



FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**CONTROL DE LA MIOGÈNESI EN PEIXOS:
FUNCIONS DE LA MIOSINA, L'IGF-II
I ELS FACTORS REGULADORS MIOGÈNICS**

Tesi Doctoral

Marta Codina Potrony

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**CONTROL DE LA MIOGÈNESI EN PEIXOS:
FUNCIONS DE LA MIOSINA, L'IGF-II
I ELS FACTORS REGULADORS MIOGÈNICS**

Memòria presentada per
Marta Codina Potrony
per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Joaquim Gutiérrez Fruitós
i la Dra. Isabel Navarro del Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia.

Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, programa de
Fisiologia (bienni 2004-06)

Dr Joaquim Gutierrez

Dra Isabel Navarro

Marta Codina

Barcelona, Abril 2009

AGRAÏMENTS

He tardat dies a decidir-me a escriure aquestes línies i, quan ho he fet, he començat fent una llista, una llista interminable de noms de persones que han estat molt importants per a mi durant aquesta etapa de la meva vida que ara acaba i en la qual no només he après a fer ciència, sinó que m'ha servit per a ser la persona que sóc avui.

Primer de tot, vull agrair als meus directors, el Guti i la Isabel, per obrir-me les portes del seu laboratori fins i tot abans d'acabar la carrera. Gràcies per haver-me introduït al món dels peixos, per haver-me donat suport fins al final, per haver-me escoltat sempre que ho he necessitat i per haver-me entès quan he vingut amb algun problema.

A tota la resta de professors i personal del departament, moltes gràcies per tot, en especial vull agrair al Josep i al Thomas, pels consells i l'interès mostrat en la meva feina, al Ginés per ser sempre allà amb solucions a tots els problemes informàtics (molts a distància!!) i a la Josefina també per la seva disposició i interès. A les secretàries, especialment la Trini i la Carmen, que m'han solucionat molts dubtes al llarg d'aquest temps i m'han ajudat en tota la paperassa, de la tesis i fora d'ella.

També donar les gràcies a la Carmen Benito i al Jordi Guinea, per la paciència sobretot i els consells sempre oportuns. I a tot l'equip de neteja i als Guasos!, per fer sempre la feina ben feta i estar sempre disposats a solucionar qualsevol coseta que se us demanés! i als nois del bar, per fer-nos riure i tenir-me sempre el cafè amb llet molt curt de cafè a punt!!

Vull agrair també al Dr Jim Du i al Dr Pierre-Yves Rescan, per donar-me l'oportunitat de treballar als seus laboratoris! Thank you very much Jim for everything I've learned with you and your people and for your effort in helping me with everything!! Pierre-Yves, merci beaucoup pour m'introduire au monde de la biologie moléculaire et pour être le "coupable" de que je me suis décidé à faire ma thèse.

També vull donar les gràcies a tota la gent de l'INRA a Rennes, Jean Charles, Cécile, Marie José, Sandrine, Céline,... pour faire mon stage là bas très plaisant et pour m'aider a connaitre la Bretagne, que j'ai beaucoup aimée. I tota la colla de Baltimore, al Pep per ajudar-me tant des del principi, al José Antonio, gracias por tu amistad y por toooodas las veces que nos has ayudado, traslados, taxis etc, también gracias a Sebastián y a Jorge por todos los buenos momentos, thank you very much Eytan for your friendship and your help with everything, Ulli and Roland, Vielen Dank fürs ständige Dasein, die Gespräche, die Partien in Carcassone, die gute Momente. Mary, thank you for being

always there and for letting me be part of your family! També donar les gràcies a la Hong, la Huiqing, la Feng, la Zhoer, el Wei, la Elena, la Becky i un llarg etcètera. I també a la Irene i la Estela i els seus nens, per fer-nos passar tants bons moments a Philadelphia!

Gràcies també a totes les persones que han contribuït d'alguna manera o altra en la tesis, amb consells, suport logístic,... Gràcies a l'Enric Gisbert per acollir-me a l'IRTA en busca d'embrions, per les xerrades a les pràctiques d'aqüicultura; al Jaume Pérez de l'IATS, pels bons consells sobre els experiments; al Dr Borrego per les SAF-1, i segur que em deixo algú... també gràcies!

Però vull agrair molt especialment als meus companys i amics del departament, Joanet, moltíssimes gràcies per TOT, em sembla que necessitaria una pàgina sencera per fer la llista de coses que t'he d'agrair... jeje. Núria, Nahir, Xavi, Jordi, Elisa, Eli, Maxi, Aran, David, moltíssimes gràcies per tota la vostra ajuda, física i moral, per tots els sopars i festetes, però sobretot, per la vostra amistat, una de les coses més importants d'haver fet la tesis! Dani, Lamia, Lu, Alicia, Cleo, Kelly, Miguel, Irene, Olga, Babs, Ruben, Diego, Yoryia, Berta, gràcies per compartir aquests anys amb mi, per escoltar sempre i pels bons moments! També vull agrair als "peixos" que ja van acabar, Juan, Encarni, Pablito, Amaya, Nuringuis, Mònica, i als que heu passat pel lab o us heu incorporat recentment, Mònica, Olivier, Patricia, Katrina, Oxana, Ina, gràcies a tots per la vostra ajuda i per les llargues xerrades durant els cultius!! I a tots aquells que ja no sou al departament, Bego, Juani, Arnau, Nuriaka, Pere, Santi, Santi noi, Moi,.. moltes gràcies per tots els bons moments!

A tots els meus amics, Clara, Vane, Marta, Bitxi, Tona, Montserrat, Lídia, les de la resi Sonia, Ainara, Eva, Meri, Gemma, Maria, Carol, Eli, Marta, al Jordi, la Fátima i la Ester, l'Imma, les cibertietes i un llarg etcètera de gent que em sabrà molt greu de deixar-me! Gràcies per ser sempre allà, per ajudar-me, escoltar-me i intentar entendre el que faig!!

I moooooolt important, vull agrair tot el suport i confiança de la meva família!!! Gràcies als meus pares, per confiar sempre en mi, per fer-me donar el màxim de mi i per ajudar-me sempre i continuar-ho fent després de tants anys!!! A l'Esther, la meva "germaneta", per fer-me riure amb els préssecs i per llegir la tesis sencera (això té molt mèrit!!!). Gràcies als meus avis i als meus tiets, per ser sempre allà i escoltar-me i interessar-vos

pel què faig! Gràcies a tota la família d'una mica més lluny, per preguntar sempre com em va i per entendre el que fem! David, muchas gracias por absolutamente todo, por tu amistad, por ser como eres, por ser quien eres, muchas gracias por darme la mano siempre que lo necesito, para echarme la bronca cuando es necesario y por estar a mi lado pase lo que pase!! I Júlia!!!! Moltes gràcies per fer-me la persona més feliç del món!!! Amb tu, cada dia s'aprenen coses noves i el teu somriure fa que tota la resta no tingui importància! Diuen que la tesi és com un part.... potser sí, però la recompensa no s'hi acostarà ni de bon tros!!!!

A tothom, i tots els que em deixo, que segur que n'hi ha uns quants....

MOLTÍSSIMES GRÀCIES!!!!!!

CONTINGUT

INTRODUCCIÓ	1
1. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC	5
1.1. COMPONENTS DEL SARCÒMER	6
1.1.1. Miosina	6
1.1.2. Actina	7
1.1.3. Titina	8
1.1.4. Nebulina	8
1.1.5. Línia M	9
1.1.6. Línia Z	9
1.1.7. Filaments intermedis	10
1.2. ENSEMBLATGE DELS FILAMENTS	11
2. DESENVOLUPAMENT DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC	13
2.1. FASES DE LA MIOGÈNESI	14
2.1.1. Formació del miòtom embrionari (miogènesi embrionària)	14
2.1.2. Hiperplàsia estratificada	15
2.1.3. Hiperplàsia en mosaic	15
2.2. CÈL·LULES SATÈL·LIT	16
3. REGULACIÓ DE LA MIOGÈNESI	19
3.1. CONTROL GÈNIC	19
3.1.1. Factors Reguladors Miogènics	19
<i>Expressió de MRFs i patró temporal</i>	20
<i>Funcions dels MRFs</i>	21
3.1.2. Miostatina	23
3.2. CONTROL HORMONAL	24
3.2.1. Factors de Creixement tipus Insulina	24
<i>Receptors dels Factors de Creixement tipus Insulina</i>	25
<i>Vies senyalització a partir del receptor d'IGF-I</i>	26
<i>Funcions dels Factors de Creixement tipus Insulina</i>	28

OBJECTIUS	31
INFORME DEL FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES	35
RESUM GENERAL	39
I. PAPER DE LA MIOSINA EN LA FORMACIÓ DE LES MIOFIBRIL·LES EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC DE PEIX ZEBRA (<i>Danio rerio</i>)	43
II. L'IGF-II PROMOU LA PROLIFERACIÓ CEL·LULAR AIXÍ COM TÉ ACCIONS EN EL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN TRUITA IRISADA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	46
III. CLONATGE I EXPRESSIÓ DE LA MIOGENINA D'ORADA (<i>Sparus aurata</i>). PATRONS D'EXPRESSIÓ DURANT EL CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES MUSCULARS	49
Expressió de Miogenina, MyoD2, Miostatina i IGF-II en cèl·lules musculars d'orada en cultiu primari i durant el desenvolupament embrionari	51
CONCLUSIONS	57
BIBLIOGRAFIA	63

PUBLICACIONS	81
1. El <i>knockdown</i> de <i>smyhc1</i> i el bloqueig de la interacció miosina-actina amb BTS (<i>N-benzyl-p-toluene sulphonamide</i>) altera la miofibril·logènesi en el múscul esquelètic d'embrions de peix zebra	83
2. Efectes metabòlics i mitogènics de l'IGF-II en miòcits de truita irisada (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) en cultiu i paper de l'IGF-II en les vies de senyalització PI3/Akt i MAPK	123
3. Clonació i caracterització de la miogenina d'orada (<i>Sparus aurata</i>) i anàlisi de l'especificitat del seu promotor	137
4. Expressió de Miogenina durant el desenvolupament muscular en embrions i en cèl·lules musculars en cultiu de l'orada (<i>Sparus aurata</i>). Relació amb MyoD2, Miostatina i IGF-II	153

LLISTA d'ABREVIATURES

ATP: adenosina trifosfat

bHLH: domini bàsic helix-volta-helix

ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinases*

eF1 α : Factor d'elongació 1 alfa

GH: Hormona de Creixement

GSK: glicogen sintasa quinasa

IGFBPs: proteïnes d'unió a factors de creixement tipus insulina

IGFs: Factors de Creixement tipus Insulina

IRS: *Insulin receptor substrate*

M6P: manosa 6 fosfat

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MEF: Myocyte Enhancer Factor

MF: fibres musculars

MHC: cadenes pesades de la miosina

MLC: cadenes lleugeres de la miosina

MRFs: Factors Reguladors Miogènics

MSTN: miostatina

MURFs: *MUScle-specific Ring Finger proteins*

PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*

SC: cèl.lules satèl.lit

smyhc: Cadena pesada de miosina específica de múscul de contracció lenta

TGF- β : Factors de creixement transformadors tipus β

INTRODUCCIÓ

En peixos, el múscul esquelètic representa un percentatge elevat de la massa corporal de l'animal, i suposa el producte final de l'aquicultura, economia en expansió els darrers anys i de la qual se'n preveu encara un increment major.

