

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

**TESI DOCTORAL
MARTI YEBRAS i CAÑELLAS
TARRAGONA 1995**

ELLAS
pro-
ar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

Fe d'errades:

- 1) pàg 125. el títol del quadre 1 és "**Proteïna corporal i el seu recanvi en rates Zucker fa/fa. Dades en animal sencer**".
- 2) pàg 220 a " Efectes del clenbuterol". paràgraf 3. on diu: "La ruta intraperitoneal causa una hipertròfia en el cor, la qual no s'observa en els animals tractats per via oral." ha de dir " Els efectes hipertròfics que s'observen sobre el cor dels animals sotmesos a un tractament crònic amb clenbuterol, només es manifestaven en l'experiment on s'empraven animals de més edat. Aquesta hipertròfia desapareix després de 10 dies de retirada".
- 3) pàg 220 Efectes del clenbuterol". paràgraf 5. no ha de figurar.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

METABOLISME PROTEICO-MUSCULAR A L'OBESITAT

Memòria que presenta

MARTÍ YEBRAS i CAÑELLAS

per optar al grau de DOCTOR EN CIÈNCIES
QUÍMIQUES.

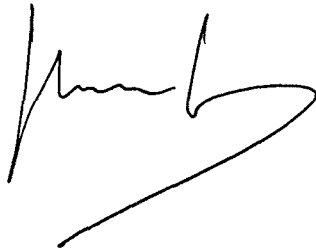
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TARRAGONA, MARÇ 1995

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

Vist i Plau dels directors

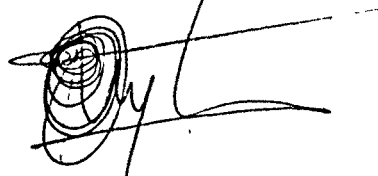
Lluís Arola i Ferrer



Jordi Cartaà i Solé



L'interessat:



Martí Yebras i Cañellas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebrás i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

A la Marta

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

Aquest treball no hagués estat possible sense la col.laboració de tots els membres del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili, en els laboratoris del qual hom ha passat tantes hores. A ells el meu més sentit reconeixement.

Vull agrair especialment a en Santiago Moreno, per la seva disposició i les seves mans de sant. I a la Guadalupe Padilla, per la cura i el carinyo amb que ha tractat els animals.

Al Departament de Fisiologia i Bioquímica de la Universitat de Barcelona, en especial al grup de Nitrogen i Obesitat, per l'acollida durant la realització de l'esperiment del recanvi d'alanina. En especial, al seu director el Dr. Marià Alemany: Gràcies!, em vaig sentir com un més de vosaltres mentre hi vaig ser.

Menció apart mereix la col.laboració del Dr. F. Xavier Remesar i Betloch, sense els seus consells , comentaris , i gestions, la mesura del recanvi d'alanina i la caracterització estructural del múscul esquelètic no s'hagués pogut portar a terme.

Agraeixo també, l'aportació decisiva del Dr. Michael J. Stock i la Dra. Nancy Rothwell en el treball dels efectes del clenbuterol.

Al Dr. Jordi Cartañà, per ensenyar-me que ambdúes mans i la ment són instruments independents i autònoms.

A en Jordi Rosselló, pel seu ajut en part del treball de les calpaïnes

A en Càndido Àlvarez que em regalà l'oïda i em donà llum en tants moments sórdids i obscurs.

A la família i als amics, gràcies pel confort i la comprensió que m'heu fet sentir aquests últims dies de bogeria.

A la Marta, per l'alé i el suport donat en els defalliments.

A tots aquells que algun dia decideixen començar el viatge cap Itaca...Aquest port no és Itaca!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

Índex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

1.- Introducció general.	1
1.1. Etiologia de l'obesitat	1
1.1.1. Necessitat d'una definició correcta.	1
1.1.2. Característiques de l'obesitat.	2
1.1.2.1 Aspectes genètics	2
1.1.2.2 Aspectes nutricionals	3
1.1.2.3. Aspectes endocrins	5
a) Hipotàlam	
b) Sistema nerviós autònom	
c) Péptids opiacis. El neuropéptid Y (NPY)	
d) Esteroides	
e) Insulina	
1.1.2.4. La teoria de l'adipocit.	10
1.1.3. Clasificació de les obesitats	11
1.1.2.1. Desordres de la ingesta.	12
Obesitat hipotalàmica	
Obesitat bulímica	
1.1.2.2. Desordres en el control de la disponibilitat dels substrats energètics	12
Obesitat digestiva	
Obesitat hiperinsulinèmica	
1.1.2.3. Desordres en la termogènesi	13
Obesitat hipotermogènica	

Obesitat Hipotiroidea

1.1.3.4. Desordres en el control del tamany dels magatzems de greix.	14
--	----

Obesitat per disfunció del senyal del pes ideal " Set point"

1.2. Models experimentals d'obesitat : aspectes fonamentals	14.
--	------------

1.2.1 El model d'obesitat genètica escollit: rata zucker fa/fa.	19.
---	-----

1.2.2 El model d'obesitat nutricional escollit: dietes hipercalòriques i saboroses (dieta de cafeteria)	21
---	----

1.3. Aspectes del metabolisme nitrogenat relacionats amb aquest estudi.	23
--	-----------

1.3.1. Recanvi de proteïnes	24
-----------------------------	----

1.3.2 Regulació del recanvi de proteïnes	26
--	----

a) Glucocorticoids

b) Insulina

1.3.3. Efectes de la dieta sobre el recanvi de proteïna.	29
--	----

a) Estat absortiu

b) Qualitat de la dieta:

1.3.4. Degradació miofibril·lar: Sistemes proteolitics implicats	30
---	----

1.3.5. Paper de l'alanina en les relacions entre el metabolisme energètic i nitrogenat	34
--	----

1.4. Metabolisme nitrogenat a l'obesitat	37
---	-----------

1.5. Bibliografia	42
--------------------------	-----------

2.- Objectius i desenvolupament experimental.	61
--	-----------

3.- Canvis en el turnover d'alanina deguts a les obesitats genètica i nutricional.

3.1. Introducció.	71
3.2. Resultats.	72
3.3. Altres elements de discussió.	79
3.4. Bibliografia	85

4.- Efectes de l'obesitat genètica i nutricional sobre el contingut de proteïna muscular. Caracterització bioquímica i estructural

4.1 Introducció	89
4.2 Materials i mètodes	95
4.2.1 Quantificació de proteïnes en les diverses fraccions	96
4.2.2. Determinació de les activitats enzimàtiques	96
4.2.2.1. Activitat Succinat deshidrogenasa	97
4.2.2.2 Activitat Lactat deshidrogenasa	97
4.2.2.3 Activitats Creatina quinasa i Adenosina Quinasa	98
4.2.2.4. Activitat β -OxoacilCoA deshidrogenasa	101
4.2.3. Microscopia Electrònica	102
4.3 Resultats.	
4.3.1. Efecte de l'obesitat genètica i nutricional en la massa, contingut proteic i activitats enzimàtiques en músculs individuals	104
4.3.2 Canvis estructurals en músculs d'animals amb obesitat nutricional i genètica.	112
4.4. Discussió	
4.4.1. Alteracions en la massa , contingut proteic i activitats enzimàtiques definidores de la tipologia fibrilar en músculs individuals	122
4.4.2. Canvis estructurals en músculs d'animals	

amb obesitat nutricional i genètica.	133
4.4.3. Discussió General	135
4.5. Bibliografia.	137
5.- Activitats enzimàtiques del sistema calpaïna en músculs individuals de rates obeses nutricionalment i genètica.	
5.1. Introducció	146
5.2. Mesura de les activitats m-calpaïna, μ -calpaïna i calpastatina.	157
5.2.1 Protocol de purificació de les activitats calpaïna	158
5.2.2. Assaig de les activitats calpaïna	161
5.2.3. Determinació de l'activitat calpastatina	162
5.2.4 Validacions del mètode i altres característiques	162
5.3. Disseny experimental	170
5.4. Resultats	172
5.5 Discussió	180
5.5. Bibliografia	183
6.- Estudi in vitro de la degradabilitat de les miofibres musculars per calpaïnes. Efecte de l'obesitat genètica i nutricional.	
6.1. Introducció	191
6.2. Materials i mètodes	193
6.3. Resultats i discussió	198
6.4. Bibliografia	206

7.- Redistribució corporal a causa d'un tractament de llarga durada amb el β_2 -agonista clenbuterol i en la seva posterior retirada en la rata.

7.1.Introducció	210
7.2. Resultats	211
8.- Conclusions generals	217

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

1. Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

1.INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1 Etiologia de l'obesitat.

1.1.1.Necessitat d'una definició correcta

Una definició amplament emprada de l'obesitat és aquella que fa referència a un excés anormal de pes corporal equivalent a més d'un 20% del pes ideal , normalment calculat a partir de l'alçada, d'un home sa (U.S. NCHS, 1991). Cal distingir aquí el simple sobrepes , en tant que aquest no és en forma de greix. Per tant, una millor definició és aquella en que s'inclou el fet que l'excés anormal de pes és en forma de greix (Powers, 1980). L'obesitat severa, descrita d'una manera ampla, afecta negativament a l'esperança i qualitat de vida en tant que està correlacionada amb nombroses malalties: malalties cardiovasculars, hipertensió, diabetis, hernia, hiperlipidèmia, gota, osteoartrosi, (Cairella, 1992). Es tracta, en humans, d'un problema multifactorial amb implicacions nutricionals, quirúrgiques, endocrinològiques, fisiològiques, genètiques, socials, conductuals, i, fins i tot,culturals, el qual s'ha d'abordar des d'una visió interdisciplinària. (Lardy i Shrago, 1990). En una obesitat poc desenvolupada, és difícil de demostrar, però, implicacions patològiques (Weiner, 1973). Cal doncs trobar una definició correcta que permeti centrar el problema adequadament:

Si es tenen en consideració paràmetres antropomètrics i risc de mortalitat es poden distingir entre quatre tipus diferenciats d'obesitat:

Tipus I, si no existeix cap zona corporal preferent d'acumulació del greix.

Tipus II (androide) si el greix es deposita preferentment subcutàniament en la zona tronc-abdòmen.

Tipus III El greix es deposita preferentment en la zona abdòmen-visceral

Tipus IV (ginoide) L'acúmul de greix es produeix preferentment en la zona gluteo femoral (Bouchard, 1991).

Definicions excessivament simplistes, com les mostrades anteriorment, les quals no ténen en compte més que la simptomatologia, fallen en aplicar els mateixos criteris de normalitat, a poblacions diferents. L'obesitat és una situació amb diferents causes fisiològiques i bioquímiques, les quals condueixen a un mateix estat simptomatològic: un "excés" de greix (Simopoulos, 1985). Excés, per altra banda, només definible com a contraposat a "normal", mot el significat del qual és voluble en funció de criteris estètics de la classe dominant del moment (o del mercat, emprant una altra terminologia ideològica). Aquesta dificultat de trobar criteris científics fa que, de moment, es continui definint l'obesitat amb criteris subjectius, sovint punitius per l'individu titllat com a tal, per amples segments de la població (Leiter, 1986). L'ampla incidència que aquest estat té en societats amb un excés d'oferta alimentària, junt amb amb els perills per a la salut que representen, tant la síndrome com les teràpies salvatges que pretenen aprimar a tota costa (Truswell, 1982) fan que sigui urgent establir una correcta definició de l'obesitat.

1.1.2. Característiques de l'obesitat

1.1.2.1. Aspectes genètics

Des d'un enfoc genètic s'intenta establir quins són els trets transmissibles de l'etiologia i quina és la seva traducció en termes moleculars (Bouchard, 1990). En humans però, només el 5% de la variancia detectada en l'índex de massa corporal (BMI), una funció del pes i l'alçada al quadrat, i la quantitat de greix subcutani és explicada per una transmissió genètica, essent aquest percentatge del 25% pel total de massa grassa. (Bouchard, 1991). En humans es considera l'obesitat és un caracter hereditari multifactorial fortament modulats per l'entorn cultural i dietari (Stunkard et al., 1986). Els subjectes obesos semblen estar adaptats a poder viure amb poca disponibilitat alimentària, en tant que ténen una eficiència metabòlica força gran (Deb et al., 1976) i una taxa metabòlica que disminueix pronunciadament en el dejuni si es compara amb els individus prims

(Deb et al, 1976). Algunes poblacions humanes (polinesis i Indis Pima) semblen haver patit una selecció natural que els ha adaptats durant segles a una pobre ingesta calòrica, de manera que en ser exposats a una gran disponibilitat alimentària desenvolupen la síndrome d'obesitat amb facilitat. (Stock i Rothwell, 1982). Els membres d'aquestes poblacions, i els animals obesos genèticament, que no han desenvolupat la síndrome per restriccions dietàries o per raons d'edat, es coneixen com a pre-obesos i ténen els mateixos desordres metabòlics que els faran ser obesos en quan tinguin la disponibilitat alimentària o l'edat suficient (Stock i Rothwell, 1982). Aquests casos il.lustren la necessitat d'una definició alternativa d'obesitat que solament pot provenir del coneixement de les disfuncions bioquímiques que representa.

1.1.2.2. Aspectes nutricionals.

Des d'un enfoc purament nutricional, l'obesitat es caracteritza per una accentuada hiperfàgia i per què l'individu tria una dieta fortament lipídica. S'estudien els condicionants nutricionals que n'afavoreixen l'aparició, éssent un objectiu intentar caracteritzar qualitativament i quantitativa la dieta que permeti revertir la malaltia, tot i que és freqüent l'experimentació simultània de teràpies psicològiques i farmacològiques que ajudin al pacient a seguir el règim imposat. (Whalqvist i Marks, 1991).

És una opinió molt estesa que l'obès menja massa, fins i tot entre especialistes (Fisler i Drenick, 1987; Vertes, 1983). Segons aquesta opinió l'obesitat és un càstig a la glotoneria (Bray, 1991) i, sovint, el fracàs d'una teràpia consistent en una ingesta força minvada en calories s'atribueix a una manca de voluntat del pacient per seguir el règim, més que al reconeixement de que no s'entenen les causes reals del desordre (Garrow, 1988). Fins i tot quan aquest tipus de teràpies han tingut èxit, el pacient es torna a engreixar en un alt percentatge de casos (Bray, 1970). De fet, però, el mateix excés d'ingesta calòrica no causa el mateix nivell d'obesitat en individus diferents, bé humans (Bouchard 1990), be entre diferents soques de rates (Rothwell et al. 1982) o ratolins (West et al. 1992).

Per altra banda, s'ha suggerit que la qualitat de la dieta és d'igual o més importància en el desenvolupament de la síndrome que la quantitat de calories ingerides. En aquest sentit s'ha postulat que, en humans, hi ha una capacitat limitada de convertir carbohidrats en lípids i que l'obesitat resulta d'un excés d'ingesta lipídica. (Ravussin i Swinburn. 1992). Com argument a favor d'aquesta teoria està la troballa de Shutz et al. (1989) segons la qual un excés d'ingesta en carbohidrats afavoreix la termogènesi, mentre que l'excés d'ingesta lipídica no. No solament la quantitat de lípids sembla important sinó la qualitat. En aquest sentit, tant estudis en humans com en rata han mostrat que els greixos són oxidats a diferents velocitats en funció de la longitud de la cadena i el grau i tipus d'insaturació (Leyton et al. 1987). Així els n-3 àcids grassos mostren efectes antiobesita en ratolins de la soca ob/ob (Cunane et al. 1986), mentre que els greixos altament saturats són pobrement oxidats i magatzemats en rata (Leyton et al. 1987).

En contra de la teoria que solament l'excés d'ingesta lipídica pot induir obesitat hi ha l'evidència que subjectes alimentats amb fórmules isocalòriques amb diverses proporcions en lípids, varen mantenir el seu pes durant 30 dies de tractament. (Leibel et al 1992).

Les condicions de nutrició durant la gestació i l'alletament són decisius en el desenvolupament posterior de l'obesitat. Així, diferents evidències demostren que una malnutrició durant les primeres fases de la gestació induïx individus amb una toleràcia a la glucosa anormal (Hales et al. 1991), hipertensió (Barker et al. 1989) i obesitat (Godfrey et al. 1993). Gran part de la descendència de les dones alemanyes que van patir gana durant els primers mesos de l'embaràs, durant els primers anys de la postguerra alemana, va desenvolupar una pronunciada obesitat (Ravelli et al. 1976). Estudis amb rates confirmen que una restricció alimentària durant les primeres 2 setmanes de gestació incrementen el pes corporal que desenvolupen d'adults llurs descendència (Jones et al. 1984) i provoca una hipertròfia en llurs adipocits (Anguita et al. 1993). La deprivació nutricional durant l'embriogènesi pot afectar la diferenciació dels

centres hipotalàmics responsables de la regulació de l'ingesta alimentària i el creixement.

En l'alletament, i durant els primers mesos mesos posteriors, és l'excés d'aliment el causant de l'obesitat (Aubert et al.1979; Plagemann et al. 1992). Efectes similars té una hiperglicèmia en la mare durant el tercer trimestre de gestació (Vohr et al 1980, Pettitt et al 1993).

1.1.2.3. Aspectes endocrins.

Interessa, sota aquest enfoc, deduir els mecanismes endocrins que permetin el control de la gana-sacietat, la lipólisi-lipogènesi, La termogènesi obligatòria-regulatòria, o la proporció de masses prima-grassa (Riva et al., 1992).

a) Hipotàlam

És prou ben documentat que, en humans, les lesions hipotalàmiques poden causar obesitat (Bray i Gallagher, 1975). Per causes electrolítiques o quirúrgiques, per aparició de tumors, craniofaringiomes, o per disfuncions d'origen genètic, les lesions en el hipotàlam provoquen el desenvolupament posterior de l'obesitat (Powley et al., 1980; Bernardis and Bellinger, 1993).

b). Sistema nerviós autònom.

S'ha hipotetitizat que el component majoritari de les variacions ocasionades pèr les alteracions de l'hipotàlam és ocasionat per canvis en l'activitat del Sistema Nerviós Autònom (Bray i York 1979)., Un descens en l'activitat simpàtica i un increment en l'activitat parasimpàtica es troben en molts models d'obesitat animal (Bray et al. 1989). Aquestes alteracions semblen provocar un descens en la termogènesi provocada pel teixit adipós marró (controlada per les vies simpàtiques), i una superexcreció de la insulina (controlada per la ruta parasimpàtica) (Bray et al. 1989). S'ha trobat, a més, una relació inversament proporcional entre la ingesta alimentària i l'activitat simpàtica, molt anterior a

l'aparició de l'obesitat, suggerint-se una retroalimentació d'ambdós sistemes. (Krief i Bazin 1991).

Ara bé, la disminució de l'activitat simpàtica no s'ha trobat en molts estudis amb humans obesos (Young i Macdonald 1992). Fins i tot l'activitat simpàtica s'ha trobat incrementada en ratolins fets obesos amb injeccions de tioglucosa or. (Young i Landsberg 1980). Per tant, al sistema nerviós simpàtic, tot i tenir un paper important en el desenvolupament de la síndrome, no és el candidat a contenir l'alteració que provoca l'aparició de l'obesitat.

c) Péptids opiacis. El neuropéptid Y (NPY).

Dins les anomalies que es produeixen en malmetre l'hipotàlam, l'increment en els nivells del neuropéptid Y, n'és de les més prometedores. Aquest péptid sintetitzat a l'hipotàlam es es mostrà com un estimulador de la gana en ser injectat en el nucli paraventricular de rates Sprague-Dawley (Stanley 1986). i provoca increments hiperinsulinèmia i increments en la lipogènesi al fetge i teixit adipós quan és administrat via intracerebroventricular (Jeanrenaud 1992). A més per aquesta via d'administració provoca una reducció del consum d'oxigen (Walker i Romsos 1993). Troballes recents mostren que els nivells hipotalàmics de NPY estan incrementats en rata Zucker (*fa/fa*). (Beck et al 1993) i en rates corpulentes (*cp/cp*) JCR:LA (Williams et al. 1992).

En el dejuni les rates primes incrementen els nivells de neuropéptid Y mentre que en les Zucker (*fa/fa*) no es veuen canvis. (Mc Kibbin et al. 1991), la qual cosa n'explicaria llur hiperfàgia. Mentre que els increments en la concentració de NPY en animals Zucker (*fa/fa*) es correspon amb un increment en l'expressió dels mRNAs respectius (Sanecora et al.1990), la qual cosa ja es produeix en el deslletament (Jeanrenaud et al. 1992), en rates fetes obeses amb manipulació nutricional l'increment en els nivells de NPY no és paral·lel a l'increment en l'expressió dels RNA missatgers. (Wilding et al. 1992). Això suggereix que, en aquest últim cas l'increment dels nivells de NPY s'ha de justificar

per una manca d'alliberament del neurotransmissor, més que per una augment de la síntesi. Aquest fet junt amb la troballa que una hiperinsulinèmia aguda incrementa els nivells de NPY en el hipotàlam de rates dejunades (Malabu 1993), fa descartar el NPY com a candidat a ser l'origen de l'obesitat.

d) Esteroides

L'implicació dels esteroides en el control del pes corporal, és amplament revisada per Remesar et al. (1993).

La participació de els glucocorticoides (corticosteroides) en el desenvolupament i manteniment de l'obesitat ha estat clarament demostrada pel descens de pes observat després de l'adrenalectomia en diferents models d'obesitat animal: ratolí *ob/ob* (Saito i Bray, 1984), rates *fa/fa* (Yukimura i Bray, 1978) i en obesitat deguda a lesions hipotalàmiques (King et al., 1992). Recentment el paper dels corticosteroides en el desenvolupament de la síndrome s'ha enfatitzat en demostrar-se en un animal transgènic, el qual tenia reduïda l'expressió del receptor de glucocorticoides de tipus II, no es va poder inhibir la secreció de corticotropina (ACTH) per efecte d'increments en els nivells circulants de corticosterona. (Pepin et al. 1992). Aquests animals incrementaren el seu pes i adipositat malgrat menjar un 15% menys que els animals controls. Per contra, la inhibició dels receptors glucocorticoides de tipus II amb un antagonista específic, la mifepristona (RU 486). (Okada et al. 1992). La aparent contradicció entre ambdós resultats es salva si tenim en compte que la reducció de receptors glucocorticoides de tipus II en l'animal transgènic s'obté fonamentalment en la glàndula pituitària (Pepin et al., 1992), mentre que l'acció de la RU 486 equival a una adrenalectomia en tant que té una acció antiglucocorticoide general (Spitz i Bardin, 1993). L'lur mecanisme d'acció no està clar, tot i que la desamethaxona inhibeix la termogènesi i incrementa els nivells d'insulina

(Walker i Romsos 1993), i n'estimulen l'hiperfàgia (Langley i York 1990).

D'altra banda els estrògens indueixen termogènesi (Sutherland et al., 1988) i influeixen en la distribució ginoide de les deposicions de greix (Vague et al 1988), mentre que els andrògens indueixen la síntesi de proteïna al múscul i altres teixits (Haupt et al., 1984), influint en la distribució androide de les deposicions de greix. (Vague et al 1988). La deshidroepiandrosterona, un intermediari de la síntesi d'andrògens, malgrat presentar un efecte androgènic feble (Liddle, 1985), té una forta acció inhibidora de la lipogènesi al fetge i llur administració dietària provoca pèrdua de greix en rates obeses (Clearly i Zisk 1986), sense canvis apreciables en el balanç proteic o en la ingesta (Mohan et al 1990).

La síntesi d'estrògens en teixits diferents de l'ovari, bàsicament al teixit adipós blanc fins i tot de mascles (Brind et al., 1990) per la participació de l'aromatasa de l'anell A (Cleland et al. 1985), és una troballa prometedora en l'aclariment de l'etiologia de l'obesitat.

El control de la síntesi dels esteroides és complex: la síntesi de les secreccions esteroidees del córtex adrenal (Glucocorticoides, mineralocorticoides, i deshidroepiandrosterona) són regulades per les secreccions de corticotropina (ACTH) en el lòbul posterior de la hipòfisi, la qual és secretada per estimulació del factor alliberador de corticotropina (CRF) procedent del hipotàlam via sistema portal hipofisari.(Liddle, 1985). Al seu temps, la CRF secreció és inhibida per alts nivells circulants de glucocorticoides o ACTH (Dallman et al 1987). La CRF com a tal, te poderosos efectes sobre el sistema serotoninèrgic(Rothwell i Stock, 1987) i el sistema nerviós autònom (Brown i Fisher, 1989), mostrant un fort efecte anorèxic (Rothwell, 1990).

e) Insulina

Una característica important de l'obesitat és la hiperinsulinèmia, fins el punt que alguns autors han proposat que increments en la

secreció de la insulina modulats per factors neurals n'és el mecanisme primari de l'aparició de l'obesitat (Bray i Gallagher, 1975; Inoue et al. 1978). Aquesta hipòtesi és reforçada pel fet que la rata fa/fa preobesa (lactant) ja mostra una hipersecreció d'insulina com a resposta a la glucosa o a l'arginina, situació que és revertida prèvia injecció d'atropina, la qual cosa suggereix que el sistema parasimpàtic també hi està involucrat (Rohner-Jeanrenaud i Jeanrenaud, 1985). La hiperinsulinèmia pot conduir per ella mateixa a una acumulació de lípids en tant que incrementa la lipogènesi en el fetge (Cusin et al. 1990a). En aquestes condicions el teixit el múscul desenvolupa resistència a la insulina, mentre que el teixit adipós incrementa el nombre de transportadors GLUT-4, i per tant el transport de glucosa mediat per la insulina. (Cusin et al. 1990b). Una resistència a la insulina en el múscul, combinada amb una incrementada resposta a la insulina en els adipocits podria desviar la majoria del flux de glucosa cap el teixit adipós (Jeanrenaud 1978). Aquesta afirmació és congruent amb el resultat de Shepherd et al. (1993) segons els quals els animals transgènics que sobreexpressen els transportadors GLUT 4 en els adipocits, finalment es tornen obesos. Aquest transport de glucosa incrementat, en condicions basals i en presència d'insulina, és un patró comú de l'obesitat i d'altres situacions de resistència a la insulina (Proietto 1989). Un cop l'obesitat s'ha establert l'adipocit també desenvolupa una resistència a la insulina. (Eckel 1992).

Donat que el cervell té una alta densitat de llocs d'unió a la insulina (Okumura and Kita. 1981) i que, quan s'injecta insulina en el ventricle lateral del cervell d'animals normals (Woods et al. 1979), es suprimeix l'injesta, s'ha proposat que la insulina pot servir de neurotransmissor o neuromodulador en el centre de la sacietat del sistema nerviós central. (Porte i Woods. 1981). Així una hiperinsulinèmia perifèrica i un defecte cerebral en la resposta a la insulina podria ser el mecanisme primari que desenvoluparia l'obesitat (Proietto i Thorburn 1994).

1.1.2.4. La teoria de l'adipocit

Un intent de destriar diferents etiologies empra com a criteri el moment d'aparició del sobrepes. Es distingeix aquí entre obesitat juvenil i la que es desenvolupa un cop l'individu és adult, ja que palesen característiques ben diferents pel que fa a al seu metabolisme energètic. Els intents per a reduir el pes als individus amb obesitat juvenil per mitjà d'una deficient ingesta calòrica els són força penosos i, sovint, infructuosos. Als obesos que s'hi han tornat d'adults, els és més senzill de reduir el seu excés de greix.

L'explicació pot venir del fet que en etapes posteriors a la maduració sexual, la proliferació cel·lular dels adipocits pugui estar inhibida. Brook (1972) ha suggerit que el teixit adipós en l'home pot tenir un període de diferenciació que va des de les 30 setmanes de gestació al primer any de vida. Quan aquest període ha finalitzat la proliferació dels adipocits s'atura i només els queda la possibilitat de créixer en tamany. En aquesta direcció, s'ha demostrat en cultius d'adipocits, que la capacitat d'iniciar la proliferació i diferenciació cel·lular és independent del teixit adipós de procedència i de l'edat de l'individu, però que la freqüència amb que aquest procés es porta completament a termini minva ostensiblement amb l'edat (Hollenber, 1990). Aquesta és l'explicació que es dona pels casos de sobrealimentació i hiperglicèmia en la última fase de la gestació (Proietto i Thorburn 1994).

Aquest és el nucli del que hom anomena la "teoria de l'adipocit", la qual consisteix en pensar que l'anomalia primària que finalment porta al desenvolupament de l'obesitat és en els adipocits.

En aquest sentit s'han descrit anomalies en adipocits d'animals obesos joves quan encara no evidencien un excés de pes (preobesos). En rates Zucker (*fa/fa*) de 9 dies, quan encara no són hiperinsulinèmics, s'han trobat incrementats l'àcid gras sintasa i de l'enzim màlic tant a nivell d'activitat (Bazin i Lavau, 1982), com l'expressió de llurs mRNAs (Dugail et al 1988; 1993). És més Briguët et al. (1992) han mostrat que els adipocits de la rata Zucker (*fa/fa*) jove mantenen

incrementada l'activitat d'aquest enzim lipogènic en cultius a llarg termini, suggerint que aquest és el defecte primari en tant que apareix abans i és independent de la presència d'altres factors de l'entorn com la hiperinsulinèmia. Un altre argument favorable de la "teoria de l'adipocit" és que l'adipositat no es normalitza quan s'aconsegueix retornar el pes a nivells "normals", ni en rata (Stendal 1992) ni en humans (Yost i Eckel 1988). Els adipocits en aquests casos no semblen variar ni en tamany ni en nombre (Faust et al. 1976; 1977). Recentment Vasselli et al. (1992), en un experiment on rates Zucker (*fa/fa*) es sotmetien a dietes riques en lípids o normals, la desaparició de la hiperfàgia coincidia amb el moment en que els adipocits arribaven al seu tamany màxim. Això suggereix l'existència de senyals moduladores de la gana emeses desde el teixit adipós. Però potser "la teoria de l'adipocit" ha rebut un suport més importants a partir dels treballs de Shepherd et al. (1993). Aquest grup obtingué un ratolí transgènic la característica del qual era la sobreexpressió específica en el adipocit del transportador de glucosa en resposta a la insulina GLUT-4. En aquest model una sobrecàrrega de glucosa induïa l'obesitat de l'animal. Sorprenentment no s'observava una hipertròfia, sinó una hiperplàsia dels adipocits de l'animal, fenomen similar al que esdevé en l'obesitat produïda per sobrenutrició en els primers mesos de vida. Aquesta sobreexpressió dels transportadors GLUT-4 en adipocits ja s'havia descrit en models d'obesitat espontània (Cousin et al. 1992, Pedersen et al. 1992). D'aquestes troballes es desprén que la regulació de l'expressió dels transportadors GLUT-4 en els adipocits pot ser important en el desenvolupament de l'obesitat.

1.1.3. Clasificació de les obesitats.

És des d'una òptica fisiològica, integradora, on es pot donar una classificació dels diferents desordres que condueixen a l'obesitat i separar-ne les diferents etiologies. Aquest ha de ser el primer pas per establir les diferents estratègies de teràpia. En aquest sentit Alemany (1989) fa una compilació dels diversos desordres que s'han descrit en l'obesitat i proposa una classificació de les obesitats en funció de les causes que l'originen. La base de la classificació estriba en el convenciment de què l'obesitat apareix com a conseqüència de

disfuncions en els tres mecanismes bàsics del control del pes corporal: Control de la ingesta, control del processament dels substrats energètics disponibles, o en el control del tamany dels magatzems de greix. Amb aquests presupòsits estableix la següent classificació:

1.1.3.1. Desordres en el control de la ingesta

El centre modulador de la gana és a l'hipotàlam ventro-medial. (Leibowitz et al., 1987). Els principals senyals coneguts que inhibeixen l'ingesta són una elevada glicèmia (Mayer i Thomas., 1967), la insulina (Porte i Woods, 1981), péptids opiàcis (Margules et al., 1978; Woods et al., 1981) i l'ompliment de l'estómac.(Gibbs i Smith, 1986). L'activen el buidat de l'estómac (Morley, 1987), una baixa glicèmia (Mayer i Thomas., 1967) o una estimulació cortical a causa d'una excitació sensorial (Friedman , 1984.)

Obesitat hipotalàmica

Sorgiria quan el centre de la sacietat, a l'hipotàlam respón anòmalament als seus moduladors (probablement als inhibidors)

Obesitat bulímica.

Sorgeix quan, per motius fisiològics o psicològics, l'estímul cortical a un senyal sensorial és desproporcionat

1.1.3.2. Desordres en el control de la disponibilitat dels substrats energètics

Obesitat Digestiva

Sorgeix quan, a causa d'una anomalia en la funció del nervi vague (Wisén et al., 1987) o per una deficiència en la modulació d'aquest per part del sistema nerviós autònom (Inoué i Gray, 1979; Cox i Powley, 1981), es produeix en una situació prandial una sobreestimulació vagal, la qual indueix una supersecreció d'insulina (Inoué i Gray, 1979; Jeanrenaud, 1978) i d'hormones

intestinals (Chikamori et al., 1983). Finalment resulta en un increment en l'eficiència digestiva de l'estómac i absortiva de l'intestí , a banda de les alteracions que genera la situació d'hiperinsulinèmia. Aquesta situació es reverteix després d'una vagotomia (Mordes et al. 1977; Kral, 1979).

Hiperinsulinèmica.

Sorgeix quan tot i un correcte funcionament de la funció vagal, persisteixen incrementats els nivells d'insulina en sang. La majoria d'obesitats presenten hiperinsulinèmia (Modan et al., 1985) i desenvolupen una resistència a la insulina (Olefski, 1981) que sovint condueix a una diabetis de tipus II (Powers, 1980)

La situació d'hiperinsulinèmia, sigui quina sigui la causa, manté activades durant més temps les rutes biosintètiques característiques de l'estat prandial, facilitant la síntesi de glicogen i lípids en teixits perifèrics, com és el cas del teixit adipós blanc. (Chiascione et al., 1987). A més cal esperar un pic de nutrients més ample, sobretot en una dieta rica en grixos, la qual cosa garanteix una hiperglicèmia prolongada (Alemany 1989). Aquesta situació genera un més curt període postprandial, catabòlic, en el qual s'empren abans les reserves de glicogen que no pas les de greixos (Andrews et al., 1984; Baker i Schotz, 1967), mentre hi ha una degradació de proteïnes paral·lela per l'obtenció de substrats gluconeogenètics (Felig, 1973, Marliss et al., 1971). Amb un període post-prandial curt, la utilització de les reserves de greix és veu disminuïda (Alemany, 1989).

