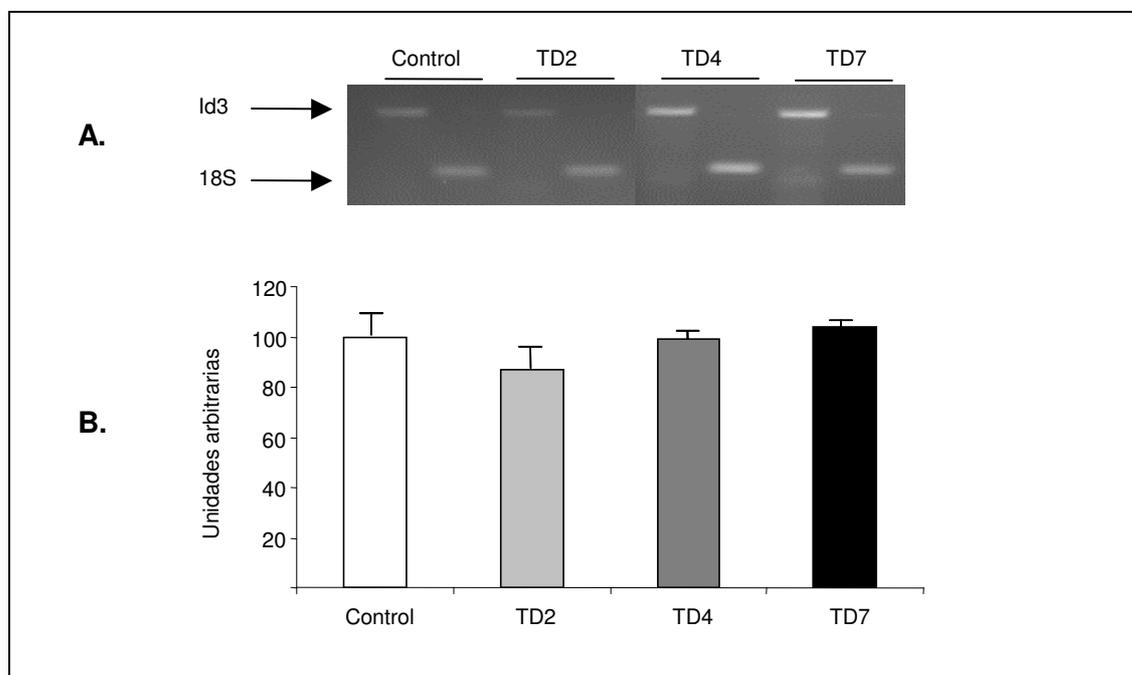


Figura 7. Expresión del inhibidor Id3 en el músculo GSN de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Panel A. RT-PCR representativa de la expresión de Id3. Panel B. Análisis densitométrico de los resultados, expresados como la media \pm s.e.m. y presentados como porcentaje del control.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de la actividad de unión al DNA para los factores de transcripción realizadas por EMSA, así como los análisis de la expresión génica y niveles de proteína, se muestran de forma resumida en la tabla 4.

	Control	Tumor día 2	Tumor día 4	Tumor día 7
NFκB (EMSA)	100 \pm 16(4)	133 \pm 15(3)	107 \pm 6(5)	95 \pm 13(5)
AP-1 (EMSA)	100 \pm 8(4)	110 \pm 11(5)	162 \pm 13(5)**	96 \pm 10(5)
C/EBP (EMSA)	100 \pm 20(4)	n.d.	n.d.	122 \pm 20(4)
Sp1 (EMSA)	100 \pm 4(4)	n.d.	n.d.	109 \pm 14(7)
IκBα (Western)	100 \pm 9(3)	108 \pm 22(3)	127 \pm 24(3)	86 \pm 13(3)
MyoD (Northern)	100 \pm 10(4)	101 \pm 6(5)	65 \pm 9(3)*	66 \pm 7(4)***
MyoD (Western)	100 \pm 10(4)	99 \pm 18(4)	49 \pm 5(3)*	72 \pm 4(4)**
Id3 (RT-PCR)	100 \pm 11(4)	87 \pm 14(5)	99 \pm 2(4)	104 \pm 7(4)

Tabla 4. Resumen de los resultados en el modelo de hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis, así como la técnica utilizada para la determinación. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. n.d. = no determinado.

3. Análisis del factor miogénico MyoD en el músculo esquelético de ratones portadores del carcinoma pulmonar de Lewis (LLC).

La implantación del LLC produjo una marcada caquexia en los animales, pero a diferencia del modelo del Yoshida AH-130, en este caso no se presenta asociada a anorexia (tabla 5). Este hecho nos permite estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de la caquexia que son independientes de la anorexia.

Los músculos GSN de los animales portadores de tumor presentaron una pérdida de masa de un 13% con respecto a los controles. Otro músculo que presentaba una importante pérdida de peso eran los tibialis, con un 21% menos que los controles.

En este modelo, la pérdida de peso en el tejido adiposo es muy importante, llegando en ocasiones a ser total; en los animales portadores de tumor de este experimento, la pérdida de peso en TAB dorsal fue de un 76%.

	Control (7)	LLC (8)
GSN (mg)	563±4	492±9***
Soleus (mg)	28±1	23±2
Tibialis (mg)	192±2	152±3***
EDL (mg)	40±1	35±2*
TAB (mg)	238±18	58±12***
Corazón (mg)	432±15	401±17
Carcasa (mg)	80±1	69±1***
Ingesta total (g)	46±1	51±2

Tabla 5. Efecto del crecimiento del carcinoma pulmonar de Lewis en ratón. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis. GSN = gastrocnemius, TAB = tejido adiposo blanco (dorsal), EDL = *extensor digitorum longus*. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

3.1. Expresión del factor miogénico MyoD en el músculo esquelético de animales portadores del carcinoma pulmonar de Lewis.

Para el modelo de LLC, la expresión del mRNA codificante para MyoD en los músculos GSN de los animales portadores de tumor se presentó disminuida significativamente. Al analizar los niveles de proteína, observamos que mientras en el músculo GSN no hubo diferencias, en el músculo EDL el factor MyoD disminuyó significativamente (figura 8). En la tabla 6 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para este modelo tumoral.