Els peixos tenen cèl.lules musculars disposades en paral.lel i separades perpendicularment per tabics de teixit connectiu anomenats mioseptes. Els segments musculars entre els mioseptes es denominen miòtoms. Una característica interessant és que existeixen dos tipus de fibres muscular en peixos, ben separades a nivell anatòmic, i que poseeixen propietats diferents. La musculatura blanca, que representa un 90% dels miòtoms en la majoria de les espècies, depèn d'un metabolisme anaeròbic i és l'encarregada de la contracció ràpida, responsable dels moviments bruscos. Per altra banda, la musculatura vermella, que està formada per fibres amb un elevat contingut en mitocondris i capil.lars, és l'encarregada de la contracció lenta i per tant del moviment sostingut.

La unitat bàsica del múscul esquelètic és el sarcòmer, que tant en el múscul blanc com en el vermell està format per un conjunt de filaments altament organitzats i que interaccionen entre ells per generar la força necessària per tal que es doni la locomoció de l'animal. Entre els diversos filaments cal destacar els filaments de miosina, considerada la proteïna motor del sarcòmer.

El procés de formació del múscul té lloc en tres fases diferents del creixement de l'animal: durant l'organogènesi, durant el desenvolupament embrionari, i durant la vida postnatal, que en peixos és especialment important ja que es dona al llarg de tota la vida adulta. En aquest sentit, tenen un paper destacat les cèl.lules satèl.lit musculars, que són les cèl.lules progenitores del llinatge muscular, i que contribueixen tant en processos d'hiperplàsia (increment en el nombre de fibres) com d'hipertròfia (augment en tamany de les fibres ja existents), augmentant així el creixement somàtic.

Entre els factors implicats en la regulació de la formació i creixement del múscul cal destacar factors hormonals, especialment l'eix format per l'hormona de creixement (GH) i el sistema de factors de creixement tipus insulina (IGFs), i factors transcripcionals com són la família dels Factors Reguladors Miogènics (MRFs), formada per MyoD, Miogenina, MRF4 i Myf5, que controlen l'expressió de diversos

gens específics de múscul, entre els quals s'hi troben gens codificants per les proteïnes dels filaments.

In vivo, se sap que l'expressió tant dels IGFs com dels MRFs es veu afectada com a conseqüència entre altres factors de l'estat nutricional (i per tant de creixement) de l'animal, mentre que *in vitro* encara es desconeix parcialment com varia la seva expressió.

En aquest treball s'ha pretès estudiar diferents aspectes de la miogènesi en peixos teleostis, *in vivo* des d'un punt de vista de proteïnes estructurals durant l'embriogènesi, passant per l'anàlisi dels efectes de factors hormonals *in vitro*, així com l'estudi de l'expressió dels diferents factors de transcripció implicats.

1. EL MÚSCUL ESQUELÈTIC

El múscul esquelètic és un teixit contràctil altament especialitzat, la funció principal del qual és l'activitat locomotora de l'organisme. Aquest teixit està format per feixos de miofibres contràctils, cadascuna de les quals deriva de la fusió de diverses cèl·lules i conté múltiples nuclis post-mitòtics, constituint una de les unions macromoleculares més ordenades i complexes que es coneixen. És interessant destacar que malgrat l'extrema organització del teixit muscular, no és un teixit estàtic, sinó que els seus components es troben en equilibri dinàmic, amb una constant alteració coordinada de la síntesi i degradació proteica, així com el seu ensemblatge i manteniment (revisat per Clark i col, 2002).

Cada miofibril·la està formada per estructures repetitives altament ordenades anomenades sarcòmers, que és la unitat contràctil bàsica del múscul esquelètic i cardíac, i està format per tres sistemes principals de filaments: els filaments gruixuts de miosina, els filaments primers d'actina, i el sistema nebulina-titina (Figura 1). L'alineació precisa dels diferents filaments en el sarcòmer és la que dona lloc a l'aparença típica del múscul estriat, amb alternança de bandes clares (bandes I) i bandes fosques (bandes A) quan és observat al microscopi. Els filaments d'actina s'estenen per les bandes I i se solapen amb els filaments de miosina a les bandes A.

Les línies (o discs) Z indiquen els extrems del sarcòmer, i és allà on els filaments d'actina, titina i nebulina s'enganxen. També trobem la banda H, una banda molt clara enmig de la banda A, i la línia M, enmig de la banda H. En cadascuna d'aquestes zones trobem altres proteïnes estructurals que interaccionaran amb les esmentades anteriorment (Squire, 1997; Gregorio i col, 1999; revisat per Clark i col, 2002; Agarkova i Perriard, 2005; Frank i col, 2006; Boateng i Goldspink, 2008).

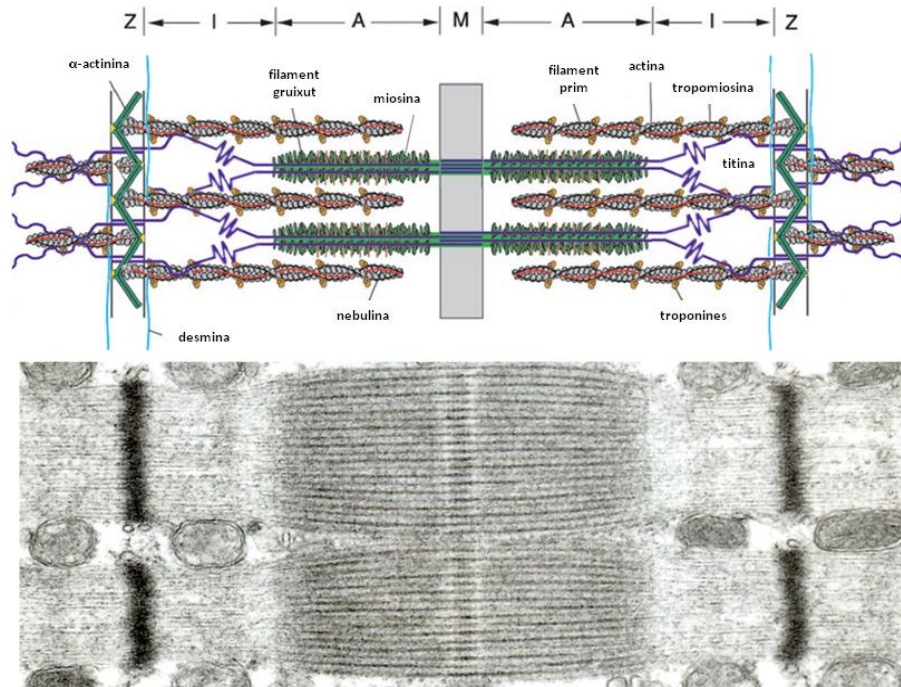


Figura 1. A dalt, model simplificat de dos sarcòmers en paral·lel, formats pels filaments primers d'actina, els filaments gruixuts de miosina, i el sistema nebulina-titina. Els filaments primers s'anclen a la línia Z, on s'entrelliguen per l' α -actinina. Els filaments gruixuts es troben al centre del sarcòmer i constitueixen les bandes A. Els caps de la miosina interaccionen amb l'actina durant la seva activació. A baix, fotografia de microscopi electrònic de l'organització ultraestructural dels sarcòmers. (Adaptat de Ottenheijm i col, 2008).

1.1. COMPONENTS DEL SARCÒMER

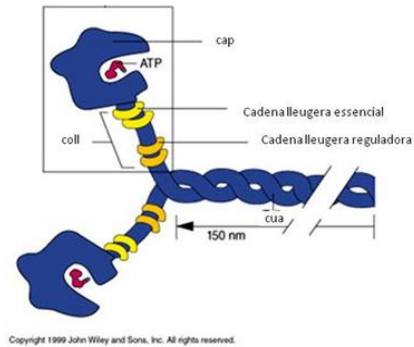
1.1.1. Miosina

A la part central del sarcòmer, trobem la banda A, que conté els filaments bipolars gruixuts formats per centenars de molècules de miosina i proteïnes associades.

La miosina muscular és considerada la proteïna motor del sarcòmer, i forma part d'una superfamília de proteïnes amb 15 classes diferents. La miosina muscular (miosina de tipus II) conté dues cadenes pesades (MHC) d'aproximadament 220 kDa, i quatre cadenes lleugeres (MLC), amb un pes molecular d'aproximadament 20kDa cadascuna, que permeten regular l'activitat motora de la miosina així com ampliar la versatilitat de la molècula (Figura 2). A nivell funcional, la molècula de miosina es divideix en dues regions diferenciades: el cap i la cua. La regió N-terminal de cada MHC i dues MLC

formen el cap, que és el domini catalític amb llocs d'unió a l'actina i activitat ATPasa (Milligan, 1996; Onishi i Morales, 2007) . Per la seva banda, la cua de la miosina conté dominis implicats en la polimerització de la proteïna i el seu empaquetament en els filaments gruixuts (McMahon i col, 2008).