1.1.3.3. Desordres en la termogènesi

Obesitat hipotermogènica.

Bé per un defecte en el teixit adipós marró (Girardier, 1983), bé per una reduïda termogènesi induïda per la dieta (Belko et al., 1986), causada per una variació en els patrons alimentaris (Welle et al., 1981; D'Alesio et al., 1988) o en una disminuïda estimulació simpàtica (Schwartz et al., 1987).

Obesitat hipotiroidea.

L'hipotiroideisme sovint genera un increment en la deposició de greixos , en tant que provoca nivells baixos de l'hormona tiroidea, la qual cosa afavoreix una termogènesi general disminuïda (Ingbar i Woeber, 1981).

1.1.3.4. Desordres en el control del tamany dels magatzems de greix.

Obesitat per disfunció del senyal del pes ideal " Set point"

Probablement el tipus més extès d'obesitat. Engloba totes les etiologies no originades pels defectes abans descrits. Suposa l'existència d'una molécula senyal del pes ideal emesa probablement pel teixit adipós. En aquest cas el defecte pot raure en una síntesi deficient del senyal en el teixit adipós, o en un disfunció en el mecanisme d'interpretació (Alemany 1989).

1.2. Models experimentals d'obesitat: Aspectes fonamentals

Des que a 1905 Cuenot observà que el ratolí groc esdevenia obès amb el temps, els models animals, en aquest cas genètica, s'han emprat abastament en l'estudi de les alteracions metabòliques i psicològiques que comporta l'obesitat.

El 1940, Hetherington i Ranson obtinguèren el primer model d'obesitat adquirida, per lesió electrolítica del nucli ventromediàl de l'hipotàlam en rata. (Hetherington i Ranson, 1940).

Una classificació exhaustiva dels models experimentals animals d'obesitat és la que elaborà A. Sclafani (A. Sclafani, 1984). A partir de la diferent etiologia, proposa 9 grups diferenciats:

I. Neural

A Hipotalàmica

- 1 Lesions de l'hipotàlam ventromedial (VMH)**
- 2 Lesions de l'hipotàlam paraventricular (PVH)**

- 3 Incisions a l'hipotàlam medial (MH)
- 4 Injeccions d'Aureotiloglucosa (GTG)
- 5 Injeccions de glutamat monosòdic (MSG)
- 6 Injeccions de mostassa de bipiperidil

B. Mesoencéfal

- 1 Injeccions de 6-hidroxidopamina
- 2 Lesions electrolítiques
- 3 Incisions.

C. Estimulació crònica de l'hipotàlam lateral

D. Lesions al lòbul Amígdalo-temporal.

E. Simpatectomia abdominal i unilateral.

II. Endocrina

- A Ovariectomia
- B Tractament crònic amb insulina.
- C Tractament crònic amb glucocorticoides.

III. Farmacològica

- A Tractament crònic amb clonidina.
- B Tractament amb clonidina.
- C Tractament amb Clordiazepòxid.

IV. Nutricional

- A Ingesta forçada (sondes)
- B Ingesta de farina.

- C. Induïda per dieta
 - 1. Dietes Hiperlipídiques (HFD)
 - 2. Dietes hipersucroses (HSD)
 - 3. Dieta de Cafeteria o de supermercat (SMD)
- D. Sobrenutrició postnatal
- E. Infranutrició prenatal
- V. Medioambiental
 - A. Restricció física al moviment.
 - B. Hiperfàgia induïda per stress (pesics a la cua)
- VI. Estacional
 - A. Prehibernació
 - B. Premigració
- VII. Genètica
 - A. Monogènics, dominants.
 - 1. Ratolí Groc. (AYy)
 - 2. Ratolí adipós (Ad)
 - B. Monogènics, recessius.
 - 1. Ratolí Obès (ob)
 - 2. Ratolí Diabètic (db)
 - 3. Ratolí greixós (fat)
 - 4. Rata grossa (fa, fa^k)
 - C. Poligènics, espontàniament obesos

- 1 Ratolí obès de Nova Zelanda (NZO)
 - 2 Ratolí Japonès (KK)
 - 3 Ratolí negre Paul Balley (PBB/Ld)
 - 4 Ratolí NH
 - 5 Ratolí Wallesley (C3HF1)
- D Poligènics, amb propensió a ser obesos.
1. Ratolí A/St
 2. Ratolí CH3
 - 3 Rata BHE
 - 4 Rata Osborne-mendel
 - 5 Rata Sand (*Psammommys obesus*)
 - 6 Ratolí Espinós (*Acomys cahirinus*)

VIII Viral.

IX Idiopàtica (sense raó coneguda).

Pel que fa a l'obesitat genètica els models més emprats són

Els ratolins ob/ob: Hiperfàgics, hiperglucèmics i hiperinsulinèmics (etiologia semblant a la diabetis no depenent d'insulina).

Els ratolins db/db: Hiperfàgics, hiperglicèmics i amb una hiperinsulinèmia transitòria (etiologia semblant a la diabetis depenent d'insulina). Cal destacar la soca mdb/mdb en tant que porta associada a la malaltia el tret del color de la pell que permet de distingir el fenotipus abans de que es manifesti el síndrome d'obesitat.

Les rates fa/fa : Hiperfàgics, hiperinsulinèmics i euglicèmics, presenten etiologia semblant a l'obesitat essencial en humans.(Johnson et al. 1991, Jeanrenaud 1991).

En els mutants de ratolí, s'ha trobat el locus cromossòmic on resideix l'anomalia. És per això que són d'utilització freqüent en els estudis de genètica molecular, els quals intenten determinar la lesió genètica primària. Així s'han fet mapes genètics de diversos factors localitzats en els diversos loci afectats. Entre altres l'adipsina (una serin-proteasa amb factor D de complement que apareix durant la diferenciació dels preadipocits (Amri et al., 1986); la calcitonina (una hormona secretada a la glàndula tiròides que regula el metabolisme del calci i que està disminuïda en la rata fa/fa); diverses proteïnes G; la insulines, la lipoprotein lipasa, en són candidats a ser la lesió genètica primària que desenvolupa el síndrome (Johnson et al. 1991).

Per una altra banda els models més emprats d'obesitat adquirida són:

Animals amb lesions hipotalàmiques: bé amb tioglucosa-or (Jeanrenaud, 1978) o Glutamat monosòdic , ja administrat prenatalment en la beguda materna, ja per injecció subcutània (Olney i Ho, 1970; Olney, 1971, Frieder i Grimm,1987); bé amb lesions electrolítiques. (Jeanrenaud 1978).

Animals que, sotmesos a dietes altament saboroses durant un període llarg de temps (dieta de cafeteria), desenvolupen una hiperfàgia voluntària.(Sclafani i Springer, 1976). Es tracta d'el model experimental que més s'assembla a la majoria dels cassos d'obesitat humana induïda per dieta (Rothwell i Stock, 1979) o bulímica (Alemany 1989), lliure dels factors estressants que impliquen altres models d'obesitat nutricional.

De tots aquests possibles models, l'ús de la soca Zucker permet estudiar, sense artefactes atribuïbles a diferències entre soques, els desordres metabòlics induït per una síndrome d'obesitat genètica de característiques similars a la manifestada en humans, i els efectes d'una obesitat generada per una hiperfàgia voluntària causada per la constant exposició a dietes altament saboroses, un cas també freqüent en els humans.

1.2.1 El model d'obesitat genètica escollit: rata Zucker fa/fa

L'obesitat de la rata Zucker es transmet genèticament com a un tret autossòmic recessiu degut a una mutació en un sol gen, anomenada "fa" (de "fatty") (Zucker i Zucker, 1961). Una sola mutació implica l'alteració d'un nombre reduït de proteïnes que haurien d'explicar tots els defectes associats amb el síndrome. Donat que és molt costós determinar el genotipus abans dels 16-18 dies d'edat (manifesten un consum d'oxigen disminuït (Kaplan, 1979) i una menor temperatura corporal (Godbole et al, 1978)), i a que el genotipus fa/fa comporta esterilitat, els estudis s'han fet majoritàriament en animals adults.

Així les hipòtesis sobre les causes del síndrome, s'han emés a partir d'estudis amb el síndrome molt desenvolupat, a partir de les 4-5 setmanes d'edat. (Krief i Bazin, 1991):

1. Una alteració de una sola proteïna (lipoprotein lipasa o àcid gras sintetasa).
2. La pròpia hiperinsulinèmia.
3. Un control anòmal de l'eix hipotalàmic-pituitàrio-adrenal.
4. Alteracions en el sistema nerviós.

Malgrat l'hiperfàgia juga un paper important en el desenvolupament de la síndrome, la restricció dietària no ho evita. (Sclafani i Springer, 1976). En dietes de lliure selecció triarà un alt contingut de greix (Argilés, 1989). Tendeixen a un excés de deposició de greixos que es caracteritza, no solament per una hipertròfia dels adipocits, sinó també per una hiperplasia del teixit adipós: els adipocits creixen en número i en tamany (Argilés, 1989), de manera similar a com succeeix a l'obesitat juvenil.

El seu metabolisme és fortament lipogènic, la qual cosa es tradueix en una forta hiperlipidèmia i hiperlipoproteinèmia a nivell de les VLDL. També és característic que manifestin amb l'edat una tolerància a la

glucosa, malgrat que son hiperinsulinèmics. S'ha especulat que la seva hiperfàgia pot ser deguda a aquesta hiperinsulinèmia, ja que tornant a nivells normals d'insulina desapareix (Chan i Stern, 1982). A ara bé , mentre que hi han evidències que , mentre que l'excés d'augment de pes i d'ingesta energètica depèn del status hiperinsulinèmic de les rates obesas, la partició de l'energia de la dieta cap a la formació de lípid és independent de la ingesta i de la insulina. (Stolz i Martin, 1982). Les rates joves obesas, en dietes de lliure elecció, consumeixen més proteïna i energia , però depositen menys nitrogen esquelètic, en relació al seu pes corporal, que les primes. Llur hiperfàgia no sembla associada a una demanda superior de proteïna de la dieta (Chee et al. 1981).

Principals anomalies de la rata Zucker *fa/fa* (Johnson et al. 1991)

Animal sencer	Sang	Cervell
Hiperfàgia +	Insulinèmia +	Somatomedina -
Intolerança a la glucosa +	glicèmia =	Colecistoquinina +
Capacitat termogènica -	Trigliceridèmia +	Sistema Adrenèrgic -
Tamany testicular -	Raó Insulina/glucagó +	Activitat Dopaminèrgica -
Resposta a feromones -	Corticosterona (recanvi) +	Hormona del Creixement -
Adrenalectomia(Reversió) +	Estrogens -	Gonadotropina -
Activitat Simpàtica -	Hormona Tiroidea -	Somatostatina +
Activitat Parasimpàtica +	Teixit adipós marró	Fetge
Teixit adipós blanc	Massa	Lipogènesi +
Massa +	GDP-binding +	Cetogènesi -
Hipertròfia/Hiperplasia +	(Mitochondrial) -	Na/K ATPasa =
Lipoprotein lipasa +		Fructosa-2,6-Bifosfat +

Lipogènesis	+	Pàncreas	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
Lipólisi	+	Hipertròfia/hiperplàsia de les illetes	Desaturasa d'àcids grassos
Receptors d'insulina	+	Secreció de glucagó	- Receptors a la insulina
		Secreció de somatostatina	
Múscul		Cervell	
Resistència a la insulina	+	Contingut en insulina	-
Receptors d'insulina	-	Receptors d'insulina	-
Unió d'insulina a múscul aïllat	+	Activitat d'opioides	+
Utilització de glucosa	-	Activitat serotoninèrgica	-

1.2.2 El model d'obesitat nutricional escollit:

Diets hipercalòriques i saboroses (dieta de cafeteria)

És possible induir increment de pes en rates normals mitjançant la hiperfàgia voluntària que les rates primes (soca zucker FA/FA) desenvolupen en ingerir ad libitum aliments altament saborosos que hom els ha ofert en excés (Sclafani i Springer, 1976) (Rothwell i Stock, 1979). Aquesta model ha estat força questionat, pel fet que, en ser una lliure selecció d'aliments de composició no constant, el control de la ingesta és molt difícil o impossible. Malgrat això, és una manera no estressant de desenvolupar una hiperfàgia voluntària, de característiques semblants a l'obesitat bulímica en humans (Alemany, 1989). Per altra banda Prats et al. (1989) han demostrat que la

selecció alimentària abans esmentada feta pels propis individus, es manté constant amb el temps.

La dieta que selecciona la rata acostuma a ésser d'un alt contingut lipídic (Naim et al, 1985), mantenint, i fins i tot incrementant, les quantitats ingerides en termes absoluts de proteïnes i carbohidrats, tot i que les proporcions són inferiors que en el cas dels controls relatius (Prats et al. 1989). La constant exposició a aquestes dietes causa en les rates un augment en la taxa de creixement (Salvadó et al. 1986), amb una important deposició de greix (Rolls i Rowe, 1982) tot i incrementant la seva termogènesi, sobre tot en rates joves (Rothwell i Stock, 1982).

No sembla clar que l'únic determinant de l'hiperfàgia en sigui el contingut en proteïnes (Chee et al. 1981), car dietes pobres en proteïnes també provoquen una hiperfàgia, encara que seguida d'una forta termogènesi (Rothwell i Stock, 1986).

La fracció d'energia destinada a la termogènesi és inversament proporcional al contingut protèic de la dieta. Alhora la resposta termogènica és més gran en joves que en adults (Kornhuber et al., 1991).

No està clar quin és el teixit responsable de la termogènesi induïda per la dieta (DIT), ja que, malgrat uns autors la situen en el teixit adipós marró (Rothwell i Stock, 1986), d'altres la situen majoritàriament al fetge (Ma et al, 1987). Un excés de disponibilitat energètica, com l'exposició crònica a les dietes de cafeteria, es tradueix en una alta activitat del teixit adipós marró, i en la hiperplasia del mateix.(Girardier, 1985)

En rata mascle adulta, el sobrepes és significatiu al cap de 20-25 dies de manipulació nutricional, mentre que en femelles apareix al cap de 15 dies.(Prats et al, 1989).

L'etapa d'inici de la manipulació nutricional, tampoc sembla tenir efectes sobre el moment d'aparició del sobrepes: 18 dies després del neixement, tant si el tractament s'ha iniciat el dia de neixement, com si s'ha començat durant la gestació. En el cas que es comenci després

del deslletament, el grup tardarà 10-15 dies en arribar a un pes similar al dels altres cassos (Iglesias et al., 1986).

En adults, el resultat d'una exposició crònica a aquests tipus de dietes és una lleugera hiperglicèmia acompanyada d'un increment en els nivells d'insulina circulants.(Cunningham et al., 1983). En joves el resultat és una hiperglicèmia acompanyada de normoinsulinèmia, amb elevats nivells de triiodetironina circulant.(Iglesias et al., 1986).

Per altra banda una dieta altament energètica incrementa la quantitat de glucosa present dins de les cèl.lules sanguínies, mentre que disminueix la quantitat d'aminoàcids en aquest compartiment. Així la glucosa sintetitzada en el fetge és inicialment confinada en el pool intracel.lular del torrent sanguini, essent més tard alliberada al plasma o directament als teixits.(Prats et al, 1986). Les dades de glicèmia que no han tingut en compte la compartimentació sanguínia, poden induir a conclusions errònies.

S'ha observat en animals sotmesos a dietes amb una alta composició en greixos, una alteració específica per teixits (activació en ronyó i inhibició en múscul i intestí) de la tirosina quinasa estimulada per la insulina, responsable del perfil de fosforilació dels receptors de la insulina, aquestes alteracions contribuirien a la observada resistència a la insulina (Nagy et al., 1990). Per altra banda no s'ha demostrat, en el fetge, una relació causal entre una hiperinsulinèmia o una lipòlisi augmentada en els magatzems de greix i la subseqüent oxidació dels acíds grassos en el fetge, i el desenvolupament de la resistència hepàtica a la insulina en rates amb obesitat induïda amb dieta de cafeteria. (Davidson i Garvey, 1993).

S'han trobat canvis en diferents la composició de diferents teixits: Una hipertròfia i hiperplàsia en el teixit adipós marró (Lladó et al, 1991) on s'han trobat nivells incrementats de termogenina paral.lel a increments en el GDP-binding en rates nutricionalment obeses, però que en situacions de dejuni els nivells de GDP-binding disminueixen sense que variïn els de termogenina, contràriament al que succeeix als animals prims. (Puigserver et al., 1991) A més el teixit adipós blanc presenta una hiperplàsia no hipertròfica. (Lladó et al., 1991). El

fetge també és hipertròfic, sense aparent hiperplàsia, mentre que no s'observen alteracions en la composició en lípids de l'intestí o el ronyó (Proenza et al. 1992). És remarcable que aquestes alteracions persisteixen malgrat la reversió a la dieta estandard (Lladó et al., 1991; Puigserver et al., 1991; Proenza et al. 1992).

1.3. Aspectes del metabolisme nitrogenat relacionats amb aquest estudi.

1.3.1 Recanvi de proteïnes.

La necessitat d'una ingesta continuada de proteïnes es justifica per una pèrdua constant de nitrogen, reflex d'un ràpid recanvi de proteïnes. Pell, cabell, suor, orina i excrements en són les vies de sortida. Recentment, acurats balanços nitrogenats en rata i ratolí, semblen demostrar l'existència d'una possible via d'eliminació de nitrogen ingerit com a N_2 (Rafecas et al., 1992).

Un recanvi ràpid de proteïnes és necessari per tal d'eliminar pèptids i proteïnes potencialment perillosos produïts, ja per errors de síntesi o processament posterior, ja per desnaturalització de proteïnes normals.

A l'hora es garanteix l'eficàcia del sistema de regulació metabòlica basat en l'inducció d'activadors / represors de síntesi d'enzims clau.

Amb el mot "recanvi" de proteïnes s'anomena aquell estat estacionari, o d'equilibri dinàmic, entre la velocitat de síntesi i la de degradació de proteïnes. És per això que les taxes de síntesi (K_S) i les de degradació (K_D) són més elevades que les de deposició (K_g) (Sudgen i Fuller, 1991). L'estudi del recanvi de proteïnes està plagat de dificultats metodològiques, sobretot pel fet que els aminoàcids són reutilitzats dins i fora dels diversos pools d'aminoàcids i proteïnes. Així, la reincorporació d'aminoàcids derivats de la degradació de proteïnes intracel·lulars pot conduir a una subestimació de la K_D . Paral·lelament, la degradació preferencial de proteïnes recent sintetitzades pot donar una minusvaloració de la K_S . (Sudgen i Fuller, 1991)

La K_s in vitro es determina per la incorporació (activitat específica) d'aminoàcids marcats isotòpicament. Els aminoàcids escollits són la fenilalanina, la tirosina o la leucina, en tant que són essencials, i, per tant, escassament metabolitzables (Williams et al, 1981). La velocitat de degradació, K_d , in vitro, es calcula mesurant l'alliberament de fenilalanina, tirosina o leucina en presència de cicloheximida (per a prevenir la reincorporació dels aminoàcids a proteïna); o emprant $K_g - K_s = K_d$ i calculant K_g com a Δ proteïna muscular / temps (Palmer et al, 1985). Cap d'aquests mètodes proveeix informació sobre la taxa de degradació d'una proteïna concreta, a no ser que emprem la pèrdua d'activitats enzimàtiques en proteïnes de vida mitja curta (per exemple, les involucrades en el metabolisme de poliamines) com a índex (Chua et al., 1979). La degradació de proteïnes miofibril·lars es pot mesurar a partir de l'alliberament de 3-metil-histidina, la qual és present a l'actina i miosina dels músculs esquelètics de contracció ràpida (però no en els de contracció lenta o cor). (Young et al., 1978). Els problemes per a la determinació del recanvi in vitro provenen del fet que els músculs incubats ténen una taxa de degradació augmentada respecte de la situació in vivo, donan un balanç nitrogenat negatiu. (Palmer et al, 1985).

In vivo, la mesura de la K_s s'obté per administració d'aminoàcids marcats isotòpicament marcats, ja a flux constant i petit, ja amb una sola dosi i gran. En ambdós mètodes cal determinar l'activitat específica al plasma en el curs de l'experiment fins arribar a un estadi estacionari. (Jepson et al. 1986; Melville et al., 1989). Els problemes deriven de la dificultat de garantir l'equilibri isotòpic en els teixits, de l'alteració de la síntesi que representa l'administració d'una dosi gran d'aminoàcid ramificat (l'ús d'aminoàcids diferents pot donar K_s diferents), o de l'alteració de la síntesi que pugui representar la canulació de l'animal en la mesura per infusió constant (Obled et al., 1989; Preddy i Garlick, 1988). La K_d global in vivo encara presenta més problemes metodològics: en una primera aproximació hom la pot calcular emprant $K_g - K_s = K_d$. Ara bé, això és cert si K_s roman constant en el període de mesura de K_g , però els canvis en K_g es produeixen en termes de dies, mentre que els canvis en K_s , en minuts, (Wardlow et al., 1978). Un segon mètode n'és la mesura de la

pèrdua de marcatge isotòpic (^{14}C leucina o fenilalanina) de proteïnes prèviament marcades, en el qual cal corregir la reutilització d'aminoàcids emprant un segon marcatge (^3H) (Wardlow et al., 1978). Un tercer mètode, el qual implica la cateterització i la infusió constant de marcatge (^{14}C -fenilalanina), permet de calcular K_s i K_d a partir de l'activitat específica de marcatge en sang arterial i venosa . Aquest mètode no permet de corregir la reutilització d'aminoàcids , a més dels problemes derivats de la cateterització (Barret et al., 1987). En rates i humans, però no en altres espècies (Murray et al, 1985), és especialment útil la utilització dels nivells urinaris de 3-metil-histidina com a mesura de la K_d de múscul esquelètic (Young et al. 1978), tot i que el ràpid recanvi del 'pool de 3-metil-histidina en teixits com la pell o l'intestí pot donar K_d musculars desproporcionades (Emery et al. 1986)

La regulació del recanvi proteic in vivo és encara en l'estadi fenomenològic. La seva comprensió depèn de la comprensió dels mecanismes de regulació de la degradació de proteïnes, bàsicament per no estan prou establerts els mecanismes enzimàtics que la governen . (Sudgen i Fuller,1991)

En aquest sentit s'han descrit dos tipus de vies: la via lisosomal és portada a terme per unes proteases funcionals a pH àcid qua estan situades a l'interior dels lissosomes: les cathepsines. La velocitat d'internalització de proteïnes i de externalització d'aminoàcids en serien els factors limitants (Barrett et al. 1980). la via no lisosomal (important al múscul) empra, per contra, proteïnes solubles, sovint unides a membrana cel.lular. Un grup força interessant en serien les calpaines (actives a pH neutre i depenents de calci), sens dubte per què permeten lligar un missatge fisiològic (els nivells de calci) amb el metabolisme proteic (Kawashima, 1988).

1.3.2 Regulació del recanvi de proteïnes

La insulina juga un paper fonamental en la regulació del recanvi de proteïnes, incrementa la síntesi i disminueix la degradació, en sinèrgia amb altres factors :

Les hormones tiroidees incrementen la síntesi a nivell del recanvi de RNA. La hormona del creixement incrementa la síntesi. Els aminoàcids, especialment la leucina, i altres metabolits com la glucosa i cossos cetònics: semblen incrementar la velocitat de síntesi i disminuir-ne la degradació, d'una manera indirecta (estimulant la secreció d'hormones com la insulina), tot i que la leucina sembla tenir efectes directes sobre l'increment de la síntesi. (Sudgen i Fuller 1991).

Glucocorticoides

Les concentracions de glucocorticoides s'incrementen en estats insulino deficients, és més hi ha qui postula que en són la causa de l'aparició de la resistència a la insulina (Odedra et al., 1982). Això ha fet postular que els efectes dels glucocorticoides, són indirectes a través dels que exerceixen sobre la insulina. De totes maneres, estudis sobre músculs esquelètics, in vitro, demostren una participació directa en la inhibició de la síntesi de proteïnes. (Mc Grath i Goldspink., 1982), resultats que estan força d'acord amb l'observat in vivo per altres autors (Kelly i Goldspink, 1982). Aquests efectes inhibitoris de la síntesi de proteïnes són més acusats en músculs de contracció ràpida que no pas en els de contracció lenta o el cor.(Rannels et al., 1980). Un pool especialment sensible a l'inhibició de la síntesi pels glucocorticoides és el de proteïnes miofibril.lars.(Odedra et al., 1983)

Pel que fa a la degradació en el múscul, sembla que els seus efectes són transitoris estimulant inicialment la degradació miofibril.lar, i només observables a altes dosis (Sudgen i Fuller, 1991).

Els glucorticoides poden afectar de manera diferent segons el teixit diana. Així, mentre que provoquen atrofia en el múscul esquelètic, ténen un efecte anabòlic en el cor (Kelly et al. 1982)

Insulina

Donat el paper central que se l'atribueix a la insulina en el control del recanvi de proteïnes donarem una breu pinzellada del que es coneix en aquest camp. La majoria dels estudis han demostrat que

tractaments aguts d'insulina inhibeixen la degradació de proteïnes in vitro, mentre que n'estimulen la síntesi, a múscul esquelètic i cardíac incubats sota condicions basals i amb glucosa com a nutrient. En aquestes condicions les respostes màximes es donen a concentracions fisiològiques de l'hormona (Sudgen i Fuller, 1991). L'estimulació de la síntesi sembla que opera a nivell del complex d'iniciació de la cadena peptídica, tot i incrementant l'eficiència en la traducció pel rRNA (Kimball i Jefersson, 1988). No està clar, però, si l'estimulació és uniforme (Sudgen i Fuller, 1991). El mecanisme pel qual la insulina inhibeix la degradació in vitro no està clar: al cor sembla ser per un descens en la formació d'autofagosomes (Sudgen i Fuller, 1991).

L'estudi de la degradació de les miofibril·laes (emprant com a índex els nivells de 3-metil-histidina urinària) sembla no ser inhibida per la insulina, tot i que el tema és encara controvertit (Smith et al, 1983). Donat que la degradació global sí sembla inhibida, el fet que això no sigui cert per les miofibril·laes, seria un reflex de diferents rutes de degradació per les proteïnes miofibril·lars i les no miofibril·lars.

Els estats de deficiència insulínica, dejuni i diabetis, són una font important de dades sobre el mecanisme d'acció de la insulina en el recanvi de proteïnes, tot i que el marc metabòlic és força complex.

Els resultats, tant in vitro (Sudgen i Fuller, 1991) com in vivo, semblen indicar una inhibició de la síntesi en el dejuni (Preddy et al., 1988) com en la diabetis (Sudgen i Fuller, 1991). Els músculs de contracció ràpida (plantaris i gastrocnemius) són afectats en més mesura que els de contracció lenta (soleus). (Sudgen i Fuller, 1991)

A la diabetis, la inhibició és mediada per una disminució en el nivell d'eficiència en la traducció del RNA, via inhibició en la formació del complex d'iniciació (la qual és alleugerida per adició d'insulina) en combinació amb un descens en la concentració de RNA per mg de proteïna. (Sudgen i Fuller, 1991)

Al dejuni, és un descens en la concentració de RNA per mg de proteïna el responsable directe de la inhibició (Preddy et al., 1988).

Pel que fa a la degradació es redueix in vitro en ambdúes situacions. L'efecte és força clar en etapes de creixement :. Al cor la taxa de degradació global és disminuïda en menor mesura en rates dejunades, mentre què pel cas de la diabetis es veu incrementada . Aquest increment sembla associat amb una disminució en la latència dels enzims lisosomals .(Sudgen i Fuller, 1991)

Hi ha menys acord amb els efectes de la deficiència insulínica sobre la taxa de degradació en el múscul in vivo. Aquesta inconsistència potser és deguda a diferències en l'edat o en la severitat del desordre (Sudgen i Fuller, 1991)

Un pool proteic especialment degradat en situacions deficientes en insulina és el dels ribosomes musculars. Així, malgrat haver-hi petits canvis en la taxa global de degradació, la pèrdua de ribosomes minvarà significativament la capacitat de síntesi. (Sudgen i Fuller, 1991)

En conclusió, en el recanvi de proteïnes la insulina intervé estimulant la taxa de síntesi i inhibint la de degradació in vitro. Hi han bones evidències de que una deficiència insulínica n'inhibeix la síntesi in vivo.

1.3.3.Efectes de la dieta sobre el recanvi de proteïna.

a) Estat absortiu

La síntesi de proteïnes i l'oxidació d'aminoàcids en animal sencer varien sensiblement en una situació prandial. Les variacions degudes a l'ingesta, de la síntesi de proteïnes en animal sencer, són tant grans que han d'involucrar a tots els teixits: augmenta molt al principi i va disminuint paulatinament en l'interval de 24h (Waterlow., 1984).

En aquest sentit en dietes riques en proteïnes, s'ha observat un increment de l'absorció intestinal tant pels transportadors depenents de gradient de sodi (transport d'aminoàcids neutres) com en el cas del transport independent del gradient de sodi (Wolfram i Scharrer,

1984). Aquest fet justifica l'increment dels nivells plasmàtics d'aminoàcids observats després de l'ingesta.

També, com a conseqüència d'aquesta hiperaminoacidèmia, i per un increment en l'eficiència del transport (s'estimula el sistema A que apareix en el dejuni, així com els preexistents ASC i L), s'incrementa l'absorció hepàtica dels aminoàcids. Alhora aquest increment absortiu es reforça per un increment del metabolisme hepàtic (Fafournox et al., 1982).

Quant a la degradació, els resultats són contradictoris: alguns autors la consideren constant en tot el període, altres consideren que augmenta paulatinament a partir d'un mínim (situació oposada a la síntesi). Com a resultat d'això el balanç nitrogenat té dues fases oposades: positiu a l'inici i negatiu al final, sense que sembli justificat pensar que el ritme circadià afecti al recanvi de proteïna (Waterlow, 1984).

b) Qualitat de la dieta:

Existeix un llindar d'ingesta proteïca, per sota del qual la síntesi decau, però per damunt del qual no hi han masses variacions. Aquest sostre està relacionat amb el requeriment basal de proteïnes. La síntesi proteïca s'adapta ràpidament a l'alteració en la dieta (1-2 dies en rates obesas són suficients perquè s'estabilitzi la nova velocitat de síntesi si es canvia de dieta) (Waterlow, 1984).

Si la quantitat de proteïna ingerida es manté constant, hi han poques variacions en la taxa de síntesi en animal sencer (fins i tot per individus obesos) per molt que en rebaixem les calories. Per contra, si l'ingesta proteïca és deficient, la síntesi cau en baixar el contingut energètic de la dieta (Waterlow, 1984).

Malgrat que s'ha trobat una relació entre els fluxs d'oxigen i nitrogen en animal sencer i teixits, el recanvi de proteïna no pot explicar més que una petita part de la taxa metabòlica basal, o dels canvis en la taxa metabòlica (Waterlow, 1984).

1.3.4. Degradació miofibril·lar: Sistemes proteolítics implicats.

Els estudis que intentin justificar variacions en el contingut de proteïna muscular hauran de tenir en compte el recanvi de la fracció majoritària, és a dir de la fracció miofibril·lar. Les característiques essencials d'aquest són:

El recanvi de les miofibres esdevé en la seva superfície: quan s'usen aminoàcids marcats radioactivament, la radioactivitat solament apareix a la superfície de les miofibres (Morkin 1970). Aproximadament el 5% de la proteïna miofibril·lar en rata és en forma de filaments fàcilment alliberables amb l'us de solucions relaxants que contenen ATP. Estudis que empren marcatge isotòpic amb pulsos de ^3H -Leucina, suggereixen que aquests filaments s'alliberen principalment de la superfície de la miofibra (Van der Westhuyzen 1981).

Un dels canvis estructurals més ràpidament observables en músculs denervats (Cullen 1979) distròfics (Cullen 1982) o altres patologies musculars (Otsuka 1985) és la pèrdua del disc-Z, total o parcial "streaming". Aquest sembla que és el primer pas en el recanvi metabòlic de la proteïna miofibril·lar.

La degradació de les proteïnes miofibril·lars és selectiva, l'actina i la miosina resten intactes en les proteïnes miofibril·lars analitzades amb SDS-PAGE de miofibres procedents de músculs en estat de ràpida atrofia (Obinata 1981). Les diferents proteïnes miofibril·lars tenen diferents velocitats de recanvi (Wolitsky 1984).

Per últim, la velocitat de recanvi de proteïna muscular (a aminoàcids lliures) s'incrementa en incubar músculs amb ionòfors pel calci o amb elevades concentracions de calci (Zeeman 1985).

Les característiques de la maquinària enzimàtica responsable de la degradació miofibril·lar hauran de ser compatibles amb aquests fets. Veiem-ne els trets fonamentals dels enzims proteolítics candidats a tenir aquest paper.

Una primera classificació dels enzims proteolítics els agrupen en dues famílies: Endopeptidases (proteïnases), quan es fa referència als grups funcionals claus del centre actiu (serin proteïnases, cisteïn proteïnases, aspàrtic proteïnases o metal·loproteïnases) (Barrett et al,

1986) . Exopeptidases, si es fa referència al seu substrat: (aminopeptidases, carboxipeptidases, tripeptidases...). Aquesta divisió no és excloent, ja que la majoria de les exopeptidases són metal.loproteïnases (Donald i Barrett, 1986). Per altra banda la degradació de proteïnes intracel.lulars ha de ser un procés altament regulat i no massa conegut.