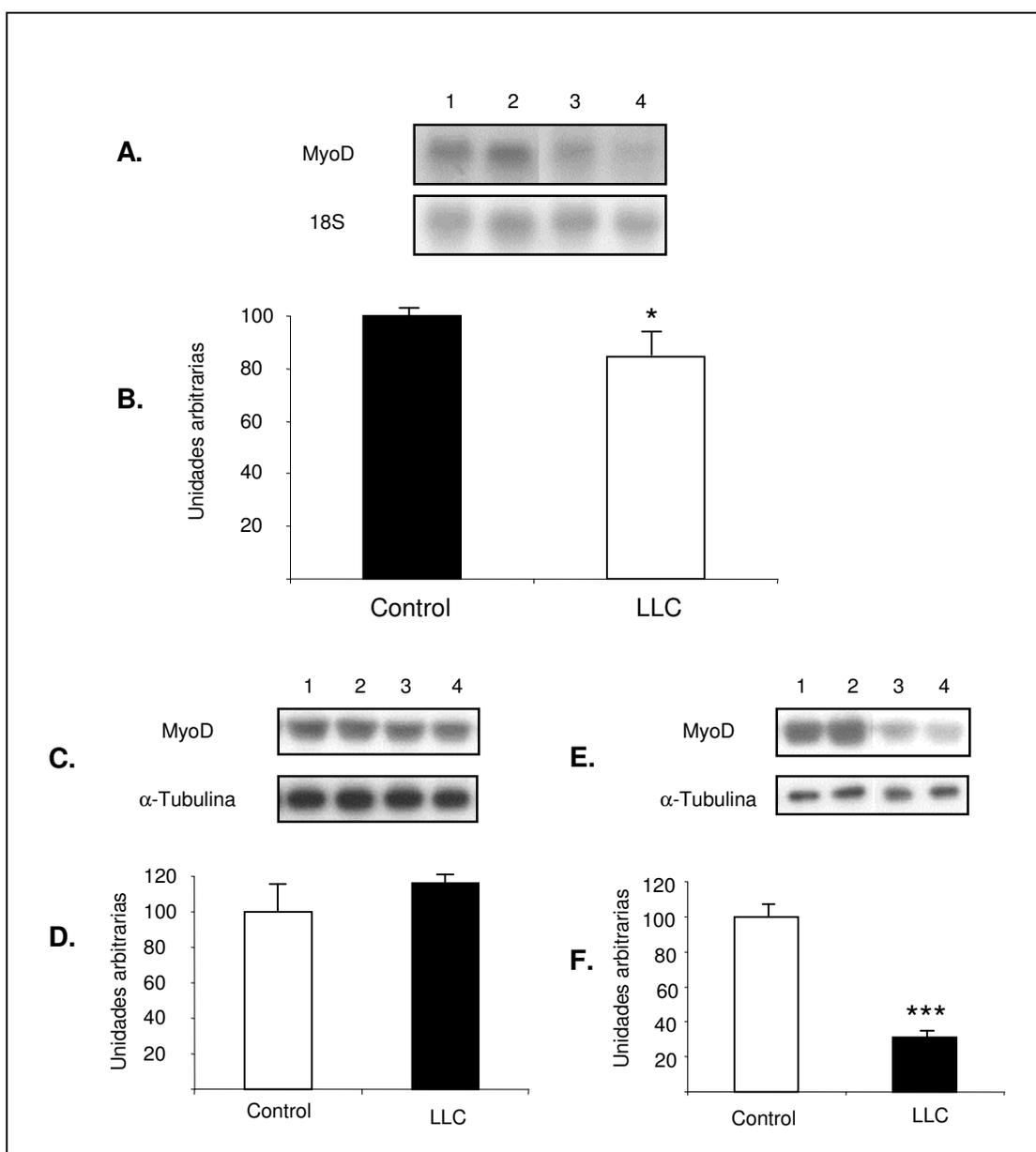


Figura 8. Expresión del factor miogénico MyoD en el músculo esquelético de animales portadores del carcinoma pulmonar de Lewis. Panel A: Northern blot representativo de la expresión del factor MyoD en los músculos GSN de ratones control y portadores del LLC; los carriles son: control (1-2) y LLC (3-4). Panel B: Análisis densitométrico de la expresión del mRNA para MyoD en músculos GSN de controles y portadores del LLC. Panel C: Western blot representativo de la expresión de MyoD en los músculos GSN; los carriles son: control (1-2) y LLC (3-4); la carga de proteína fue corregida con la expresión de la tubulina. Panel D: Análisis densitométrico de la proteína MyoD en los músculos GSN de los animales controles y LLC. Panel E: Western blot representativo de la expresión de MyoD en los músculos EDL; los carriles son: control (1-2) y LLC (3-4); la carga de proteína fue corregida con la expresión de la tubulina. Panel F: Análisis densitométrico de la expresión proteica del factor MyoD en los músculos EDL de controles y ratones portadores del LLC. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

3.2. Resumen de los resultados obtenidos para en músculo esquelético de ratones portadores del carcinoma pulmonar de Lewis.

Los resultados de la expresión y los niveles de la proteína para el factor miogénico MyoD en el músculo esquelético de ratones portadores del carcinoma pulmonar de Lewis, se muestran en forma de resumen en la tabla 6.

	Control	LLC
Gastrocnemius		
MyoD (Northern)	100±1(4)	85±7(3)*
MyoD (Western)	100±10(2)	116±1(2)
EDL		
MyoD (Western)	100±12(3)	31±3(4)***

Tabla 6. Resumen de los resultados en el LLC. Los datos están presentados como media ± s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis, así como la técnica utilizada para la determinación. Significatividad estadística de las diferencias: *, p<0,05; ***, p<0,001.

4. Análisis de la expresión de MyoD y la actividad de unión al DNA para NF- κ B en los músculos GSN de ratones portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich.

Éste es un hepatoma ascítico de ratón, que crece en la cavidad peritoneal y que también produce una marcada caquexia (tabla 7) y profundas alteraciones metabólicas (Shapot, 1972; Lockner *et al.*, 1972). Este modelo tumoral produce elevadas concentraciones de IL-1, IL-6 y TNF- α en plasma y líquido ascítico (da Silva *et al.*, 2002). Los animales fueron sacrificados a los 10 días de crecimiento tumoral. Este modelo presenta una importante pérdida de peso en músculos: así, para GSN y tibialis la pérdida de masa fue de un 16%. Otro tejido muy afectado en este modelo al igual que en el de LLC es el tejido adiposo que presenta una disminución de un 55% para el TAB perigenital. La pérdida de peso en el músculo cardiaco representado por el peso del corazón fue de un 24%.

	Control	Ehrlich
GSN (mg)	593 \pm 14(5)	496 \pm 17(8)**
Tibialis (mg)	194 \pm 3(4)	162 \pm 7(7)**
TABpg (mg)	913 \pm 85(5)	412 \pm 33(7)***
Corazón (mg)	440 \pm 12(5)	336 \pm 8(8)***
Higado (mg)	4510 \pm 70(5)	6190 \pm 150(8)***
Riñones (mg)	610 \pm 17(5)	529 \pm 12(8)**
Carcasa (mg)	72,6 \pm 0,7(5)	72,8 \pm 2,1(8)

Tabla 7. Efecto del crecimiento del hepatoma ascítico de Ehrlich en ratón. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis. GSN = gastrocnemius, TABpg = tejido adiposo blanco perigenital. Significatividad estadística de las diferencias: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.1. Expresión del factor miogénico MyoD en el hepatoma ascítico de Ehrlich.