Figura 2. Estructura esquemàtica de la miosina, amb els dos dominis funcionals: el cap (regió amb activitat ATPasa que representa el domini catalític) i la cua (implicada en la polimerització i empaquetament de la molècula).



És important comentar que les necessitats del múscul esquelètic pel que fa a la potència requerida varia en diferents situacions, i per aquest motiu la miosina muscular ha de permetre diferents taxes d'activitat. Això s'aconsegueix, en part, gràcies a l'existència de múltiples isoformes de cadenes pesades i cadenes lleugeres i la fina regulació de la seva expressió i ensemblatge (Reggiani i col, 2000). En mamífers, per exemple, s'han descrit fins a 8 isoformes diferents de MHC, i diverses isoformes de MLC específiques de múscul blanc i múscul vermell. En peix zebra, per la seva banda, s'han descrit diverses isoformes de MHC i de MLC (Hinits i col, 2007; Du i col, 2008). Entre elles, cal destacar una isoforma de MHC específica de múscul blanc (*fmyhc*) i 4 específiques de múscul vermell (*smyhc*). D'aquestes últimes, la *smyhc1* és la primera en expressar-se en l'embrió en formació.

1.1.2. Actina

Els filaments d'actina són el component majoritari de la banda I i s'estenen a la banda A. És una molècula d'aproximadament 42 kDa, d'expressió ubíqua, implicada en diverses funcions cel·lulars com la motilitat, la citoquinesi i la contracció. Les unitats individuals d'actina es coneixen com a actina globular (actina G), que s'ensamben en polímers filamentosos llargs anomenats actina F. Aquests polímers formen alhora

dímers amb una conformació d'hèlix, que és tal com trobem l'actina al citoesquelet. Un subdomini d'aquesta estructura té la capacitat d'unió als caps de miosina, interacció fonamental pel procés de contracció muscular.

És interessant comentar que existeixen diverses isoformes d'actina, però que tant les seves seqüències com les seves estructures moleculars són extraordinàriament similars. Així, en mamífers i aus trobem sis isoformes d'actina, l'expressió de cadascuna de les quals té un patró d'expressió específic. En peix zebra s'han descrit dues isoformes específiques de múscul esquelètic (actina1 α i actina1 β). (Rauch, i col, 2003; Thisse, i Thisse, 2004)

1.1.3. Titina

La titina, que constitueix el tercer sistema de filaments del múscul estriat, és la proteïna de major tamany descrita fins avui (3,7MDa) i la tercera en abundància al múscul. Les molècules de titina s'expandeixen per les bandes I i A, fins a la línia M, formant un sistema filamentós continu en les miofibril·les. Les seves propietats estructurals han portat a postular la titina com a un component clau pel sarcòmer, atribuint-li un paper multifuncional, des de la regulació d'alguns aspectes de la densitat miofibril·lar, fins a l'estabilització de l'estructura sarcomèrica. Una altra característica de la titina és que té un domini Ser/Thr quinasa en l'extrem C-terminal suggerint la seva implicació en vies de senyalització (revisat per Clark i col, 2002).

1.1.4. Nebulina

La nebulina és una altra macroproteïna estructural (pes molecular entre 600 i 900 kDa) que s'estén des de les línies Z fins als filaments primers d'actina (McElhinny i col, 2001). Aquest filament, al contrari que la resta, no té capacitat de desplaçament vers els altres filaments, de manera que s'ha postulat com a candidat per a l'especificació de les diferents longituds dels filaments primers (Kruger i col, 1991; revisat per Littlefield i Fowler, 2008), cosa que s'aconseguiria gràcies a les diferents formes de nebulina originades per *splicing* alternatiu. Recentment, ha aparegut una publicació descartant aquesta funció de la nebulina (Castillo, A. i col, 2009).

A part d'aquesta funció estructural, també s'han suggerit funcions més complexes per aquesta molècula, com podria ser la modulació de la velocitat de rotació de l'actina sobre la miosina, així com la inhibició de l'activitat ATPasa (Root i Wang, 2001).

1.1.5. Línia M

Aquesta complexa estructura és el punt central del sarcòmer i ha estat proposada com a punt d'anclatge dels filaments gruixuts. Malgrat la seva complexitat, només se'n coneixen alguns components, dels quals destaquem la *Miomesina* i la *Proteïna M*.

La miomesina és una proteïna d'aproximadament 185kDa de pes molecular, que conté dominis d'unió tant per la cadena leugera de la miosina com per la titina, per la qual cosa se li ha atribuït un paper en la integració dels filaments gruixuts de miosina durant l'ensamblatge dels sarcòmers (Ehler i col, 1999). Es coneixen diferents isoformes de la miomesina, amb patrons d'expressió altament regulats tant temporalment com espacial. En peix zebra s'han descrit, fins el moment, tres gens codificants per miomesina, el més estudiat dels quals és el que codifica per la miomesina 1 α .

La proteïna M, per la seva banda, és un pèptid amb un pes molecular aproximat de 165kDa. La seva funció ha estat menys estudiada però es pensa que actuaria conjuntament amb la miomesina en l'estabilització dels filaments gruixuts i la titina en múscul blanc i cardíac (revisat per Clark i col, 2002).

1.1.6. Línia Z

La línia Z defineix els marges laterals del sarcòmer i constitueix un lloc d'unió pels filaments d'actina, titina i nebulina, essent un punt central en el procés de contracció. D'aquesta manera, l'alineació amb les línies Z de les miofibril·les adjacents permet la contracció coordinada.

El principal component de la línia Z és l' α -*Actinina*, tot i que actualment se sap que existeixen moltes altres proteïnes de diferent naturalesa, com poden ser els MURFs (*MU*scl*e-specific Ring Finger proteins*) (Centner i col, 2001) o la obscurina, que recentment ha estat objecte de nombrosos estudis en diferents sistemes incloent el peix zebra (Sutter i col, 2004; Raeker i col, 2006).

L' α -actinina és una proteïna de 97kDa de pes molecular i forma dímers antiparalels, amb capacitat d'unió a actina. Així doncs, com a funció principal de la proteïna trobem l'enllaç dels filaments d'actina i titina de sarcòmers adjacents (Djinovic-Carugo i col, 1999). Malgrat això, s'ha vist que l' α -actinina no és totalment imprescindible per l'ensamblatge inicial del sarcòmer, mentre que sí que és crítica per a l'estabilització del citoesquelet muscular durant la contracció (Fyrberg i col, 1998).

En vertebrats superiors, s'han descrit 4 gens per l' α -actinina, tot i que semblen tenir funcions solapades. En peix zebra s'han descrit, fins el moment, 5 isoformes, tot i que les diferències d'expressió han estat poc estudiades (Thisse, i Thisse, 2004).

1.1.7. Filaments intermedis

Els filaments intermedis, juntament amb proteïnes associades, són un factor clau en el manteniment de l'estabilitat del citoesquelet. La *Desmina* és el filament intermedi predominant del múscul estriat i, malgrat no és una proteïna totalment essencial per la funció muscular, contribueix de forma molt important en el manteniment de la integritat i alineació de les miofibril·les madures i en formació, ja que entrellaça lateralment línies Z, possiblement interaccionant amb la nebulina (Bang i col, 2001) i integrant les miofibril·les amb els components intracel·lulars.

Tots aquests filaments i altres proteïnes associades, actuen conjuntament per a mantenir l'estructura muscular i permetre la contracció del teixit. En aquest sentit, la miosina (que forma els filaments gruixuts) és considerada la proteïna motor, que juntament amb els filaments prims d'actina dona lloc a miofibril·les d'ACTOMIOSINA, principals encarregades del mecanisme de contracció muscular.

Quan la miosina i l'actina interaccionen, s'activa el domini ATPasa en la molècula de miosina induint la hidròlisi de la molècula d'ATP. Gràcies a l'energia generada, el cap de la miosina que interacciona amb l'actina fa una rotació generant una tensió, que resulta en un desplaçament de la miosina vers l'actina, escurçant el múscul i donant lloc a la contracció muscular (revisat per Huxley, 2000). A continuació, l'actomiosina retorna a un estat de relaxació i així successivament (Figura 3) (revisat per Vale i Milligan, 2000). La interacció actina-miosina està altament controlada per diversos factors, entre els quals cal destacar el complex tropomiosina-troponines, i la

importància de la concentració de Ca^{+2} pel seu funcionament (Weber i Murray, 1973; revisat per Clark i col, 2002).

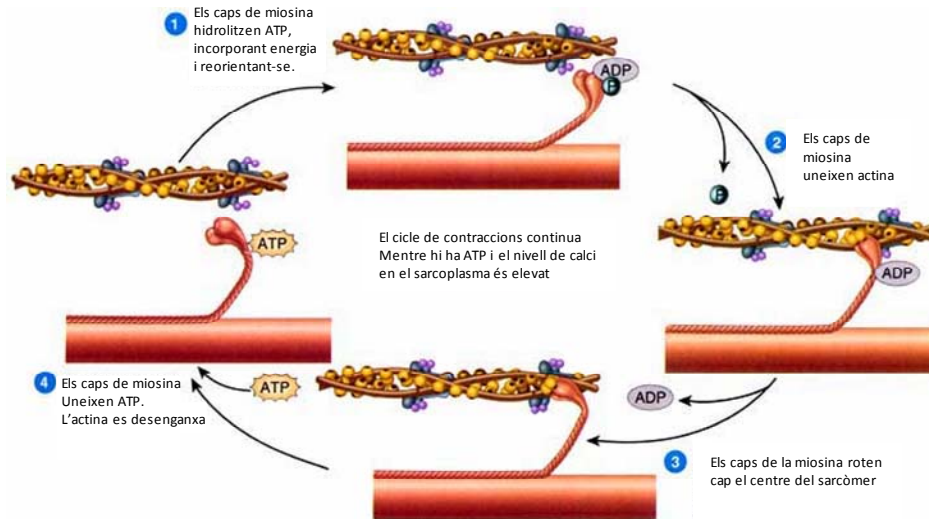


Figura 3. Esquema de la contracció muscular. La interacció miosina-actina permet l'activació del domini ATPasa, cosa que condueix a la hidròlisi d'ATP i la rotació dels caps de miosina vers l'actina, generant una contracció muscular, que es dona successivament mentre hi ha ATP i calci disponible, i el sistema ho requereix. (Adaptat de <http://pharyngula.org>)