Malgrat no es pugui negar a les proteases lisosomals un paper en la degradació intracel.lular de proteïnes (Goldeberg i St. John, 1976), hi una gran quantitat d'estudis que demostren que altres proteases no-lisosomals també hi estan involucrades. (Zeeman et al., 1985)

Goll et al (1989), proposen la següent classificació per a les proteases intracel.lulars, tot i agrupant-les en tres rutes proteolítiques trobades a partir de l'us de diferents inhibidors:

Sistema lisosomal: inclou les cathepsines., peptidases actives a pH àcid localitzades dins el lisosoma , inactives en l'exterior (Reeves et al., 1981). S'els atribueix un paper de degradació massiva de les proteïnes internalitzades, però no en les etapes inicials de la degradació de miofibril.les.

Sistema eliminador d'errors: Actiu a pH 7,5-8 estudiat fonamentalment en reticulocits i consumeix ATP en la degradació selectiva de proteïnes anormals. (Goldberg et al. 1978). Inclou el sistema degradatiu mediat per Ubiquitina (Tanaka et al. 1983, Pickart and Rose, 1985)

Sistema Caixa Negra:

Inclou els sistemes proteolítics, la funció dels quals encara són motiu de discussió: el sistema independent d'ubiquitina depenent d'hidrólisi d'ATP (macropain) (Waxman et al. 1987), el sistema sistema independent d'ubiquitina depenent de conjugació del substrat amb ATP (Waxman et al. 1987), i el sistema calpaïna (Busch et al. , 1972).

Existeix tot un seguit d'arguments, segons els quals les cathepsines no estarien involucrades en els primers passos de la degradació de les proteïnes miofibril.lars, tot i que sí tenen un paper decisiu en la

transformació dels filaments , prèviament alliberats de les miofibrilles i parcialment degradats, a aminoàcids (Gerard i Schneider, 1979). Entre ells, el fet que inhibidors específics per a les cathepsines no prevenen una atròfia muscular ràpida (Wildenthal et al. 1980), n'és un dels més conculents.

Pel que fa a les proteases alcalines, tot i que són presents a homogenats de múscul esquelètic, estudis immunohistoquímics no les han localitzades a les cèl.lules musculars, sinò als mastocits presents al teixits musculars.(Kuo et al., 1981). Estudis semblants no han reeixit tampoc en detectar nivells apreciables de serin proteases actives a pH neutres en cèl.lules musculars (Kay 1985). Els sistemes degradatius estimulats per ATP,els quals precisen de substrats conjugats amb ubiquitina s'han trobat als reticulocits, i homogenats de fetge i de múscul (Fagan 1987), però no han estat immunolocalitzats a cèl.lules musculars.

Analitzant els sistemes presents a l'interior de cèl.lules musculars, el sistema macropàina (Proteasa dependent d'ATP i de substrats ubiquitinatzats) s'ha mostrat actiu en presència de Leupeptina o E-64 (potents inhibidors de cistein-proteases, els quals prevenen l'atròfia muscular). Un altre candidat, l'anomenat proteasoma o proteasa multicatalítica, te una activitat proteolítica molt petita vers les proteïnes sarcoplasmàtiques sinò és estimulat amb SDS o lípids (Tanaka et al. 1986). Fins a la data no s'ha demostrat convincentment que les proteïnes miofibril.lars en siguin substrats.

Per eliminació, el únic sistema que sembla tenir unes característiques que encaixin amb els esdeveniments de la degradació miofibril.lar, és el Sistema Calpàina. És el únic sistema proteolític en el qual coincideix què inhibidors específics de la seva activitat, també inhibeixen la atròfia en músculs denervats. Per altra banda, explica la connexió d'un 2on missatger en la transducció del senyal hormonal, el calci, amb la degradació de proteïnes, la qual cosa ja hem esmentat que ha estat experimentalment demostrat No s'ha determinat si aquests primers esdeveniments són o no limitants de la velocitat de degradació de la proteïna miofibril.lar. Si fos així la quantificació de les activitats d'aquest sistema en seria un bon índex.

1.3.5. Paper de l'alanina en les relacions entre el metabolisme energètic i nitrogenat.

L'alanina és un dels més importants substrats gluconeogènics al fetge. El seu catabolisme, no solament implica la formació de glucosa, sino que transfereix nitrogen amínic a urea. Una bona aproximació a l'estudi de les relacions entre el metabolisme energètic i el nitrogenat, ha estat establir les relacions entre la gluconeogènesi i la ureogènesi, la qual cosa s'ha fet en presència de lactat i piruvat com a substrats gluconeogènics, i d'amoni com a urogènic (Casado et al., 1987). És prou establert que, a altes taxes d'urogènesi es requereix un precursor gluconeogènic per tal de mantenir una concentració intracel·lular suficient d'aspartat per tal de garantir el funcionament del cicle de la urea (Waterlow., 1984).

Recentment s'ha observat que l'addició d'amoni accelera la formació tant de glucosa com d'urea. Conclusions que es desprenen del fet que, en aquestes condicions, la producció de lactat i piruvat s'incrementa notablement, s'estimula la respiració i els quocients redox Lactat / Piruvat i 3Hidroxibutirat/ Acetoacetat son desplaçats cap als estats més oxidats. (Cohen et al., 1982). Una interpretació recent (Bohnensack i Fritz, 1991), implicaria l'increment en els nivells d'amoni en l'estimulació de la urogènesi tot i accelerant la desaminació de l'alanina per tal d'incrementar la formació de piruvat, lactat, i glucosa. La càrrega energètica resultant de la urogenesi i de la gluconeogenesi desplaça els sistema de NAD, tant mitocondrial com citosòlic, cap estats oxidats, la qual cosa en modifica les taxes de flux, mostra de l'alt grau de cooperativitat d'ambdúes vies metabòliques (Cuezva et al, 1986; Fritz i Bohnensack, 1988)

El lligam entre ambdúes vies pot entendre's millor si pensem que l'alanina pot transaminar-se a piruvat, al temps que el cetoglutarat ho fa a glutamat de manera que, en situacions d'elevats nivells d'amoni, es garantirien els nivells de glutamat necessaris per la ureogènesi via glutamina sintasa (també activada)(Häussinger., 1990). Aquesta via d'aport d'amoni al cicle de la urea suplementaria la ordinària i poc eficient entrada directa d'amoni al cicle. Per altra banda la transaminació de l'alanina a l'oxoglutarat per a rendir piruvat i

aspartat, també garantirien els nivells d'aquest per a mantenir la urogènesi en situacions de altes concentracions d'amoni. La activació de la ureogènesi, efecte primari de l'increment de l'amoni, té dos conseqüències que condueixen a un increment en els nivells de piruvat i, per tant del flux a través de la gluconeogenesi: per un costat el catabolisme de la alanina és activat ja que el nitrogen pot ser eliminat per la argininosuccinat sintetasa. Per un altre, la càrrega energètica s'incrementa tot i portant l'estat redox mitocondrial i citosòlic dels sistemes NAD cap els estats més oxidats. L'últim efecte activa el catabolisme de la alanina degut a un increment del flux a través de la glutamat deshidrogenasa. (Bohnensack i Fritz, 1991)

Les situacions de deficiència insulínica semblen modificar el metabolisme intrahepàtic d'alanina, incrementant l'extracció fraccional d'alanina del llit esplàncic, així com la seva incorporació a glucosa, com en el cas de la rata gestant (Pastor-Anglada et al. 1987), on a més s'esdevé un descens de la urogènesi i el recanvi d'alanina, la seva extracció hepàtica i la seva degradació semblen estar incrementades (Pastor-Anglada et al. 1988).

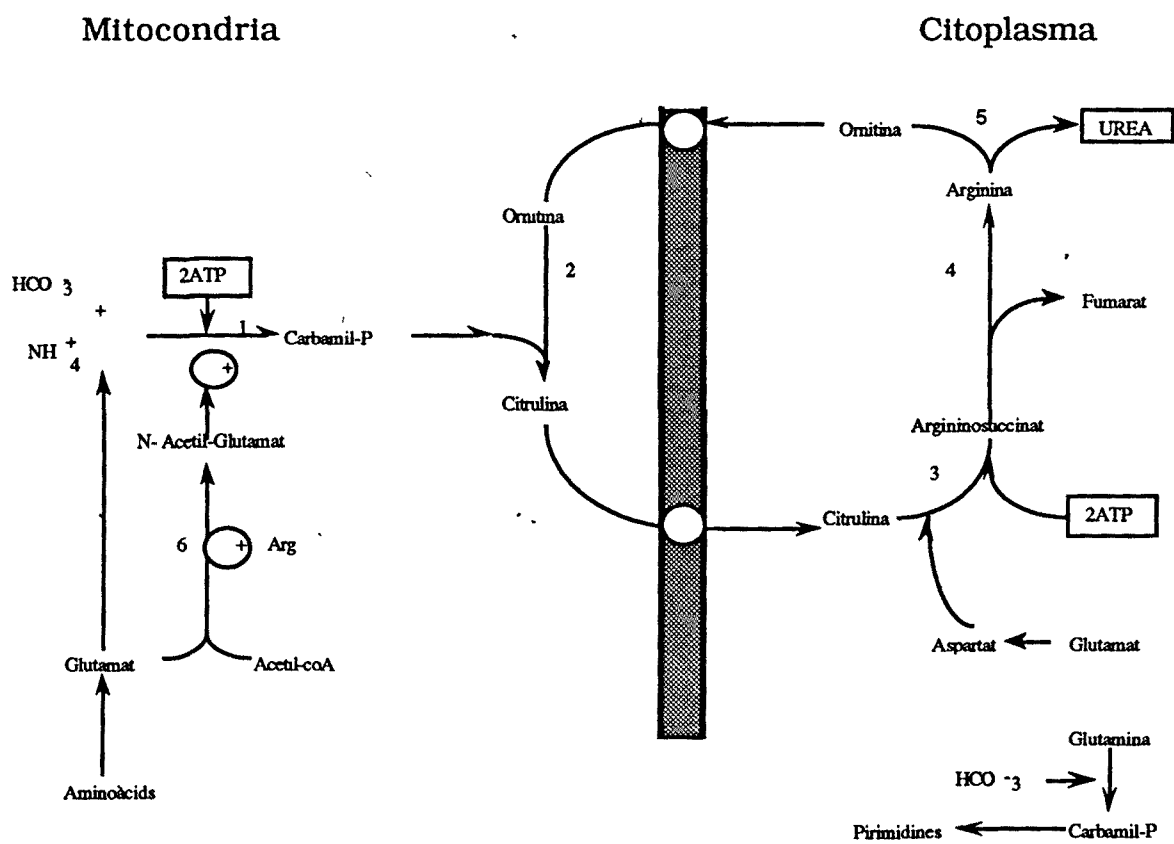


Figura 1. Representació esquemàtica del cicle de l'urea i la seva compartimentació cel·lular en un hepatocit periportal.

1, Carbamil-fosfat sintetasa I; 2, Ornitina Transcarbamilasa; 3, Argininosuccinat sintetasa; 4, Argininosuccinat liasa; 5, Arginasa.; 6, N-acetil-glutamat sintetasa.

1.3. Metabolisme nitrogenat a l'obesitat.

Els primers estudis en aquest camp es centraren en els efectes del dejuni en obesos. Mostraren que els obesos en situació de dejuni tenien elevats els nivells plasmàtics d'aminoàcids ramificats i aromàtics (Adibi , 1968) i que els nivells d'aquests aminoàcids es correlacionava amb el grau d'hiperinsulinèmia que s'aconseguia (Felig et al, 1969). Tot això suggeria que la hiperaminoacidèmia estava relacionada amb la resistència a la insulina. Ademés indicava un desajust en el recanvi de proteïnes en tant que aquest increment en la concentració d'aminoàcids essencials solament podia succeir per un augment en la taxa de proteolisis o un descens en la taxa de desaparició del plasma.

En el cas d'estudis amb humans, nombrosos estudis indiquen que les velocitats de proteolisi en individu total (Nair et al., 1987), (Welle i Nair, 1990),(Welle i Nair, 1990), (Jensen i Haymond, 1991) o de síntesi de proteïnes (Nair et al., 1987),(Welle i Nair, 1990), (Bruce et al., 1990) són superiors en obesos que en subjectes prims, mentre que d'altres no corroboren aquests fets (Nair et al., 1987), (Bruce et al., 1990), (Caballero i Wurtman, 1991). Aquestes taxes es donen relatives a la massa magra dels individus, L.B.M, calculada a partir de la densitat corporal o emprant el contingut en aigua corporal, mesures que inclouen elements extracel.lulars en el còmput. Emprant el comptatge de 40K com a índex de la massa intracel.lular total, i assumint aquesta com a proporcional al L.B.M., es troba un lleuger increment en aquesta mesura. (Welle et al., 1992). D'altra banda, en el mateix estudi, el recanvi de proteïnes s'incrementa com a conseqüència d'un increment superior de la taxa de síntesi que la de degradació de proteïnes. Aquest increment en el recanvi no està justificat pel pobre creixement en L.B.M.. Això junt amb una correlació significativa entre adipositat i recanvi de proteïnes, la qual no és tant clara quan s'empren només els individus obesos de l'estudi, fa que els autors especulin sobre un paper pel teixit adipós en el recanvi de proteïnes en individu sencer (Welle et al., 1992).

En ratolins genèticament obesos (ob/ob) , els músculs de les extremitats inferiors són menors que els dels seus respectius controls (+/?). (Bergen et al., 1975). El pes de la seva carcassa, lliure de greixos, comença a ser inferior en els obesos a partir de la cinquena setmana d'edat.(Trostler et al., 1992). Correlacionat amb això, s'han trobat velocitats de degradació , mesurades com a excreció de 3-metil-histidina, incrementades, mentre que la taxa de síntesi, mesurada a partir de l'acumulació de 3-MH en la carcassa i la taxa de degradació, no es veia incrementada. (Trostler et al., 1992). El fet que les activitats de proteases alcalines es trobessin incrementades en músculs de ratolins (ob/ob) (Trostler et al., 1982), fou esgrimit com a explicació dels resultats anteriors, tot i que aquesta activitat no sigui originada en el interior de la cèl.lula muscular. (Goll et al., 1989). Els nivells sanguinis d'aminoàcids no estan variats en aquests ratolins obesos respecte dels prims, però la distribució entre els pools plasmàtic i intracel.lular és alterat en el sentit que s'incrementen els nivells d'aminoàcids en el plasma, a costa d'una reducció del pool intracel.lular (Serra et al, 1991).

En obesitats generades per lesió hipotalàmica, cries de rata Wistar a les quals se'ls administra diàriament una injecció subcutània de 4mg/kg de glutamat monosòdic, mostren en arribar a adults un increment en adipositat i en lípids circulants, tot i que són hipofàgics. El pes corporal, tissular, i el seu contingut en proteïnes són menors en aquests animals que en els respectius controls. Els nivells d'urea circulants són superiors, mentre que el nitrogen i la urea excretada són inferiors. La síntesi d'urea en hepatocits isolats, i les activitats dels enzims del cicle de la urea són menors o iguals, considerant el pes del fetge, que pels controls. (Bertrán et al., 1992). Els resultats, pel que fa al cicle de la urea són inversos fins arribar a les quatre setmanes, concluint-se que , fins el deslletament, les rates tractades amb glutamat monosòdic acceleren el consum de proteïnes per a produir greix, reduint el contingut tissular en proteïnes. En arribar a un llindar, en edat adulta, el procés s'atura i s'estabilitza.(Bertrán et al., 1992). Analitzant la resistència a la insulina dels diferents tipus de múscles, en aquests tipus de lesions, els músculs glicolítics són els

que primer la manifesten, mentre que els oxidatius només la manifesten en etapes molt avançades.(Pénicaud i Ferré, 1988).

Els animals genèticament obesos (soca zucker *fa/fa*), presenten un patró metabòlic oposat a l'estalvi de nitrogen, donat que la seva hiperfàgia els proporciona un excés de nitrogen procedent de l'ingesta, el qual, en part, és eliminat incrementant l'excreció urinària d'urea (Esteve et al., 1992). Tot i que ténen una disponibilitat hepàtica d'amoni semblant a les primes, la captació d'amoni pel fetge és disminuïda, resultant en un excés d'amoni plasmàtic (Herrero et al., 1994). A més el fetge de les rates obeses presenta una extraordinària eficiència en la captació d'aminoàcids neutres, en mostrar incrementats els valors de $V_{m\acute{a}x}$ de les cinètiques dels cotransportadors depenents de Na^+ , A, ASC i (N. Ruíz et al, 1991). Això pot concordar amb el fet que els nivells sanguinis dels diversos aminoàcids no estan variats en la rata obesa, ni en la seva distribució entre els pools plasmàtic i intracel.lular, però en el dejuni s'observa respecte de les primes un descens superior en els nivells plasmàtics dels aminoàcids neutres. (Serra et al, 1993).

Estudis de balanç de nitrogen palesen que, quan s'ofereix la mateixa quantitat de proteïna a la dieta a les primes (FA/FA) que a les obeses (*fa/fa*), les últimes tendeixen a depositar els esquelets carbonats dels aminoàcids en forma de greix més que no pas en forma de proteïna muscular, tot i que retenen la mateixa quantitat de nitrogen (Dunn i Hatsook, 1980). Això concorda amb els primers estudis sobre la elevada eficiència energètica d'aquest tipus d'obesitat.(Young, 1977), i amb altres estudis de balanços nitrogenats segons els quals la quantitat d'aminoàcids ingerits que ni són depositats a proteïnes ni són excretats, és superior en la rata obesa que en la prima.(Rafecas et al, 1993)

Malgrat que la deposició de proteïna en la rata obesa (*fa/fa*), és normal fins els 34 dies d'edat, la rata obesa adulta deposita menys nitrogen en el múscul i més en altres òrgans, en relació als controls. (Triscari et al., 1977). Tot i així, mentre que la rata prima disminueixen la seva taxa d'incorporació d'aminoàcids a proteïnes a partir de 45 dies, aquest fet no es produeix en la rata obesa, ni en arribar als 60 dies

d'edat (Rafecas et al. 1993). Els seus músculs són més petits i contenen menys proteïna, DNA, RNA (Cleary i Vasselli, 1981), (Schonfeld et al., 1974), (Lanza-Jacobi i Kaplan, 1984). La massa magra és menor en les obeses adultes (Pullar i Webster., 1974), tot i mostrant una reduïda taxa de deposició de proteïnes, malgrat que la proteïna ingerida és superior (Dunn i Hatsook, 1980), i una taxa de síntesi de proteïna minvada al múscul esquelètic, però no a la carcassa, la qual cosa ja és evident en el moment del deslletament. (Reeds et al., 1982). Aquests resultats semblen discrepar dels trobats per altres autors donat que, quan la rata fa/fa ha estat alimentada amb dieta normoproteica, tenen la mateixa quantitat de proteïna corporal (Radcliffe i Webster, 1979) i una massa magra incrementada (Rafecas et al., 1994).

Per altra banda els nivells de 3-metil-histidina en orina són més elevats en la rata obesa respecte de la prima, la qual cosa suggereix una major taxa de degradació proteica. (Dunn i Hatsook, 1980).

Pel que fa a les rates primes amb obesitat induïda amb dieta de cafeteria, el seu metabolisme nitrogenat es modifica en el sentit de l'estalvi de nitrogen, en tant que redueixen l'excreció urinària d'urea, fruit d'una capacitat disminuïda per a la seva síntesi en el fetge (Barber et al., 1985), ténen nivells inferiors d'urea plasmàtica (Salvadó i Arola, 1994) i una menor activitat en els enzims claus del catabolisme d'aminoàcids (Salvadó et al., 1986).

El cicle glucosa-alanina és inhibit a nivell de formació de glucosa a partir d'alanina en fetge (Gianotti et al., 1990). D'aquesta manera, tot i que no es modifica l'aportació d'amoni procedent de l'intestí, la disponibilitat hepàtica d'amoni és incrementada, probablement per una major aportació de teixits perifèrics (múscul, teixit adipós). Donat que no varia la captació hepàtica d'amoni, el resultat és una elevació en els nivells d'amoni sanguini. (Herrero et al., 1994). A més les rates que s'han fet obeses mitjançant una dieta de cafeteria, tot i que no presenten diferències substancials en els nivells sanguinis d'aminoàcids, la distribució entre els pools intracel·lular i plasmàtic està alterada, en tant que els nivells d'aminoàcids intracel·lulars estan disminuïts en comparació al que esdevé en les rates primes. Aquesta

situació es manté un cop es reverteix el tractament dietari (Picó et al., 1991), probablement a causa d'una alteració en la capacitat de captació dels transportadors d'aminoàcids en els eritrocits de les rates sotmeses a dieta de cafeteria (Picó et al., 1992).

Per altra banda presenten una major capacitat d'extracció del nitrogen procedent de la dieta (Rafecas et al., 1992) i una major eficiència en el metabolisme del nitrogen: increment en l'activitat aspartat transaminasa hepàtica, i major capacitat de síntesi de glutamina i alanina en múscul i intestí. Adaptacions que es conserven malgrat es suspenguí el tractament dietari (Serra et al., 1991).

En rates sotmeses a 50 dies de dieta de cafeteria, després del deslletament, s'observa un increment en els nivells absoluts d'aminoàcids circulants, respecte dels respectius controls. Per teixits, s'aprecia una hipertròfia en teixit adipós, fetge, ronyons i cor, en termes absoluts. En relativitzar-ho respecte del pes de l'animal tots aquests valors es normalitzen, excepte el teixit adipós, el qual resta hipertròfic, i el cor que proporcionalment és més petit.(Prats et al., 1986).

En general tots els teixits ténen una concentració més elevada de proteïnes, excepte el fetge i el teixit adipós, el qual en té una concentració significativament menor (Prats et al., 1986).En el múscul de la cama aquest increment en la concentració de proteïnes es correlaciona amb una disminució del contingut relatiu d'aigua.(Prats et al., 1986) i amb una taxa de síntesi incrementada en gastrocnemius i tibialis com la trobada en rates alimentades amb dietes hiperlipídiques (Estornell et al, 1994). A més tots els teixits mostren una concentració superior de lípids (Prats et al., 1986). Mentre que, en rates primes, la resposta al dejuni és el consum de glicogen, en el cas de les alimentades amb dieta de cafeteria, es consumeix preferentment lípids i proteïnes.(Prats et al., 1986) (Hill i DiGirolamo., 1991).

1.5 Bibliografia

- Adibi S.A. *J. Appl. Physiol.* (1968), 25 : 52-57
- Alemaný M. *Prog. Food Nutr. Sci.* (1989), 13: 45-66.
- Amri E., Dani C., Doglio A., Etienne J., Grimaldi P., Ailhaud G. *Biochem. J.* (1986), 238 : 115-122.
- Andrews J, Kashiwagi A, Verso MU, Vasquez B, Howard BV, Foley JE. *Int Obesity* (1984); 8: 355-363
- Anguita R.M. Siguiem D.M., Sawaya A.L. *J. Nutr.* (1993), 123: 1421-1428.
- Argilés J.M. *Prog. Lipid Res.* (1989), 28 : 53-66
- Aubert R., Suquet J.P., Lemmonier D. *J. Nutr.* (1979), 110: 649-661.
- Baker N, Schotz MC. *J Lipid Res* (1967); 8: 646-660
- Barber T, Viña J.R., Viña J., Cabo J. *Biochem. J.* (1985), 230 : 675-685
- Barker P.J.P., Winter P.D., Osmond C. *Lancet* . (1989), 11: 577-580.
- Barret A., Kirschke H. *Methods in Enzimology* (1980), : 80
- Barret E., Revkin J. H., Young L.H., Zaret B. L., Jacob R., Gelfand. R. A. *Biochem. J.*(1987), 245: 223-228
- Barrett A.J. Mc Donald J.K. *Academic Pres New York* (1986), Vol 1 :
- Bazin R., Lavau M. *J. Lipid Res.* (1982), 23: 839-849.
- Beck B., Burlet A., Bazin R., *J. Nutr.* (1993), 123: 1168-1172.
- Belko AZ, Barbieri TF, Wong EC. *Am J Clin Nutr* (1986); 863-869
- Bergen W.G., Kaplan M.L., Merkel R.A. *Am. J. Clin Nutr.* (1975), 28
157-161
- Bernardis LL., Bellinger LL. *Neurosci. Behav. Rev.* (1993), 17: 141-193.

Bertrán M.A., Estornell E., Barber T., Cabo J. *Int. J. Obesity* (1992), 16 : 555-564

Bohnensack, R. and Fritz, S. *Biochim. Biophys. Acta* (1991), 1073 : 347-356.

Bouchard C. *Am. J. Clin. Nutr.* (1991), 53 : 1561S-5S

Bouchard C. *Obesity: basic concepts and clinical aspects*, Belfiore F. Jeanrenaud B, Papalia D. Eds. *Front Diabetes*. Basel, Karger (1992), 11 : 26-36

Bouchard C., Tremblay A. Després J.P., *N. Eng. J. Med.* (1990), 322:1477-1482.

Bray G.A. *Ann. Int. Med.* (1991), 115:152-153.

Bray G.A., *Gallagher Medicine*. (1975), 54:301-330.

Bray G.A., York D.A. *Physiol. Rev.* (1979), 59: 719-809.

Bray GA. *Am. J Clin Nutr* (1970); 23: 1141-1148

Brind J., Strain G., Miller L., Zumoff B., Vogelman J., Orentreich N. *Int. J.Obesity*. (1990, 14: 483-487.

Briquet-Laugier V., Quignard-Boulangé A., Dugail I., *Proc. Eur. Cong. Obesity*. (1992), pp.95-99.

Brook C.G.D. *Lancet* (1972), 11: 624-627.

Brown M, Fisher L.A., *Fed. Proc.* (1985),44: 243-248.

Bruce A.C., McNurlan M.A., McHardy K.C. *Int. J. Obes.* (1990), 14 631-646

Busch W.A., Stromer M.H., Goll D?E., Suzuki A. *J. Cell. Biol.* (1972), 52 : 367

Caballero B., Wurtman R.J. *Metabolism* (1991), 40 : 51-58 †

Cairella M. Obesity: basic concepts and clinical aspects, Belfiore F. Jeanrenaud B, Papalia D. Eds. Front Diabetes. Basel, Karger (1992), 11 : 211-214

Casado J., Remesar X., Pastor-Anglada M. Biochem. J. (1987), 248 : 117-122.

Cleary M.P., Vaselli J. R. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1981), 167 : 616-623

Cleary M.P., Zisk J.F., Int. J. Obesity. (1986), 10: 3-8.

Cohen, N.S., Cheung C-W., Kyan, F.S., Jones, C.E., and Rajjman, L. J. Biol. Chem (1982), 257 : 6898-6907.

Cohen, N.S., Kyan, F.S., Cheung, C-W and Rajjman, L. Biochem. J. (1985), 229 : 205-211.

Cousin B. Agou K., Leturque A. Eur. J. Physiol.(1992), 207:377-382.

Cuezva JM., Valcarce C, Chamorro M., Alanine and lactate as gluconeogenic substrates during late gestation Fed. Eur. Biochem. Soc (1986), 194 : 219-225

Cullen M.J., Appleyard S.T., Bindoff L. Ann. N.Y. Acad. Sci. (1979), 317 : 440

Cullen M.J., Fulthorpe J.J. J. Pathol. (1982), 138 : 129

Cunnane S.C., McAdoo K.R.,Horrobin D. Br. J. Nutr. (1986): 87-95.

Cunningham J., Calles J., Eisikowitz L., Zawalich W., Felig P. Diabetes (1983), 32 : 1023.

Chan Ch., Stern J.S. Am. J. Physiol. (1982), 242 : E445-E450

Chascione C, Elwyn DH, Davila M, Gil K.M, Askanazi J, Kinney J.M. Am. J. Physiol (1987); 253: E664-E669

Chee K.M., Romsos D.R., Bergen W.G., Leveille G.A. J.Nutr. (1981), 11 : 58-67

Chikamori R, Fukushima Y, Yamashita H, Sato K, Nishimura N. Mori N. Int J Obesity (1983); 7: 563-567

Chua B., Kao R. L., Rannels D.E., Morgan H.E. J. Biol Chem (1979), 254: 6617-6623

D'Alessio DA, Kavie EC, Mozolli M.A., Smalley K.J., Polansky M., Kendrick Z.V., Owen L.R., Bushman M.C., Boden G., Owen O.E. J Clin Invest (1988); 81: 1781-1788

Dallman V.M., Akana S.F., Jacobson L., Levine N., Cascio C.S., Skinsako J. Ann. NY Acad. Sci (1987), 512: 402-406

Davidson M.B., Garvey D. AM. J. Physiol. (1993), 264 Endocrinol. metabol. 27 : E18-E23

Deb S, Martin R.J., Hershberger TV. J Nutr (1976); 108: 181-197

Dugail I, Quignard-Boulangé A. Bazin R. Biochem. J. (1988), 254: 483-487.

Dunn M.A., Hartsook E.M., J. Nutr. (1980), 110 : 1865-1879

Eckel R.H. Lancet (1992), 340: 1452-1453.

Emery P.W., Cotellesa L., Holness M., Egan C., Rennie M.J. Biosci Rep. (1986), 6: 143-153.

Estornell E., Barber T., Cabo J. Br. J. Nutr. (1994), 72 : 509-517

Fafournoux, Rémésy, Demigné Biochem J. (1982), 206 : 13-18

Fagan J.M., Waxman L, Goldberg A.L. Biochem. Journal (1987), 243 : 335

Faust IM. Johnson P.R., Hirsch J. Am. J. Physiol. (1976), 231: 538-544.

Faust IM. Johnson P.R., Hirsch J. Science. (1977), 197: 393-396.

Felig P. Metabolism. (1973); 22: 179-207

- Felig P., Marliss E., Cahill G.F. N. Engl. J. Med (1969), 281 : 811-816
- Fisler JS, Drenick EJ. Annu Rev Nutr (1987); 7: 465-484
- Frieder B., Grimm V.E. Int. J. Neurosci. (1984), 23 : 117-126
- Frieder B., Grimm V.E. J. Neurochem. (1987), 48 : 1359-1365
- Friedman MI. In: Malnutrition : determinants and consequences. New York: Alan R Liss, (1984): 295-303
- Fritz, S. and Bohnensack, R. Biomed . Biochim. Acta (1988), 47 : 923-932
- Fuller S.J, Sudgen P.H.. FEBS Lett. (1989), 247 : 209-212
- Garrow JS. In : Obesity and related diseases. Edinburgh: Churchill Livingstone. (1988): 1-19
- Gerard K.W., Schneider D.L. J. Biol. Chem. (1979), 254 : 11798
- Gianotti M., Roca P., Pons A., Palou A. Biochem. Int. (1990), 20 2 : 353-361.
- Gibbs J, Smith GP. Fed Proc (1986); 45: 1381-1395
- Girardier L. In: Girardier L, Stock, M.J. eds. Mammalian Thermogenesis. London: Chapman & Hall, (1983): 50-98.
- Girardier L. in: Mammalian Thermogenesis (Girardier L and Stock M.J. eds), Chapman and Hall. London (1985), : 50.
- Godbole V., York D.A., Bloxham D.P. Diabetologia (1978), 15 : 41-44
- Godfrey K.M., Barker D.J. P, Peace J. Br. Med. J. (1993). 307:405-409.
- Goldberg A.L., Kowit J., Etlinger J., Klemes Y. Protein recanvi and lysosomal function . H.L. Segal and D.J. Doyle Eds. (1978), Academic pres N.Y. : 171-196
- Goldeberg A.L. and St John A.C.. Annu. Rev. Biochem. (1976), 45 : 747.

Goll D.E., Kleese W.C., Szpacenko A. in: Animal Growth Regulation, edited by D.R. Campion, G.J. Huasman and R.J. Martin. Plenum Pres, New York (1989), : pp. 141-182

Hales C.N., Barker DJP, Clark PMS. Br. Med. J., (1991), 301:10(19-1022).

Haupt H.A., Rovere G.D. Am. J. Sports Med.(1984), 12: 469-474.

Haüssinger D. Biochem. J. (1990), 267 : 281-290

Herrero M.C., Anglés N., Remesar X., Arola Ll., Bladé C. Int. J. Obes. (1994), 18 : 255-261.

Hetherington A.W., Ranson, S.W. Anat. Rec. (1940), 78 : 149-172.

Hill J.O., DiGirolamo M. Life sciences (1991), 49 : 1907-1914.

Hollenber Ch. H. Int. J. Obes. (1990), 14 3 : 135-152

Iglesias R., Andrés V., Castellà J., Alemany M. Nut. Rep. Int. (1986), 34 : 229-236.

Ingbar Sh, Woeber K.A. In Williams RH., ed. Textbook of endocrinology. Philadelphia: Saunders, (1981): 117-247.

Inoue S, Bray CA. Life Sci (1979); 25: 561-566

Inoue S., Bray G.A., Mullen YS. Am. J. Physiol., (1978), 235: E266-E271.

Jeanrenaud B. Rec. Adv. Obesity Res. (1978), 2 : 111-122.

Jeanrenaud B. Metabolism. (1978), 27. Suppl. 2.: 1181-1192.

Jeanrenaud B., Rohner-Jeanrenaud F, Cousin I. Int. J. Obesity. (1992), 16: S9-S12.

Jensen MD, Haymond M.W. Am. J. Clin. Nutr. (1991), 53 : 172-176

Jepson M.M., Pell J.M., Bates P.C., Millward D.J. Biochem J. (1986), 235: 329-336.

Johnson P.R., Greenwood M.R.C., Horwitz B.A., Stern J.S. *Annu. Rev. Nutr.* (1991), 11 : 325-353.

Jones A.P., Simson E.L., Friedman M.I. *J. Nutr.*(1984), 114: 1484-1492.

Kaplan M.L. *Metabolism* (1979), 28 : 1147-1151

Kawashima S., Hayashi M., Saito Y., Kasai Y., Imahori K. *Biochimica et Biophysica acta* (1988), 965 : 130-135

Kay J., Heath R., Dahlmann B., Kuehn L., Stauber W.T. *Intracellular protein catabolism* .Khairallah, Bond and Bird Eds. (1985), Allan R. Liss N.Y. : 195-205

Kelly F.J., Goldspink D.F., *Biochem J.* (1982), 208: 147-151.

Kimball S.R., Jefferson L. S. *Diabetes Metab. Res.* (1988), 4 : 773-787

King B.M., Zansier C.A., Richard S.M. *Physiol. Behav.* (1992), 51:1207-1212.