Cuando analizamos el factor miogénico MyoD en el músculo GSN de los animales portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich, encontramos que la expresión de su mRNA estaba fuertemente aumentada (figura 9), al contrario de lo observado en los modelos tumorales anteriores.

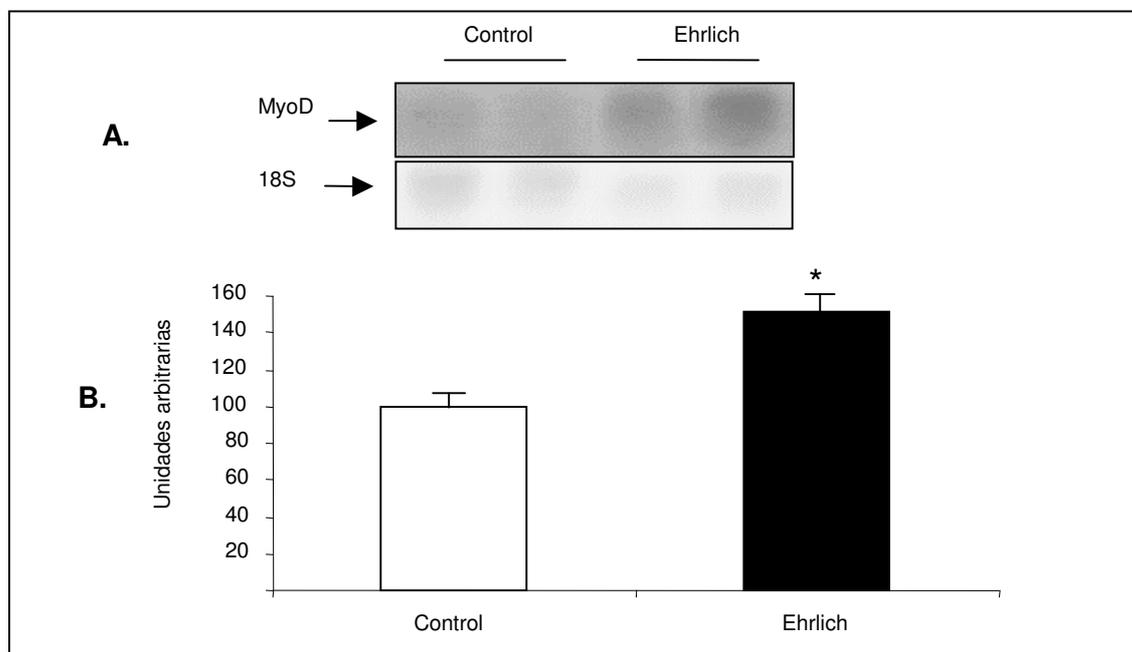


Figura 9. Expresión del factor miogénico MyoD en el músculo GSN de ratones portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich. Panel A: Northern blot representativo de la expresión del factor MyoD. Panel B: Análisis densitométrico de los resultados, expresados como la media \pm s.e.m. y presentados como porcentaje del control. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$.

4.2. Regulación de AP-1 y NF κ B en los músculos GSN de animales portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich.

A partir de los resultados obtenidos en la expresión de MyoD, decidimos analizar la actividad de unión al DNA para los dos factores de transcripción (AP-1 y NF- κ B), que podrían estar siendo regulados diferencialmente en los GSN de los animales portadores de tumor. Al analizar la actividad de unión al DNA de AP-1, encontramos una tendencia a la disminución en los GSN de los ratones portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa (figura 10).

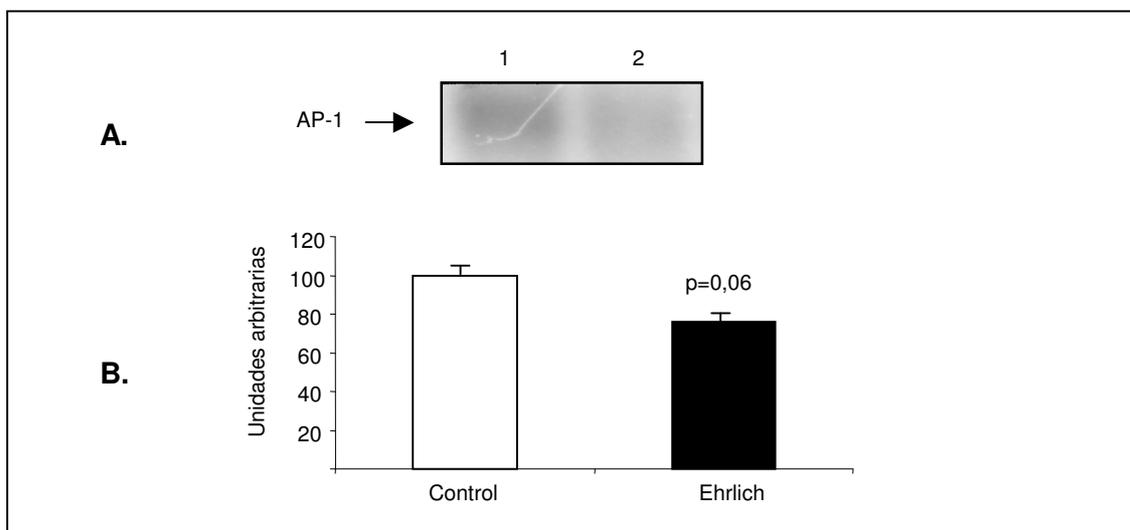


Figura 10. Actividad de unión al DNA para el factor de transcripción AP-1 en músculos GSN de ratones portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich. Panel A: EMSA, representativo para el factor de transcripción AP-1; los carriles son: control (1) y portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich (2). Panel B: Análisis densitométrico de los resultados, presentados como porcentaje del control y expresados como la media \pm s.e.m.

Cuando realizamos la determinación de la actividad de unión al DNA para NF- κ B en los músculos GSN de los animales controles y portadores de tumor, encontramos un aumento significativo en la actividad de unión al DNA para este factor (figura 11).