1.2. ENSEMBLATGE DELS FILAMENTS

Els mecanismes reguladors que condueixen a la formació del sarcòmer, han estat àmpliament estudiats en cultius cel.lulars *in vitro*. Així, s'ha vist que l'ensamblatge dels miofilaments requereix una xarxa complexa de proteïnes estructurals i proteïnes associades, tals com la troposina, la tropomiosina, o les proteïnes d'unió a miosina (MyBP), entre d'altres (revisat per Clark i col, 2002), i que l'organització del sarcòmer s'inicia a la membrana cel.lular (Epstein i Fischman, 1991). Altres estudis han permès concretar la seqüència d'esdeveniments que es donen. En primer moment trobem unes premiofibril·les caracteritzades per minisarcòmers units per les línies Z i que estan formats per α -actinina. Els filaments d'actina es connecten llavors a aquests discs Z donant lloc als complexos I-Z-I (Holtzer i col, 1997) i a continuació s'uneixen a les mini bandes A, formades per filaments de miosina no muscular. Un segon pas és l'alineació

d'aquestes premiofibril·les i la seva modificació incorporant titina i miosina muscular. Les miofibril·les madures s'obtenen després de l'eliminació de la miosina no muscular i la fusió dels discs Z rics en α -actinina (revisat per Sanger i col, 2002). L'aparició de la línia M en el centre del sarcòmer és considerada el punt final de l'ensamblatge de les miofibril·les (revisat per Clark i col, 2002).

Malgrat aquests coneixements *in vitro*, el mecanisme regulador durant el desenvolupament muscular *in vivo* encara no ha estat del tot clarificat. Se sap que l'expressió coordinada i la interacció entre la miosina i l'actina són processos crítics per l'ensamblatge precís de les miofibril·les. Les mutacions en la miosina, l'actina i altres proteïnes sarcomèriques sovint comporten una miofibril·logènesi deficient en el múscul, tant cardíac com esquelètic. De fet, es coneixen més de vint malalties del múscul esquelètic diferents causades per aquestes mutacions (Laing i Nowak, 2005).

Així, doncs, el fet de conèixer els mecanismes moleculars que controlen la miofibril·logènesi és crític pel diagnòstic i tractament de miopatologies. Per tal d'intentar entendre la fisiologia del múscul tant sa com patològic, han estat àmpliament utilitzats els models de *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*. Anàlisis genètics demostren la importància de les proteïnes sarcomèriques (Epstein i Bernstein, 1992; Moerman i Williams, 2006) i altres proteïnes associades en la miofibril·logènesi, com poden ser factors de transcripció, proteïnes de la membrana plasmàtica, proteïnes de la matriu extracel·lular, proteïnes amb activitat quinasa o xaperones (Epstein i Bernstein, 1992; Landsverk i Epstein, 2005; Moerman i Williams, 2006), entre les quals cal destacar Unc45 i Hsp90 (Barral i col, 1998).

El peix zebra ha esdevingut recentment un sistema model molt poderós per estudiar la funció de gens implicats en l'ensamblatge dels miofilaments així com en el desenvolupament del múscul esquelètic i cardíac (revisat per Lieschke i Currie, 2007), i són especialment importants els estudis relacionats amb proteïnes estructurals (Raeker i col, 2006) i amb proteïnes implicades en el plegament (Tan i col, 2006)(Tan i col, 2006)(Tan i col, 2006)i el processament final dels diferents filaments (Tan i col, 2006; Etard i col, 2007; Du i col, 2008; Hawkins i col, 2008). Així doncs, la possibilitat de treballar a nivell d'embrions ha suposat un gran avenç en l'estudi del desenvolupament del múscul des dels primers estadis de l'organisme.

2. DESENVOLUPAMENT DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC

La musculatura esquelètica dels peixos, igual que de la resta de vertebrats deriva de somites originats en el mesoderm en una progressió antero-posterior (Asakura i col, 2002). En l'embrió en formació, aquests somites donen lloc a tres compartiments principals: l'escleròtom, el miòtom primari (o embrionari) i la capa cel.lular externa (revisat per Rescan, 2008). Cadascun d'aquests compartiments esdevindrà una regió específica, així doncs, les cèl.lules de l'escleròtom contribuiran en la formació de l'esquelet axial, mentre que el miòtom primari derivarà dels somites de la zona medial (adaxial), que es troben prop de la notocorda, i també dels somites posteriors (Stellabotte i col, 2007). La capa externa de cèl.lules és, per la seva banda, una font de cèl.lules miogèniques durant el període més primerenc de creixement del miòtom, suggerint una homologia important amb el dermomiòtom dels amniotes (Figura 4).

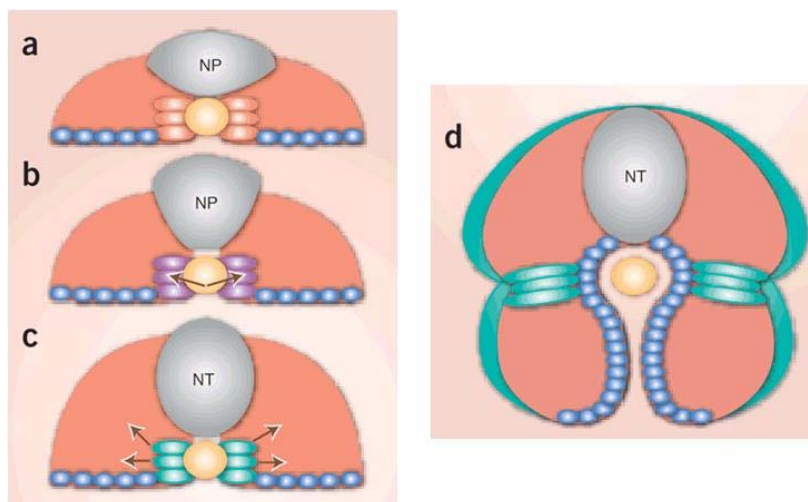


Figura 4. Seccions transversals del mesoderm presomític (a-c) i somita (d), mostrant el desenvolupament del compartiment muscular en l'embrió. El miòtom es mostra en taronja, l'escleròtom en blau, la notocorda en groc i les cèl.lules adaxials en taronja (a), lila (b) o verd (c). (a) Les cèl.lules adaxials envoltant la notocorda comencen a expressar factors de transcripció específics musculars, indicant l'entrada al llinatge muscular, mentre que l'escleròtom encara ocupa una posició ventral. (b) En resposta a senyals de la notocorda (fletxes), les cèl.lules adaxials són activades i comencen a expressar gens específics de múscul, tals com la MHC, suggerint diferenciació cap a fibra muscular de contracció lenta. (c) Les cèl.lules migren radialment (fletxes) fins a la seva posició final a la capa superficial. (d) Algunes cèl.lules adaxials romanen prop de la notocorda i l'escleròtom migra dorsalment envoltant la notocorda. El miòtom diferencia en fibres musculars de contracció ràpida (vermell). (Adaptat de Brent i Tabin, 2004).

2.1. FASES DE LA MIOGÈNESI

En vertebrats superiors, el procés de miogènesi es dona en tres estadis principals, que són la formació del miòtom primari, un procés d'hiperplàsia estratificada, i una fase final d'hiperplàsia en mosaic (que només es dona en espècies de gran tamany) (Figura 5).

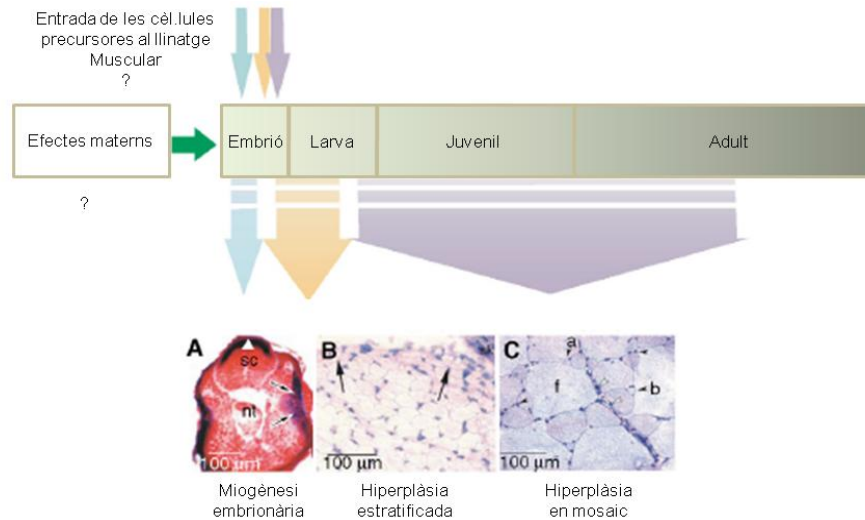


Figura 5. Diagrama esquemàtic de les tres fases de la miogènesi en el múscul blanc de la truita àrtica *Salvelinus alpinus*: miogènesi embrionària (fletxa blava), hiperplàsia estratificada (fletxa taronja) i hiperplàsia en mosaic (fletxa lila) (Adaptat de Johnston, I. A., 2006).

2.1.1. Formació del miòtom embrionari (miogènesi embrionària)

Durant la primera fase de miogènesi, una subpoblació de cèl·lules somítiques medials i posteriors, els precursors musculars, s'allarguen, diferencien i desenvolupen estries (Felsenfeld i col, 1991; revisat per Johnston, I. A., 2006). Els miotubs derivats de les cèl·lules adaxials migren radialment a través del miòtom des de la seva posició a la notocorda per a formar una capa de fibres musculars de contracció lenta (múscul vermell), que cobreixen les fibres musculars de contracció ràpida (múscul blanc) que deriven de somites posteriors (conegut amb el nom de mesoderm paraxial) i es troben en una posició més profunda (Devoto i col, 1996; revisat per Stickney i col, 2000; Hollway i col, 2007; Stellabotte i col, 2007; revisat per Rescan, 2008).