Kral JG. *Surg Clin North Am* (1979); 59: 1131-1138

Krief S., Bazin R. *Genetic obesity* (1991), : 528-538

Krief S., Bazin R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1991), 198: 528-538.

Kuo T., Giacomelli F., Kithier K., Malhotra A. *J. Mol. Cell Cardiol.* (1981), 13 : 1035

Langley S.C, York D.A. *Am. J. Physiol.*(1990), 259:R539-R544.

Lanza-Jacoby S., Kaplan M.C. *Int. J. Obes.* (1984), 8 : 451-456

Lardy H., Shrafo E. *Annu Rev. Biochem.* (1990), 59 : 689-710

Leibel R.L., Hirsch J., AppleB.E., Checani G.C. *Am. J. Clin. Nutr.* (1992), 55: 350-355.

Leibowitz S.F., Weiss G.F., Shor-Posner C..*Int J Obesity* (1987), 11. Suppl.3: 109-123

Leiter LA. *Can. J. Physiol. Pharmacol* (1986); 64: 814-817

Leyton J. Drury P.J., Crawford M.A., *Br. J. Nutr.* (1987), 57:383-393.

Liddle G.W., in *William's Textboock of endocrinology*. J.D. Wilson & D.W. Foster, eds. Saunders, Philadelphia. (1985) p242.

Lladó I., Proenza A.M., Serra F., Palou A., Pons A. *Int. J. Obesity* (1991), 15 : 415-419

Ma, Nadeau, Foster *Canadian Journal of Physiology and pharmacology* (1987), 65 8 : 1802-1804

Malabu U.H., Cotton S.J., Kruzynska Y.T. *Life Sci.* (1993), 52:1407-1416.

Margules DL, Moisset B, Lewis MJ, Shibuya H, Pert CB. *Science* (1978); 202: 988-981

Marliss EB, Aoki TT, Pozefsky T, Most AS, Cahill GF. *Clin Invest* (1971); 50: 814-818

Mc Donald J.K. and Barrett A.J. *Academic Pres New York*. (1986), Vol. 2 :

McGrath J.A., Goldspink D.F. *Biochem J.* (1982), 206: 641-645.

McKibbin P.E., Cotton SJ, McMillan S. *Diabetes* (1991), 40: 318-323.

Melville S., McNurlan MA., McHardy K.C., Broom J., Milne E., Calder A. G., Garlick P.J. *Metabolism*. (1989), 38: 248-255.

Meyer J, Thomas D.W. *Science*. (1967); 156: 328-337

Modan M, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eshkol A, Shefi M, Shitrit A, Fuchs Z. *J Clin Invest* (1985); 75: 809-817

Mordes JP Herrera MG, Silen W. *Proc Soc Exp Biol Med* (1977); 156: 2S7-260

Morkin. E., *Science* (1970), 167 : 140

Morley JB. *Endocrine Rev* (1987); 8: 256-287

Murray A. J., Nield M. K, Jones L.M.,Galbraith N., Tomas F.M. *Biochem J.* (1985): 232, 409-413.

Nagy K., Levy J., Grunberger G. *Acta endocrinol.* (1990), 122 3 : 361-368.

Nair K.S., Garrow J.S., Ford C. *Diabetologia* (1983), 25 : 400-403

Nair K.S., Halliday D., Ford G.C. *Int. J. Obes.* (1987), 11 : 537-544

National Center For Health Statistics. DHHS, Washington DC. USPHS (1991), Public. No (PHS)81-1317 Ser 1:15 :

Obinata T., Maruyama K., Sugita H., Kohama K., Ebashi S. *Muscle nerve* (1981), 4 : 456

Obled C., Barre F., Millward D.J. Arnal M. *Am J. Physiol.*(1989), 257, E639-E649

Odedra B.R., Bates P.C., Millward D.J. *Biochem. J.* (1983), 214: 617-627.

Odedra B.R., Dalal S.S., Millward D.J. *Biochem J.*, (1982), 202: 363-368.

Okada S., York D.A., Bray A.G. *Am. J. Physiol.* (1992), 262: R1106-R1110.

Okumura Y. Kita H. *Diabetologia.* (1981), 20:290-298.

Olefsky JM. *Diabetes* (1981); 30: 148-162.

Olney. J.W. *J. Neuropathol. Exp Neurol.* (1971), 30 : 75-90

Olney. J.W., Ho O.L. *Nature* (1970), 227 : 609-611

Otsuka Y., Goll D.E. *J. Biol. Chem.* (1987), 262 : 5839

Palmer R. M, Bain P. A. Reeds P. J. *Biochem J.*(1985) , 230: 117-123

- Pastor-Anglada M., Champigny O., Ferre P Biol. Neonate (1988), 54 : 126-132
- Pastor-Anglada M., Remesar X., Bourdel G. Am. J. Physiol. (1987), 252 : E408-E413
- Pedersen O., Kahn CR., Kahn BB. J. Clin. Inves. (1992), 89: 1964-1973.
- Pénicaud L., Ferré P. The Journal of Obesity (1988), 7 2 : 91-107
- Pepin MC, Pothier, Barden N. Nature. (1992), 355: 725-728.
- Pettitt D.J., Nelson R.G., Saad M.F., Diabetes Care (1993), 16: 310-314.
- Pickart C.M. and Rose I.A. J. Biol. Chem. (1985), 260 : 7903
- Picó C., Pons A., Palou A. Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. (1991), 99 : 345-348
- Picó C., Pons A., Palou A. Biochem Int. (1992), 23 3 : 509-517
- Porte D., Woods S.C. Diabetologia (1981); 20: 274-280
- Powers PS. In : Obesity the regulation of weight. Baltimore: Williams & Wilkins: (1980); 3
- Powers PS. Obesity. Baltimore: Williams & Wilkins, (1980): 27-42
- Powley TL., Opsahl C.A., Cox J.E., Weingarten HP., In Morgan & Panksepp eds. Handbook of the hypothalamus. Vol. 3. New York: Dekker. (1980).
- Prats E., Monfar M., Argilés J.M., Alemany M. J. Obes. Weight Reg. (1986), 5 2 : 77-88.
- Prats E., Monfar M., Castellà J, Iglesias R., Alemany M., Biochem Int. (1987), 14 1 : 95-101.
- Prats E., Monfar M., Castellà R., Iglesias R., Alemany M. Physiol. & Behavior (1989), 45 : 263-272

- Preedy V. R. Garlick P.J. *Biochem J.* (1988),251: 577-580
- Preedy V. R., Paska L.,Sudgen P.H., Schofield P. S., Sudgen M. S. *Biochem. J.* (1988), 250 : 179-188
- Proenza A.M., Lladó I., Serra F., Picó C., Pons A., Palou A. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* (1992), 100 : 147-154
- Proietto J., Thorburn A.W. *Baillière's Clin Endocrinol. Metab.* (1994), 8,3: 509-525.
- ProiettoJ. In Colagiuri. Heding. Kuhl. Ma. Mortimer, Cameron Eds. *Non-insulin dependent diabetes.* Elsevier, Amsterdam. (1989), pp.85-90.
- Puigcerver., Lladó I., Palou A., Gianotti M. *Biochem J.* (1991), 279 : 575-579
- Pullar J.D., Webster A. J. F. *Br. J. Nutr* (1974), 31 : 377-392
- Radcliffe J.D., Webster J.F. *Br. J. Nutr.* (1979), 41 : 111-124
- Rafecas I., Esteve M., Fernández-López A., Remesar X., Alemany M. *Mol. Cell. Biochem.* (1993), 121 : 45-58
- Rafecas I., Esteve M., Fernández-López J.A., Remesar X., Alemany M. *Nutr. Res.* (1994), 14 7 : 1077-1088
- Rafecas I., Esteve M., Ramesar X., Alemany M. *Biochemistry International* (1992), 26 4 : 687-694
- Rannels S.R., Jefferson L.S. *Am.J. Physiol.* (1980), 238: E564-E572.
- Ravelli GP., Stein ZA., Susser MW.. *N. Eng. J. Med.*(1976), 295:349-353.
- Ravussin E., Swinburn B.A., *Lancet.* (1992), 340: 404-408.
- Reeds P. J., Haggarty P., Whale K. W. J., Fletcher J. M. *Biochem.J.* (1982), 204 : 393-398

Reeves J.P., Decker R.S., Crie J.S., Wildenthal K. Proc. Natl. Acad. Sci. (1981), 82 : 7545

Remesar X. Fernández-López J.A., Alemany M. Med. Res. Rev. (1993), 13, 5: 623-631.

Riva P., Alboni S., Bonati M., Bellini M., Del Rio G., Zironi F., Ceccarelli G., Bonati B. Obesity: basic concepts and clinical aspects, Belfiore F. Jeanrenaud B, Papalia D. Eds. Front Diabetes. Basel, Karger (1992), 11 : 95-109

Rolls B.J., Rowe E.A. Physiol. Behav. (1982), 28 : 393-400

Rothwell N., Stock M.J. Int. J. Obesity (1987), 11: 319-324

Rothwell N.J., Neurosci Biobehav. Rev. (1990), 14: 263-270.

Rothwell N.J., Stock M.J in Brown Adipose Tissue (1986), Eds Trayhurn Nichols : 269-298

Rothwell N.J., Stock M.J. Br. J. Nutr. (1982), 47 : 461-471

Rothwell N.J., Stock M.J. Nature (1979), 281 : 31-35

Rothwell N.J., Saville M.E., J. Nutr. (1982), 112: 1515-1524.

Ruiz B., Felipe A., Casado J., Pastor-Anglada M. Biochem. J. (1991), 280 : 367-372

Saito M., Bray G.A. Am. J. Physiol. (1984), 248: E20-E25

Salvado J., Arola Ll. Revista Española de Fisiología (1994), 50 2 : 117-124

Salvado J., Arola Ll., Alemany M. Biochem Int. (1986), 13 1 : 115-121

Sanacora G., Kershaw M., Finkelstein J.A., White J.D. Endocrinology. (1990), 127: 730-737.

Sclafani A.A., Springer D. Physiol. Behav. (1976), 17 : 461-471.

Schonfeld G., Felski C., Howald M.A. J. Lipid. Res. (1974), 15 : 457-464

Schwartz K., Jaeger LF, Silberstein S, Veith R.C. Int J Obesity (1987); 1: 141-149

Serra F., Gianotti M., Palou A., Pons A. Biochem. Int. (1991), 24 4 : 769-776.

Serra F., Gianotti M., Palou M., Pons A. Biochem. Int (1991), 24 4 : 769-776

Serra F., Johnston J., Carnie J., Palou A. Biochem. Biophys. Acta (1991), 1097 : 289-292

Serra F., Picó C., Johnston J., Carnie J., Palou A. Biochem. Molec. Biol. Int. (1993), 29 3 : 483-491

Shepherd P.R., Gnudi L., Tozzo E. Exp. Clin. Endocrinology. (1993).101:212-213.

Simopoulos A.P. Nutr. Rev. (1985); 43: 33-40

Smith O. L .K., Wong C. Y., Gelfand R. A. Diabetes (1989), 38 : 1117-1122

Spitz I.M.,Bardin M.D., N. Eng. J. Med. (1986), 329: 404-412.

Stanley B.G., Kyrkouli S.E., Lampert S., Leibowitz S.F.(1986) Peptides: 1189-1192.

Stock M., Rothwell N. In: Obesity and leanness. Basic aspects. London : John Libbey, (1982): 76-87.

Stolz D.J., Martin R.J. J. Nutr. (1982), 112 : 977-1002

Stunkard A. J, Sørensen T. A, Hanis C, Teasdale TW. , Chakrabarty R, Schull YJ, Schulsinger F. N Engl J Med. (1986); 314: 183-199

Sudgen P.H., Fuller S.J. Biochem. J. (1991), 273 : 21-27

Sutherland P.L., Watts C. K., Clarke C. L. In: Hormons and their actions. Cooke, King, van der Molen, eds. Elsevier Amsterdam (1988), 88: p. 197

Tanaka K., Li K., Ichihara A., Waxman L., Goldberg A.L. J. Biol. Chem. (1986), 261 : 15197

Tanaka K., Waxman L., Goldberg A.L. J. Cell. Biol. (1983), 96 : 1580

Triscari J., Greenwood M.C.R., Sullivan A. Fed. Proc. (1977), 36 : 1150

Trostler N., Amin R., Shafrir E. Int. J. Obesity (1982), 6 : 557-566

Trostler N., Romsos D. R., Bergen W. G., Leveille G.A. Metabolism (1979), 28 9 : 928-933

Truswell AS. Br Med J (1982); 285: 1519-1520

Vague J., Vague P., Jubelin J., Barré A. In: Fat distribution during growth and later health outcomes. Alan Liss, New York. (1988), p. 9.

Van der Westhuyzen. D.R., Matsumoto K., Etlinger J.D. J. Biol. Chem. (1981), 256 : 11791

Vaselli J.R., Fiene J.A., Maggio C.A., Am.J. Physiol. (1992), 262:R33-R38.

Vertes V. In: Conn HL, DeFelice EA, Kuo P, eds. Health and Obesity. New York: Raven Pres. (1983); 131-140.

Vinsant G, Den Besten C, Weststrate J, Deurenberg P. Int J Obesity (1988); 12: 133-140

Vohr B.R., Lipsitt L.P., Oh W. J. Pedriat. (1980). 87: 196-199.

Wahlqvist M.L., Marks S. Sugars and nutrition Gracey M., Kretchmer N., Rossi E. eds. Nestlé Nutrition Workshop Series (1991), 25 : 179-196

Walker H.C., Romsos D.R. Am. J. Physiol. (1993), 264: E226-E230.

Waterlow J.C. Quarterly Journal of Experimental physiology (1984), 69 : 409-438

Waxman L., Fagan J.M., Goldberg A.L. J. Biol.Chem. (1987), 262 : 11994

Weiner JS. In: The natural history of man. New York: Anchor Pres/Doubleday (1973): 143-197

Welle S, Lilavivat U, Campbell RG. Metabolism (1981); 30: 953-958

Welle S., Barnard R.r., Statt M., Amatruda J.M. Metabolism (1992), 41 9 : 1028-1034

Welle S., Nair K.S. Am. J. Physiol. (1990), 258 : E990-E998

West D.S., Boozer C.N., Moody D.L., Atkinson R.L. Am. J. Physiol. (1992), 262:R1025-R1032.

Wildenthal K., Wakeland J.R., Ord J.M., Stull J.T. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1980), 96 : 793

Wilding J.P, Gilbey S.G., Jones P.M., Peptides (1992) 13: 557-563.

Williams G., Shellard L., Lewis D.E. Peptides (1992) 13: 537-540.

Williams I.H., Sudgeen P.H., Morgan H.E?, m. J. Physiol., (1981), 240, E677-E681.

Wisén O , Rössner S, Johansson C. Digest. Dis Sci. (1987); 32: 968-972.

Wolfram S., Scharrer E. Plügers archiv (1984), 400 : 34-39

Wolitsky B.A., Hudecki M.S., Segal H.L. Biochim. Biophys. Acta (1984), 803 : 106

Woods S.C., Lotter E.C., McKay L.D., Porte D. Jr. Nature (1979) 282: 503-505.

Woods S.C., West DB, Stein LJ, McKay LD, Lotter K, Porte SG, Kenney NJ , Porte D. Diabetologia.(1981); 20: 305 313

Yost T.J., Eckel R.H. J. Clin. Endocrinol. Metab. (1988), 67: 259-264.

Young J.B., Landsberg L. J. Clin. Invest. (1980), 65: 1086-1094.

Young J.B., MacDonald I.A., Int. J. Obesity (1992), 16: 959-967.

Young V. R. Munro H. N. Proc. Fed . Am. Soc. Exp. Biol. (1978) , 37:
2291-2300

Young V.R. Cancer Res. (1977), 37 : 2336-2347

Yukimura Y., Bray G.A. Endocrine Res. Comm. (1978), 5: 189-198.

Zeeman R.J., Kameyama T., Matsumoto K., Bernstein P., Etlinger J.D.
J. Biol. Chem. (1985), 260 : 13619

Zucker T.F., Zucker L.M. J. Hered. (1961), 52 : 275-278.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

2. Objectius i Desenvolupament experimental

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

2 OBJECTIUS I DESENVOLUPAMENT EXPERIMENTAL.

2.1 Presentació

Les disfuncions que l'obesitat genera en el metabolisme nitrogenat han estat poc estudiades. El nostre grup al Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, porta una trajectòria ampla en la recerca d'aquest aspecte, emprant models d'obesitat genètica i nutricional.

L'interés que desperta la caracterització de les alteracions en el metabolisme nitrogenat que genera l'obesitat és múltiple:

- 1.- El coneixement en profunditat de les relacions entre els metabolismes energètic i nitrogenat, justifica per ell mateix aquests tipus d'estudis.
- 2.- La caracterització de les patologies que poden representar aquestes alteracions per elles mateixes.
- 3.- La variació que introdueixen en el risc i morbiditat de malalties associades a l'obesitat (malalties cardiovasculars, hipertensió...).
- 4.- Els diferents mètodes d'aprimament poden interactuar amb el metabolisme nitrogenat, metabolisme que la pròpia situació fisiopatològica de l'obesitat ja ha alterat, i posar en perill alguna funció important.

Cal esmentar aquí que la definició d'obesitat és difícil. Tot i que hom entén per obès aquell individu amb un sobrepes anormal, la seva etiologia és múltiple. És per això que cal centrar-se en models concrets d'obesitat i ésser conscients de la dificultat, quan no impossibilitat, d'extrapolar els efectes en ells observats a d'altres models. Més quan, les alteracions en el metabolisme nitrogenat, poden no ser causa primària, sinó conseqüència, del desenvolupament dels diferents tipus d'obesitat.

En aquest sentit nosaltres hem escollit per l'estudi uns models que creiem força representatius de la síndrome que esdevé majoritàriament

en humans. Per un costat individus prims que en la seva maduresa sexual adquireixen un sobrepes anormal a causa d'una hiperfàgia voluntària "no estressant", bulímica, la qual presenta un creixement del teixit adipós generalment no hiperplàsic. Per un altre aquells individus que desenvolupen sobrepes per causes genètiques. En rata, la soca Zucker permet comparar aquests dos tipus d'anomalies, en tant que presenta dos fenotipus bàsics: el prim i l'obès.

Els models experimentals animals que s'han emprat en aquesta tesi han estat:

1.- El model d'obesitat genètica escollit ha estat el de la rata Zucker (fa/fa), un model força caracteritzat, i del que hi han força antecedents en estudis relacionats amb el camp del nostre interès. S'escollí la edat en la qual hi ha més ample consens en els resultats d'estudis precedents sobre metabolisme de proteïnes.

2.- El de "dieta de Cafeteria" sobre rata zucker prima (Fa/?) com a model d'obesitat adquirida nutricionalment. Consistia en oferr, juntament amb el pinso habitual, un excés d'aliments àltament saborosos i variats, asequibles en qualsevol supermercat, que la rata ingeria a voluntat. Aquest model ha estat força criticat per certs autors, adduïnt-hi manca de reproducibilitat, a causa de la impossibilitat d'assegurar una constància en la composició de l'oferta dietària. Diversos treballs, però, han mostrat que la rata selecciona la ingesta de manera que la seva composició resta constant. El nombre d'estudis que s'han realitzat amb aquest model ja és en l'actualitat prou gran com per poder assegurar que és força contrastat. L'inici del tractament, s'escollí després de l'alletament, per tal de garantir una màxima similitud a la obesitat desenvolupada en humans adults.

2.2. Objectius i desenvolupament experimental.

Canvis en el recanvi d'alanina a causa de les obesitats genètica i nutricional.

Resultats anteriors mostraven estratègies oposades en el procesament dels substrats nitrogenats, en especial dels aminoàcids, segons el tipus d'obesitat: Tant els nivells de metabolits com la maquinària enzimàtica estudiada fins el moment indicaven que en l'obesitat nutricional es

produeix un l'estalvi de nitrogen paral·lel a l'increment de pes, mentre que en l'obesitat genètica es balafia el nitrogen.

La determinació de la variació de la importància relativa de les vies catabòliques vers les anabòliques en els aminoàcids, per efecte dels dos tipus d'obesitat abans esmentats, podria ajudar a la comprensió d'aquest fenomen. Per tal d'assolir el primer objectiu s'empraren perfusions arterials d'alanina isotòpicament marcada en l'esquelet carbonat. L'alanina és un aminoàcid cruïlla entre les rutes del metabolisme energètic i nitrogenat. Extraccions de sang venosa a diferents temps permeten establir la velocitat total de recanvi de l'aminoàcid en el animal sencer com a suma de la velocitat de recanvi degut al catabolisme de la cadena carbonada i de la deguda al seu anabolisme. El mètode ha estat validat per Golden et al. (1981).

Efectes de l'obesitat genètica i nutricional sobre el contingut de proteïna muscular. Caracterització bioquímica i estructural

Donat que els resultats obtinguts en l'estudi anterior, suggereixen alteracions importants, segons el tipus d'obesitat, en la fracció de recanvi d'alanina atribuïble a les rutes anabòliques, hom podia pensar en alteracions en el recanvi de proteïnes en aquestes situacions. Un dels teixits cabdals en el metabolisme de proteïnes és el múscul., de manera que els esforços subsequents es centraren en:

1. Ampliar la informació sobre les alteracions que l'obesitat podia causar en el contingut de proteïna muscular.
- 2.-Caracteritzar possibles canvis estructurals de les miofibres, i en el metabolisme muscular, a través de l'anàlisi de la maquinària enzimàtica de les vies bàsiques del catabolisme energètic i del metabolisme contractil, causats per ambdós models d'obesitat.

En el disseny experimental hom tingué en compte que els músculs esquelètics presenten diferents capacitats metabòliques en funció de la seva composició fibril·lar. És per això que s'escolliren per al seu estudi diferents músculs individuals amb la intenció d'abastar el màxim de possibilitats pel que fa al per fil fibril·lar. També es tingué en compte en la seva elecció, la facilitat d'extracció individualitzada. Habitualment

s'escolliren el soleus (múscul amb predomini de fibres de contracció lenta de metabolisme energètic oxidatiu), el tibialis (amb predomini de fibres de contracció ràpida i amb metabolisme energètic glicolític) i el gastrocnemius (múscul amb predomini de fibres de contracció ràpida i amb metabolisme energètic mixte, glicolític i oxidatiu). El cor també s'estudià en tant que les alteracions en aquest òrgan implica conseqüències greus per l'animal.

Es determinà la massa i el contingut de proteïnes dels diferents músculs en ambdúes situacions fisiològiques. Paral·lelament, també se n'intentàren caracteritzar les alteracions en les capacitats d'obtenció d'energia i la seva velocitat contràctil. Amb aquesta finalitat s'estudiaren les variacions en les activitats lactat deshidrogenasa (LDH) indicador de la seva capacitat glucolítica; adenosin quinasa (AK), de la seva velocitat de contracció; creatina quinasa (CK), de la capacitat de magatzematge d'energia; succinat deshidrogenasa (SDH), de la capacitat oxidativa a nivell de substrats del cicle de Krebs; i β -oxoacil-CoA deshidrogenasa (β -OAC), de la capacitat oxidativa a nivell de β -oxidació.

Al mateix temps, i donat que situacions on hi ha variacions en el metabolisme energètic muscular, s'han observat també alteracions estructurals importants, com és el cas de la fatiga o la diabetis, es feren preparacions per a microscopia electrònica dels músculs abans esmentats amb la intenció de verificar si això també esdevenia en l'obesitat. Els resultats indicaven una major desestructuració de les miofibres lligada amb increments en les capacitats oxidatives, per efecte d'ambdós tipus d'obesitat. Donat que això no es corresponia amb variacions en el mateix sentit en el contingut en proteïnes, es suggeria possibles comportaments diferenciats en el recanvi proteic, segons el tipus d'obesitat. Tema aquest força controvertit en la bibliografia estudiada.

Activitats enzimàtiques del sistema calpaïna en músculs individuals de rates obesas nutricionalment i genètica.

Si es té en compte que entre el 65%-75% de la proteïna muscular correspon a la proteïna que estructura les miofibrilles, les variacions observades a l'estudi anterior en el contingut proteic eren fàcilment

atribuïbles a aquest pool proteic, i per tant a alteracions en el seu recanvi.

A l'hora d'investigar el recanvi de proteïnes s'ens presentaven diferents possibilitats:

Estudiar la síntesi de proteïnes musculars mitjançant la injecció d'un bolus d'aminoàcid marcat radioactivament (o l'infusió d'un flux conegut i petit, però constant) , i examinar-ne l'incorporació al múscul.

Per altra banda la degradació de proteïnes es pot conèixer per diferència entre el creixement muscular i la síntesi observada, o mitjançant la quantitat de tirosina alliberada per un múscul aïllat, o examinant l'eliminació urinària de 3-Metilhistidina.

3. Recentment, però, al sistema calpaïna, un sistema proteolític intracel.lular i no lisosomal depenent de calci que actua a pH neutre, se li atribueix, entre d'altres, el paper d'intervenir en les primeres etapes de desbastiment de les miofibres i és candidat clar a ser el regulador de la degradació d'aquestes.

Els mètodes aquests mètodes basats en fluxs d'amoinoàcids han generat les seves controvèrsies a l'hora d'interpretar els resultats, fins i tot resultats discrepants entre sí. A més, cap d'ells permetia l'estudi directe del recanvi miofibril.lar, ni permetia esbrinar els possibles mecanismes de les alteracions.

Ens vàrem decidir per la quantificació de les activitats del sistema calpaïna, sota la hipòtesi que n'és el regulador de la degradació miofibril.lar. Aquesta hipòtesi va ser en part comprovada contrastant els resultats dels nivells dels diferents elements del sistema proteolític amb les taxes de degradació trobades per altres grups (Garlick et al, 1989) per als músculs individuals dels animals control, que nosaltres preteníem estudiar.

Després d'uns estudis preliminars en els quals es vàren optimitzar els mètodes de separació i quantificació dels diferents components del sistema, dos enzims proteolítics i un inhibidor, es varen determinar les

seves activitats en els diferents músculs abans emprats dels obesos genètics i nutricionals.

Estudi in vitro de la degradabilitat de les miofibres musculars per calpaïnes. Efecte de l'obesitat genètica i nutricional.

El sistema calpaïna, in vivo, té una gran quantitat d'efectors. de manera que les activitats mesurades "in vitro" poden ser variades en condicions fisiològiques. Tret de moduladors allostèrics, com el pH i les concentracions locals de Ca^{2+} , de difícil avaluació a causa de l'elevat grau de compartimentació existent en el múscul, s'han observat que modificacions covalents de les proteïnes miofibril·lars, tals com l'oxidació o la fosforil·lació, varien la seva estabilitat front les calpaïnes. La mesura de la variació de la qualitat de les miofibres com a substrat de les calpaïnes, per efecte d'ambdós models d'obesitat, podia ajudar a explicar el diferent comportament observat en anteriors experiments dels diferents models d'obesitat respecte del metabolisme de proteïnes a l'obesitats. Amb aquesta finalitat, i a partir d'una metodologia ja emprada per Belcastro et al. (1991) es dissenyà el següent experiment consistent en:

- 1.- Aïllament de miofibres, lliures de calpaïnes i sistemes membranosos, procedents dels diversos músculs d'animals obesos tant nutricionalment com genètica.
- 2.- Incubació a diferents temps amb igual quantitat de calpaïna prèviament purificada per nosaltres, de les preparacions de miofibres procedents dels músculs dels diferents grups experimentals.
- 3.- Seguiment de les variacions en les bandes de SDS-PAGE de la fracció insoluble a baixes forces iòniques d'aliquotes preses a diferents temps de les anteriors incubacions de miofibres en calpaïna.

Redistribució corporal a causa d'un tractament de llarga durada amb el β_2 -agonista clenbuterol i en la seva posterior retirada en la rata.

Estudis paral·lels del nostre grup, investigaven els efectes sobre el pes corporal mediat pel tractament amb certs estimuladors adrenèrgics. Entre ells el clenbuterol, un agonista β_2 adrenèrgic, havia mostrat, en

experiments realitzats pel nostre grup i d'altres, efectes redistributius de la massa corporal, consistents en un descens de la composició en lípids i un increment en el contingut de proteïna, específicament en el múscul esquelètic.

Semblava adient investigar si l'administració de clenbuterol podia generar en rates obesas:

- 1.- Una reducció a nivell de composició lipídica corporal.
- 2.- Un increment del contingut en proteïna en el múscul, aspecte aquest interessant en tant que n'havíem comprovat una reducció com a conseqüència de l'obesitat genètica .

Un estudi preliminar aquest és el que mostrem a continuació. En ell es relacionen els efectes del clenbuterol en rates no obesas, per tal d'establir si, a nivell del que serien després el grup control:

- 1.- Les possibles diferències en els efectes entre músculs individuals, o rutes d'administració.
- 2.- Quin era el període d'administració en el qual l'efecte era màxim, segons la ruta d'administració.
- 3.- Si persistien els efectes després de la retirada del fàrmac per un període de la mateixa duració que el d'administració.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

3.- Canvis en el recanvi d'alanina a causa de les obesitats genètica i nutricional.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

3.1. INTRODUCCIÓ

L'alanina és un dels més importants substrats gluconeogènics al fetge (Balasse et al,1985; Beaton, 1957). El seu catabolisme , no solament implica la formació de glucosa, sino que transfereix nitrogen amínic a urea. Una bona aproximació a l'estudi de les relacions entre el metabolisme energètic i el nitrogenat, ha estat establir les relacions entre la gluconeogènesi i la ureogènesi, la qual cosa s'ha fet en presència de lactat i piruvat com a substrats gluconeogènics, i d'amoni com a urogènic (Bohnensack i Fritz, 1991; Casado et al., 1987;Chiasson et al., 1980; Chodrinov, 1978).

Determinar com es modifiquen els fluxos catabòlics i anabòlics de l'alanina en animal sencer per efecte dels models d'obesitat emprats, pot donar llum sobre el paper que, en aquests estats fisiològics, ténen els metabolismes energètic i nitrogenat. Aquest és l'objectiu del treball que, a continuació presentem.

Vol. 34, No 1, September 1994 BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL

Pages 67-74

CHANGES IN ALANINE TURNOVER RATE DUE TO NUTRITIONAL AND GENETIC OBESITY IN THE RAT.

Martí Yebras, Josepa Salvadó, Lluís Arola, Xavier Remesar⁺ and Teresa Segué

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain,
and ⁺ Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona Spain.

Received July 21, 1994

Summary

The changes in alanine turnover were determined in Zucker rats, which were either genetically obese (*fa/fa*) or rendered obese by dietary treatment (*cafeteria fed*). The whole body rate of alanine turnover was higher in genetically obese rats than in rats in which obesity was induced by diet (*cafeteria*). This is possibly due to variations in the rate of the amino acid incorporation into proteins, since the rate of whole body alanine degradation is the same for both groups. Thus, the different pattern followed by alanine turnover rate in these types of obese animals reflects the differences in the nitrogen economy of these animals, pointing to a higher alanine utilization in the genetically obese animals and a conservative management of alanine in the cafeteria-fed animals.

Introduction

The mechanisms leading to the obese syndrome are poorly understood, especially those that are concerned with the whole body nitrogen metabolism. The obese Zucker rat has been studied as a model of genetic obesity, which is inherited as an autosomal, recessive trait (*fa*). The main characteristics of the *fa/fa* animals are hyperphagia, hyperinsulinemia, impaired thermogenic capacity, high activity of lipoprotein lipase in white adipose tissue and a high hepatic lipogenic rate (1). The nitrogen metabolism of the Zucker rats presents unique and discrepant results, since the obese animals, although they retain the same amount of nitrogen as their lean

Abbreviations: ZL = Zucker lean rats; ZLC = Zucker lean rats fed a cafeteria diet; ZO = genetically obese Zucker rats (*fa/fa*).

Vol. 34, No 1, 1994

BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL

littermates, contribute the carbon chains of dietary amino acids into fat rather than to muscle protein (2). In fact, the skeletal muscles of these animals are smaller, contain less protein, DNA and RNA than those of their normal lean counterparts (3). The *fa/fa* rat, fed a normal protein diet, has the same amount of protein as the lean animal (4), and in spite of having a reduced protein synthetic capacity in the skeletal muscle, has a greater lean body mass (5) than non-obese littermates (6). In addition, the urinary levels of 3-methyl-histidine are higher in obese animals, which is indicative of an enhanced muscle protein breakdown.

On the other hand, it is possible to induce an increase of body weight in rats by hyperphagia, either through force-feeding or by offering the rat a highly palatable self-selected diet, such as the cafeteria diet (7). Hyperphagic rats can be used as a model of nutritional obesity, allowing a comparison between genetic and nutritional obesity. The food items selected by the rats have a common high lipidic content (7), with relative unchanged content of protein and carbohydrate (8) when compared with the reference-diet of the control rats. Constant exposure to these diets results in high grow rates (9) and fat accretion (10), with increases in energy intake and heat production through increased thermogenesis (11). In relation to nitrogen metabolism, hyperphagic rats fed with the cafeteria diet showed low plasma urea levels (9), low nitrogen excretion (12) and low activity of the enzymes of amino acid catabolism (13); these data are consistent with the conservation of whole-body nitrogen.

The comparison of these two models of obesity (genetic and nutritional) suggests a different pattern of nitrogen economy. Thus, the metabolism of the hydrocarbon skeletons of the amino acids and the amino acid turnover can be altered in both models of obesity. The aim of this study is to estimate the relative contribution of alanine catabolism and of alanine incorporation into proteins to overall alanine turnover in genetically obese rats and to compare the results with similar data obtained with lean littermates fed either the cafeteria diet (nutritional obesity) or a reference diet as a control group.