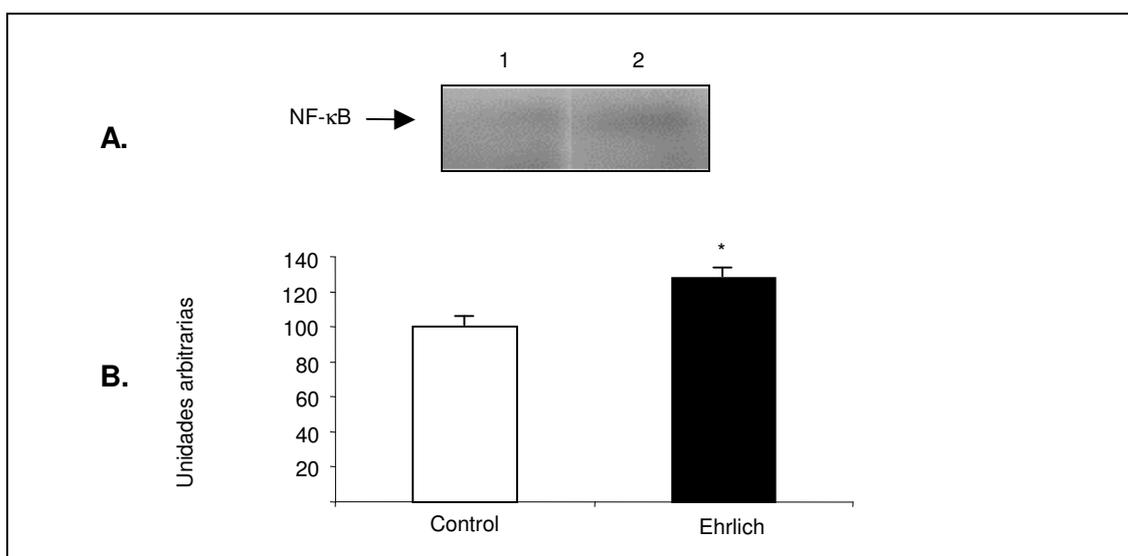


Figura 11. Actividad de unión al DNA para el factor de transcripción NF-κB en músculos GSN de ratones portadores del hepatoma ascítico de Ehrlich. Panel A. EMSA, representativo para el factor de transcripción NF-κB, los carriles son: animales portadores del hepatoma ascítico de control (1) y Ehrlich (2). Panel B. Análisis densitométrico de los resultados, presentados como porcentaje del control y expresados como la media \pm s.e.m. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$.

4.3. Resumen de los resultados obtenidos para el modelo tumoral de Ehrlich.

En la tabla 8 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para el modelo tumoral del hepatoma ascítico de Ehrlich.

	Control	Ehrlich
MyoD (northern)	100 \pm 14(4)	189 \pm 21(5)**
NFκB (EMSA)	100 \pm 8(5)	128 \pm 8(5)*
AP-1 (EMSA)	100 \pm 8(5)	76 \pm 7(4)p=0,06

Tabla 8. Resumen de los resultados en el hepatoma ascítico de Ehrlich. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis, así como la técnica utilizada para la determinación. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

5. Análisis de la expresión del factor miogénico MyoD en el músculo esquelético de pacientes con cáncer de páncreas.

Los pacientes con cáncer de páncreas presentan una prognosis muy negativa: sólo un 20-30% pueden ser intervenidos quirúrgicamente para la extirpación del tumor, y de éstos muy pocos son los que superan los 5 años de vida (Fearon *et al.*, 1998; Wenger *et al.*, 2000). Estos pacientes presentan una marcada caquexia en los estadios finales de la enfermedad (Fearon *et al.*, 1998), con una importante pérdida de peso corporal y de tejidos, principalmente de grasa subcutánea y de músculo esquelético (Wigmore *et al.*, 1997a). Además, estos pacientes presentan anorexia que empeora su cuadro clínico. La causa de este síndrome aún se desconoce, pero cobran importancia como candidatos la cascada de citoquinas pro-inflamatorias (Wigmore *et al.*, 1997b; Fearon *et al.*, 1998).

Los sujetos incluidos en este estudio preliminar fueron 10 pacientes con cáncer de páncreas, diagnosticados por pruebas histológicas (biopsias), con una importante pérdida de peso, y 3 sujetos como control (sometidos a cirugías benignas), que no presentaban pérdida de peso. Las muestras fueron obtenidas mediante una incisión de 0,5 cm³ desde el músculo *rectus abdominis*, congeladas y mantenidas a -80°C hasta su análisis. Los resultados obtenidos demuestran que MyoD se encuentra fuertemente disminuido en el músculo esquelético de estos pacientes, resultados que coinciden con los obtenidos en nuestros modelos animales de caquexia cancerosa (Yoshida AH-130 y carcinoma pulmonar de Lewis).

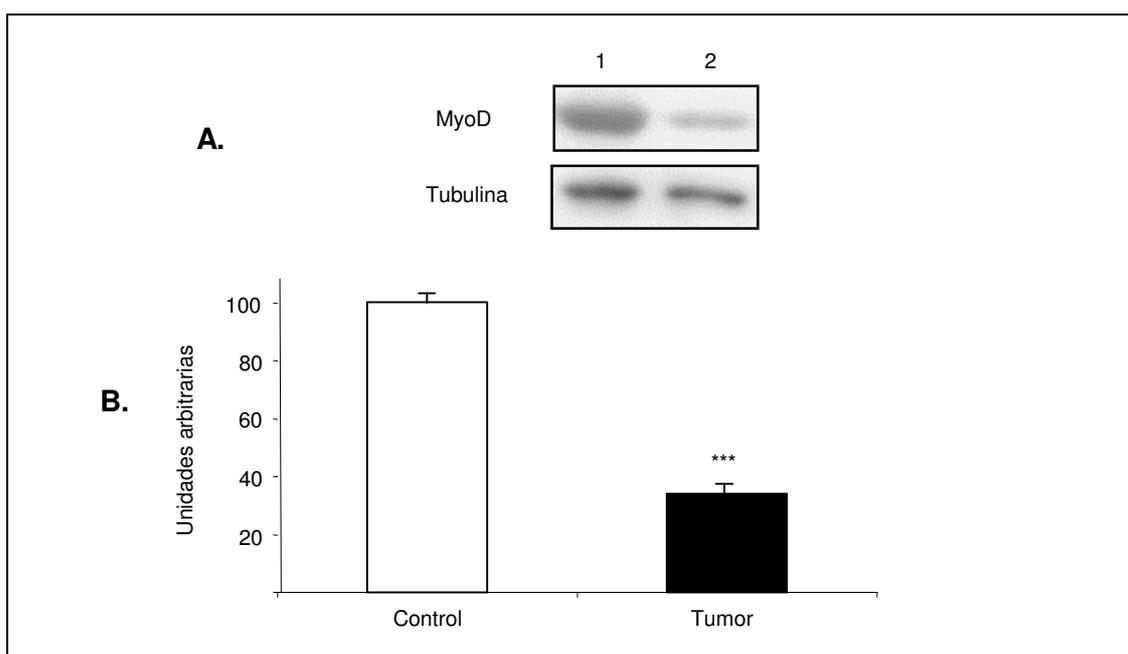


Figura 12. Expresión proteica del factor miogénico MyoD en el músculo esquelético de pacientes con cáncer de páncreas. Panel A: Northern blot representativo de la expresión del factor MyoD, los carriles son: control (1) y tumor (2). Panel B: Análisis densitométrico de los resultados, expresados como la media \pm s.e.m. y presentados como porcentaje del control. Control n=3, tumor n=10. Significatividad estadística de las diferencias: ***, $p < 0,001$.