En algunes espècies, com la truita irisada o el peix zebra, les cèl·lules somítiques medials expressen, en un primer moment, gens característics d'ambdós

músculs, però a mesura que es van localitzant a la seva posició final, s'especialitzen i només expressen gens específics de múscul vermell.

Una característica interessant del peix zebra és que les cèl.lules de múscul blanc es diferencien fusionant-se, donant lloc a un miotúbul primarenc, mentre que els mioblasts del múscul vermell romanen mononucleats (Roy, S. i col, 2001).

2.1.2. Hiperplàsia estratificada

El nombre de fibres musculars lentes provenint de l'onada de miogènesi inicial no és suficient per tal d'explicar el nombre de fibres presents en el moment de l'eclosió (Barresi i col, 2001). En una segona fase de miogènesi, coneguda amb el nom d'hiperplàsia estratificada, es dona l'expansió lateral del miòtom embrionari (Rowlerson i Veggetti, 2001; Hollway i col, 2007; Stellabotte i col, 2007; revisat per Rescan, 2008), formant-se noves fibres musculars als extrems dorsal i ventral del miòtom, just a la interfase entre el múscul blanc i el múscul vermell (Johnston, I. A. i Hall, 2004; Chauvigne i col, 2006; Steinbacher i col, 2006; Steinbacher i col, 2007). Aquestes fibres de nova formació també presenten característiques de múscul blanc i múscul vermell abans d'esdevenir clarament fibres de musculatura vermella.

També s'han identificat zones de formació de miotubs en el múscul de contracció ràpida en algunes espècies, com l'orada (Rowlerson i col, 1995). Aquestes zones esdevenen inactives durant les darreres etapes del desenvolupament larvari o les primeres de l'estadi juvenil (revisat per Johnston, I. A., 2006).

2.1.3. Hiperplàsia en mosaic

Aquesta fase de miogènesi és probablement la més important, i té encara una implicació més elevada en peixos, on el creixement muscular es dona al llarg de tota la vida de l'animal. Durant aquesta fase de creixement muscular, s'afegeixen noves fibres al llarg de tot el miòtom, donant lloc a una morfologia típica de mosaic, en la que es poden observar fibres de diferents diàmetres en el múscul blanc.

La fase d'hiperplàsia en mosaic es pot donar en diferents moments del desenvolupament segons l'espècie. Així doncs, en l'orada, es donaria en els darrers estadis larvaris o primers estadis de juvenil (Rowlerson i Veggetti, 2001) mentre que en

altres com la truita bruna (*Salmo trutta*), aquesta fase començaria ja abans de l'eclosió, i se solaparia amb l'hiperplàsia estratificada (Steinbacher i col, 2007). En espècies de petit tamany, com el peix zebra, aquesta fase d'hiperplàsia en mosaic no es dona.

Aquesta fase final de miogènesi és el principal mecanisme d'expansió del nombre de fibres de múscul blanc en els estadis juvenils i adults de la majoria d'espècies, que contribueix fins aproximadament el 40% de la llargada màxima de l'animal (revisat per Johnston, I. A., 2006). A partir d'aquí, el creixement depèn exclusivament de l'increment en llargada i diàmetre (hipertròfia) de les fibres ja existents, procés en el qual tenen un paper molt destacat les cèl.lules satèl.lit.

2.2. CÈL.LULES SATÈL.LIT

Les anomenades cèl.lules satèl.lit, que reben el seu nom per la seva localització a la perifèria del miotub madur, són cèl.lules precursoras miogèniques que es troben sota la làmina basal de les fibres musculars madures i que contribueixen a la síntesi de noves fibres i a l'hipertròfia de les fibres ja existents (Dhawan i Rando, 2005; revisat per Rescan, 2008).

Les cèl.lules satèl.lit musculars han estat identificades en diverses espècies de mamífers, aus, rèptils, amfibis i peixos (revisat per Charge i Rudnicki, 2004) i presenten la característica de ser cèl.lules indiferenciades i mononuclears.

En peixos, les cèl.lules satèl.lit es localitzen a diferents punts de les fibres musculars, i més específicament als angles del polígon format per les fibres musculars en les seccions transversals (Figura 6) (Koumans i col, 1991).

Tradicionalment s'ha dit que les cèl.lules satèl.lit s'originen a partir d'un grup de cèl.lules precursoras generades al final del desenvolupament embrionari (Stockdale, 1992), però altres estudis s'han referit a diferents poblacions de cèl.lules satèl.lit, cadascuna de les quals s'encarregaria dels diferents processos de creixement muscular (hiperplàsia i hipertròfia) i una població serviria d'auto-renovació (Molnar i col, 1996; revisat per Collins, 2006). També s'ha hipotetitzat sobre un possible segon origen de les cèl.lules satèl.lit en mamífers. Es tractaria de cèl.lules d'origen endotelial que es trobarien en els espais intersticials del múscul (Seale i Rudnicki, 2000; Tamaki i col,

2002). Tot i això, més recentment s'ha demostrat, en ratolí i pollastre, que la majoria de cèl.lules satèl.lit deriven dels somites (revisat per Gros i col, 2005; Relaix i col, 2005; Collins, 2006).

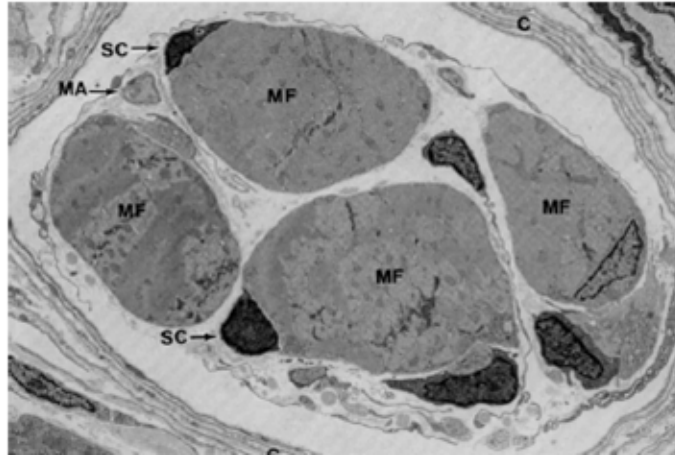


Figura 6. Localització de cèl.lules satèl.lit (SC) al voltant de les fibres musculars (MF). (Color Atlas of Basic Histology, Ed. I. Berman, Appleton & Lange, 1993).

A part de la seva particular localització, altres característiques morfològiques importants són que presenten una relació nucli-citoplasma elevada, un reduït contingut en orgànuls, i uns nuclis de tamany reduït amb elevada quantitat d'heterocromatina, si es compara amb els nuclis de les fibres (Schultz i McCormick, 1994). Aquestes característiques morfològiques, que reflecteixen el fet que les cèl.lules satèl.lit són quiescents i poc actives a nivell transcripcional (revisat per Charge i Rudnicki, 2004), han estat utilitzades per a la identificació *in situ* d'aquesta població cel.lular des de la seva primera descripció (Mauro, 1961).

A nivell molecular, les cèl.lules satèl.lit presenten marcadors específics que poden facilitar-ne la seva identificació. Així per exemple, presenten molècules de superfície com la M-cadherina, el c-met o el CD34, i com a molècula intracel.lular trobem el Pax7 com a bon marcador (Bosnakovski i col, 2008). Un cop les cèl.lules satèl.lits són activades i proliferen, altres marcadors moleculars ajuden a la seva identificació, com la desmina, o els MRFs (Taula 1) (revisat per Charge i Rudnicki, 2004; Peault i col, 2007).

Marcadors Moleculars	Expressió en cèl·lules satèl·lit		Protocol Experimental
	Quiescents	En proliferació	
Superfície cel·lular			
M-cadherina	+/-	+	In vivo/m vitro
Sindecan-3	+	+	In vivo/m vitro
Sindecan-4	+	+	In vivo/m vitro
c-met	+	+	In vivo/m vitro
VCAM-1	+	+	In vivo
NCAM	+	+	In vivo
Glicoproteïna Leu-19	+	+	In vivo/m vitro
CD34	+/-	+/-	In vitro
Citoesquelet			
Desmina	-	+	In vivo/m vitro
Factors de Transcripció			
Pax7	+	+	In vivo/m vitro
Myf5	+/-	+	In vivo/m vitro
MyoD	-	+	In vivo/m vitro
MNF	+	+	In vivo/m vitro
MSTN	+	+/-	In vivo/m vitro
IRF-2	+	+	In vivo
Msx1	+	-	In vitro

Taula 1. Marcadors moleculars de cèl·lules satèl·lit. MSTN: Miostatina; VCAM: Molècula d'Adhesió Vascular; NCAM: Molècula d'Adhesió Neural; MNF: Factor Nuclear de Miòcits; IRF: Factor Regulador d'Interferó. (Adaptat de Charge i Rudnicki, 2004).

En el múscul madur dels peixos, la majoria de cèl·lules satèl·lit són quiescents però poden ser ràpidament activades en resposta a diversos estímuls, tant d'origen ambiental, com nutricional o hormonal (Johnston, I. I. i Cole, 1998). Aquesta activació inclou tres fases: en primer lloc, l'entrada al cicle cel·lular de les cèl·lules satèl·lit quiescents i la determinació cap al llinatge muscular, a continuació la proliferació dels mioblasts i finalment la diferenciació a miòcits que, o bé es fusionen entre ells donant lloc a noves fibres musculars, o bé es fusionen amb fibres ja existents contribuint al creixement en tamany de les mateixes (Le Moigne i col, 1990; Dhawan i Rando, 2005), tot això a mesura que expressin un repertori de gens musculars específics (revisat per Oksbjerg i col, 2004), que controlen el procés de miogènesi juntament amb diversos factors hormonals (revisat per Velloso, 2008). Recentment s'han publicat diversos estudis que demostren també una funció reguladora dels microRNAs sobre la miogènesi (revisat per van Rooij i col, 2008; Chen, X. i col, 2009).