Materials and Methods

Animals and diets

Male Zucker rats lean (+/?) or obese (*fa/fa*) were obtained from Harlan Olac Ltd. stock (Bicester, UK). Upon arrival the animals were housed in pairs and kept in polypropylene cages on a bed of wood shavings under controlled conditions of light cycle (08:00-20:00h), temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity (70%). At an age of five weeks, the lean animals were placed in metabolic cages and after a short period of acclimatation (3 days) were randomly divided into two groups: a) Reference diet group (ZL), fed a standard chow pellet diet (A04 Panlab, Barcelona, Spain) or b) Cafeteria diet group (ZLC), fed a *cafeteria diet*, consisting of

Vol. 34, No 1, 1994

BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL

an offering of different palatable foods -biscuits, apple, chocolate and chocolate biscuits, cheese, foie-gras, croissant, water enriched with sucrose and chow pellet-, as described previously (9). The caloric content of the standard diet was 14.17 kJ/g and the caloric content of the *cafeteria* diet was 11,6 kJ/g. The genetic obese group (ZO) were maintained under the same conditions and were given the reference diet for the same period of time. For four weeks the body weight, caloric intake and nitrogen intake were recorded daily.

Estimation of alanine turnover

After four weeks of the dietary treatments, food was removed at 9:00 a.m. and experimental procedures were commenced 2h later. Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg body weight i.p.) and placed under a bench light to maintain body temperature at 37°C during the following surgical procedure. The animals were fitted with an indwelling polyethylene cannulae into the aortic arch (via the carotid artery) and into the cava vein (via the jugular vein) (PE10 and PE50, Becton and Dickinson, USA) which was then inserted to reach the right atrium. In order to estimate the alanine turnover and metabolic clearance rates, a primed infusion A-V technique was used (14,15). L-(2,3-3)-³H-alanine (Radiochemical Centre, Amersham, UK) was used since it permitted a suitable estimate of the irreversible loss of alanine (16). Rats were injected with 25 μCi of tritiated alanine which was perfused into the arterial catheter at the rate of 0.3 μCi/min for a total of 105 min. Venous blood samples (200μl) were obtained at different times and were deproteinized immediately with 6% (w/v) HClO₄ and centrifuged at 10000xg for 5 min and the supernatant fluid was used for the determination of the specific radioactivity of alanine. Alanine concentrations were determined enzymatically (17). Alanine was separated from other radiolabelled metabolites by ion-exchange chromatography (16) and was quantified by liquid scintillation counting.

Steady-state alanine turnover rates were calculated from the formula $R_t = I_r / SA$, where R_t is the alanine turnover rate in blood (μmol/min), I_r is the infusion rate of L-(alanine) (dpm/min) and SA is the specific radioactivity of alanine in blood (dpm/μmol). Steady-state alanine concentrations and specific activities were achieved 45 min after the start of the tracer infusion. The calculation of alanine turnover from steady-state specific radioactivity measurements allowed correction for eventual changes in the whole body tracer pool. The metabolic clearance rate at steady-state was calculated as the ratio of alanine turnover (μmol/min) and alanine blood concentration (μmol/ml) and expressed in millilitres per minute. Ion exchange chromatography showed that tritiated water was the only detectable labelled metabolite formed from alanine, which was present in blood during the time course of the infusion. Since L-alanine incorporation into proteins does not yield tritiated water, the tritiated water production was used as an index of alanine catabolism when the steady-state value of the blood alanine specific radioactivity was reached. In all cases it was noted that the rate of tritiated water accumulation in the blood was linear from 30 min onwards. The alanine catabolic rate (R_c) was calculated from the slope of the straight line representing tritiated water accumulation in blood (a , in dpm/min) and from the blood specific radioactivity at steady state (SA , in dpm/μmol). A water distribution space equivalent to 70 per cent of the body weight (V , in ml) was assumed. These values were substituted into the following formula: $R_c = V \cdot a / SA$.

Calculations and Statistics

Parallel groups of animals were used to determine the total body water content (9) and then to calculate the lean body weight using the formula: Free fatty mass = Total body water/ 0.73 (18).

The means of the three experimental groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) prior to their application to Levene's test for equality of variances. When variances were not assumed to be equal, the probability for the equality of the means were taken from the Brown-Forsythe test. Scheffe's multiple range tests followed when significant differences were found (BMDP Statistical Software Inc., USA) (19).

Results

The lean group fed the reference diet (ZL) ingested a mean of 0.54 ± 0.03 g of nitrogen per day; a similar value was obtained for nitrogen ingested (0.58 ± 0.01 g of N per day) by the cafeteria group (ZLC). A higher daily nitrogen ingestion (0.79 ± 0.05 g of N per day) was measured in the genetic obese group (ZO). The total caloric intake of the experimental groups was as follows: lean animals (ZL) = 241 ± 8 kJ/d; lean animals fed cafeteria diet (ZLC) = 322 ± 9 kJ/d and genetically obese animals (ZO) = 398 ± 15 kJ/d.

The variation in body weight of the animals is shown in Figure 1. The increase in body weight was significantly higher in both of the obese groups (ZO and ZLC) than in the lean group (ZL). After 4 weeks of dietary treatment, the cafeteria-fed rats had increased their weight 44% more than the reference fed animals ($P < 0.01$), although they ingested 29.9% more energy than the lean rats fed the reference diet ($P < 0.001$). The increase in body weight of the genetic obese

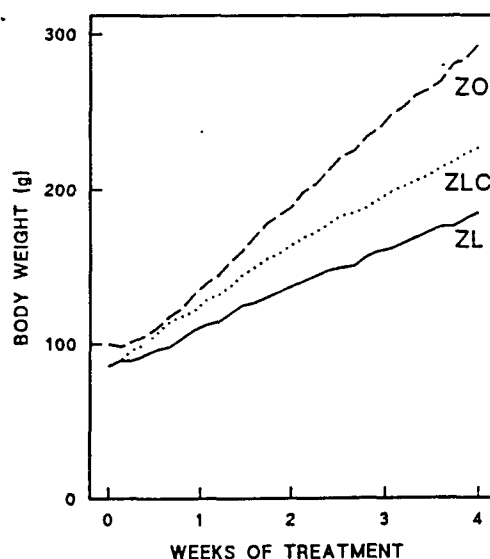


FIGURE 1. Variation of body weight of Zucker rats during the four weeks of dietary treatment. Lean rats (ZL) fed with reference diet (solid line), lean rats fed with cafeteria diet (ZLC) (dotted line) and genetically obese rats (ZO)(dashed line) fed with reference diet.

Vol. 34, No 1, 1994

BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL

Table 1

The effect of dietary-induced obesity or genetic obesity on blood alanine concentration, alanine turnover rate and alanine clearance rate.

	Lean rats receiving the:		Genetically obese rats receiving the Reference Diet (ZO)	P ⁽²⁾
	Cafeteria Diet (ZLC)	Reference Diet (ZL)		
Blood Alanine μM	456 ± 62 a	418 ± 35 a,b	319 ± 18 b	0.0372
Alanine Turnover (T) μmol/min.kg of LBM	28.71 ± 2.87 a	35.83 ± 3.91 a,b	45.92 ± 5.61 b	0.0415
Alanine Degradation (D) μmol/min.kg of LBM	15.64 ± 1.93	17.53 ± 3.02	14.83 ± 2.87	0.7663
Alanine Incorporation into proteins (I) ¹ μmol/min.kg of LBM	12.10 ± 1.18 a	17.79 ± 2.20 b	31.10 ± 4.18 c	0.0027
I/D ratio	0.75 ± 0.06 a	1.12 ± 0.19 b	2.54 ± 0.58 c	0.0252
Alanine clearance μmol/min	10.86 ± 1.96 a	13.13 ± 2.22 a	25.56 ± 2.54 b	0.0383

Values are the mean ± s.e.m. of 5-7 different animals. Alanine turnover, alanine degradation and alanine incorporation into proteins are expressed by kg of lean body mass (LBM).

¹. Rate of alanine incorporation into proteins (I) = (T) - (D)

²: Probability from one-way ANOVA

a,b,c: means with different letters are significantly different between rat groups (P < 0.05, from Scheffe's test). For further details of calculations and statistics, see the Methods section.

rats (ZO) was double that of the lean animals (ZL) and the caloric ingestion of the genetically obese animals (ZO) was 68% greater than that of the lean rats.

Table 1 shows the concentration of blood alanine, the alanine clearance rate and the values of the estimation of the alanine turnover (T), alanine degradation (D) and alanine incorporation into proteins (I) expressed per kg of lean body mass (LBM). The concentration of alanine in blood of obese animals was significantly different from that of the cafeteria-fed rats, the blood

Vol. 34, No 1, 1994

BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL

alanine levels of the reference-lean (ZL) animals was between that of the obese and the cafeteria-fed (ZLC) rats. Furthermore, the alanine turnover rate was increased in the genetic obese animals (ZO), and decreased in the cafeteria-fed animals (ZLC) relative to the reference-diet group (ZL). The alanine degradation rate was maintained at the same level in all three groups studied. The ratio of the rate of alanine incorporation into proteins relative to the rate of alanine catabolism (I/D in Table 1) was significantly higher in the genetically obese group than in both the reference-diet fed and the cafeteria-fed groups; the cafeteria I/D value was significantly lower than that of the reference-diet fed animals. It can also be seen that the alanine clearance values showed a significant increase in the genetic obese animals compared with the levels found for reference-diet fed animals.

Discussion

The pattern of growth shown by the animals coincides with the nutritional growth patterns described by Esteve *et al.* (20), with significant differences between all groups with reference to body weight at the end of the treatment. Furthermore, the alanine blood levels are at the levels expected following previous results (21).

The reduction in urea production in cafeteria-fed animals (12) is a principal metabolic mechanism for the sparing of nitrogen. This is principally achieved by decreasing the rate of alanine uptake (22) perhaps by a lowering of the V_{max} of the specific transporters of alanine in spite of its greater availability in the post-absorptive state. Thus, the final result is the minimization of the use of a principal ureogenic substrate (alanine) and the possible utilization of this substrate by other tissues. The lower rate of alanine turnover presupposes a decrease in the rates of alanine release by muscle and adipose tissue, the main tissue generators of alanine in the animal. Moreover, a decline in the protein turnover rate is supported by the decrease in the rate of alanine incorporation into proteins in cafeteria fed rats. The maintenance of the alanine degradation rate reinforces the general sparing pattern of nitrogen metabolism in the cafeteria-fed animals.

In contrast to the cafeteria-fed animals, the genetically obese animals (*fa/fa*) fed on a standard diet did not spare nitrogen (20) since their hyperphagia induced an excessive nitrogen intake, which was in part excreted as urea (20). In consequence, the pattern followed by these rats was different to that shown by the *cafeteria*-fed rats, either when referred to the rates of

Vol. 34, No 1, 1994

BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL

urea production or to the potential hepatic uptake of the ureogenic substrates. Thus, alanine is taken up by the liver of the *fa/fa* rats faster than in the lean animals (both groups on a reference diet) (23), as a consequence of the increase in the V_{max} of the transport. In this metabolic context, the increase in the turnover rate of alanine is consistent with the accelerated rate of utilization of nitrogenous compounds to produce urea. Thus, it is assumed that the tissue producers of alanine, mainly striated muscle, may release alanine at a higher rate than in the lean animals, as a consequence of the higher protein turnover. From the data of Table 1, it may be assumed that during the time course of the experiment, there is an increase in the incorporation of alanine into proteins. Since the rate of alanine incorporation into body proteins is derived from the rates of appearance of tritiated alanine in the aqueous fraction of the blood of the obese group, it is important to be aware of the possible change in the alanine distribution space, since the large amount of stored fat in the adipose tissue may influence that value. The change may powerfully influence the percentage of alanine catabolized and finally may vary the rate of alanine incorporation into proteins. Moreover, the tendency of genetically obese rats to show an increase in protein turnover, mainly due to muscular turnover, may accord with the increase in the rate of protein breakdown in these animals (2,6). However, it is noted that obese animals (*fa/fa*) fed with a normoproteic diet show the same, or a higher, proportion of total muscular mass (4,5) in spite of a decreased weight of the individual muscle (24).

Thus, the different patterns of alanine turnover rate in obese animals reflect the differences in the nitrogen economy of these animals, tending to a higher alanine utilization in genetically obese animals and a conservative management of alanine in cafeteria-fed animals.

Acknowledgements

This work was supported by grants PB91-0433 from the Spanish Government and CIRIT, AR1990-3979 from the Catalan Government. Thanks are given to Robin Rycroft for help in the preparation of the manuscript.

References

1. Bray, G.A. (1977) *Federation Proc.* 36, 148-153.
2. Dunn, M.A. and Hartsok E.W. (1980) *J. Nutr.* 110, 1865-1879.
3. Cleary, M.P. and Vaselli J.R. (1981) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 167, 616-623.
4. Radcliffe, J.D. and Webster J.F. (1979) *Br.J.Nutr* 41, 111-124.
5. Rafecas, I., Esteve M., Fernández-López J.A., Remesar X. and Alemany M. (1994) *Nutr. Res.* (in press).
6. Reeds, P.J., Haggarty P., Whale K.W.J. and Fletcher J.M. (1982) *Biochem. J.* 204, 393-398.

7. Naim, M., Brand J., Kare M.R. and Carpenter R.G. (1985) *J. Nutr.* 115, 1447-1458.
8. Prats, E., Monfar M., Castellà J., Iglesias R. and Alemany M. (1989) *Physiol. Behav.* 45, 263-272.
9. Salvadó, J., Segués T., Alemany M. and Arola L. (1986) *Br. J. Nutr.* 55, 139-147.
10. Rolls, B.J. and Rowe E.A. (1982) *Physiol. Behav.* 28, 393-400.
11. Rothwell, N.J. and Stock M.J. (1982) *Br. J. Nutr.* 47, 461-471.
12. Barber, T., Viña J.R., Viña J. and Cabo J. (1985) *Biochem. J.* 230, 675-681.
13. Salvadó, J., Arola L. and Alemany M. (1986) *Biochem. Int.* 13, 115-121.
14. Katz, J. (1982) *Fed. Proc.* 41, 123-128.
15. Pastor-Anglada, M., Champigny O., Ferré P., Remesar X. and Girard J. (1988) *Biol. Neonate* 54, 126-132.
16. Golden, S., Chemowet M., Dunn A., Okajima F. and Katz J. (1981) *Am. J. Physiol.* 241, E121-E128.
17. Williamson, D.H. (1974), In: *Methods of enzymatic analysis*, vol. 4, 1679-1682.
18. Garrow, J.S. (1988) In: *Obesity and related diseases*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
19. Dixon, W.J., Brown M.B., Engelman L., Frane J.W., Hill M.A., Jennrich R.I. and Toporek J.D. (1983) *BMDP Statistical Software*. University of California Press, Berkeley. Los Angeles.
20. Esteve, M., Rafecas I., Remesar X. and Alemany M. (1992) *Int. J. Obes.* 16, 237-244.
21. Rafecas, I., Esteve M., Remesar X. and Alemany M. (1991) *Biochem. Int.* 25, 797-806.
22. Herrero, M.C., Anglès N., Remesar X., Arola L. and Bladé C. (1994) *Int. J. Obes.* 18, 255-261.
23. Ruíz, B., Felipe A., Casado J. and Pastor-Anglada M. (1991) *Biochem. J.* 280, 367-372.
24. Lanza-Jacoby, S. and Kaplan M.L. (1984) *Int. J. Obes.* 8, 451-456.

3.3 Altres elements de discussió.

En el capítol 1 hem al·ludit a l'aparició de resultats discrepants en intentar determinar el recanvi de proteïnes de l'individu sencer en el cas de l'obesitat. Una de les causes apuntades fou la dificultat d'una estimació correcta de la massa corporal magra (L.B.M.) com a mesura de normalització de les dades entre obesos i prims (Welle et al., 1992), en un intent de obviar la interferència del teixit adipós, important en els obesos, en la discussió dels resultats.

El teixit adipós, en l'obesitat pot significar un 40% (Stolz i Martin, 1982) del pes de l'individu, en rata adulta (fa/fa) serien més de 100-125 g. Assumir una concentració de proteïna del 2-3% (Prats et al., 1986) en el teixit adipós, implica 2-4 g de proteïna total. Es fa difícil menyspreuar en estudis de metabolisme nitrogenat, un teixit que pot contenir més del 10% de la proteïna corporal, en situacions d'obesitat severa.

És per això que hem decidit de mostrar també, els resultats en mesures absolutes i referides al pes corporal.

Taxes de recanvi d'alanina i Taxa de desaparició d'alanina: Mesures absolutes

	Dieta de Referència	Dieta de Cafeteria	Obesitat genètica (fa/fa)
Taxa de recanvi d'alanina(T) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$	6,31±0,99 a	3,87±0,31 a	11,00±1,81 b
Taxa de degradació d'alanina(D) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$	2,61±0,50 a	1,98±0,39 a	3,26±0,82 a
Taxa d'incorporació a proteïnes(P) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$	3,70±0,99 a	1,89±0,22 a	7,75±1,86 b
Desaparició d'alanina $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$	15±3 a	9±2 a	35±5 b

Els valors són les mitjanes ± S.E.M. de 5-7 animals.

Els valors s'han sotmès a un anàlisi de la variància (ANOVA) pel factor grup. Quan hi ha hagut diferències significatives entre grups ($P<0,05$) s'ha efectuat un test de Scheffé. Les mitjanes amb lletres a,b,c, diferents són significativament diferents en aquest test post-hoc. ($P<0,05$)

Taxes de recanvi i de desaparició d'alanina. Valors relatius al pes de l'animal

	Dieta de Referència	Dieta de Cafeteria	Obesitat genètica (fa/fa)
Taxa de recanvi d'alanina(T) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$	37±6 a	21±2 b	37±8 a
Taxa de degradació d'alanina(D) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$	15±3 a	11±2 a	11±2 a
Taxa d'incorporació a proteïnes(P) $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$	22±6 a	10±2 b	26±7 a
Desaparició d'Alanina $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{Kg}^{-1}$	88±15 a	47±8 b	120±22 a

Els valors són les mitjanes ± S.E.M. de 5-7 animals.

Els valors s'han sotmès a un anàlisi de la variància (ANOVA) pel factor grup. Quan hi ha hagut diferències significatives entre grups ($P<0,05$) s'ha efectuat un test de Scheffé. Les mitjanes amb lletres a,b,c, diferents són significativament diferents en aquest test post-hoc. ($P<0,05$)

Quan s'expressen les dades en mesures absolutes, els valors de la taxa de recanvi d'alanina (T), i la taxa d'incorporació a proteïnes (I) dels animals prims sotmessos a dieta de cafeteria no són significativament diferents dels animals prims sotmessos a dieta de referència, tot i que s'intueix una tendència a ser inferiors. Aquesta tendència es veu consolidada en relativitzar les mesures respecte del pes corporal. La taxa de degradació d'alanina (D) i l'eliminació d'alanina del flux sanguini, no són diferents entre ambdós grups en cap de les formes d'expressió dels resultats, mentre que la relació I/D sempre es troba significativament disminuïda en les rates manipulades nutricionalment. Els resultats, quan comparem els grups referència i els de dieta de cafeteria, expressats en funció del pes corporal són paral·lels als relativitzats segons la massa corporal magra (L.B.M).

Quan analitzem el cas del grup d'animals genèticament obesos, les dades en mesures absolutes, els valors de la taxa de recanvi d'alanina (T), la taxa d'incorporació a proteïnes (I) i l'eliminació d'alanina del flux sanguini, són significativament superiors als dels animals prims sotmessos a dieta de referència. En relativitzar les mesures respecte del pes corporal, desapareixen aquestes diferències. La taxa de degradació d'alanina (D) no és diferent entre ambdós grups en cap de les formes d'expressió dels resultats, mentre que la relació I/D sempre es troba significativament augmentada en les rates (f_a/f_a). Els resultats, expressats en valors absoluts, són, en aquest cas, paral·lels als relativitzats segons el L.B.M.

L'ús del pes corporal, en lloc del L.B.M., com a paràmetre normalitzador, només introdueix variacions importants en el grup d'obesos genètics (precissament on el teixit adipós és quantitativament més important): Les rates genèticament obeses normalitzen els seus valors en tenir en compte el pes del teixit adipós. És per això que en la discussió l'hauré de tenir present

Una altra assumpció no massa ben fonamentada en aquest cas, és el model de compartiments: La taxa que hom anomena d'incorporació a proteïnes, en realitat explica la fracció de l'esquelet carbonat de l'alanina que l'individu anabolitza. No es contempla en aquest model de compartiments, la possibilitat que l'esquelet carbonat de l'alanina,

piruvat, pugui incorporar-se com a tal en els depòsits lipídics o de glicogen.

En el capítol 1 s'han vist com a trets comuns entre els models d'obesitat, genètica (fa/fa) i nutricional (cafeteria) és l'aparició d'alts nivells d'amoni circulants, resistència a la insulina en múscul i teixit adipós i una hiperfàgia accentuada. En aquest sentit s'ha observat que l'addició d'amoni accelera la formació tant de glucosa a partir d'alanina com d'urea (Cornell et al, 1974) en models "in vivo", tot i incrementant-se notablement la producció de lactat i piruvat . Paral·lelament s'estimula la respiració i els quocients redox Lactat/Piruvat, 3Hidroxibutirat/ Acetoacetat i NAD/NADH, tant mitocondrial com citosòlic, són desplaçats cap als estats més oxidats. (Cohen et al., 1985; Fritz i Bonhensak., 1988).la qual cosa en modifica les taxes de flux, mostra de l'alt grau de cooperativitat entre la urogènesi i gluconeogènesi (Cuezva et al., 1986). A més és prou establert què, a altes taxes d'urogènesi es requereix un precursor gluconeogènic per tal de mantenir una concentració intracel·lular suficient d'aspartat per tal de garantir el funcionament del cicle de la urea (Waterlow, 1984).

No és estrany pensar que la dieta hipercalòrica assolida per la hiperfàgia que ambdós models d'obesitat desenvolupen, pot generar nivells elevats de metabolits característics del metabolisme energètic (piruvat, lactat, glucosa...), així com un desplaçament dels sistemes redox (lactat/piruvat, 3hidroxibutirat/acetoacetat, NAD/NADH tant citosòlic com mitocondrial) cap els estats més oxidats (Fritz i Bonhensak., 1988).

En el cas de les rates sotmeses a dieta de cafeteria, això explicaria, per un cantó la inhibició de la gluconeogènesi a partir d'alanina en fetge (Gianoti et al., 1989) i la menor captació hepàtica de la mateixa que s'ha observat. Per una altra banda, sembla lògic esperar que un excés de càrrega energètica comportés una menor taxa de transaminació de l'alanina en aquest teixit (Serra et al., 1991) de manera que minvaria l'aparició de de glutamat i aspartat a partir de l'amoni de l'alanina (Serra et al., 1991) (la qual cosa sembla en part corregit per un augment de la activitat aspartat transaminasa quan es

relativitza front el contingut cel·lular en DNA, però no quan es relativitza vers pes de teixit (Serra et al., 1991). D'aquí a explicar el descens observat (Barber et al., 1985) en el flux a través del cicle de la urea (car els nivells plasmàtics d'aquest metabolit són inferiors als observats en controls) és immediat.

El múscle i el teixit adipós en aquest model d'obesitat desenvolupen una resistència a la insulina (Felig et al., 1969; Pénicaud i Ferré, 1988) que els pot provocar una deficiència de glucosa en l'estadi post-absortiu (moment en que em fet les mesures), més si tenim en compte que, en el nostre model, s'ha trobat que la glucosa sintetitzada al fetge és confinada al pool intracel·lular del torrent sanguini (Prats et al., 1987). Aquesta pot ser l'explicació del manteniment de la taxa de recanvi catabòlic observat en l'alanina, malgrat la disminució ja esmentada de la transaminació hepàtica d'alanina. Observació que concorda amb el fet que la glutamina sintetasa com l'alanina transaminasa semblen activades tant en múscul com en intestí (Serra et al., 1991). Tots aquests esdeveniments concorden també, amb el fet que, en aquesta situació, els nivells d'amoni sanguini són elevats (Herrero et al., 1994).

El mateix excés de càrrega energètica pot disminuir la necessitat d'utilització anabòlica de l'esquelet carbonat de l'alanina via cetogènesi o gluconeogènesi. Aquesta pot ser una explicació complementària al descens en la taxa anabòlica per l'alanina en animals amb obesitat induïda per dieta de cafeteria, concordant amb la observació d'una menor activitat específica de ^{14}C -alanina i ^{14}C -glucosa en el múscul en injectar a l'animal ^{14}C -alanina, mentre no estroben diferències en el ^{14}C incorporat al múscul o a proteïna muscular (Gianoti et al., 1989), car no és un aminoàcid limitant de la síntesi proteica. És més hi han evidències d'un increment en la síntesi de proteïnes en el múscul de rates sotmeses a dieta de cafeteria (Zamora 1988), o a dietes hiperlipídiques (Estornell et al., 1994). La càrrega energètica excedentària forçaria, per últim, un increment en la deposició de lípids en tots els teixits (Prats et al., 1986).

Pel que fa al grup de rates genèticament obeses (fa/fa), la sobrecàrrega energètica produïda no aconsegueix reduir la ureogènesi

al fetge, sino incrementar-la (Esteve et al., 1992), ja per l'excés d'amoni ingerit (Cornell et al., 1974), bé per que n'és una anomalia pròpia. Tal com hem dit abans, això comporta no reduir la gluconeogènesi hepàtica a partir de l'alanina. L'excés de càrrega energètica circulant pot ser absorbida via lipogènesi en diferents teixits. (Argilés, 1989).

Els múscul i el teixit adipós d'aquests animals també són resistents a la insulina. Una argumentació similar a la feta en el cas anterior, podem raonar el manteniment de la taxa de catabòlisi de l'alanina. La cetogènesi en aquests animals és força incrementada. (Argilés, 1989) de manera independent dels nivells d'ingesta i d'insulina. (Stolz i Martin, 1982), aquesta pot ser la raó de l'increment en la taxa anabòlica d'alanina, malgrat que no hagi un increment clar en la síntesi de proteïnes, o com a mínim els resultats en aquest camp siguin discrepants. D'altra banda, l'increment en la concentració d'amoni circulant, només és compatible amb l'augment de flux en la ureogènesi (paral·lel a l'increment en la gluconeogènesi a partir de l'alanina en fetge) si l'increment en la taxa d'anabolisme de l'alanina l'atribuïm a un increment en la seva incorporació a lípids i no a proteïnes. La participació del teixit adipós en la variació d'aquests paràmetres ha de ser important en aquest cas, car representa un percentatge important del pes de l'animal sencer. El fet que els paràmetres es normalitzin tenint en compte el seu pes, i no tenint en compte la seva massa magra, corrobora aquesta assumció.

En conclusió:

En ambdós models d'obesitat hi ha un manteniment de la taxa catabòlica d'alanina, malgrat contar amb una sobrecàrrega de metabolits característics del metabolisme energètic, com a conseqüència del comportament hiperfàgic. Fet que pot reflectir la resistència a la insulina que desenvolupen ambdós models en els teixits perifèrics.

En els animals amb obesitat adquirida nutricionalment. La taxa d'incorporació a teixits de l'alanina, calculada com a diferència entre la taxa total de recanvi i la taxa catabòlica, és disminuïda, quan tenim

en compte el pes corporal, o es manté invariable en menyspreuar el pes del teixit adipós del paràmetre normalitzador. Aquesta resposta sembla armoniosa amb una resistència a la insulina en teixits perifèrics.

En el model d'obesitat genètica, la taxa d'incorporació d'alanina a teixits és incrementada si no tenim en compte el pes del teixit adipós o roman inalterada en fer-ho. En qualsevol cas aquesta és una resposta anòmala a la resistència a la insulina en teixits perifèrics.

Argumentar una relació directa entre les variacions de la taxa d'incorporació d'alanina a teixits i el recanvi de proteïnes pot conduir a hipòtesis errònies, car no és un aminoàcid limitant de la síntesi i, amb el model de marcatge emprat, no es pot descartar una certa incorporació de l'esquelet carbonat de l'alanina a lípids.

3.4 Bibliografia

Argilés J.M. Prog. Lipid Res. (1989),28: 53-66

Balasse EO, De Greef J., Neef MA. Horm Metab. Res. (1985),17: 554-558

Barber T, Viña J.R., Viña J., Cabo J. Biochem. J. (1985),230: 675-685

Beaton J.H Arch. Biochem. Biophys (1957),. 67: 1-9

Bohnensack, R. and Fritz, S. Biochim. Biophys. Acta (1991),1073: 347-356.

Casado J., Remesar X., Pastor-Anglada M. Biochem. J. (1987),248: 117-122.

Cohen, N.S., Cheung C-W., Kyan, F.S., Jones, C.E., and Rajjman, L. J. Biol. Chem (1982),257: 6898-6907.

Cohen, N.S., Kyan, F.S., Cheung, C-W and Rajjman, L. Biochem. J. (1985),229: 205-211.

Cornell, N.W., Lund, P. And Krebs H.A. *Biochem .J.* (1974),142: 327-337.

Cuezva JM., Valcarce C, Chamorro M., Alanine and lactate as gluconeogenetic substrates during late gestation *Fed. Eur. Biochem. Soc* (1986),194: 219-225

Chiasson JL., Atkinson RL., Cherrington AD *Metabolism* (1980),29: 810-818

Chodrinov Rh., Braaten JT., Mc Kendry JBR. *Diabetis* (1978),27: 420-426

Esteve M., Rafecas I., Remesar X., Alemany M. *Int. J. Obes.* (1992),16: 237-244

Estornell E., Barber T., Cabo J. *Br. J. Nutr.* (1994),72: 509-517

Felig P., Marliss E., Cahill G.F. *N. Engl. J. Med* (1969),281: 811-816

Fritz, S. and Bohnensack, R. *Biomed . Biochim. Acta* (1988),47: 923-932

Gianotti M., Roca P., Pons A., Palou A., *Biochem J* (1989),20 (2): 353-361

Herrero M.C., Anglés N., Remesar X., Arola Ll., Bladé C. *Int. J. Obes.* (1994),18: 255-261.

Hetenyi G Jr., Layberry RA, Foster DM., *Am. J. Physiol.* (1980),239: E39-E44

Pénicaud L., Ferré P. *The Journal of Obesity* (1988),7 (2): 91-107

Prats E., Monfar M., Argilés J.M., Alemany M. *J. Obes. Weight Reg.* (1986),5 (2): 77-88.

Prats E., Monfar M., Castellà J, Iglesias R., Alemany M., *Biochem Int.* (1987),14 (1): 95-101.

Serra F., Gianotti M., Palou M., Pons A. *Biochem. Int* (1991),24 (4): 769-776

Stolz D.J., Martin R.J. J. Nutr. (1982),112: 977-1002

**Waterlow J.C. Quarterly Journal of Experimental physiology (1984),69:
409-438**

**Welle S., Barnard R.r., Statt M., Amatruda J.M. Metabolism (1992),41
(9): 1028-1034**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

4.- Efectes de l'obesitat genètica i nutricional sobre el contingut de proteïna muscular, caracterització bioquímica i estructural.

4.1.Introducció

4.1.1. Característiques estructurals i bioquímiques del múscul

Estructuralment, el múscul esquelètic, a diferència del múscul llis i cardíac, no està format per cèl·lules aïllades, sino per fibres. La fibra muscular es genera per divisió i creixement d'una cèl·lula, i sovint arriba a posseir centenars de nuclis. Pot arribar a mesurar 40-60µm de llarg, i està rodejada d'una sola membrana plasmàtica: el sarcolema. Es compon de miofibril·les que s'extenen al llarg d'ella, les quals estan formada pels elements contràctils, filaments gruixuts i prims, els quals s'ordenen periòdicament segons un patró característic. (Loewy 1970)

Els filaments prims estan composts de F-actina, polímer en doble hèlix construït a partir de monòmers de G-actina en un procés que precisa el consum d'ATP. Al filament d'actina se li afegeixen les proteïnes reguladores troponina i tropomiosina. Les molècules de tropomiosina formen una cadena superposada a la de F-actina, producte de la superposició a cada set molècules de G-actina d'una de tropomiosina, lloc on s'afegeix el complex troponina. (Huxley 1974)

Els filaments gruixuts, d'uns 1,5µm de llarg, és conformat per uns quants centenars de molècules de miosina. La miosina està formada per dues cadenes polipeptídiques enrollades entre si, unides a dos polipèptids globulars, els caps, en un extrem. Els caps de miosina posseeixen activitat ATP-asa que és activada quan entra en contacte amb el filament prim. Aquest contacte només serà possible quan, després d'una irrupció de calci, la troponina experimenti un canvi conformacional que n'indueixi un altre en la troponina, deixant a la vista de la miosina la cadena de F-actina (El-Saleh, 1986)

Aquestes estructures estan ancorades en una altre, el disc Z, paper que se li atribueix, entre d'altres, a la actinina. L'espai entre disc Z i disc Z, s'en diu sarcòmer, el qual és la unitat que s'escurça en el moment de la contracció. En el centre del sarcòmer hi ha una banda prima transversal, la línia M formada per quatre proteïnes: proteïna M, mlomesina, esquelemines, i la isoforma muscular de la creatina

quinasa (CK). Les tres primeres estarien implicades en el manteniment de l'estructura com a suport dels filaments gruixits de miosina, mentre que la última, situada de forma estratègica, garantiria la regeneració de l'ATP. De totes maneres la fracció de majoritària de la CK és soluble al sarcoplasma. A més Les estructures membranoses al múscul són altament organitzades i juguen un paper important en els fluxs de calci a l'interior de la cèl·lula.(Small et al, 1992).

Pel que fa a la distribució de les proteïnes en el múscul és heterogènia. De fet, generalment s'agrupen en tres categories en funció de la seva solubilitat segons la força iònica del medi, i pertanyen a tres compartiments separats de la cèl·lula muscular. (Goll et al, 1984):

La fracció sarcoplasmàtica la conformen aquelles proteïnes solubles a baixa força iònica, inferior a 0,03. Constitueix el 30% en pes de la proteïna muscular i conté quasi totes les proteïnes del citosol muscular. D'altra banda aquelles proteïnes que precisen de forces iòniques superiors a 0,2, conformen la fracció miofibril·lar i suposa un 55% de la proteïna muscular total. Es suposa que la majoria de les proteïnes que conformen les miofibrilles del múscul s'obtenen en aquesta fracció. La fracció de proteïnes insoluble en disolvents aquosos, el 15% restant, es coneix com a fracció estromal i es presuposa composta majoritàriament per proteïnes extracel·lulars: elastina i colàgen.