6. MyoD en el músculo esquelético de ratas tratadas con LPS.

El LPS (lipopolisacarido) es una molécula que se encuentra en la membrana celular de bacterias gram negativas y que es capaz de producir una fuerte respuesta inmunológica e inflamatoria (Hurwitz *et al.*, 1975). La activación de la cascada de citoquinas inflamatorias inducida por el LPS, produce múltiples alteraciones, entre las que se encuentran: la activación de los sistemas proteolíticos (Dehoux *et al.*, 2003), aumento de la lipólisis en el tejido adiposo (Feingold *et al.*, 1992), y la respuesta de fase aguda (Sipe *et al.*, 1979). El LPS adicionado al medio de cultivo de células musculares de la línea celular C2C12 disminuye los niveles de expresión del factor miogénico MyoD (Sachidanandan *et al.*, 2002).

La administración de LPS y la respuesta inflamatoria que produce, es similar en parte a la respuesta inflamatoria que se presenta en la caquexia cancerosa. Por esta razón y para determinar si esta activación afecta los niveles de expresión génica y proteína del factor miogénico MyoD, realizamos una administración aguda de LPS intraperitoneal a ratas Wistar sanas. La dosis de LPS utilizada fue de 3 mg por kg de peso corporal. Procedimos a anestesiarse y sacrificar los animales a las 3, 9 y 24 horas posteriores a la administración del LPS.

Los resultados que encontramos en los músculos GSN de estos animales demuestran que la expresión génica de MyoD disminuye drásticamente a las 3 horas de la administración del LPS; a las 9 horas después de la administración, la disminución en la expresión de MyoD se acentúa, para luego a las 24 horas mostrar una leve mejoría (figura 13).

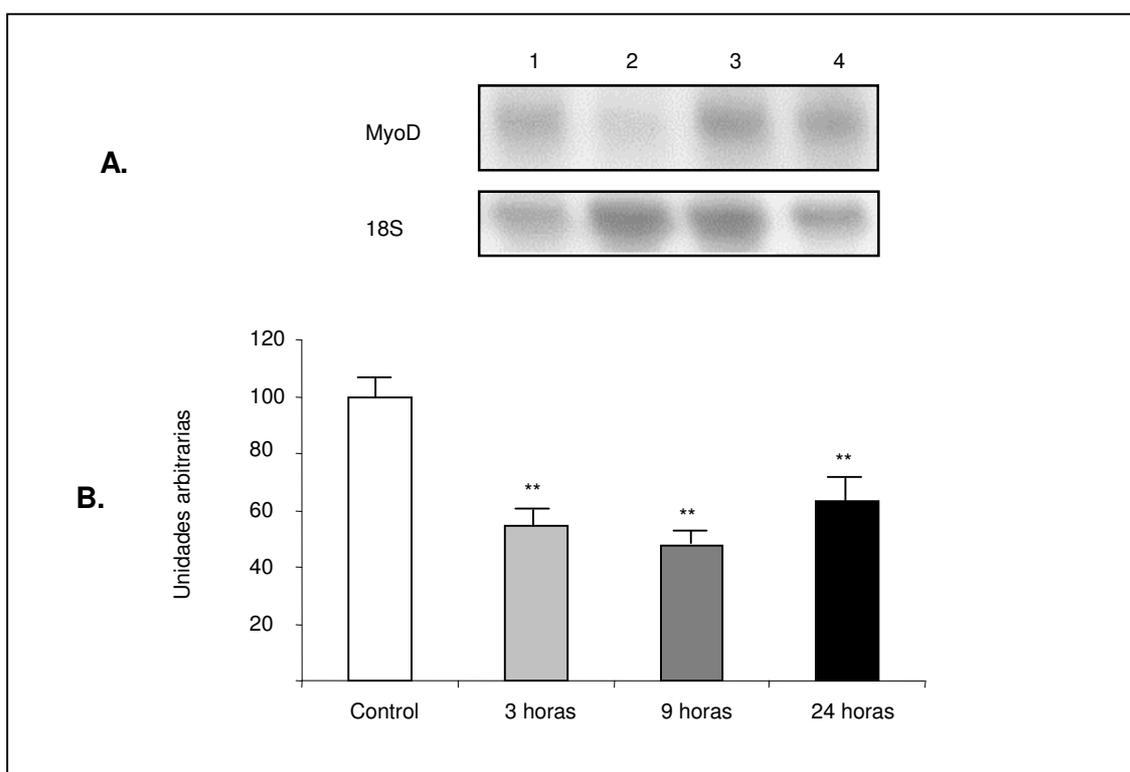


Figura 13. Expresión del factor miogénico MyoD en el músculo GSN de ratas tratadas de forma aguda con LPS. Panel A: Northern blot representativo de la expresión del factor MyoD; los carriles son: control (1), 3 horas (2), 9 horas (3) y 24 horas (4). Panel B: Análisis densitométrico de los resultados, expresados como la media \pm s.e.m. y presentados como porcentaje del control. Significatividad estadística de las diferencias: **, $p < 0,01$.

Al analizar los niveles de proteína para este factor, encontramos que al igual que la expresión génica, estos niveles disminuían a las 3 horas, pero la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa hasta las 9 horas posteriores a la administración del LPS, mientras que a las 24 horas los niveles seguían siendo muy bajos (figura 14).