3. REGULACIÓ DE LA MIOGÈNESI

En vertebrats, l'activació del programa miogènic en cèl·lules precursors del múscul (tant en l'embrió com en el teixit adult) està controlada per una sèrie de molècules reguladores extracel·lulars així com per factors de transcripció intracel·lulars, que condueixen a l'expressió de diversos gens que codifiquen per proteïnes específiques de múscul, entre elles les diferents proteïnes contràctils.

3.1. CONTROL GÈNIC

3.1.1. Factors Reguladors Miogènics

En resposta a senyals provinents de teixits adjacents, les cèl·lules precursors de múscul comencen a expressar progressivament els diferents membres de la família dels Factors Reguladors Miogènics (MRFs), dels quals s'ha demostrat en mamífers que exhibeixen funcions diferents però solapades.

Els MRFs són una família de factors de transcripció, que inclouen el MyoD, el Myf5, la Miogenina i el MRF4 (Weintraub i col, 1991; Sassoon, 1993; revisat per Perry i Rudnick, 2000; Pownall i col, 2002), caracteritzats per tenir un domini conservat bàsic helix-volta-helix (bHLH), essencial per l'especificació i determinació del llinatge muscular.

En peixos s'ha descrit l'existència d'aquests factors en diferents espècies, com són la truita, el peix zebra o la carpa (*Cyprinus carpio*) entre d'altres, i en alguns casos s'ha observat una duplicació gènica per algun d'aquests factors, com és el cas de MyoD en la truita irisada (Delalande i Rescan, 1999) i en l'orada (Tan i Du, 2002).

Tots els MRFs descrits fins el moment en peixos presenten el domini conservat bHLH, que és un punt clau en l'activació transcripcional. La regió bHLH es caracteritza per tenir dues hèlixs α separades per una volta. El domini bàsic facilita la unió a seqüències específiques de DNA, mentre que la interacció de les dues hèlixs regula la dimerització del factor de transcripció amb les proteïnes E12 o E47 (Figura 7). L'heterodímer resultant té una alta afinitat pels motius consens E-box (CANNTG) (revisat per Rescan, 2001) localitzats en les seqüències promotores de la majoria de gens específics de múscul, i per tant tenen capacitat per activar la seva transcripció (Apone i Hauschka, 1995; Spinner i col, 2002).

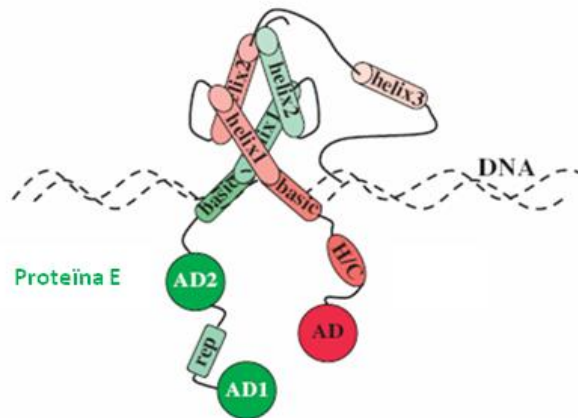


Figura 7. Dominis funcionals dels Factors Reguladors Miogènics. Els MRFs (vermell) formen heterodímers amb les proteïnes E (verd) a través del domini hélix-volta-hèlix. Les regions bàsiques adjacents s'uneixen al DNA. AD: Domini d'Activació; H/C: regions riques en histidina i cisteïna, rep: domini repressor de la funció dels AD. (Adaptat de Tapscott, 2005).

Tanmateix, altres regions col·lidants també tenen un paper en aquesta especificitat. Així doncs, cal parlar dels llocs d'unió a MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2), que són seqüències de DNA riques en A/T presents en les regions reguladores de la majoria de gens específics de múscul (Olson i col, 1995). Les proteïnes MEF2 són una família de factors de transcripció que tenen l'habilitat d'actuar juntament amb les proteïnes bHLH, activant gens específics.

Expressió de MRFs i patró temporal

S'ha vist que els diferents MRFs s'expressen en relació a un patró espacial i temporal altament regulat durant la miogènesi i l'embriogènesi (Currie i Ingham, 1998; Hinits i col, 2009). D'aquesta manera, el MyoD i el Myf5 s'expressen majoritàriament durant el desenvolupament primari i són essencials per iniciar el programa cel·lular que conduirà al llinatge muscular, mentre que la Miogenina i el MRF4 s'expressen relativament més tard i estan implicats principalment en la maduració final de les cèl·lules musculars i la seva diferenciació en miofibres (Figura 8) (Sumitani i col, 2002; revisat per Holterman i Rudnicki, 2005).

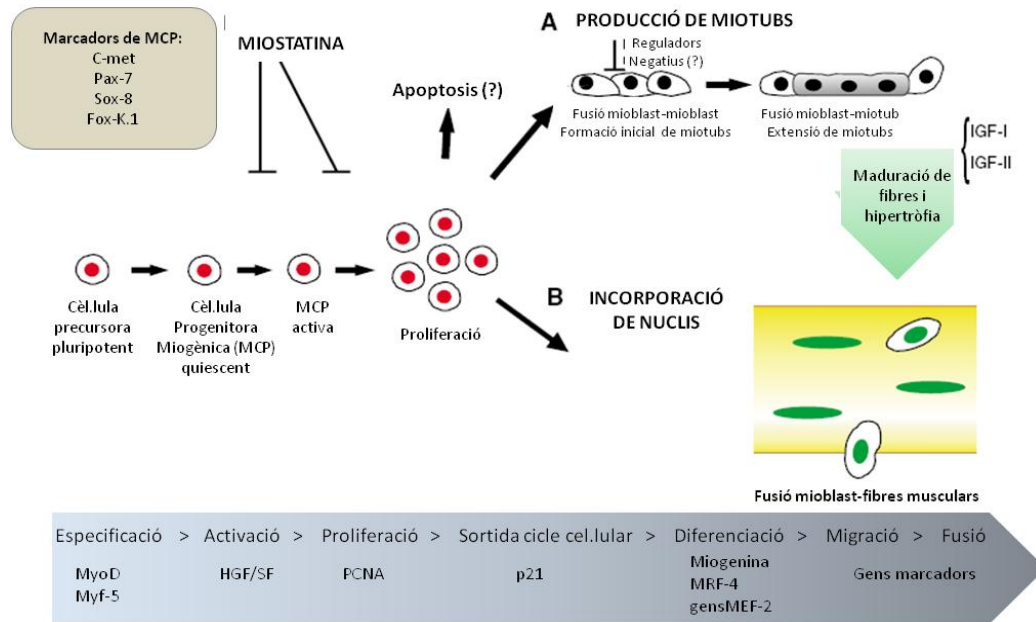


Figura 8. Model representatiu dels principals esdeveniments del procés de miogènesi en múscul esquelètic de peixos teleosts. (Adaptat de Johnston, I. A., 2006).

En peixos, els patrons d'expressió de diferents MRFs durant el desenvolupament embrionari han estat descrits en diverses espècies, com són la carpa (Kobiyama i col, 1998), truita (Delalande i Rescan, 1999), o peix zebra (Amali i col, 2004) entre d'altres, i s'ha vist que entre els factors que influeixen l'activació d'aquests factors de transcripció es troben causes ambientals, com el fotoperíode i la temperatura (Brodeur i col, 2003; revisat per Johnston, I. A., 2006), i causes nutricionals (Fauconneau i Paboeuf, 2000).

En cèl.lules musculars de mamífer en cultiu s'ha vist que MyoD i/o Myf5 són els primers que s'expressen un cop activades les cèl.lules satèl.lit musculars, mentre que els transcrits de Miogenina i el MRF4 no es detecten fins que les cèl.lules han començat el procés de diferenciació a miotubs (Smith i col, 1994; Yablonka-Reuveni i Rivera, 1994; Cornelison i Wold, 1997; revisat per Rescan, 2001).

Funcions dels MRFs

Durant la miogènesi, els factors de transcripció MyoD i Myf5 són necessaris per la determinació inicial del llinatge miogènica, i s'ha vist que la seva funció és

parcialment redundant. Així, estudis de doble *knock-out* en ratolí mostren que la manca de MyoD i Myf5 impedeix la formació del mioblast, i per tant una manca de múscul esquelètic (Rudnicki i col, 1993) mentre que estudis anteriors havien demostrat que la manca de MyoD o Myf5 per separat no conduïen a tal defecte (Braun i col, 1992; Rudnicki i col, 1992; Braun i col, 1994). En peix zebra, però, Chen i Tsai (2002) van observar que l'ús de morfollinos per a Myf5 induïa defectes en la miogènesi i també en la formació neuronal.

L'expressió de la Miogenina i MRF4, per la seva banda, s'activa durant la diferenciació dels mioblasts (Edmondson i Olson, 1993; Pownall i col, 2002; Suelves i col, 2004; Yun i Matts, 2005; Schabort i col, 2009), i aquestes proteïnes tenen, possiblement, funcions de cooperació amb el MyoD i el Myf5 en l'activació de proteïnes contràctils del múscul (Lassar i col, 1991). En ratolins deficientes en Miogenina, els mioblasts es formen normalment però no es fusionen per a generar fibres (Hasty i col, 1993; Nabeshima i col, 1993; Venuti i col, 1995). Estudis més recents indiquen que el MRF4 podria també jugar un paper clau en l'especificació inicial dels mioblasts (Kassar-Duchossoy i col, 2004).

Una altra característica destacada dels MRFs és la seva habilitat d'induir la conversió d'una varietat de tipus cel·lulars (incloent fibroblasts, neurones, adipòcits, condrocits i melanòcits) al llinatge muscular (Edmondson i Olson, 1993; Tapscott, 2005; Jin i col, 2006).

En l'activació de les cèl·lules satèl·lit, en mamífers, s'ha vist que es dona un augment de MyoD, que precedeix l'inici de l'acció mitòtica (revisat per Collins, 2006). En la línia cel·lular de mioblasts C2C12 s'ha vist que durant la diferenciació els nivells de MyoD no són detectables (Zammit i col, 2006). Estudis *in situ* en truita han revelat que les cèl·lules satèl·lit s'activen molt ràpidament en resposta a determinats estímuls, i que en poques hores expressen MyoD seguit de Miogenina (Rescan i col, 1994; Rescan i col, 1995).