Ademés, el múscul esquelètic compren una població heterogènia de fibres amb diferents capacitats per generar energia. Les quantitats relatives d'enzims característics de les dos vies majoritàries del metabolisme energètic serveixen per fer-ne una classificació en tres tipus diferenciats: Tipus I: àltament oxidatius - poc glicolítics, tipus IIa: àltament oxidatius - àltament glicolítics, tipus IIb: poc oxidatius - àltament glicolítics. (Peter et al., 1972) (Lowry et al., 1978). Els del tipus I es caracteritzen per ser de contracció lenta (slow twitch), mentre que els del tipus II són de contracció ràpida. (fast twitch).

Histoquímicament aquests dos tipus de fibres es diferencien pel fet que contenen diferent composició en les isoformes de miosina, les

activitats ATPases calci-depenents de les quals ténen una labilitat diferenciada amb el pH: les presents en el tipus I són làbils en una preincubació a pH àlcali, mentre que les del tipus II ho són a pH àcid (Brook i Kaiser, 1970).

Per a la caracterització bioquímica de la proporció dels diferents tipus de fibres, s'empra usualment la mesura de les següents activitats (Chi et al., 1983):

Glicolítiques: Lactat deshidrogenasa (LDH) o Fosfofructo quinasa (PFK).

Enzims del cicle dels àcids tricarboxílics: Succinat deshidrogenasa (SDH) o Malat deshidrogenasa (SDH).

Enzims de la β -oxidació dels àcids grassos: β -hidroxo-acil-Coa deshidrogenasa (β -OAC).

Enzims del metabolisme de l'enllaç fosfat àltament energètic: Creatina quinasa (CK) i Adenosina quinasa (AK).

Per altra banda les activitats AK i LDH estan directament relacionades amb la velocitat contràctil en unitats motores individuals (Hamm, 1988) i amb la del tipus de fibra (Hintz, 1984).

A aquesta heterogeneïtat bioquímica li correspon una heterogeneïtat ultraestructural: Els músculs rics en fibres lentes són més prims i posseïxen molts mitocondris, els quals contenen un gran assortit d'enzims respiratoris, a més de una gran quantitat de mioglobina, proteïna transportadora d'oxigen, la qual és responsable del color vermell característic d'aquestes fibres. A més ténen una gran quantitat d'inclusions lipídiques.(Carpenter, 1984). Per contra les fibres musculars blanques, o de contracció ràpida, són més grans en diàmetre que les vermelles, i contenen grans quantitats de fosforilasa, enzims glicolítics i grans dipòsits de glicògen. (Chi et al 1983)

4.1.2 Alteracions musculars en l'obesitat.

Tot i que el contingut en els diversos tipus de fibres de cada múscul és principalment determinat genèticament (Lompre et al., 1984), aquest perfil pot ser alterat per canvis hormonals. De particular importància en aquest aspecte són els canvis en els nivells d'insulina (Rutschman, 1984), d'hormones tiroïdals (Nwoye et al., 1982), i de catecolamines (Levin, 1990; Levin i Sullivan, 1989). També s'han observat canvis en el perfil miofibril·lar a causa de l'edat (Lexell et al., 1983; Maltin et al., 1989) o l'exercici (Chi et al., 1983).

En relació amb la seva composició en tipus de fibra, existeix una marcada heterogeneïtat en la sensibilitat a la insulina entre músculs, (James et al., 1985). Músculs amb una alta proporció de fibres oxidatives de contracció lenta són més sensibles a la insulina que els que tenen una composició majoritària en fibres glicolítiques de contracció ràpida (James et al., 1985). Aquestes dades porten a la hipòtesi general segons la qual la resistència a la insulina pot ser deguda a canvis en la proporció relativa dels diferents tipus de fibres musculars, hipòtesi que ve corroborada per la troballa d'una correlació positiva entre el percentatge de fibres oxidatives i la captació de glucosa estimulada per insulina en humans, tant normals com insulino resistent (Lillyoja et al., 1987). Per altra banda en rates obeses Zucker (*fa/fa*) o per lesió ventromedial (VMH), s'ha demostrat un menor efecte biològic de la insulina en músculs amb una composició majoritària en fibres glicolítiques a l'inici de la manifestació de la síndrome, la qual cosa es generalitza a tots els músculs posteriorment (Crettaz et al., 1980; Pénicaud et al., 1987; Pénicaud i Ferré, 1988).

En el cas de l'obesitat recentment s'ha demostrat que existeix un decreixement en el percentatge de les fibres oxidatives en diferents tipus de músculs d'humans obesos (Wade 1990) i de rates Zucker (*fa/fa*), les quals exhibeixen, però, activitats oxidatives més elevades (Wardlaw 1989, Torgan 1990). Aquests canvis que no s'observaren quan l'obesitat és causada per lesió hipotalàmica (Pujol et al., 1993). Pel que fa a l'obesitat induïda per dietes hiperlipídiques s'han trobat canvis metabòlics en tots els tipus de fibres tendents a dotar al múscul d'una major capacitat oxidativa. Canvis que són més espectaculars en el gastrocnemius, un múscul que presenta una freqüència elevada en fibres del tipus (Iib) (Nemeth, 1992).

Pel que fa a l'alteració del contingut en proteïna muscular i dels paràmetres relacionats amb el seu recanvi, com a conseqüència de l'obesitat, existeixen discrepàncies tant en funció del model examinat com d'altres factors com l'edat i el sexe. Així, malgrat que la deposició de proteïna en la rata obesa (*fa/fa*) és normal fins els 34 dies d'edat, la rata obesa adulta deposita menys nitrogen en el múscul i més en altres òrgans, en relació als controls. (Triscari et al., 1977). A més, mentre que la rata prima disminueix la seva taxa d'incorporació d'aminoàcids a proteïnes a partir de 45 dies, aquest fet no es produeix en la rata obesa, ni en arribar als 60 dies d'edat (Rafecas et al. 1993). Els seus músculs són més petits i contenen menys proteïna, DNA, RNA (Cleary i Vasselli, 1981), (Schonfeld et al., 1974), (Lanza-Jacobi i Kaplan, 1984). La massa magra és menor en les obeses adultes (Pullar i Webster., 1974), tot i mostrant una reduïda taxa de deposició de proteïnes, malgrat que la proteïna ingerida és superior (Dunn i Hatsook, 1980), i una taxa de síntesi de proteïna minvada al múscul esquelètic, però no a la carcassa, la qual cosa ja és evident en el moment del deslletament. (Reeds et al., 1982). Per un altre costat s'han descrit nivells de 3-Metilhistidina en orina més elevats en la rata (*fa/fa*) respecte de la prima, la qual cosa suggereix una major taxa de degradació proteica. (Dunn i Hatsook, 1980). Aquests resultats semblen discrepar dels trobats per altres autors donat que, quan la rata *fa/fa* ha estat alimentada amb dieta normoproteica, tenen la mateixa quantitat de proteïna corporal (Radcliffe i Webster, 1979) i una massa magra incrementada (Rafecas et al., 1994).

En la obesitat induïda amb dieta de cafeteria, s'aprecia en la rata una hipertròfia en teixit adipós, fetge, ronyons i cor, en termes absoluts. En relativitzar-ho respecte del pes de l'animal tots aquests valors es normalitzen, excepte el teixit adipós, el qual resta hipertròfic, i el cor que proporcionalment és més petit. (Prats et al., 1986). En general tots els teixits ténen una concentració més elevada de proteïnes, excepte el fetge i el teixit adipós, el qual en té una concentració significativament menor (Prats et al., 1986). En el múscul de la cama aquest increment en la concentració de proteïnes es correlaciona amb una disminució del contingut relatiu d'aigua (Prats et al., 1986) i amb una taxa de síntesi incrementada en gastrocnemius i tibialis com la

trobada en rates alimentades amb dietes hiperlipídiques (Estornell et al, 1994).

Els resultats del capítol anterior suggereixen variacions importants en l'anabolisme de l'alanina, decrement en rates fetes obeses amb manipulació nutricional, increment en les que ja ho són per causa genètica, essent impossible distingir si aquestes variacions són conseqüència de diferències en el anabolisme de proteïnes o del de compostos de reserva energètica. Si les variacions del paràmetre anteriorment estudiat finalment són degudes a alteracions en el metabolisme proteic, centrar-se en els possibles canvis metabòlics i estructurals que podia patir el múscul esquelètic o el cor, teixit central en aquest metabolisme, pot ajudar a determinar-ho.

En el disseny experimental hom ha tingut en compte que els músculs esquelètics presenten diferents capacitats metabòliques en funció de la seva composició fibril·lar. És per això que s'han escollit per al seu estudi diferents músculs individuals amb la intenció d'abastar el màxim de possibilitats pel que fa al perfil fibril·lar. També s'ha tingut en compte en la seva elecció, la facilitat d'extracció individualitzada. És per això que s'ha triat el soleus (múscul amb predomini de fibres de contracció lenta de metabolisme energètic oxidatiu), el tibialis (amb predomini de fibres de contracció ràpida i amb metabolisme energètic glicolític) i el gastrocnemius (múscul amb predomini de fibres de contracció ràpida i amb metabolisme energètic mixte, glicolític i oxidatiu). El cor també s'ha estudiat en tant que les alteracions en aquest òrgan poden implicar conseqüències greus per l'animal.

S'han determinat la massa i el contingut de proteïnes dels diferents músculs en rates Zucker (fa/fa), obeses genèticament, i en rates Zucker primes fetes obeses amb dieta de cafeteria. Paral·lelament, també s'han caracteritzat les alteracions en les capacitats d'obtenció d'energia i la seva velocitat contràctil. Amb aquesta finalitat s'han analitzat les variacions en les activitats lactat deshidrogenasa (LDH) indicador de la seva capacitat glucolítica; adenosin quinasa (AK), de la seva velocitat de contracció; creatina quinasa (CK), de la capacitat de magatzematge d'energia; succinat deshidrogenasa (SDH), de la

capacitat oxidativa a nivell del cicle de Krebs ; i β -oxoacil-CoA deshidrogenasa (β -OAC), de la capacitat oxidativa a nivell de β -oxidació.

Al mateix temps, i donat que situacions on hi ha variacions en el metabolisme energètic muscular, s'han observat també alteracions estructurals importants, com és el cas de la fatiga o la diabetis, s'han fet preparacions per a microscopia electrònica dels músculs abans esmentats amb la intenció de verificar si això també esdevé en l'obesitat.

4.2 Materials i mètodes

Per aquest experiment s'empràren rates mascles de la soca Zucker. Setze dels animals s'escolliren fenotípicament prims ($Fa/?$), i vuit obesos (fa/fa). Tots ells s'obtingueren de Harlan Olac Ltd. (Bicester, U.K.) amb 5 setmanes d'edat. Després de dos dies d'aclimatació a les noves condicions d'estabulació, els animals prims es separàren en dos grups de vuit animals cada un, de manera que els pesos promig no fóssin estadísticament diferents, i varen ser engabiats per parelles. Un d'aquest dos grups (grup Caf) fou, a partir d'aquest moment, alimentat amb dieta de Cafeteria, tal i com es relata en el capítol 3. Tant els animals prims restants (grup Con), com els genèticament obesos (grup fa/fa) fóren alimentats "ad libitum" amb pinso per a rata (A04, Panlab, Barcelona). Es mantinguéren durant 30 dies en condicions de constància en la temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$), com en el cicle llum-fosc (08:00-20:00h) de l'estabulari. En aquest moment, els pesos promig dels animals dels grups Caf i fa/fa eren clarament superiors als dels del grup Con. (320 ± 4 g, 381 ± 11 g, 253 ± 5 g, respectivament).

El dia de l'experiment els animals fóren pesats i morts per dislocació cervical. Els músculs d'ambdues potes, soleus gastrocnemius i tibialis, i el cor varen ser disseccionats i pesats individualment. Els músculs de la cama dreta, i la meitat dreta del cor es destinàren a la valoració de proteïnes musculars, mentre que els de l'esquerra s'empràren en la mesura de les diferents activitats enzimàtiques (sis individus) o a la

preparació per a la caracterització ultraestructural (els dos individus restants).

4.2.1 Quantificació de les proteïnes de les diverses fraccions.

Després de retirar el teixit connectiu, els músculs fóren esmicolats i homogeneïtzats en 5 volums de tampó de baixa força iònica (Tris-HCl 50mM, EGTA 1mM, β -mercaptoetanol 10mM i Pepstatina 150nM, a pH 7,4) a 4°C, emprant un OMNImixer (OMNI International, Inc., Waterbury, CT) a la meitat de potència durant 20 segons i en dos cops. Durant aquest procés es tingué cura de què el tub restés inmers en un bany de gel. Els homogenats foren aleshores centrifugats a 20000g durant 30 min a 4°C.

Tant dels homogenats, com dels sobrenadants filtrats amb una gasa de nylon, com dels pellets recentrifugats i resuspendos en volums equivalents als inicials, se n'agafàren tres al·lòtotes per fer la determinació de proteïnes pel mètode de Lowry (Lowry et al, 1951).

4.2.2. Determinació de les activitats enzimàtiques.

Els diferents músculs s'homogeneïtzaren de manera semblant a l'apartat anterior, però en 10 volums del següent tampó: Fosfat sòdic 20mM i pH 7,4, 10% glicerol, 5mM β -ME, 0.02% BSA, 0.5mM EDTA. S'agafaren al·lòtotes de l'homogenat. Es separàren al·lòtotes per a la determinació de la proteïna de l'homogenat i de les diferents activitats, segons els mètodes descrits per Chi et al. (1986), el quals són adaptacions per a petites quantitats de mostra. Les quantitats mínimes d'homogenat necessàries per a les diferents determinacions fóren: per a proteïna (triplicat), 150 μ l; SDH, 200 μ l; LDH, 10 μ l; CK i AK, 10 μ l; β -OAC, 50 μ l. Usualment es feien 250 μ l cada una. Donat que es perd activitat SDH en congelar la mostra, s'havia de mesurar en fresc el mateix dia del sacrifici (Chi et al. 1983). La resta d'al·lòtotes es congelaren a -80°C fins el dia de la determinació, car no pateixen aquesta restricció.

4.2.2.1 Activitat succinat deshidrogenasa

El mètode emprat es basa en el seguiment espectrofotomètric en continu, del descens de l'absorbància deguda al ferricianur de potassi com a conseqüència de la seva oxidació en la reacció catalitzada per la succinat deshidrogenasa :

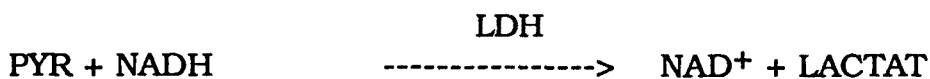
SDH



Deprés de preincubar les mostres a 37°C 5 minuts, per tal d'esgotar els diferents substrats d'enzims oxidatius, s'afegien 0,1 de mostra ml a 2,8 ml de tampó d'incubació (K₄Fe(CN)₆) 2mM, azida sódica 1mM, Rotenona 1µg/ml, Fosfat dissòdic 20mM pH 7,4 ajustat amb HCl 1M) i es deixava atemperar a 25 °C durant 5 minuts. Un cop mesurat el descens constant en el valor de l'absorbància durant 1min, s'addicionava 0,1 ml de la solució de substrat (succinat sòdic 1M en tampó d'incubació, per tal que la concentració en la cuveta de reacció sigui de 30mM). De la caiguda d'absorbància d'aquesta barreja, (constant durant 1 min) menys la de la lliure de substrat es desprendreà l'activitat SDH sabent que el coeficient d'extinció molar és 9,6.10⁵ L/(mol.cm), i normalitzat al contingut de proteïna.

4.2.2.2. Activitat lactat deshidrogenasa

L'assaig es basa en el seguiment espectrofotomètric, en continu, del descens d'absorbància generat pel consum de NADH segons la següent reacció:



ASSAIG

<u>Solucions</u>	<u>Volum</u>	<u>Concentració a Cuveta</u>	
Tris-NaCl-NADH	500µl	Tris	80 mM
		NaCl	200 mM
		NADH	100 µM
Addició de mostra	fracció de volum : 0,0164		10 µl

Barrejar-ho i portar-ho a 30°C

Adició de substrat Tris-NaCl/Pyruv 100 µl

Barrejar i començar a llegir l'absorbància a 339nm a partir de 30s de mescla. Posteriorment es pren la nota de la variació (linial) d'absorbància durant 2min (cal que $\Delta A/\text{min}$ no superi el valor de 0.160).

La mostra es centrifugava a 15000g 30 minuts per tal d'eliminar la fracció particulada i es diluïa 1:10 amb NaCl 150mM.

Segons els músculs calien les següents dilucions posteriors

Gastrocnemius:	1: 75
Soleus:	1: 50
Tibialis:	1: 100
Cor:	1: 50

Solucions

1) TRIS-NaCl: magatzemable

81,3mM Tris (4,92g), 203,3mM NaCl (5,95g), en 400ml aigua. Ajustar fins pH= 7,2 a 30°C i enrasar fins 500ml.

2)Tris-NaCl/ NADH . Cal fer-la el mateix dia que s'hagi d'emprar

1 mg de NADH en 11 ml solució Tris

3) Tris-NaCl/PYR.Cal fer-la el mateix dia que s'hagi d'emprar

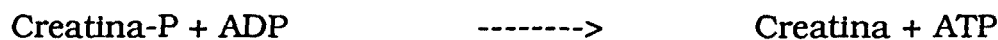
11mg de Piruvat sòdic en 10ml solució Tris-NaCl..

4.2.2.3. Activitats creatina quinasa i adenosin quinasa

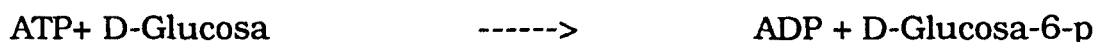
L'assaig es fonamenta en el seguiment espectrofotomètric, en continu, del NADH generat com a conseqüència de les següents reaccions acoblades.



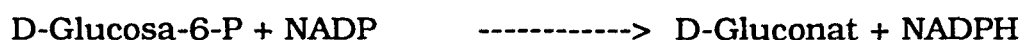
CK



HK



G-6-P DH



Assaig

SOLUCIO	VOLUM	ConCENTRACIÓ
Reactiu de treball	1 ml	IMIDAZOL 100mM
		EDTA 2mM
		Mg 10mM
		ADP 2mM
		AMP 5mM
		NAC 20mM
		NADP 2mM
		D-Glucosa 20mM
		HK 300 U/l
		G-6-P-DH 200 U/l

MESURAR Δ ABS/min durant 1min

Addicionar la mostra (0,05ml)

Barrejar

Esperar 1min

Mesurar Δ ABS/min durant 2min

Addicionar la solució de substrat (0,1 ml)

Barrejar

Mesurar durant 2min (segons la linealitat del pendent) Δ abs a 339nm

Normalment per tal que els valors que es donaven fossin de $\Delta\text{Abs}_{339} = 0,6$ en 1 min. i la absorbància final no superés mai el valor de 2 al cap de 3min, calia diluïr la mostra 1:1000 amb solució tamponadora. La reacció es portava a terme a 25°C, després d'un període d'uns 5 minuts per tal que s'esgotessin els substrats endògens. La velocitat de producció de NADH es considerava indicatiu de la de producció d'ATP per part de les dues activitats a mesurar, en tant que aquest n'era l'únic reactiu limitant i els enzims auxiliars es trobaven en quantitats suficients per poder fer aquesta afirmació. De la mesura de la variació de l'absorbància a 339nm, en absència de fosfat de creatina i en presència d'ADP se'n desprenia l'activitat AK, tot i tenint en compte el coeficient d'extinció molar del NADH. Mentre que, en afegir el fosfat de creatina, la mesura permetia el calcul de la suma d'activitats AK + CK. Per diferència se n'obtenia l'activitat CK.

Solucions

a) Solució tamponadora (emmagatzemable).

Imidazol (PM=104,5) 100mM (10,45g); Acetat de magnesi (PM=241,5) 11,5mM (2,47g); EDTA (PM=372,2) 2,3mM (0,85g).pH=7,5(25°C) (cal ajustar amb àc. Acètic 1M. Enrasar a 1000ml

A 95 ml de la solució anterior cal afegir 115,3mg ADP-K (PM=501,3), 290mg AMP-Na₂ (PM=499,2), 1,1 mg AP₅A (PM= 934,2), 414 mg D-Glucosa (PM=180,2), 181 mg NADP (PM=787,4), ajustar a pH=7,1-7,15 (25°C) amb acètic 1M i enrasar a100ml . Magatzemada a -20°C és estable durant dos mesos.

b)Solució de substrat

Creatina-P 300mM 1,13g creatina-P (PM=327,2) en 10 ml H₂O. Magatzemada a -20°C és estable durant dos mesos.

c) Reactiu de treball. (Estable a 4°C durant una setmana)

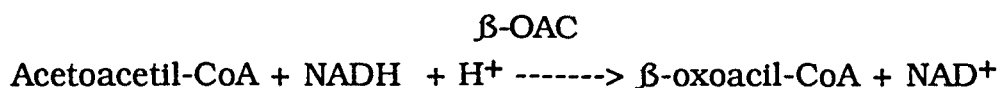
A 25 ml de la solució tamponadora afegir, 100 mg N-acetil-L-cisteïna (PM=163,2) i ajustar el pH a 6,6 amb acètic 1M

El dia de treball cal afegir per a 25 assajos: Hexoquinasa (36mg) i G-6-PDH (10µl)(25 assays)

4.2.2.4. Activitat β-OxoacilCoA deshidrogenasa

Assaig

El mètode es fonamenta en el seguiment espectrofotomètric en continu, del descens de l'absorbància causada pel NADH segons la següent reacció



L'assaig es realitzava de la següent manera:

<u>Solucions</u>	<u>Volum</u>	<u>Concentració</u>
S. de Treball	500µl	150mM Imidazol 100µM NADH 1mM EDTA 0,05% BSA
Addició de mostra	50µl	Fracció de volum (0,08)

Barrejar

Mesurar ΔAbs a 340 nm (blanc) durant 2 min.

Addició de substrat 50µl

Mesurar ΔAbs a 340 nm durant 2 min. Tenint en compte el coeficient d'extinció molar del NADH es calculava l'activitat β-OAC.

Segons el múscul calia fer les següents dilucions de l'homogenat amb solució magatzemable:

Tibialis	1:25
Gastrocnemius	1:50
Soleus	1:100

Cor 1:50

Solucions

a) **Solució emmagatzemable**

150 mM Imidazol, 1mM EDTA, 0,05% BSA, en 900 ml Aigua. Ajustar a pH= 6.0 amb HCl i enrasar a 1000 ml.

b) **Solució de Treball**

1mg NADH en 15 ml de Solució magatzemable.

c) **Solució de Substrat**

500 µM Acetoacetyl COA (PM= 851,6)

Estadística

Donat que la qüestió que es preten discutir és si els paràmetres, tant del grup *Caf* com del grup *fa/fa*, són diferents respecte dels del grup Con, s'ha cregut més addient comparar les mitjanes d'aquells grups per separat amb les del grup de referència, tot i emprant un test t d'Student per poblacions desaparellades. S'ha comprovat prèviament que els grups mostrals estan distribuïts normalment amb la prova no paràmètrica de Kolmogorov-Smirnov, i que ténen igualtat de variància mitjançant un test de Levene.

4.2.3. Microscopia electrònica.

El protocol es basava en el descrit per Belcastro et al. (1985) modificat de la següent manera:

Dels músculs individuals eren disseccionats dos prismes d'aproximadament 3x1x1 mm de manera que l'eix més llarg fos paral·lel a l'eix de la fibra muscular. Els especimens eren rentats amb tampó fosfat 0.2M i pH 7.4, i posteriorment fixats durant dues hores a 4°C en glutaraldèhid al 3.5% en tampó fosfat 0.2M i pH 7.4. Després

d'un rentat amb tampó fosfat 0.2M , els especimens eren postfixats amb tetròxid d'osmi al 2%, tamponat com abans, durant 2 hores a 4°C.

Després d'aquest procés, es deshidrataven les mostres per immersió durant 15 minuts en cada una d'una sèrie de solucions d'acetona cada cop més concentrada: 30%, 50%, 75% i 90%. En aquest punt, els Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona s'encarregàren segons el seu procediment rutinari d'infiltrar a les mostres una reïna epoxi de baixa densitat , de tallar les mostres en seccions perpendiculars a l'eix més allargat de 80nm d'espessor i de tenyir les mostres amb acetat d'uranil (30min) i citrat de plom (10min). Les microfotografies foren obtingudes en un microscopi electrònic Philips 200 a 60kV.

METABOLISME PROTEICO-MUSCULAR A L'OBESITAT

Memòria que presenta

MARTÍ YEBRAS i CAÑELLAS

per optar al grau de DOCTOR EN CIÈNCIES
QUÍMIQUES.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TARRAGONA, MARÇ 1995

4.3 Resultats

4.3.1. Efecte de l'obesitat genètica i nutricional en la massa, contingut proteic i activitats enzimàtiques en músculs individuals.

Soleus

En analitzar els efectes de l'obesitat genètica sobre la massa muscular del soleus, s'observa un decrement significatiu en la seva massa, respecte del que esdevé en animals controls quan s'analitza en termes absoluts. El contingut de proteïna total en aquest teixit és estadísticament inferior a la observada en soleus dels animals prims, la qual cosa també succeeix en termes de concentració. Aquest efecte s'ha d'atribuir a una disminució en la proteïna insoluble.

Les activitats LDH, β -OAC i AK no es veuen significativament modificades. Per contra, incrementa la seva capacitat oxidativa a nivell de les activitats enzimàtiques del cicle de Krebs, com ho palesa un increment significatiu del 39% en l'activitat SDH. L'activitat CK, es veu augmentada en 28% respecte dels controls.

En els soleus de rates sotmeses a dieta de cafeteria, per contra, no s'observen variacions pel que fa a massa o al contingut en proteïnes. Com la obesitat genètica, la obesitat nutricional indueix un increment significatiu del 42% en l'activitat SDH. En aquest cas, però, l'activitat CK no varia.

Gastrocnemius

L'obesitat genètica produeix de nou un descens en la massa muscular, ara en el gastrocnemius, el qual manifesta un pes significativament 18% inferior al dels animals prims. Com a conseqüència d'aquest fet, el contingut proteic del múscul minva significativament, tot i que la concentració en proteïna total és incrementada. Aquest descens és generalitzat en totes les fraccions, quan s'expressa com a mg de proteïna per pes de teixit fresc, no variant-ne significativament les concentracions de les fraccions insoluble i soluble.

La pujada, d'un 22 i un 20%, en els nivells de SDH i β -OAC que es fan patents en aquest múscul en rates (f_a/f_a) respecte de les primes és acompanyat per l'increment d'un 29% en l'activitat CK. Novament, la obesitat genètica no indueix alteracions significatives en les activitats de LDH ni de AK.

Com a resposta a l'obesitat nutricional el gastrocnemius augmenta significativament el seu pes en un 10% al mateix temps que la concentració de proteïna, de manera que el contingut proteic és superior que en animals controls. Aquesta variació només és explicable amb l'increment en el contingut de proteïna insoluble, en tant que la fracció soluble no varia. Pel que fa a la maquinària enzimàtica, en aquest cas es veuen significativament incrementades ambdues activitats oxidatives, un 38% la SDH i un 29% la β -OAC, sense que aquest fet vingui acompanyat de cap variació en els nivells de CK. No varien tampoc les activitats LDH ni AK.

Tibialis

En el tibialis, la massa muscular també es veu minvada en l'obesitat genètica, encara que en menor proporció que el descrit pels músculs anteriors, un 11%. Aquesta disminució que es veu acompanyada d'un descens significatiu i generalitzat de proteïna en totes les fraccions, malgrat que no es modifiquin llurs concentracions. És en aquest múscul, el únic que veu minvats la seva activitat de AK, un 28%, al mateix temps que són significativament incrementats els nivells de SDH i β -OAC, un 25 i 26% respectivament. Fins i tot, malgrat que no podem parlar de significativitat estadística, hi ha una tendència al descens en els nivells de LDH. En aquest cas, però, l'increment en el potencial oxidatiu no es veu acompanyat d'un augment en la CK.

L'obesitat nutricional, tot i provocar-li una certa hipertròfia al tibialis, com ho palesa un increment significatiu del 7% en el seu pes, no altera significativament ni la concentració, ni el seu contingut en proteïnes en cap fracció, llevat del contingut en proteïnes solubles. Tampoc es poden apreciar canvis notables en la maquinària enzimàtica estudiada, llevat de l'increment significatiu, un 37%, en els nivells de SDH. Tot i que el descens en els nivells de LDH ara és

més pronunciat que en el cas anterior, un 21%, continua sense ser significatiu. En aquest cas no vé acompanyat d'un descens pronunciat de l'indicador de la isoforma de miosina implicada en la contracció AK.

Cor

Els resultats que mostrem a continuació, demostren que l'obesitat genètica no altera el pes del cor en termes absoluts, però això no evita una certa hipotròfia si ho relativitzem pel pes d'animal.

La concentració de la proteïna total del cor és significativament incrementada en un 9%, però no sembla que l'obesitat genètica en modifiqui sensiblement els contiguts en proteïna tissular total. Aquestes variacions s'han d'atribuir a la fracció de proteïna que resta insoluble a baixes forces iòniques, ja que segueixen patrons de variació paral·lels. En canvi, la quantitat de proteïna solubilizable en aquestes condicions resta inalterada.

D'altra banda, el cor de les rates (fa/fa) incrementa el nivells de β -OAC i CK, sense variar les activitats específiques d'AK, SDH, ni de LDH

La dieta de cafeteria provoca un increment significatiu del 9% respecte dels animals primsen els pes del cor, la qual cosa el contingut en proteïna se'n veigi significativament augmentada en un 9%, com a conseqüència de l'increment tant en proteïna citosòlica com miofibril·lar. Quan analitzem les concentracions de proteïnes en les diferents fraccions, l'increment significatiu, 11%, en la fracció total s'ha de justificar a causa de l'augment en la concentració de proteïna miofibril·lar més que en la citosòlica.

La maquinaria enzimàtica analitzada no mostra canvis en el cas de l'adaptació a l'obesitat nutricional.

Taula.1 Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (*Caf*) sobre el pes, el contingut en proteïnes i les activitats enzimàtiques del soleus

Paràmetre	Grup		
	Con	<i>Caf</i>	<i>fa/fa</i>
Pes múscul	104±3	107±3	90.7±2.8 *
Proteïna Total (mg/g Teixit)	119±2	121±5	106±3 **
Proteïna Total (mg/Teixit)	12.1±0.7	13.6±0.4	9.58±0.36 *
Proteïna Soluble (mg/g Teixit)	27.6±0.7	28.5±0.8	27.8±0.7
Proteïna Soluble (mg/Teixit)	2.91±0.24	3.12±0.18	2.52±0.14
Proteïna No Soluble (mg/g Teixit)	91.8±3.8	92.2±4.6	77.5±2.8**
Proteïna No Soluble (mg/ Teixit)	9.32±0.58	10.03±0.52	7.09±0.07 *
Activitats Enzimàtiques	(µmol/min.mgprot)		
Lactat deshidrogenasa	1.41±0.12	1.47±0.27	1.86 ±0.42
Succinat deshidrogenasa	0.16±0.02	0.28±0.03 **	0.26±0.01 **
β-oxoacil-CoA deshidrogenasa	0,54±0,06	0.62±0.04	0.62±0.04
Creatina Quinasa	26.9±1.8	21.8±1.1	37.2±2.9 *
Adenosina Quinasa	4.12±0.33	4.48±0.46	4.66±0.48

Els valors són mitjanes ± S.E.M 6-8 animals. *, ** indiquen diferències significatives ($P < 0,05$, $P < 0,01$ respectivament) dels grups *Caf* o FA respecte del Grup Con quan es comparen les mitjanes mitjançant el test de la t d'Student.

Taula. 2 Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (*Caf*) sobre el pes, el contingut en proteïnes i les activitats enzimàtiques del gastrocnemius

Paràmetre	Grup		
	Con	<i>Caf</i>	<i>fa/fa</i>
Pes múscul	1642±38	1778±32 *	1353±15 ***
Proteïna Total (mg/g Teixit)	135±3	146±2**	147±2 **
Proteïna Total (mg/Teixit)	222±8	259±4 **	199±9 *
Proteïna Soluble (mg/g Teixit)	30.1±0.9	29.8±0.8	30.6±0.7
Proteïna Soluble (mg/Teixit)	48.3±1.8	52.7±2.1	39.7±0.8**
Proteïna No Soluble (mg/g Teixit)	105±4	115±3	116±8
Proteïna No Soluble (mg/ Teixit)	174±5	206±5**	159±5*
Activitats Enzimàtiques	(µmol /min.mgprot)		
Lactat deshidrogenasa	3.77±0.28	4.08±0.38	4.12±0.41
Succinat deshidrogenasa	0.11±0.01	0.18±0.02**	0.14±0.01*
β-oxoacil-CoA deshidrogenasa	0.47±0,02	0.66±0.05**	0.58±0.03*
Creatina Quinasa	59.8±5.7	62.8±5.9	85.1±3.6**
Adenosina Quinasa	4.68±0.16	5.03±0.28	4.29±0.62

Els valors són mitjanes ± S.E.M 6-8 animals. *, **, *** indiquen diferències significatives (P< 0,05, P<0,01 i P<0,001 respectivament) dels grups *Caf* o *fa/fa* respecte del grup control (Con) quan es comparen les mitjanes mitjançant el test de la t d'Student.