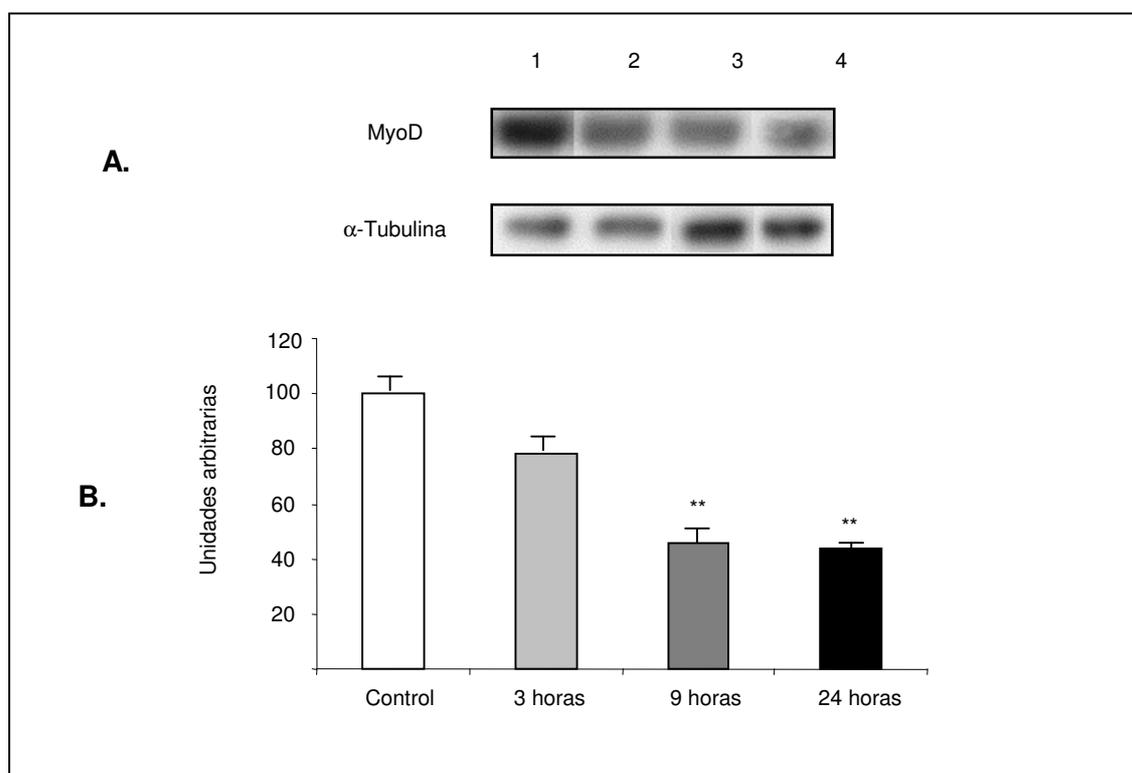


Figura 14. Niveles de proteína del factor miogénico MyoD en el músculo GSN de ratas tratadas de forma aguda con LPS. Panel A: Western blot representativo de la proteína MyoD; los carriles son: control (1), 3 horas (2), 9 horas (3) y 24 horas (4). Panel B: Análisis densitométrico de los resultados, expresados como la media \pm s.e.m. y presentados como porcentaje del control. Significatividad estadística de las diferencias: **, $p < 0,01$.

Está demostrado que NF- κ B se activa en situaciones de infección aguda (Karin, 1999). Para demostrar la implicación de este factor de transcripción en este modelo experimental, decidimos determinar los niveles de su inhibidor I κ B α en los músculos GSN de estos animales (figura 15). Los resultados obtenidos muestran una disminución clara de esta proteína en los animales que recibieron LPS, aunque ésta no llega a ser estadísticamente significativa. Estos resultados demuestran una activación de NF- κ B, dado que la degradación de I κ B α promueve la translocación de NF κ B al núcleo (Karin, 1999).

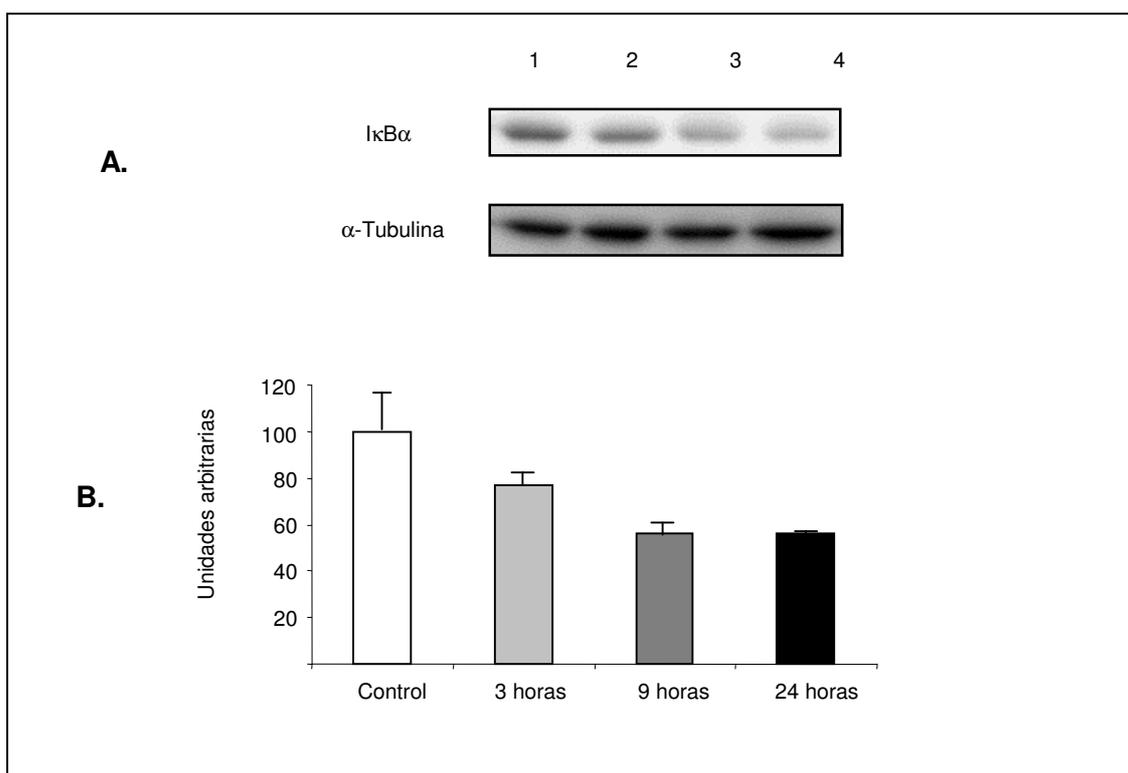


Figura 15. Niveles de la proteína IκBα en el músculo GSN de ratas tratadas de forma aguda con LPS. Panel A: Western blot representativo de la proteína IκBα, los carriles son: control (1), 3 horas (2), 9 horas (3) y 24 horas (4). Panel B: Análisis densitométrico de los resultados, expresados como la media \pm s.e.m. y presentados como porcentaje del control.

6.1. Resumen de resultados correspondientes al experimento de administración aguda de LPS.

Los resultados de las determinaciones de expresión génica y niveles de proteína se presentan de forma resumida en la tabla 9.

	Control	3 horas	9 horas	24 horas
MyoD (Northern)	100 \pm 7(4)	55 \pm 6(4)**	48 \pm 12(4)**	63 \pm 8(4)**
MyoD (Western)	100 \pm 10(3)	78 \pm 8(4)	46 \pm 8(4)**	44 \pm 2(3)**
IκBα (Western)	100 \pm 22(3)	77 \pm 10(4)	56 \pm 8(4)	56 \pm 1(3)

Tabla 9. Resumen de los resultados correspondientes al experimento de administración aguda de LPS en ratas Wistar. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis, así como la técnica utilizada para la determinación. Significatividad estadística de las diferencias: **, $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

1. Factores de transcripción implicados en el desgaste muscular asociado al crecimiento del hepatoma ascítico Yoshida AH-130.