Entre els gens regulats pels MRFs, molts d'ells codifiquen per proteïnes específiques de múscul implicades en el desenvolupament i la funció musculars, tals com la creatina quinasa (Jaynes i col, 1988) o la cadena lleugera de la miosina (Braun i col, 1991). Més recentment, en mioblasts C2C12 s'ha vist com MyoD és capaç d'activar la transcripció de la cadena pesada de la miosina (Beylkin i col, 2006), o el gen mateix de la Miogenina (Tapscott, 2005). També s'han identificat regions E-box en els

promotors dels gens que codifiquen per IGF-I (McLellan i col, 2006) i IGF-II (Wilson i col, 2003), augmentant-ne la seva síntesi i secreció, de forma que actuarien d'una forma paracrina activant diferents vies de senyalització promovent proliferació o diferenciació, segons les senyals.

3.1.2. Miostatina

Un altre gen important en el procés de la miogènesi és la Miostatina. Aquest gen és un membre de la superfamília dels factors de creixement transformadors tipus β (TGF- β). Les funcions biològiques d'aquests pèptids extracel.lulars són àmplies, ja que poden activar o inhibir el creixement i la diferenciació depenent del tipus cel.lular i l'estat de diferenciació (revisat per Johnston, I. A., 2006). En ratolins i bovins s'ha observat que la manca de Miostatina comporta increments en la massa muscular, augmentant tant l'hiperplàsia i l'hipertrofia (McPherron i col, 1997). S'ha vist també, que la Miostatina té la capacitat de bloquejar la proliferació dels mioblasts C2C12 iniciant específicament la seva diferenciació (Thomas i col, 2000) tot regulant l'expressió de MyoD i Myf5 (Yang i col, 2005). Estudis *in vitro* utilitzant mioblasts de pollastre indiquen que l'expressió de Miostatina és més elevada durant el procés de diferenciació i fusió de les cèl.lules (Kocamis i col, 2001).

En peix zebra transgènic sobreexpressant Miostatina, s'ha vist un increment en el nombre de fibres (Xu, C. i col, 2003). Altres estudis en la mateixa espècie han observat increments en el creixement muscular mitjançant injeccions de RNA de Miostatina en embrions (Amali i col, 2004; Acosta i col, 2005), confirmant la Miostatina com a inhibidor de la hiperplàsia embrionària.

En salmònids s'ha vist que el gen de la Miostatina està duplicat (Ostbye i col, 2007) i està implicat en el creixement de l'organisme durant el desenvolupament (Johansen i Overturf, 2005) així com en el creixement compensatori després del dejuni (Montserrat i col, 2007a). La Miostatina s'ha clonat també en orada (Maccatrozzo i col, 2001; Xue i col, 2008) i més recentment en barramundi (*Lates calcarifer*) (De Santis i col, 2008) i el peixgat (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan i col, 2007) entre d'altres.

3.2. CONTROL HORMONAL

En la regulació del desenvolupament i el creixement muscular, tant en mamífers com en peixos, el sistema endocrí juga un paper molt important, a través de l'eix GH-IGFs (Hormona del Creixement – Factors de Creixement tipus Insulina), que respon a factors nutricionals i ambientals (Figura 9) (Erbay i col, 2003; Sotiropoulos i col, 2006; revisat per Velloso, 2008).

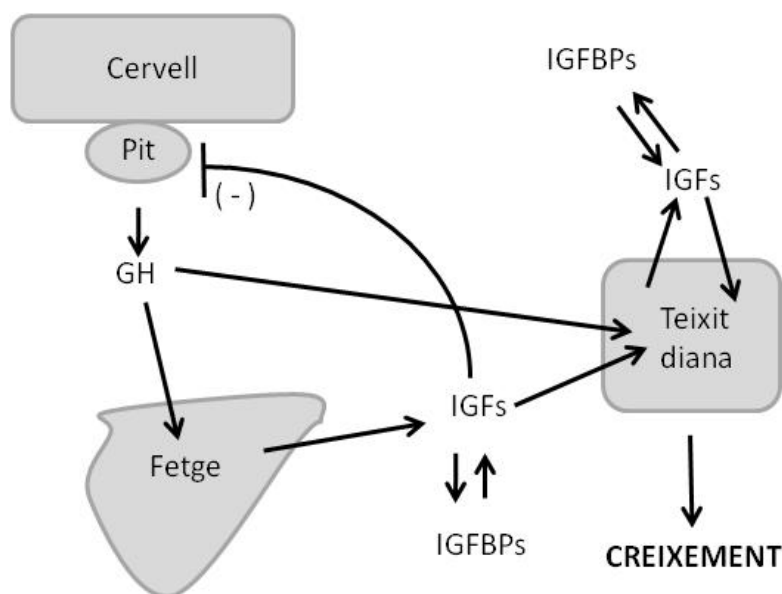


Figura 9. Esquema del sistema Hormona de Creixement (GH) – Factors de Creixement tipus Insulina (IGFs). La GH sintetitzada a la pituitària (Pit) estimula teixits diana com el múscul, ja sigui per acció directa o indirecta a través de la producció d'IGFs al fetge principalment. Els IGFs circulants estan associats amb múltiples proteïnes d'unió (IGFBPs) que en regulen les seves accions.

3.2.1. Factors de Creixement tipus Insulina

Els factors de creixement tipus insulina (IGFs), que engloben l'IGF-I i l'IGF-II, són una família de polipèptids de cadena simple relacionats estructuralment amb la proinsulina (revisat per Duan, 1998), constituïts per 4 dominis (A,B, C i D) i que són sintetitzats a partir de seqüències iniciadores a l'extrem amino-terminal. També cal indicar que presenten un domini E a l'extrem carboxi, identificat en salmònids com a resultat del fenomen de *splicing* alternatiu (Kavsan i col, 1993; Kavsan i col, 1994). Les proteïnes madures, que tenen un pes aproximat de 7,5kDa, mantenen l'estructura terciària gràcies a ponts disulfur. Juntament amb els seus receptors (IGF-IR i IGF-IIR) i

diverses proteïnes d'unió (IGFBPs), els IGFs tenen un paper crític en el creixement i diferenciació de molts teixits. Al llarg de l'evolució s'ha conservat l'estructura primària, havent-hi una gran similitud entre pèptids de diferents espècies. L'organització genòmica de l'IGF-I ha estat determinada en diverses espècies de peix, com la tilàpia (*Oreochromis mossambicus*) (Chen, J. Y. i col, 1998), el peix zebra (*Danio rerio*) (Chen, M. H. i col, 2001) o la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) (Shamblott i Chen, 1992). El cDNA d'IGF-II també ha estat clonat a diferents espècies com el tauró (*Squalus acanthias*) (Duguay i col, 1995), l'orada (Duguay i col, 1996), la truita irisada (Shamblott i col, 1998) o la tilàpia (Chen, J. Y. i col, 1998).

En els salmònids, igual que en espècies de mamífers, tant l'IGF-I com l'IGF-II tenen una expressió tissular ubiqua, malgrat en proporció variable, sent el fetge l'òrgan amb una major producció (Duguay i col, 1992; Shamblott i col, 1995; revisat per Duan, 1998). Un cop sintetitzats, els pèptids poden ser alliberats a la circulació o bé poden actuar de forma paracrina sobre el mateix teixit productor. Principalment, els pèptids trobats a plasma provenen de la producció hepàtica.

Receptors dels Factors de Creixement tipus Insulina

La majoria dels efectes biològics dels IGFs estan mediatos pel receptor de tipus I (IGF-IR). Igual que el receptor de la insulina, el IGF-IR té una estructura heterotetramèrica (amb dues subunitats α i dues subunitats β) amb un domini tirosina-quinasa en el fragment citoplasmàtic de la subunitat β (Czech, 1989). Cada receptor uneix preferencialment el seu lligand: d'aquesta manera, el IGF-IR té una afinitat entre 15 i 20 vegades superior per l'IGF-I que per l'IGF-II, i entre 100 i 1000 vegades superior que per la insulina (Jones, J. I. i Clemmons, 1995; Leibush i col, 1996).

Fins ara, els estudis d'unió hormona-receptor en peixos han posat de manifest, al contrari que en mamífers (Zorzano i col, 1998), que l'abundància dels receptors d'IGF-I a la musculatura blanca en totes les espècies estudiades duplica el nombre de receptors per la insulina (Parrizas i col, 1995b; Banos i col, 1997). L'abundància dels receptors d'IGF-I i el reduït nombre de receptors d'insulina en cèl.lules musculars de truita en cultiu ha estat descrit amb anterioritat (Castillo, J. i col, 2002; Castillo, J. i col, 2004).

Un segon receptor d'IGF transmembrana és el receptor d'IGF-II/manosa 6 fosfat, que consta d'una cadena glicoproteica de 15 dominis extramembrana. La part

extracel.lular del receptor uneix lligands de diferent naturalesa, i la regió citoplasmàtica regula el moviment del receptor entre els diferents compartiments cel.lulars.

En peixos, aquest IGF-IIR/M6P només ha estat caracteritzat en embrions de truita bruna, espècie en la qual s'ha demostrat la seva habilitat per unir IGF-II i la manca d'activitat tirosina quinasa (Mendez i col, 2001a).

El receptor d'IGF-II uneix preferencialment IGF-II, induint-ne la internalització i degradació (Oka i col, 1985; Jones, J. I. i Clemmons, 1995). També pot unir IGF-I amb menor afinitat, i no uneix insulina (Massague i Czech, 1982; Mendez i col, 2001b).

Vies senyalització a partir del receptor d'IGF-I

La unió del lligand al seu receptor dimèric comporta el reordenament de l'estructura quaternària del receptor, que resulta en l'autofosforilació dels residus tirosina del domini quinasa (Kato i col, 1993; LeRoith i col, 1995), cosa que comporta una cascada de fosforil.lacions d'una sèrie de proteïnes implicades en la senyalització intracel.lular, i que condueix a vies metabòliques i/o mitogèniques. En el múscul, les dues principals vies de senyalització activades per aquests pèptids són la via de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) i la via del *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). Aquestes vies desencadenen diverses respostes biològiques en mamífers, des de l'estimulació de la proliferació, diferenciació, migració i metabolisme, fins a la inhibició de l'apoptosi (Figura 10) (Petley i col, 1999; Sun i col, 2008).