Taula.3 Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (*Caf*) sobre el pes, el contingut en proteïnes i les activitats enzimàtiques del tibialis

Paràmetre	Grup		
	Con	<i>Caf</i>	<i>fa/fa</i>
Pes múscul	540±10	582±8 *	434±8 ***
Proteïna Total (mg/g Teixit)	139±7	143±5	142±4
Proteïna Total (mg/Teixit)	75.1±4.7	82.8±3.3	61.7±1.8 *
Proteïna Soluble (mg/g Teixit)	25.0±0.5	25.4±0.6	26.1±0.3
Proteïna Soluble (mg/Teixit)	13.3±0.28	14.7±0.37 *	11.3±0.19 ***
Proteïna No Soluble (mg/g Teixit)	114±8	118±5	116±4
Proteïna No Soluble (mg/ Teixit)	61.9±2.8	68.6±3.2	49.8±1.7 **
Activitats Enzimàtiques	(µmol/min.mgprot)		
Lactat deshidrogenasa	4.08±0.37	3.22±0.41	3.64±0.33
Succinat deshidrogenasa	0.15±0.01	0.24±0.03 *	0.20±0.02*
β-oxoacil-CoA deshidrogenasa	0.20±0.01	0.19±0.02	0.27±0.01***
Creatina Quinasa	62.1±5.9	66.8±5.1	55.7±3.6
Adenosina Quinasa	7.22±0.17	6.73±0.62	5.18±0.55*

Els valors són mitjanes ± S.E.M 6-8 animals. *, **, *** indiquen diferències significatives (P< 0,05, P<0,01 i P<0,001 respectivament) dels grups *Caf* o *fa/fa* respecte del grup control (Con) quan es comparen les mitjanes mitjançant el test de la t d'Student.

Taula 4. Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (*Caf*) sobre el pes, el contingut en proteïnes i les activitats enzimàtiques del cor.

Paràmetre	Grup		
	Con	<i>Caf</i>	<i>fa/fa</i>
Pes múscul	869±20	949±7 **	888±23
Proteïna Total (mg/g Teixit)	103±2	113±3 *	113±5 *
Proteïna Total (mg/Teixit)	90.2±4	107±3 **	100±3
Proteïna Soluble (mg/g Teixit)	25.7±0.8	25.8±0.6	26.6±0.9
Proteïna Soluble (mg/Teixit)	21.6±0.9	24.0±0.4 *	23.2±0.9
Proteïna No Soluble (mg/g Teixit)	77.1±1.8	87.3±2.1**	86.9±3.8*
Proteïna No Soluble (mg/ Teixit)	67.9±2.9	83.2±2.8**	76.5±3.1
Activitats Enzimàtiques	(µmol/min.mgprot)		
Lactat deshidrogenasa	2.51±0.32	2.09±0.29	2.04±0.12
Succinat deshidrogenasa	0.33±0.04	0.34±0.04	0.34±0.03
β-oxoacil-CoA deshidrogenasa	1.68±0.09	1.89±0.12	2.23±0.08**
Creatina Quinasa	10.8±0.9	10.4±0.7	18.2±1.9**
Adenosina Quinasa	4.18±0.29	4.41±0.42	3.69±0.31

Els valors són mitjanes ± S.E.M 6-8 animals. *, **, *** indiquen diferències significatives (P< 0,05, P<0,01 i P<0,001 respectivament) dels grups *Caf* o *fa/fa* respecte del grup control (Con) quan es comparen les mitjanes mitjançant el test de la t d'Student.

A tall de resum, i per a tenir una visió més global, es mostren les variacions percentuals dels diferents paràmetres en ambdós tipus d'obesitat respecte del que succeeix en animals control.

Taula 5. Percentatge de variació dels paràmetres musculars en la obesitat genètica i nutricional respecte dels animal prims.

PROTEÏNA MUSCULAR	Caf				<i>falfa</i>			
	Cor	Tib	Gast	Sol	Cor	Tib	Gas	Sol
Pes corporal	+21				+34			
Múscul	Cor	Tib	Gast	Sol	Cor	Tib	Gas	Sol
Pes	+9	+8	+8	+3	+2	-18	-13	-20
Proteïna Total	+11	+8	+8	+3	+9	-17	-11	-21

ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES EN MÚSCULS INDIVIDUALS

Múscul	Caf				<i>falfa</i>			
	Cor	Tib	Gast	Sol	Cor	Tib	Gast	Sol
Lactat deshidrogenasa	+16	+21	+7	+6	-20	-12	+7	+26
Succinat deshidrogenasa	0	+37	+38	+42	0	-25	+22	+39
β -Oxoacil-CoA deshidrogenasa	+10	-5	+29	+13	+23	-26	+20	+13
Creatina Quinasa	-6	+7	+7	-18	+39	-8	+29	+28
Adenosinaa Quinasa	+4	-6	+6	+8	-12	-28	-8	+12

Els valors representen la diferència entre mitjanes , en tant per cent , respecte de llurs controls. Quan aquesta diferència fou significativa (test de la t d'Student, $p < 0,05$), s'ha ressaltat el valor amb negreta.

4.3.2 Canvis estructurals en músculs d'animals amb obesitat nutricional i genètica.

En les pàgines 116 a 121 mostrem una micrografia electrònica per cada múscul i grup acompanyat d'un breu comentari qualitatiu de les principals variacions observades. Hom pot arguir que els efectes observats són resultat d'artefactes produïts en el protocol de fixació. Tant mateix, si ho són indicaran una susceptibilitat diferent de les mostres procedents dels grups objecte de l'estudi respecte dels controls, en tant que, en ells, aquests artefactes esdevenen amb més profusió i espectacularitat.

Entre músculs dels animals prims s'observen més alteracions en músculs amb majoria de fibra ràpides i glicolítiques (Gastrocnemius blanc, E.D.L., Tibialis), que en el cas dels músculs amb predominància de fibres lentes i oxidatives (Gastrocnemius vermell i Soleus): les dilatacions en el reticle sarcoplasmàtic i les "balonitzacions" en mitocondris, tot i que només visible en el tibialis, són més freqüents en en els primers tipus de músculs que no pas en el segon.

Soleus

Els soleus dels animals obesos nutricionalment presenten localment mitocondris més inflats (dupliquen el tamany) i de forma irregular, inclusions lipídiques més grans i freqüents, i un reticle sarcoplasmàtic quelcom més dilatat que els dels animals control. En el sarcòmer s'observa una major desestructuració, en tant que són més freqüents les absències ("gaps") al disc-Z i el seu serpenteig ("streaming"), més acusat.

Pel que fa a l'obesitat genètica s'observen alteracions més greus en els mitocondris, en tant que s'observen "balonitzacions": mitocondris inflats i carents de crestes. Donat que aquestes "balonitzacions" no són generalitzades i que l'àrea escombrada per la fotografia és molt petita, no les podem atribuir a un retard en l'arribada del fixador (glutaraldèhid), en tant que això no explicaria ell fet que altres mitocondris situats a 1µm de distància estan en estat correcte. No s'observen amb tanta freqüència inclusions lipídiques i, per contra sí

acúmuls de glicògen més freqüents. En els sarcòmers, el serpenteig i les absències del disc-Z són més freqüents en aquest grup. Els soleus dels obesos genètics té un aspecte general de major desorganització, coincident amb la constatació de la seva superior fragilitat en la dissecció.

Extensor Digitalis Longus

Els E.D.L. dels animals obesos nutricionalment presenten localment mitocondris més inflats (dupliquen el tamany) i de forma irregular, un reticle sarcoplasmàtic més dilatat que els dels animals control. En el sarcòmer s'observa una desestructuració prou evident, en tant que són força freqüents les absències ("gaps") al disc-Z i el seu serpenteig ("streaming"), més acusat.

Pel que fa a l'obesitat genètica s'observen alteracions més greus en els mitocondris, en tant que localment s'observen "balonitzacions" força evidents. Els acúmuls de glicògen són molt freqüents, fins el punt que enmascaren inflamacions del reticle. En els sarcòmers, el serpenteig i les absències del disc-Z no són obvis en aquest grup. Contràriament al que esdevenia amb el soleus, l'aspecte general no és de major desorganització.

Gastrocnemius vermell

Les seccions de Gastrocnemius, extrems del fascicle vermell, procedents dels animals obesos nutricionalment presenten localment mitocondris més inflats (dupliquen el tamany) i de forma irregular, a l'hora que el reticle sarcoplasmàtic és més dilatat que els dels animals control. Les inclusions lipídiques són més grans i freqüents, tot i que no manca glicògen. En el sarcòmer s'observa una certa desestructuració, en tant que són més freqüents les absències ("gaps") al disc-Z i el seu serpenteig ("streaming"), més acusat.

Pel que fa a l'obesitat genètica s'observen alteracions més greus en els mitocondris, en tant que localment s'observen "balonitzacions" força evidents. Els acúmuls de glicògen són molt freqüents, No són evidents les inflamacions del reticle. En els sarcòmers, el serpenteig i les

absències del disc-Z no són obvis en aquest grup. L'aspecte general no és de major desorganització.

Gastrocnemius Blanc

Les seccions de Gastrocnemius, extremitats del fascicle blanc, procedents dels animals obesos nutricionalment presenten localment mitocondris balonitzats i inflamats, el reticle, tot i estar dilatat no ho està més que els dels gastrocnemius blancs animals controls. Els acúmuls de glicògen són més freqüents. En el sarcòmer s'observa una major desestructuració, en tant que són més freqüents les absències ("gaps") al disc-Z i el seu serpenteig ("streaming"), més acusat.

Pel que fa a l'obesitat genètica també s'observen localment mitocondris, balonitzats. Tot i que l'aspecte general és de menor desorganització.

Tibialis

Els Tibialis procedents dels animals obesos nutricionalment presenten localment mitocondris inflamats però no "balonitzacions", com en el cas dels animals prims. El reticle sarcoplasmàtic és força dilatat. Les acumulacions importants de glicògen que s'observen en tibialis d'animals prims, no s'observen en els dels sotmesos a dieta de cafeteria. En el sarcòmer s'observen desestructuracions locals importants, en tant que hi han absències locals de totes les bandes. En les zones no desestructurades, el serpenteig del disc-Z és més acusat que en els controls.

Pel que fa a l'obesitat genètica també s'observen mitocondris inflamats, i un reticle sarcoplasmàtic més dilatat que en els animals controls. En el sarcòmer, s'aprecien desestructuracions locals importants, en tant que, localment, les bandes estan difuminades, amb alguna desaparició del Disc-Z. El serpenteig d'aquest és força acusat.

Cor

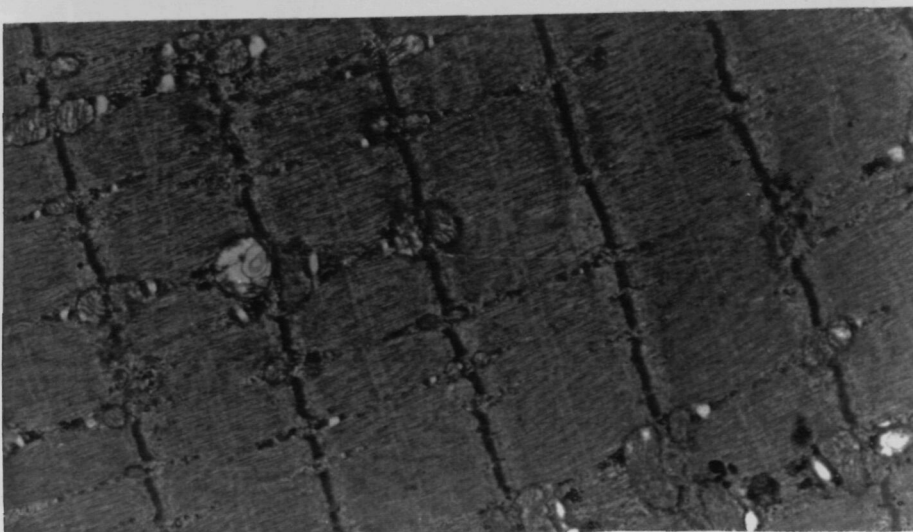
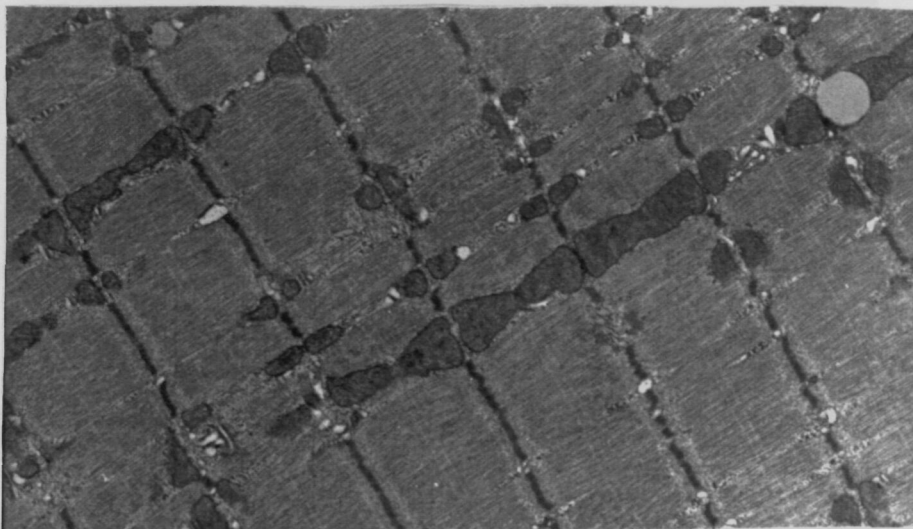
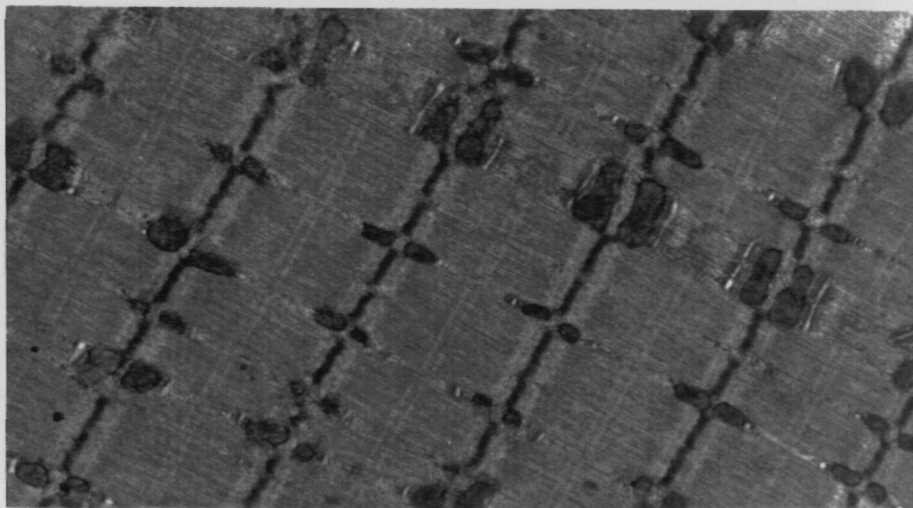
Els cors procedents dels animals obesos nutricionalment no presenten alteracions remarcables en els mitocondris. Com en els

animals prims, s'observen incusions lipídiques. En el sarcòmer, tampoc s'observen alteracions remarcables.

L'efecte més apreciable de l'obesitat genètica en els cors n'és la "balonització" i la degeneració de crestes en els mitocondris. No s'observa una desestructuració especialment remarcable dels sarcòmers.

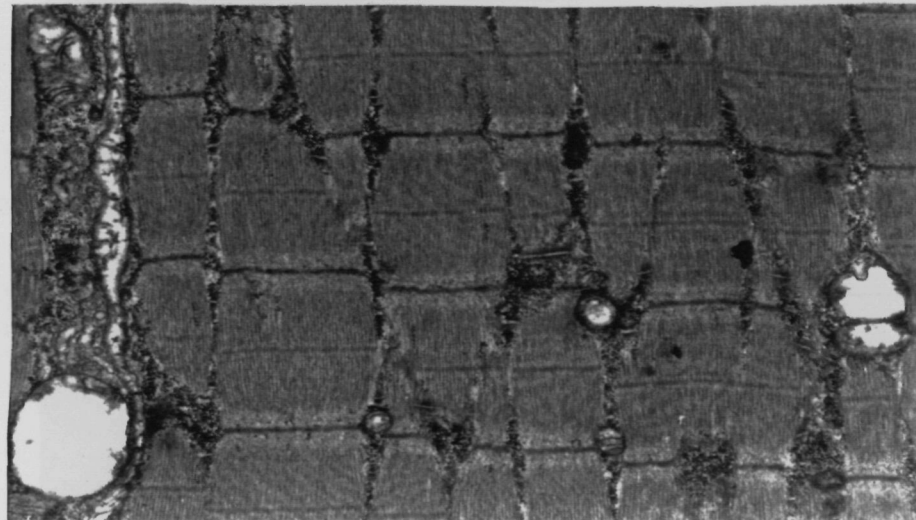
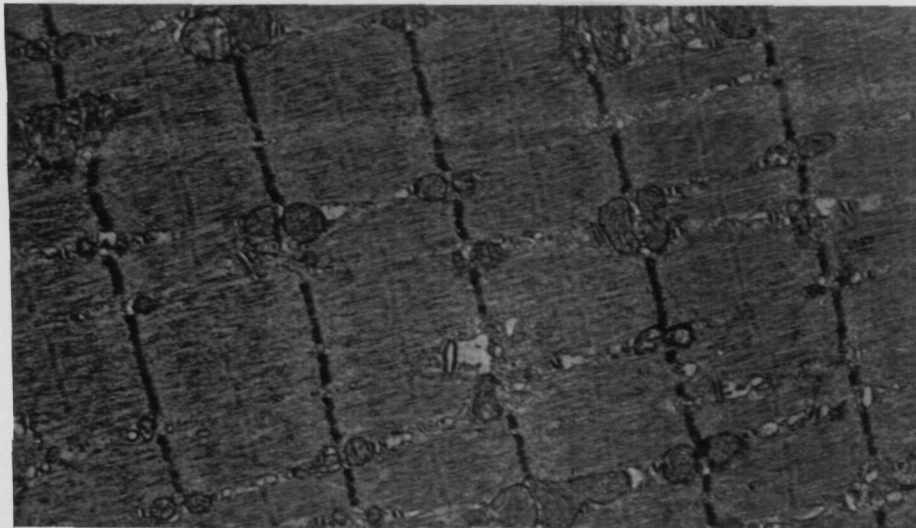
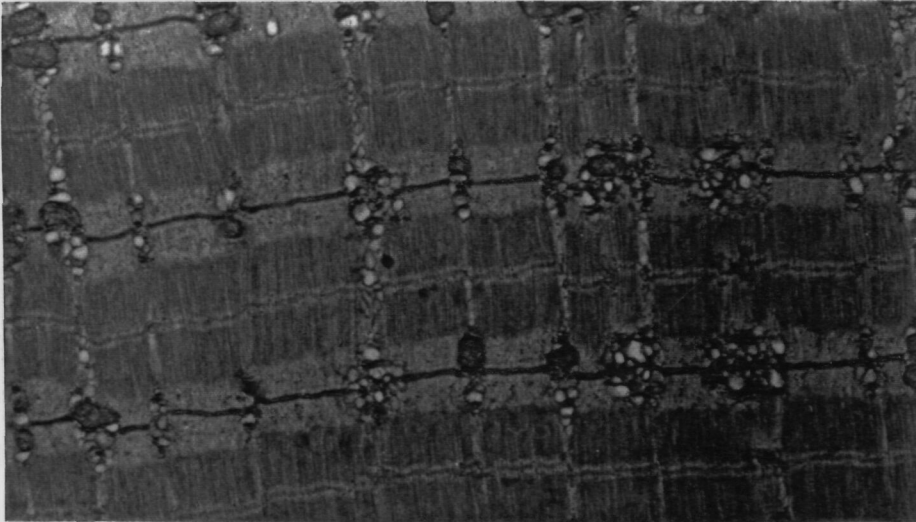
Soleus

(Les fotografies estan ordenades d'adalt a baix per aquest ordre: Grup Control, Grup Cafeteria, Grup *fa/fa*. Les magnificacions són d'un factor X3000)



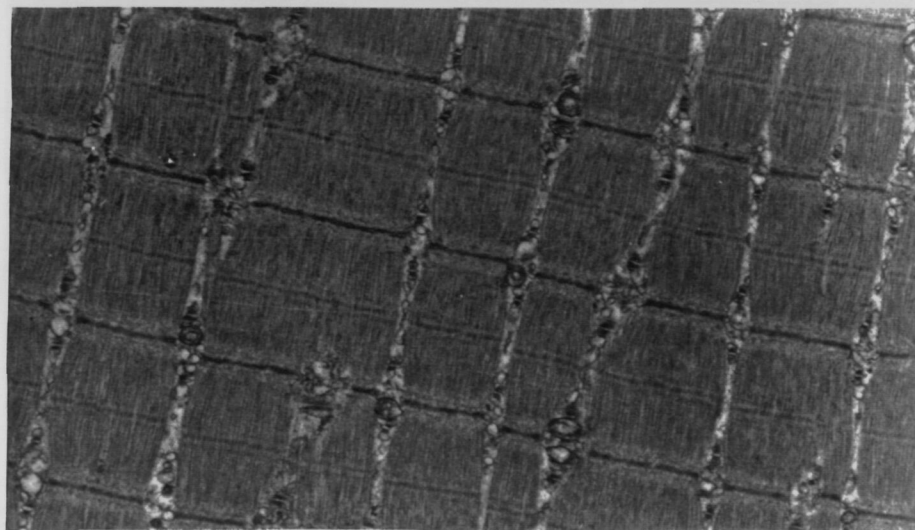
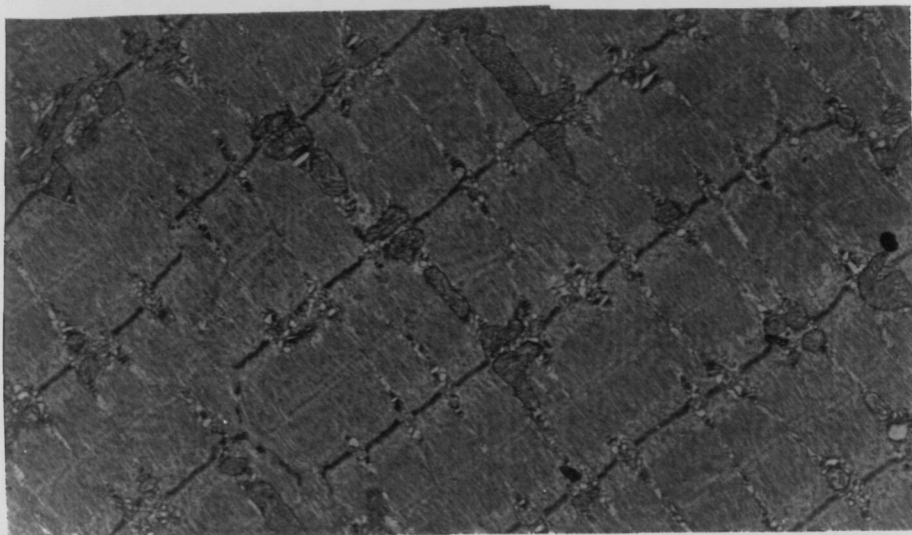
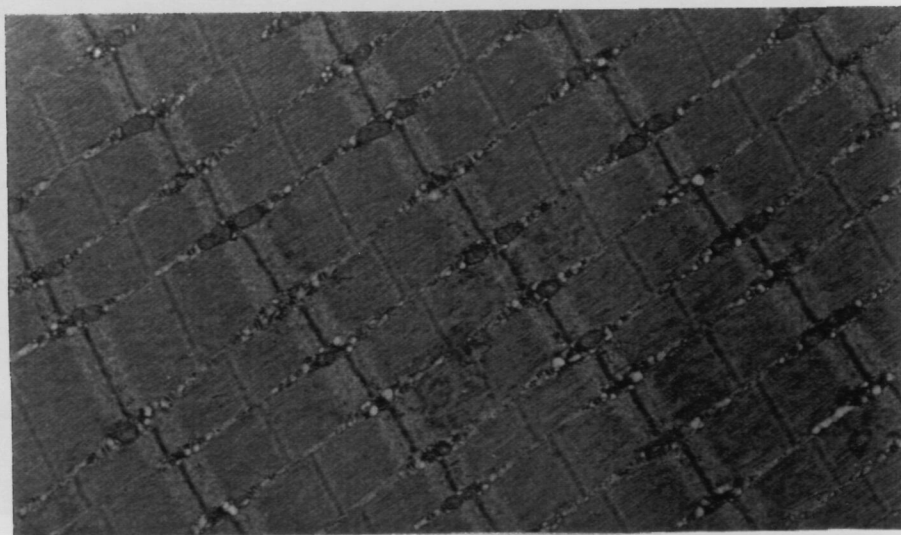
Extensor Digitalis Longus

(Les fotografies estan ordenades d'adalt a baix per aquest ordre: Grup Control, Grup Cafeteria, Grup *fa/fa*. Les magnificacions són d'un factor X3000)



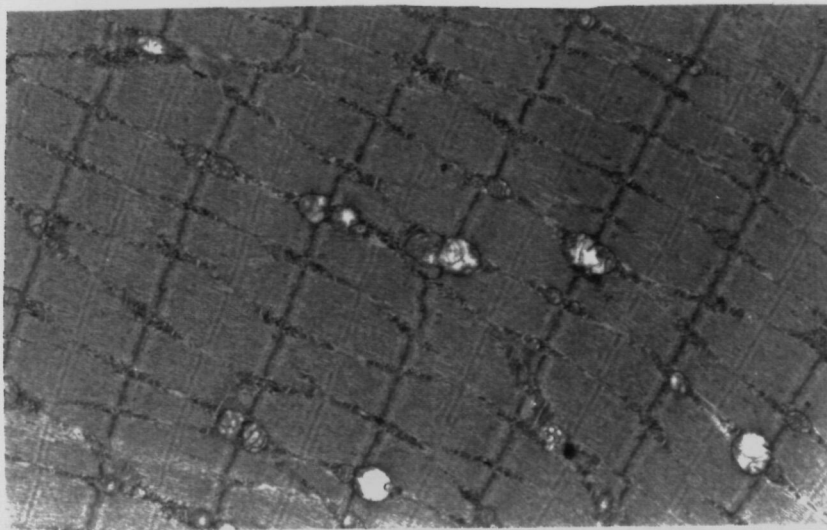
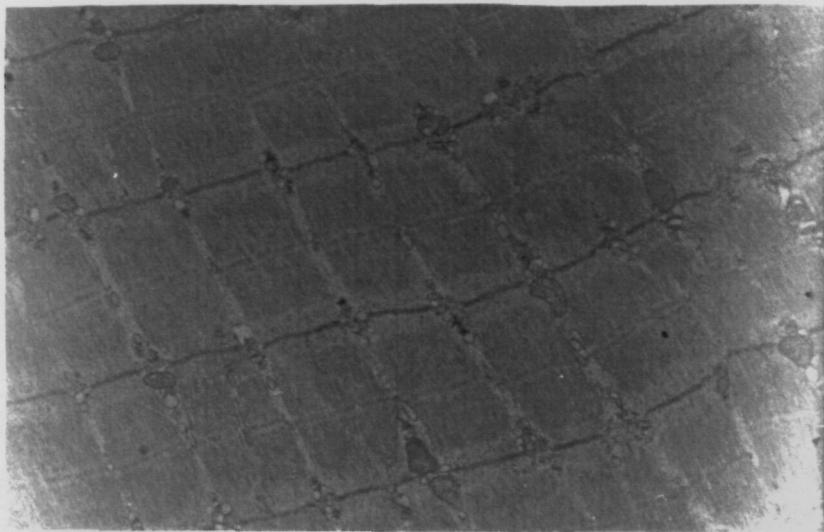
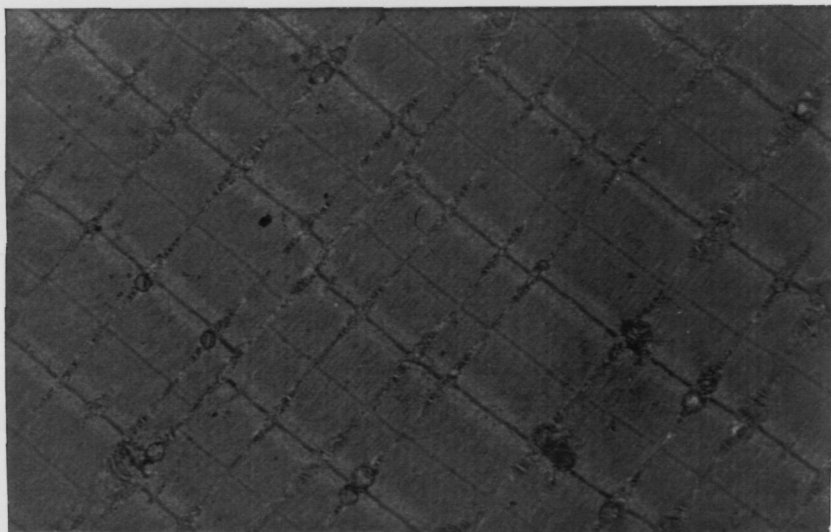
Gastrocnemius vermell

(Les fotografies estan ordenades d'adalt a baix per aquest ordre: Grup Control, Grup Cafeteria, Grup fa/fa. Les magnificacions són d'un factor X3000)



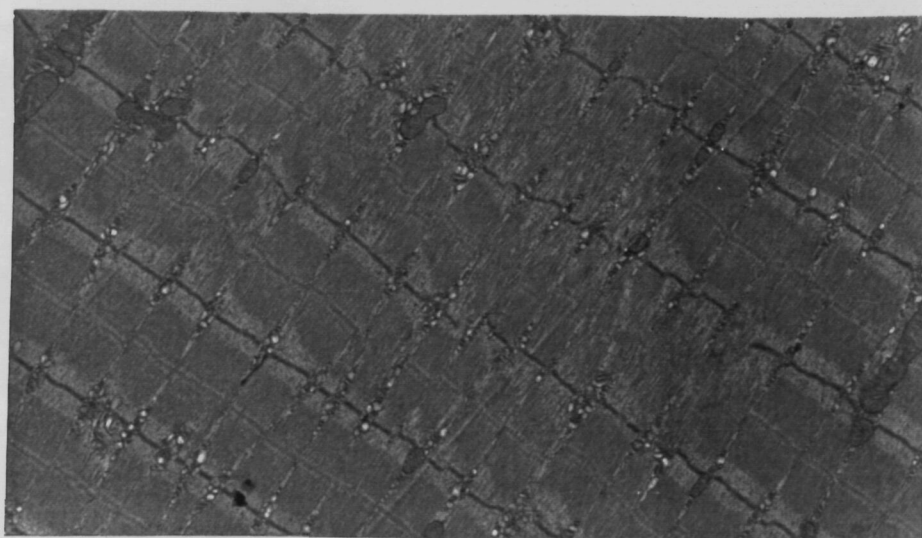
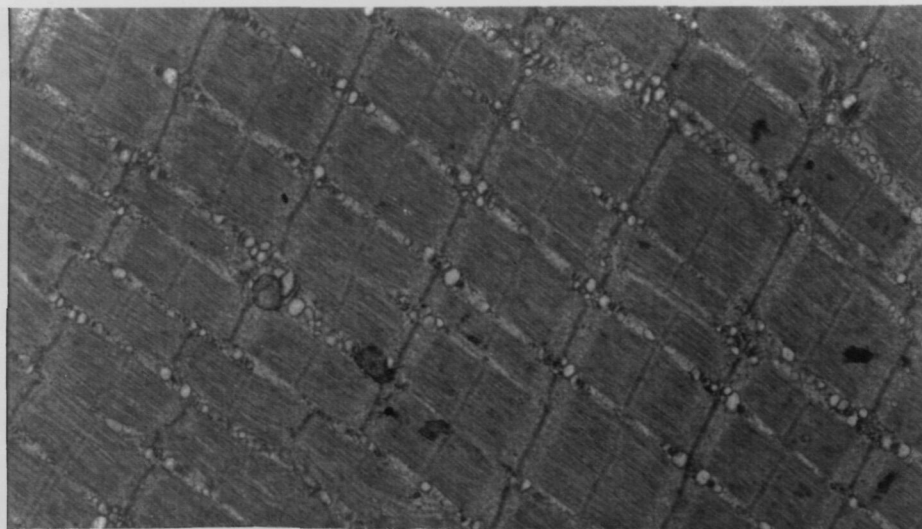
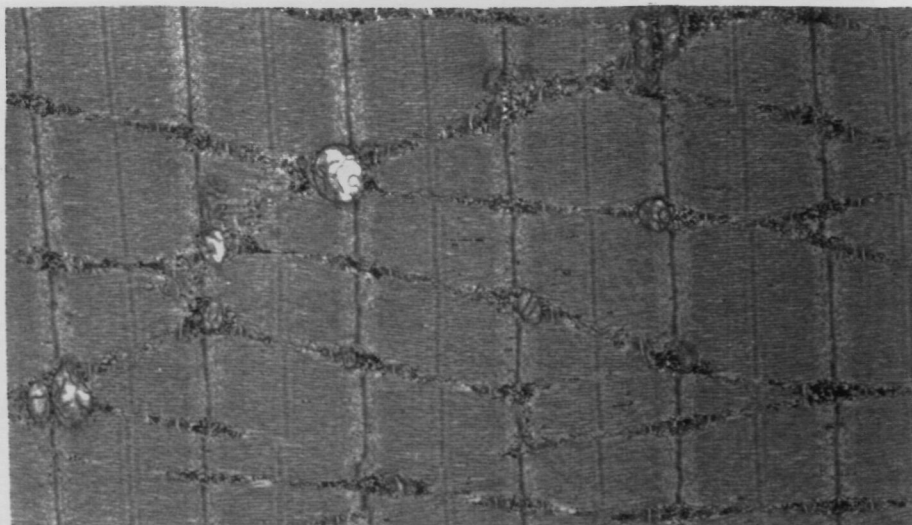
Gastrocnemius Blanc

(Les fotografies estan ordenades d'adalt a baix per aquest ordre: Grup Control, Grup Cafeteria, Grup *fa/fa*. Les magnificacions són d'un factor X3000)