Se conoce bastante sobre la regulación de estos factores de transcripción *in vitro* y en procesos de infección aguda, pero no existen datos en cuanto a la regulación de estos factores en el proceso de caquexia cancerosa. En este estudio hemos querido determinar la actividad de unión al DNA de estos cuatro factores de transcripción y su relación con MyoD. Las secuencias de unión al DNA para los factores de transcripción AP-1, NF κ B y C/EBP están ampliamente distribuidas en las regiones promotoras de las distintas subunidades de algunos de los sistemas proteolíticos más importantes en el desarrollo de la caquexia, siendo por este motivo interesante determinar su regulación en el músculo de ratas portadores de un tumor inductor de caquexia, como es el hepatoma ascítico Yoshida AH-130.

Cuando analizamos la actividad de unión al DNA para NF κ B, observamos que no se presentaban cambios significativos en el transcurso del crecimiento tumoral (figura 1). Estos resultados son un tanto sorprendentes, debido a que este factor de transcripción está íntimamente ligado al TNF- α , siendo esta citoquina tan importante en el desarrollo de la caquexia para este modelo (Tessitore *et al.*, 1987; Costelli *et al.*, 1993). Estos resultados son, además, contradictorios con el desgaste muscular asociado a la administración *in vivo* de TNF- α (Li y Reid, 2001), como también a los resultados observados en ratas sépticas, donde aparece una rápida activación para luego normalizarse los valores (Penner *et al.*, 2001), o con los datos que asocian a TNF- α , NF κ B y la disminución de MyoD (Guttridge *et al.*, 2000). Por otra parte, la administración de curcumina, un inhibidor natural de NF κ B, favorece la recuperación del músculo después de un daño (Thaloor *et al.*, 1999). Aunque la administración de este mismo inhibidor no logra revertir el desgaste muscular asociado a la implantación del tumor Yoshida AH-130 (Busquets *et al.*, 2001). La activación de NF κ B podría ser un mecanismo más de defensa contra los efectos tóxicos del TNF- α que un mediador catabólico (Coletti *et al.*, 2002). Al analizar los niveles de la proteína inhibidora I κ B α , encontramos que no presenta variaciones en el transcurso del crecimiento tumoral (figura 2)

Al analizar la actividad de unión al DNA para AP-1, observamos una regulación diferencial en el transcurso del crecimiento tumoral, ya que encontramos una activación a día 4 de crecimiento tumoral (cuando el tumor está creciendo de forma exponencial) y una disminución a los niveles basales a día 7 de crecimiento tumoral (figura 3). Esto concuerda en parte con los resultados obtenidos por Penner *et al.* (2001) en un modelo experimental de sepsis, donde se observa una activación de AP-1 rápida y sostenida. La actividad de unión al DNA de este factor también ha sido asociada a una inhibición de la miogénesis (Su *et al.*, 1991; Thinakaran *et al.*, 1993; Thinakaran y Bag, 1993). También se ha descrito que el TNF- α es capaz de activar tanto la expresión de c-Jun como la actividad de unión al DNA de AP-1 (Brenner *et al.*, 1989), y son varios los trabajos que demuestran una relación inhibitoria entre miembros de la familia Jun y MyoD (Bengal *et al.*, 1992; Finker *et al.*, 1993). Esta activación podría explicar en parte algunos de los efectos del crecimiento tumoral en este modelo.

C/EBP es una familia de factores de transcripción que está formada por seis miembros (α , β , γ , δ , ϵ y CHOP-10) (Lekstrom *et al.*, 1998). Dos integrantes de esta familia (β y δ) son especialmente importantes para la respuesta inflamatoria (Poli, 1998). En ratas con sepsis, este factor de transcripción se encuentra drásticamente aumentado a partir de las 4 horas posteriores a la inducción de la sepsis, y se ha determinado que las subunidades β y δ son esenciales para el desarrollo de esta respuesta en el músculo de estos animales. Por otra parte, estos autores demuestran

que este factor está regulado por glucocorticoides en el músculo de ratas sépticas (Penner *et al.*, 2001). La actividad de unión al DNA para el factor C/EBP no está alterada en los animales portadores del hepatoma ascítico Yoshida AH-130 (figura 4), lo que podría explicarse por el hecho que, si bien es cierto que los glucocorticoides están involucrados en el desgaste muscular asociado a infecciones agudas (Fischer y Hasselgren. 1991), en la caquexia producida por el crecimiento del Yoshida AH-130 no parecen jugar un papel importante (Llovera *et al.*, 1996).

Sp-1 es otro factor de transcripción que también se encuentra involucrado en el proceso de diferenciación miogénica. Lehtinen *et al.* (1996) han descrito que para que tenga lugar el proceso de diferenciación, primero debe haber una disminución en la actividad de unión al DNA de los factores de transcripción NF κ B, AP-1 y Sp-1. Sp-1 disminuye de manera muy importante en las células musculares diferenciadas, debido principalmente a un efecto represor que ejerce MyoD sobre la actividad de Sp-1 (Viñals *et al.*, 1997), además de estar implicado en la regulación del transportador de glucosa GLUT1 (Sanchez-Feutrie *et al.*, 2003 y 2004), un transportador presente específicamente en células indiferenciadas y transformadas. Utilizando la técnica de *microarray* se ha demostrado que Sp-1 es una diana de IGF-I en músculo cardíaco (Li *et al.*, 2003). Este dato se contrapone con los anteriores, dado que el IGF-I es un factor de crecimiento muy importante en las células musculares. Los resultados obtenidos en animales portadores de tumor demuestran que no está implicado en la patogénesis de la caquexia inducida por el hepatoma ascítico Yoshida AH-130 (figura 5).

MyoD, un miembro de la familia de factores de transcripción específicos del músculo bHLH, participa en el control de la miogénesis durante el desarrollo y la regeneración (Lassar *et al.*, 1994; Black y Olson, 1998). MyoD heterodimeriza con los miembros de la familia MEF2, ejerciendo de esta forma su actividad, que es regulada por una familia de proteínas inhibitoras Id (*inhibitors of differentiation*) (Langlands *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 1998). La inducción de MyoD es crucial para que se lleve a cabo el programa de regeneración muscular posterior a un trauma, ya que con la activación de MyoD las células satélite salen de su estado quiescente para proliferar y diferenciarse (Megeney *et al.*, 1996; Bomemann *et al.*, 1999; Cooper *et al.*, 1999). La inyección intramuscular de TNF- α y de INF γ , o la utilización de células CHO modificadas genéticamente para producirlas, induce una marcada hipotrofia del músculo asociada a una importante disminución de los niveles de MyoD (Guttridge *et al.*, 2000).