Les primeres proteïnes intracel.lulars implicades en aquestes vies són les anomenades IRS, que són fosforil.lades pel receptor, cosa que els permet interaccionar amb altres proteïnes intracel.lulars que tenen dominis SH2, com són la Grb2, la Shc, i la PI3K, activant-les. A la vegada, la Grb2 és capaç d'interaccionar amb la proteïna Sos, i juntes promouen l'activació de les MAPKs (revisat per De Meyts i col, 1994; Pollak i col, 2004).

La proteïna MAPK pertany a la família de les ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), que està formada per ERK1 i ERK2, també denominades MAPK p44 i p42, amb pesos moleculars de 44 i 42 kDa respectivament. El paper de la MAPK en la proliferació de cèl.lules musculars ha estat àmpliament descrit ens els darrers anys en estudis en mamífers (Coolican i col, 1997; Al-Khalili i col, 2003; Al-Khalili i col, 2004). De la mateixa manera, Castillo i col (2006) han descrit els efectes de la insulina i

de l'IGF-I sobre l'activació de la MAPKp44p42 en cèl.lules musculars de truita irisada durant estadis proliferatius.

Per altra banda, la senyalització a través de la PI3K intervé en diferents efectes dels IGFs, tals com fusió de mioblasts, activació de processos metabòlics o resistència a l'apoptosi (Coolican i col, 1997). Aquests efectes es duen a terme gràcies a diferents proteïnes (enzims), una de les quals és l'Akt/PKB, que un cop activada es transloca a la membrana cel.lular. Les dianes de l'Akt inclouen la glicogen sintasa quinasa 3 (GSK), el transportador de glucosa sensible a la insulina GLUT4 (revisat per Cheatham, B. i Kahn, 1995; Butler i col, 1998; revisat per Baumann i Saltiel, 2001) i l'enzim p70S6 quinasa, involucrat en el procés de mitogènesi (Cheatham, L. i col, 1995).

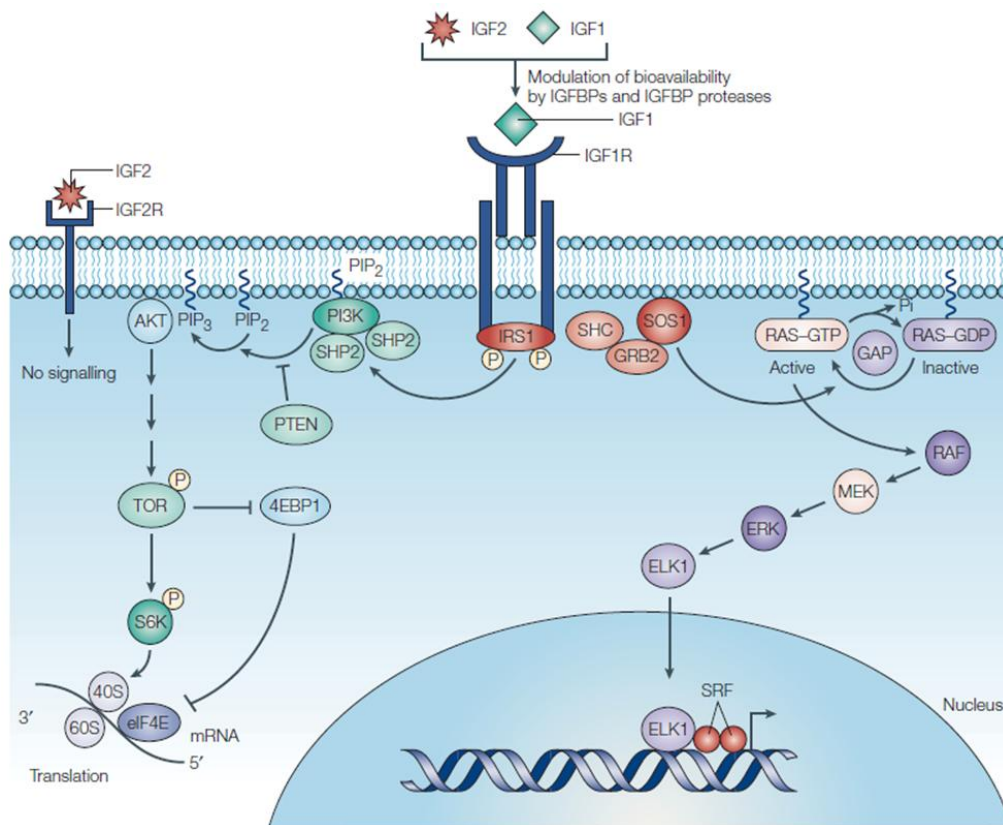


Figura 10. Esquema de l'activació del receptor d'IGF-I (IGF1R) i la senyalització intracel.lular a partir d'ell. L'IGF1R és un receptor de superfície amb capacitat tirosina quinasa i que uneix tant IGF-I com IGF-II, fet que desencadena les vies de senyalització MAPK i PI3K/Akt, vies que intervenen en la proliferació, apoptosi i metabolisme de les cèl.lules entre altres processos (de Pollak i col, 2004).

Funcions dels Factors de Creixement tipus Insulina

El paper de l'IGF-I i l'IGF-II en la regulació del desenvolupament i creixement de diversos teixits es coneix bé en diverses espècies. Més recentment, la regulació paracrina i autocrina d'aquestes hormones i la seva activitat durant el desenvolupament i reparació del múscul han esdevingut clares.

En mamífers, el paper central de l'IGF-I és el de regular el creixement postnatal i mediar l'acció de l'hormona del creixement (GH), tot i que altres estudis demostren que també és important pel creixement embrionari normal (Baker i col, 1993; Powell-Braxton i col, 1993). La funció fisiològica de l'IGF-II, per la seva banda, encara no està ben definida, tot i que en mamífers es considera un factor de creixement fetal (Ayson i col, 2002; Fowden i col, 2006).

S'ha vist que l'IGF-I i l'IGF-II són capaços de promoure tant la proliferació com la diferenciació de mioblasts incrementant així la massa muscular com a conseqüència de l'activació de les cèl.lules satèl.lit per a proliferar, i de l'augment en el contingut en DNA i de proteïna (Charge i Rudnicki, 2004; Johnston, I. A., 2006). Aquesta regulació de la síntesi i la degradació proteiques en el múscul la duen a terme mitjançant l'activació de la via de senyalització a través de l'Akt (Stitt i col, 2004; Ohanna i col, 2005).

En peixos, l'IGF-II no només s'expressa durant el desenvolupament embrionari (Duguay i col, 1996; Greene i Chen, 1997) sinó també durant la vida adulta de l'animal (Gabillard i col, 2003; Radaelli i col, 2003; Peterson i col, 2004), fet que contrasta amb el patró en mamífers i suggereix un paper destacat de l'IGF-II en el peix adult.

De fet, la implicació dels IGFs en processos de creixement muscular en peixos ha estat demostrada *in vivo*. Així, s'ha vist una correlació entre els nivells d'IGF-I o IGF-II i l'estat nutricional de l'animal en l'orada (Marti-Palanca i Perez-Sanchez, 1994; Perez-Sanchez i col, 1995; Meton i col, 2000) i també un increment dels nivells plasmàtics d'IGF-I en períodes d'acceleració del creixement en l'orada (Mingarro i col, 2002) i el salmó coho (Fukada i col, 2004). Recentment, en orada, l'IGF-II ha estat postulat com un factor promotor del creixement durant tot el cicle vital (Benedito-Palos i col, 2008).

Per tal d'estudiar els efectes dels IGFs en el metabolisme i la proliferació de les cèl.lules musculars, s'han dut a terme diferents experiments *in vitro*. Entre les funcions

metabòliques dels IGFs, s'ha demostrat que poden estimular la captació de glucosa en múscul de rata (Bevan i col, 1992; Weinstein i col, 2002) i en cultius primaris de múscul cardíac (Donthi i col, 2000) i esquelètic de diferents espècies, tals com humans (Sarabia i col, 1990; Burguera i col, 1994) o aus (Duclos i col, 1993a; Duclos i col, 1993b).

Els efectes de l'IGF-I en la diferenciació del múscul en peixos estan ben caracteritzats (Nordgarden i col, 2006; Wuertz i col, 2007). S'ha demostrat *in vitro*, en cèl.lules embrionàries de peiz zebra, que l'IGF-I estimula la proliferació i la síntesi de DNA (Pozios i col, 2001). En truita irisada, l'IGF-I i la insulina estàn implicats en el metabolisme i la proliferació del múscul (Castillo, J. i col, 2004). Més recentment, Castillo i col (2006) van demostrar el paper de la insulina i l'IGF-I en la transducció de la senyal en cèl.lules musculars de truita irisada en cultiu. En ambdós estudis, l'IGF-I va resultar tenir un efecte superior que la insulina, consistent amb el major nombre de IGF-IR en cèl.lules musculars (Parrizas i col, 1995a).

Malgrat que la relació entre l'IGF-II i els seus efectes en metabolisme i processos mitogènics encara no està clara, existeixen estudis sobre el seu paper en proliferació cel.lular. En humans, la implicació de l'IGF-II en processos tumorals i de sobreproliferació ha estat estudiada (Strange i col, 2002; Pavelic i col, 2003; Schaffer i col, 2003). En models murins, l'IGF-II modula la proliferació i diferenciació de mioblasts en cultiu (Ewton i col, 1994). Publicacions més recents descriuen la contribució de l'IGF-II a l'activació de vies de senyalització en cèl.lules del pulmó (Linnerth i col, 2005) i cèl.lules d'hepatocarcinoma (Alexia i col, 2004).

Estudis *in vitro* han demostrat el paper proliferatiu de l'IGF-II en cèl.lules embrionàries de peix zebra (Pozios i col, 2001), i més recentment s'ha vist que l'IGF-II és capaç d'activar les vies de la MAPK i la PI3K en miòcits d'orada en cultiu (Montserrat i col, 2007b).