El TNF- α es un conocido inhibidor de la diferenciación miogénica *in vitro* (Salía *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Coletti *et al.*, 2002; Langen *et al.*, 2004;). Se ha descrito que esta acción está mediada por la activación de NF κ B (Li *et al.*, 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Coletti *et al.*, 2002; Langen *et al.*, 2004), y daría lugar a una disminución de MyoD y miogenina, dos factores de transcripción esenciales para la diferenciación miogénica (Salía *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1998). En células musculares ya diferenciadas a miotubos, el tratamiento con TNF- α produce una disminución de la cadena pesada de la miosina (*myosin heavy chain*, MHC), una proteína miofibrilar y claro marcador de diferenciación (Li *et al.*, 1998; Li y Reid. 2001). Otra molécula implicada en la señalización de TNF- α en músculo es el IGF-I, un factor precursor de la diferenciación y principalmente anabólico para el músculo maduro. El TNF- α es capaz de disminuir la expresión de IGF-I a través de una vía dependiente de la activación del factor de transcripción AP-1 (Layne y Farmer. 1999). Otros datos, como la inhibición de la miogénesis por la sobreexpresión de c-Jun y la activación de AP-1 por el TNF- α , son importantes de tener en cuenta en el complejo sistema que regula la diferenciación de las células musculares.

En este modelo experimental, la implicación del TNF- α en el desarrollo de la caquexia está ampliamente estudiado (Tessitore *et al.*, 1987; Costelli *et al.*, 1993). En

el presente estudio hemos observado una clara disminución tanto de la expresión como de los niveles de proteína para el factor miogénico MyoD en el músculo gastrocnemius de las ratas portadoras de tumor (figura 6). Esta disminución se hace evidente desde el día 4 de crecimiento tumoral y se mantiene hasta el día 7. Esta disminución en los niveles de MyoD demuestra que este factor de transcripción miogénico está implicado en el desarrollo de la caquexia *in vivo*. La disminución de este factor de transcripción podría estar afectando la capacidad del músculo para regenerar el músculo dañado por los efectos catabólicos provocados por la presencia del tumor, y también podría estar causando cambios en las fibras ya formadas. MyoD es un factor clave en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo del músculo esquelético maduro, regulando múltiples genes entre los que se incluyen los de la MHC (Allen *et al.*, 2001) y la distrofina (Marshall *et al.*, 2001). Al analizar los niveles de Id3, una de las proteínas inhibidoras de MyoD, observamos que no presenta cambios en los gastrocnemius de los animales portadores de tumor en ninguno de los tiempos estudiados (figura 7). Este fenómeno se ha descrito para la inhibición que ejerce c-Jun sobre MyoD *in vitro* (Bengal *et al.*, 1992).

MyoD ha sido implicado en el mantenimiento del fenotipo en las fibras musculares rápidas (Allen *et al.*, 2001). La disminución de MyoD en los animales portadores del hepatoma ascítico Yoshida AH-130 que presentan un hipercatabolismo, mediado en parte por TNF- α (Costelli *et al.*, 1993), es más consistente con el hecho que la caquexia cancerosa produce una hipotrofia de ambos tipos de fibras, rápidas y lentas (Clark y Goodlad, 1971).

2. Estudio del factor miogénico MyoD en el modelo tumoral de carcinoma pulmonar de Lewis.

La expresión de MyoD en el modelo tumoral de carcinoma pulmonar de Lewis, se vió disminuida significativamente en el músculo gastrocnemius (figura 8); sin embargo, los niveles de proteína en el mismo músculo no están disminuidos (figura 8). Por otra parte, al analizar los niveles de MyoD en los músculos EDL, se observó una drástica disminución (figura 8), lo que concuerda en parte con lo descrito para MyoD y su función como regulador del fenotipo en fibras de tipo rápido (Allen *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este modelo tumoral inductor de caquexia confirman la reducción de MyoD en la caquexia cancerosa.

3. Estudio de los factores de transcripción: MyoD, NF κ B y AP-1 en el modelo tumoral de Hepatoma ascítico de Ehrlich.

Cuando analizamos la expresión de MyoD en el modelo tumoral de Ehrlich, observamos un aumento en los niveles del mRNA en los músculos gastrocnemius de los ratones portadores del tumor (figura 9), asociado a un aumento en la actividad de unión al DNA para NF κ B (figura 11) y una disminución (aunque no significativa) de AP-1 (figura 10). Este resultado es controvertido, dado que MyoD está claramente implicado en el desgaste muscular presente en los modelos de hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en rata y al carcinoma pulmonar de Lewis en ratón. Por otra parte, confirma que NF κ B no está implicado en la reducción de la expresión de MyoD observada en la caquexia cancerosa, e implica directamente al factor de transcripción AP-1 en este proceso. La explicación de los resultados para MyoD requiere de más estudios, pero una explicación preliminar podría ser la redundancia que existe entre los factores miogénicos (Rudnicki y Jaenisch, 1995). Es posible que este modelo tumoral produzca una disminución de otro integrante de esta familia de factores, y el aumento de MyoD sea el resultado de una respuesta compensatoria.

4. Estudio de los niveles del factor miogénico MyoD en el músculo esquelético de pacientes con cáncer de páncreas.

Finalmente, resultados preliminares obtenidos en biopsias de pacientes con cáncer de páncreas demuestran una disminución de MyoD en el músculo esquelético (figura 12). Estos resultados reafirman el papel de MyoD en el desgaste muscular asociado a la caquexia cancerosa.

5. Expresión de MyoD y niveles de las proteínas MyoD y I κ B α en el músculo de ratas tratadas con LPS de forma aguda.

Con los datos obtenidos en el músculo esquelético de animales portadores de tumor, analizamos la regulación de MyoD y I κ B α en un modelo que también presenta un importante estado catabólico, con una marcada activación de los sistemas proteolíticos principalmente el sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina. La administración aguda de LPS *in vivo*. Este tratamiento produjo una importante disminución de la expresión de MyoD en el músculo gastrocnemius de estos animales a las 3 horas de la administración de LPS; la expresión de MyoD siguió disminuyendo a las 9 horas, para presentar una leve mejoría a las 24 horas (figura 13). Los niveles de proteína de MyoD están disminuidos a las 3 horas, pero la disminución no es significativa hasta las 9 horas que se mantiene hasta las 24 horas (figura 14). Estos resultados coincidieron con los obtenidos en la línea celular C2C12 tratada con LPS (Sachidanandan *et al.*, 2002). Sobre la regulación de MyoD u otros factores de transcripción de la familia de los bHLH en modelos de infección u administración de LPS *in vivo* no existen datos hasta la fecha.

Los niveles de I κ B α muestran una disminución a las 3 horas, para seguir disminuyendo hasta las 9 horas para mantener estos niveles hasta las 24 horas (figura 15). La disminución de I κ B α es representativa de una activación del factor de transcripción NF- κ B. Esta aparente activación de NF- κ B presente en este modelo de administración aguda de LPS *in vivo*, coincidiría con la activación de este mismo factor en ratas sépticas (Penner *et al.*, 2001).