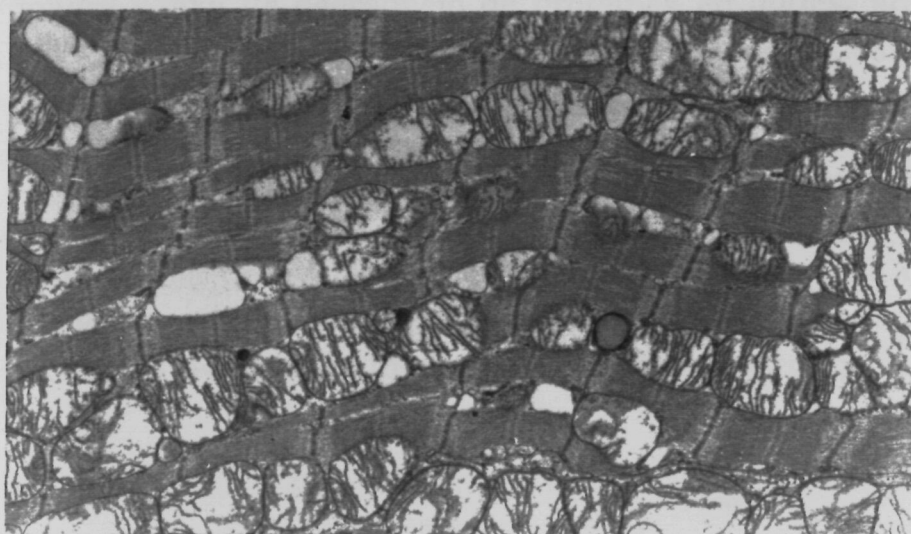
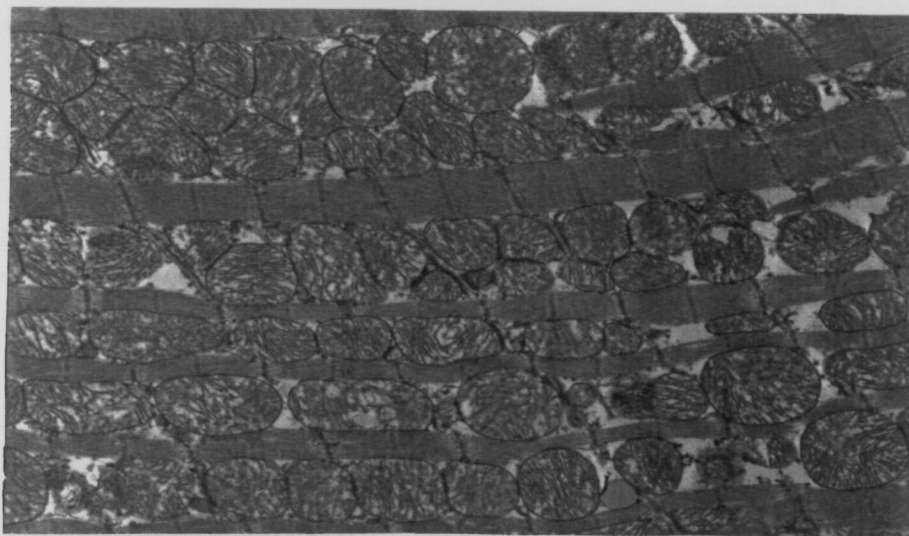
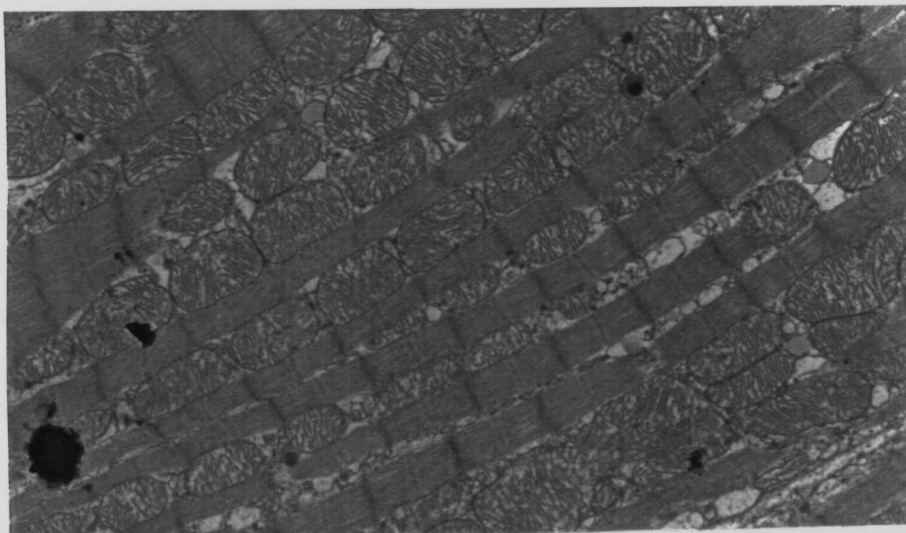
Tibialis

(Les fotografies estan ordenades d'adalt a baix per aquest ordre: Grup Control, Grup Cafeteria, Grup *fa/fa*. Les magnificacions són d'un factor X3000)



Cor

(Les fotografies estan ordenades d'adult a baix per aquest ordre: Grup Control, Grup Cafeteria, Grup *fa/fa*. Les magnificacions són d'un factor X3000)



4.4. Discussió

4.4.1. Efecte de l'obesitat genètica i nutricional en la massa, contingut proteic i activitats enzimàtiques en músculs.

Pel que fa als antecedents sobre el metabolisme de proteïnes a l'obesitat, sembla haver-hi una certa discrepància en els resultats, després d'una primera lectura. És per això que s'han elaborat els següents quadres sinòptics, en un intent de destriar les variables que poden afectar al metabolisme de proteïnes, i agrupar els resultats de manera uniforme. S'han agrupat els resultats segons el model d'obesitat que s'estudia, i s'ha esmentat, sempre que ha estat possible, la soca, l'edat, la dieta, el pes, el sexe, el tractament (en el cas dels models d'obesitat adquirida) i la duració d'aquest. Per altra banda, també s'esmenta la metodologia emprada per a la determinació dels diferents paràmetres. En el cas que no s'esmenti altra cosa s'entendrà que la dieta és pinso control ad libitum, i la metodologia per a la determinació de proteïnes és la de determinació de N amínic (Kjeldahl). D'ells es pòden extreure les següents conclusions:

Pel cas de l'obesitat genètica que palesen les rates Zucker (fa/fa), tot i que els resultats són discrepants quan es refereixen a animal sencer (quadre 1), les discrepàncies semblen provenir a causa dels factors edat i sexe. Els resultats més homogenis provenen del subgrup de resultats provinent de determinacions en mascles d'edat superior a les 8 setmanes i inferior als nou mesos alimentats ad libitum amb pinso control. Tantmateix, no es pot ser categòric en aquesta afirmació ja que, mentre que hi ha un gran acord pel que fa a l'efecte de l'obesitat respecte del contingut proteic corporal, pes de la massa magra i taxa de degradació de proteïnes en aquest subgrup, aquesta situació no es dona respecte de la velocitat de deposició de proteïnes i la taxa de síntesi de proteïnes.

Els resultats, pel que fa a músculs individuals (quadre 2) provinents de rates d'aquesta soca, semblen més homogenis, com a mínim els dels extrems de les extremitats inferiors, reflectint-ne un menor pes i menor contingut en proteïnes, éssent la concentració de proteïnes igual (als 44 dies) o inferior (als 72 dies), en comparació amb el que

succeeix al fenotipus no mutant. D'altra banda, no s'han trobat diferències entre fenotips per raó del sexe. Les possibles discrepàncies provenen del factor edat: just després del deslletament, i en edats avançades (52 setmanes) no es veuen diferències en contingut de proteïna i pes dels músculs, mentre que en els inicis de la maduresa sexual (8-9 setmanes) es fan paleses les diferències esmentades. A aquesta edat es detecten unes taxes de recanvi de proteïnes disminuïdes en tots els músculs de les extremitats inferiors de les rates obeses, atribuïble, en el soleus, a una disminució en la taxa de síntesi, més que a variacions en la de degradació. Cal matisar, com ho fa l'autor, que la taxa de síntesi s'ha obtingut per mesura de la taxa d'incorporació de ^{14}C -Tyr en músculs incubats, els quals presenten un règim catabòlic incrementat. Per mesura de la velocitat d'alliberament de ^{14}C -Tyr a un medi lliure d'aquest amino àcid se n'ha obtingut la taxa de degradació. Per una altra banda aquest es pren actualment com a índex de la proteolisi total, incloent la proteïna no miofibril·lar (Hasselgren 1989). És per això que aquest resultat s'ha de prendre amb precaució a l'hora de correlacionar-ho amb variacions en el contingut de proteïnes musculars, majoritàriament miofibril·lars. Per exemple, Hasselgren (1989) en EDL en situació de sepsis ha trobat una variació del 58% en la taxa de degradació de proteïnes, emprant ^{14}C -Tyr com a índex, essent del 103% en emprar 3-MH com a índex, de manera anàloga succeeix amb la reducció en la taxa de degradació provocada per la incubació del múscul en medis suplementats amb insulina. L'autor conclou que la degradació del pools miofibril·lar i no-miofibril·lar estan regulats independentment, essent més sensible el pool miofibril·lar als canvis metabòlics.

En analitzar els resultats dels efectes de l'obesitat nutricional sobre el contingut en proteïna muscular (Quadre 3), hom podria esperar força heterogeneïtat, car a les variables sexe, edat i dieta, se n'afegeixen la duració de la dieta, el moment en que es comença el tractament i la soca que s'ha emprat. Sorprenentment els resultats són força homogenis, sobre tot dins el grup de rates sotmeses a dieta de cafeteria. Així podem dir que en rates zucker (fa/?) sotmeses a dieta de cafeteria de més de 15 dies augmenta la seva massa magra, degut a un increment en el contingut de proteïna muscular. D'aquest

tractament nutricional, no s'ha pogut recopilar cap resultat de músculs individuals tot i que en l'estremitat inferior Prats et al(1986). ja detectaren en rates sotmeses a 50 dies de dieta de cafeteria un increment en la concentració de proteïna associada a una disminució de la concentració d'aigua i un increment en la de lípids, aquests resultats són congruents amb les evidències d'una síntesi de proteïna incrementada (Zamora, 1988) (Estornell et al., 1994). Resulta interessant destacar la hipertròfia que es relata en el cor en aquesta situació, tot i que la seva proporció respecte del pes de l'animal es veu disminuïda (Prats et al, 1986) .

En altres models d'obesitat (Quadre 4.) sembla haver-hi un cert acord: La massa magra i el contingut en proteïna corporal disminueix com a conseqüència de l'obesitat genètica en ratolins (ob/ob), en rates sotmeses a lesió hipotalàmica ventromedial i a injeccions de glutamat monosòdic, sense variar la concentració de proteïnes. Cal destacar aquí el resultat de Bertran et al., segons els quals això també succeeix a cors d'animals sotmesos a injeccions de glutamat monosòdic. Els resultats a ratolins (ob/ob) apunten a descens en la velocitat de deposició de proteïnes com a conseqüència d'un augment en la taxa de degradació de proteïnes, tant emprant com indicador l'excreció de 3-MH, com quan s'analitzen els nivells de proteases alcalines miofibril·lars.

Per últim, els resultats en humans (quadre 5)., tot i majoritàriament només s'han trobat dades provinents d'un sexe, les quals , tot i les controvèrsies sobre la metodologia adequada per a la determinació del L.B.M., semblen apuntar també a un augment en la taxa de degradació en individu sencer.

Referència	Dieta	Edat Pes	Sexe	Massa Magra	Proteïna Corporal	Velocitat de deposició de proteïna	Índex de síntesi de Proteïna	Índex de degradació de Proteïna
Pullar & Webster (1974)	Ingesta equiparada	200 - 350g	♂ vs con ♀	↓	↓	N(retenció)		
Radcliffe & Webster (1976)	≠ proteïna (qualitat)		♀	=	=			
Pullar & Webster (1977)		200 - 350g	♂		↓	N(retenció)	= N(retenció) vs proteïna corporal	
Bell & Stern (1977)		16 dies			=			
Radcliffe & Webster (1978)	≠ proteïna (quantitat)	66 dies	♂, ♀	↓, =	↓, =	↓, ↓	=	
Lobley et al. (1978)		200g	♂	↓	↓	↓	=	↓ 3-MH
Hartsook et al. (1978)		21 setmanes	♂					
Radcliffe & Webster (1979)		Deslle- ment	♀	=	=	= N(retenció)	=	
Dunn et al. (1980)		8, 17 setmanes	♂	=, ↓	=, ↓			↓ 3-MH 8 setmanes
Cleary et al. (1981)	Ingesta equiparada			↓	↓			
Reeds et al. (1982)		18, 25 dies			=, ↓	↓, =	↓, = (3HPhe)	*
Chan et al. (1982)		5 setmanes			↓	↓		
Dunn et al. (1982)		25 setmanes			↓	=	↓	↓ 3-MH
Wardlaw et al. (1984)		6 setmanes	♂		=			
Demes et al. (1990)		9 mesos	♂		=			
Esteve et al. (1992)		30, 45, 60 dies	♀		↓ N Anàlitz Elementa	↓ N Anàlitzor Elemental		
Rafecas et al. (1994)		30, 45, 60 dies	♀		↓ N Anàlitz Elementa	↓ N Anàlitzor Elemental		

S'han agrupat els resultats segons el model d'obesitat que s'estudia, i s'ha esmentat, sempre que ha estat possible, la soca, l'edat, la dieta, el pes, el sexe. Per altra banda, també s'esmenta la metodologia emprada per a la determinació dels diferents paràmetres. En el cas que no s'esmenti altra cosa s'entendrà que la dieta és pinso control ad libitum, i la metodologia per a la determinació de proteïnes és la de determinació de N amínic (Kjeldahl).

Quadre 2. Contingut de proteïna i recanvi en múscul individual de rata Zucker fa/fa.

Referència	Observacions	Pes del Múscul	Proteïna Tisular	Concentració de Proteïna	Creixement i Turnover de Proteïna	Síntesi de Proteïna	Degradació de Proteïna
Shapiro et al. (1980)	♂ Ingesta: equiparada. Edat: 15 setm	Gastrocnemius ↓	↓	=		Soleus ↓	Soleus =
Durschlag et al. (1983)	♂, ♀ No es trobaren diferències entre fenotips per raó del sexe.	Soleus =, ↓ Gastrocnemius, Plantaris, EDL ↓, ↓		Soleus, Gastrocnemius EDL = Edat: 44 d. (Lowry)	Creixement: ↓ en tots els músculs Turnover Soleus ↓	Soleus ↓ Assaig in Vitro 14C-Tyr Edat: 44 dies	Soleus = Assaig in Vitro 14C-Tyr Edat: 44 dies
Lanza-Jacobi et al. (1984)	♂, ♀ Edat: 44, 72 d.	Biceps B. =, = Gastrocnemius 3 S. =	Gastrocnemius 3 S. =	Gastrocnemius 3 S. = (*)			
(*) Les diferències en concentració de proteïnes s'observaren en les fraccions: Total, estromal, sarcoplasmica i miofibril·lar	No es trobaren diferències entre fenotips per raó del sexe. Edat: 3, 8, 52 setmanes	8S. ↓ 52S. =	8S. ↓ 52S. ↓	8S. ↓ 52S. ↓ (Lowry)			
Wardlaw et al. (1984)	♂ Edat: 6 setmanes	Soleus, EDL ↓	Soleus, EDL =				
Glore et al. (1992)	♂ Edat: 9-12 mesos	Soleus, Gastroc., Plantaris, Biceps B. ↓ Cor ↓					

S'han agrupat els resultats segons el model d'obesitat que s'estudia, i s'ha esmentat, sempre que ha estat possible, la soca, l'edat, la dieta, el pes, el sexe. Per altra banda, també s'esmenta la metodologia emprada per a la determinació dels diferents paràmetres. En el cas que no s'esmenti altra cosa s'entendrà que la dieta és pinso control ad libitum, i la metodologia per a la determinació de proteïnes és la de determinació de N amoniac (Kjeldahl).

Quadre 3. Proteïna corporal i el seu recanvi en obesitat nutricional.

Referència	Dieta	Estat Pes	Sexe	Soca	Massa Magra	Proteïna Corporal	Pes Múscul	observacions
Schemmel et al. (1969)	Hiperlipídica 100-450 dies	20-460 dies Igual pes	♂, ♀	Osborne-Mendel		= fins 100 dies ↓ 100-460 dies		No es trobaren diferències entre sexes
Rothwell & Stock (1979)	Cafeteria 21 dies	Adults	♂	Sprague-Dawley	=	↑	Total ↑ Creatinina Urinària	El descens de la massa magra l'atribueix a la massa visceral,
Cunningham et al (1983)	Cafeteria 4 setmanes	10-14 setmanes	♂	Sprague-Dawley	↓			
Barr et al (1984)	Cafeteria					↑ N retenció		
Prais et al (1986)	Cafeteria 50 dies	71 dies	♂	Wistar		↑ Múscul (pota)		*Descens en contingut d'aigua
Zamora (1988)	Cafeteria 12 setm.	200g	♀	Wistar				Múscul ↑ Captació 2-aminobutirat Múscul =
Gianotti et al (1990)	Cafeteria 3 mesos Dejuni de 24 h	3 mesos	♀	Wistar				Incorporació 14C-Alanina
Esteve et al. (1992)	Cafeteria 15-30 dies	45,60 dies	♀	Wistar		=, = N Anàlitzador Elemental		
Esteve et al. (1992)	Cafeteria 15-30 dies	45,60 dies	♀	Zucker (FA?)		↑, = N Anàlitzador Elemental	=	
Esteve et al. (1994)	Cafeteria 15-30 dies	45,60 dies	♀	Wistar	↑, ↑, estimació	=, ↑ N Anàlitzador Elemental		
Rafecas et al. (1994)	Cafeteria 15-30 dies	45,60 dies	♀	Zucker (FA?)	↑, ↑, estimació	↑, ↑, N Anàlitzador Elemental		
Rozen et al (1994)	Cafeteria 34, 93 d.	84, 143 dies	♂	Wistar	=, =, estimació			
Kim et al (1994)	Hiperlipídica 10 set.	14 setmanes	♂	Sprague-Dawley			Soleus =	
Estornell et al. (1994)	Hiperlipídica 21 dies	160-180	♂	Wistar		↑ En tots els teixits analitzats.	↑ Gastrocnemius i tibialis	Síntesi ↑ Gastrocnemius i tibialis 14C-Phe

S'han agrupat els resultats segons el model d'obesitat que s'estudia, i s'ha esmentat, sempre que ha estat possible, la soca, l'edat, el sexe, el tractament i la durada d'aquest. Per altra banda, també s'esmenta la metodologia emprada per a la determinació dels diferents paràmetres. En el cas que no s'esmenti altra cosa s'entendrà que la dieta és pinso control ad libitum, i la metodologia per a la determinació de proteïnes és la de determinació de N

Quadre 4. Proteïna corporal i el seu recanvi en altres models d'obesitat.

Referència	Edat Pes	Sexe	Espècie Soca / tractament	Massa Magra	Proteïna Corporal	Velocitat de deposició de proteïna	Taxa de Síntesi de Proteïna	Taxa de degradació de Proteïna
Chloverakis et al (1972)	Adults	♂	Ratolí ob / ob C57 BL / 6J		↓			
Bergen et al (1975)	Adults	♂	Ratolí ob / ob C57 BL / 6J			↓ a extremitats inferiors		
Goldman (1976)	Lactants		Rata. Lesió Hipotàlmica Ventruncudial		↓			
Trosler et al. (1979)	2-37 semanes	♂	Ratolí ob / ob C57 BL / 6J	↓ Carcassa i extremitats inferiors 7-37 setmanes	↓ (= conc.)	↓ 5-37 setmanes	= Estimació	↑ 3-MH 5-37 setmanes
Trosler et al. (1982)	13 semanes		Ratolí ob / ob C57 BL / 6J	Pes Múscul: Gastrocnemius Diafragma, Sòleus ↓ Cor =	= Concentració: Gastrocnemius Diafragma, ↓			Proteases Alcalines miofibril·lars ↓ Gastrocnemius Diafragma, Sòleus
Bertán et al (1992)	Lactants	4-16 semanes	Rata Wistar Ghuatanat monosòdic injecció diària(2-6 dies)	↓ en múscul i cor	↓ en múscul i cor			

S'han agrupat els resultats segons el model d'obesitat que s'estudia, i s'ha esmentat sempre que ha estat possible, la soca, l'edat, la dieta, el pes, el sexe, l'altre banda, també s'esmenta la metodologia emprada per a la determinació dels diferents paràmetres. En el cas que no s'esmenti altra cosa s'entendrà que la dieta és pinso control ad libitum, i la metodologia per a la determinació de proteïnes és la de determinació de N amínic (Kjeldahl).

Quadre 5. Síntesi i degradació de proteïna en l'obesitat humana.

Referència	Sexe	Observacions	Massa magra L.B.M.	Síntesi	Degradació
Nair et al (1983)	♀	Controls ♂	=	↑ (LBM) 13C-Leu	↑ (LBM) 13C-Leu
Nair et al (1987)	♀	Controls	↑	= (LBM) 13C-Leu	= (LBM) 13C-Leu
Welle (1990)	♀, ♂	Proteòlisi correlacionada amb adipositat	=		↑ (LBM) 13C-Leu
Welle (1990)	♀	Postmenopausa, Diabetes tipus II. Proteòlisi correlacionada amb adipositat	=		↑ (LBM) 13C-Leu
Jensen (1991)	♀		=		↑ (LBM) 13C-Leu
Bruce (1990)	♀		↑		= (LBM) 13C-Leu
Caballero (1991)	♀		↑		= (LBM) 13C-Leu
Welle (1992)	♀	Turnover	LBM ↑ (Estimació RMN)	↑ (LBM) 13C-Leu	↑ (LBM) 13C-Leu

S'han agrupat els resultats segons el model d'obesitat que s'estudia, i s'ha esmentat, sempre que ha estat possible, la soca, l'edat, la dieta, el pes, el sexe. Per altra banda, també s'esmenta la metodologia emprada per a la determinació dels diferents paràmetres. En el cas que no s'esmenti altra cosa s'entendrà que la dieta és pinso control ad libitum, i la metodologia de proteïnes és la de determinació de N amínic (Kjeldahl).0

Els nostres resultats mostren que el múscul esquelètic de la pota respón a l'obesitat genètica disminuint-ne la seva massa, tot i que el pes de l'animal augmenta. Aquest resultat, tenint en compte el sexe i edat dels grups emprats, encaixa amb els resultats mostrats en la sinopsi anterior (en especial amb els resultats de 72 dies d'edat de R.Durschlag, 1983). En part, aquesta disminució en la massa muscular es pot atribuir a una disminució en el contingut en proteïnes, la qual, s'ha d'atribuir a la fracció miofibrilar, insoluble a baixa força iònica. Aquest fet és més espectacular en el soleus de composició majoritària en fibres lentes i oxidatives, que en el gastrocnemius i en tibialis (amb un nombre més gran de fibres ràpides i glicolítiques). A més també es produeix un descens del contingut de proteïna citosòlica. Aquest resultat coincidiria amb el trobat per Lanza-Jacobi (1984) pel gastrocnemius en rates de 8 setmanes. El fet que la fracció insoluble en sigui minvada en tots els casos, també és compatible amb la assumpció d'un increment en la degradació miofibril·lar que reflexa uns nivells urinaris de 3-MH incrementats (Dunn et al 1980).

Un descens en la taxa de síntesi de proteïnes també explicaria el fenomen. Ara bé les dades en rates Zucker fa/fa , apunten més aviat a un manteniment (Pullar 1976, Loblely 1978, Hartsook 1978, Reeds 1982) o increment (Dunn 1982) en la síntesi a partir d'aminoàcids, la qual cosa referma la hipòtesi d'una degradació augmentada. Només en el soleus s'ha trobat una síntesi de proteïnes a disminuïda (Durchschlag 1983), però el mateix autor recomana cautela en l'assumpció d'aquesta dada donat que s'ha extret de mesures d'alliberament de tirosina en incubacions de múscul (estat força catabòlic). Assumint però una síntesi de proteïnes disminuïda en el soleus, no es pot descartar la hipòtesi d'un augment en la degradació, ja que és en aquest múscul on el contingut de proteïnes que varia d'una manera més espectacular.

En el cas de rates sotmeses a dieta de cafeteria els resultats encaixen amb els trobats per Prats et al (1986), pel que fa referència a la hipertròfia en el cor i a l'increment en la concentració en proteïna tot i les diferències en soca i edat. La hipertròfia generalitzada que nosaltres trobem en tots els músculs, llevat del sòleus, es normalitza en relativitzar-ho pel pes d'animal. Aquesta hipertròfia de la massa

muscular és paralela en percentatges a l'increment en contingut de proteïna, tal i com mostra la taula adjunta. Ara bé, només en el cas del gastrocnemius aquesta variació és significativa. A més, mentre que en el cor l'augment en proteïnes es produeix en totes les fraccions, en gastrocnemius es produeix en la fracció insoluble, essent la proteïna de la fracció soluble la que creix en el cas del tibialis.

Aquests resultats son congruents amb una major síntesi de proteïnes a partir d'aminoàcids com la suggerida per una major captació de 2-amino-isobutirat en músculs de rates obeses per dieta de cafeteria trobat per Zamora (1988), o per l'increment en la taxa fraccional de síntesi de proteïnes a partir d'aminoàcids trobada en rates sotmeses a dietes hiperlipídiques en gastrocnemius i en tibialis. (Estornell et al., 1994).

La variació en el contingut de proteïnes no solament és diferent segons el tipus d'obesitat, sino que depèn de la composició fibril·lar del múscul que s'estudia: les disminucions, en el cas de l'obesitat genètica, són més importants en el soleus i el tibialis.. Precissament aquests músculs no incrementen el seu contingut en proteïnes per efecte de l'obesitat nutricional, la qual cosa sí que succeeix en el gastrocnemius. La possibilitat que un canvi en el perfil metabòlic en els diferents músculs com a conseqüència dels diferents models d'obesitat emprats s'ha explorat en el present treball.

Així, en l'obesitat genètica, els músculs mostren uns canvis en el seu perfil metabòlic en el mateix sentit que l'indicat per Champion et al. (1987) en tant que augmenten la capacitat oxidativa. Aquests canvis, en el nostre cas, depenen del múscul estudiat: en el tibialis i gastrocnemius, músculs amb més alta proporció en fibres ràpides i glicolítiques, l'augment es dona tant a nivell del cicle dels àcids tricarboxilics (increment de l'activitat SDH), com a nivell de β -oxidació (increment en l'activitat β -OAC). En el cas del soleus només incrementa la SDH, probablement perquè la β -OAC ja es prou incrementada en condicions normals. En el s'incrementa la β -OAC sense afectar-se la SDH. De especial importància pot ser el fet que en tots els casos, llevat del tibialis, es produeix un increment de l'activitat CK, la qual podria absorbir l'increment de producció

energètica per part de les vies oxidatives tot i generant fosfat de creatina. Per últim la possibilitat d'un canvi en el perfil fibril·lar dels diferents músculs, sembla especialment factible en tibialis on addicionalment a l'increment del potencial oxidatiu, també en aquest múscul s'observa una reducció en l'activitat AK, indicativa d'un creixement en la proporció de la isoforma de miosina de contracció lenta (Hamm 1984). Els canvis no venen acompanyats de variacions significatives en la capacitat glucolítica (activitat LDH), ni, llevat del tibialis, de la velocitat contràctil (activitat AK). És per això que es fa difícil fer la hipòtesi d'una variació en la composició fibril·lar per efecte de l'obesitat genètica, i per tant explicar la resistència a la insulina en el múscul de les rates (fa/fa), en termes d'increment en la proporció de fibres glicolítiques. (James et al., 1985). Més al contrari, si asumim els resultats donats per aquest autor, un canvi a un perfil més oxidatiu faria més sensible els músculs a la insulina. Donat que és amplament reconeguda la resistència a la insulina en el múscul esquelètic en la rata Zucker (fa/fa), cal argüir que aquest increment en el potencial oxidatiu no és funcional in vivo (Campion et al. 1987), potser a causa d'alteracions mitocondrials.

Si l'increment en el potencial oxidatiu és reflex d'un increment en el nombre de fibres oxidatives, aquest fet fora compatible amb un increment en la taxa de degradació, en tant que els músculs amb una composició majoritària tenen una taxa de degradació més elevada (Garlick 1989). Per últim, una major capacitat oxidativa dels músculs contribueixen a explicar un recanvi catàbolic d'alanina incrementat en termes absoluts en animal sencer, com el trobat en el capítol 3.

En els músculs de rates fetes obeses pel subministrament de dieta de cafeteria, els nostres resultats corroboren els trobats per dietes hiperlipídiques (Nemeth et al 1992). La variació més notable fa referència a un augment generalitzat en els nivells de SDH, llevat del cor. En gastrocnemius, també s'observa un increment de la β -OAC. La resta de paràmetres no estan alterats, de manera que tampoc aquí es pot parlar de variacions en la capacitat glicolítica o en la velocitat contràctil de les fibres dels músculs. A diferència de la genètica, l'obesitat nutricional no genera, en músculs, un increment en l'activitat CK, ni en el cas del gastrocnemius, que permeti magatzemar

l'energia produïda per una maquinària oxidativa incrementada. Una manera de justificar aquest fet pot ser que l'increment en el flux a través del cicle de Krebbs s'empri per garantir nivells d'ATP suficients d'un cicle de les pentoses fosfat hipotèticament accelerat., per tal de permetre regenerar més NADPH^+ esgotats en una lipogènesi incrementada . Aquesta hipòtesi seria concordant a més, amb l'increment en la concentració de lípids trobada en múscul de la pota per Prats et al (1986), o amb un increment en la taxa lipogènica muscular trobada per Carbó et al. (1991).

Pel que fa a la possible relació entre variacions entre el contingut de proteïnes als diferents músculs i els canvis en el perfil enzimàtic estudiat, en la obesitat genètica hi ha una consonància entre increment de les capacitats oxidatives i reducció del contingut en proteïnes, sobretot a nivell del pool miofibril·lar, la qual cosa fa pensar en un increment en la degradació d'aquest pool.

En la situació d'obesitat nutricional un increment en el potencial oxidatiu no és associat amb un decrement en el contingut proteic muscular, és més, en el múscul on además del l'activitat SDH també creix la β -OAC, el gastrocnemius, el contingut en proteïna creix significativament. Si mantenim com a certa la correlació entre potencial oxidatiu muscular i degradació de proteïnes, només podem explicar aquest fet amb un increment en la taxa de síntesi de proteïnes (Estornell et al. 1994).

4.4.2. Canvis estructurals en músculs d'animals amb obesitat nutricional i genètica.

Les alteracions en la ultraestructura musculars han estat estudiades com a conseqüència de l'exercici a diverses intensitats (Gollnick et al. 1971, Warhol et al. 1985). Les alteracions més comunes són les disrupcions de la banda A, dissolució o serpenteig del disc-Z i severes inflamacions o disrupcions dels mitocondris . Aquestes alteracions no són uniformement distribuïdes , sino que apareixen focalment dins la fibra (Ogilvie et al.1988). Además, també s'observen dilatacions importants de les cisternes , el sistema de túbul-t i porcions

longitudinals del reticle sarcoplasmàtic, sovint emmascarats per inflamacions dels mitocondris.(Nimmo et al. 1982). Cronològicament, les alteracions en el reticle sarcoplasmàtic apareixen en un primer estadi i són reversibles, mentre que la resta d'alteracions ultraestructurals apareixen posteriorment i ténen certa perdurabilitat (Nimmo et al. 1982). Com a conseqüència d'aquestes alteracions els fluxs de calci (captació / alliberament) entre el reticle i el citosol s'enlenteixen , amb increment dels nivells de calci intracel.lular (Lee et al. 1991). Paral.lament també s'observen enlentiments de les Na^+/K^+ ATPases, del sistema d'antiport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ i del l'ATPasa estimulada per calci. (Byrd et al 1989). Els mecanismes que poden provocar aquestes alteracions no són coneguts, tot i que Byrd (1992) postula com a probables: l'acidosi, l'increment de la temperatura, l'increment en la concentració de ADP o disminució de la de ATP, o la peroxidació lipídica induïda per l'aparició de radicals lliures com a metabolits intermediaris de reaccions oxidatives .

Una altra situació on s'observen aquest tipus d'alteracions morfològiques en múscul i cor d'animals amb *diabetis mellitus*. (Thompson 1988)

Paral.lament a increments en diferents enzims mitocondrials de diferents rutes oxidatives en la rata Zucker (*fa/fa*), com els trobats per nosaltres i altres autors (Wardlaw 1989, Torgan 1990), Campion et al (1987) trobà en soleus d'aquests animals una oxidació de glucosa, mesurada com a producció de CO_2 , disminuïda. Alhora en soleus de ratolins (*ob/ob*) també s'ha trobat un consum d'oxigen disminuït. (DeLuise et al.1989). Això suggereix que, malgrat existeixi un complement enzimàtic adequat, la utilització de substrats energètics o llur accesibilitat està impedida per alguna raó en els mitocondris de les rates Zucker. Estudis de ^{31}P -RMN una menor capacitat de regenerar creatina-P i ATP després de l'exercici, tot i que no hi han diferències de concentració d'aquests metabolits en el repós. A l'hora l'exercici indueix una acidosi incrementada en els obesos. Com a justificació els autors apelen a una possible disfunció mitocondrial. (Klein et al, 1994).

En la humans obesos, s'ha observat un increment de la relació Na^+/K^+ que indica un descens en l'activitat de la bomba de Na/K , descens que no s'observa en altres tipus de resistència a la insulina com és l'hipertensió. (Landin et al 1991).

En rates sotmeses a dieta de cafeteria no s'observen diferències en l'activitat $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ (Zamora 1988).

Els nostres resultats mostren que en els músculs de Zucker fa/fa que l'aparició local de disrupcions o inflamacions en mitocondris són més freqüents que en els músculs dels animals prims, la qual cosa abona la hipòtesi segons la qual una disfunció mitocondrial provocaria una reducció en la oxidació de substrats energètics tot i tenir la maquinària adequada.

En ambdúes obesitats es reproduïxen les alteracions en la ultraestructura muscular que es descriuen pel cas de l'exercici, essent més acusades en músculs ràpids i glicolítics que en els lents i oxidatius. Mentre que en l'obesitat genètica disrupcions mitocondrials s'observen amb més profusió que en l'obesitat nutricional, la dilatació del reticle sarcoplasmàtic, i la desorganització dels elements del sarcòmer a nivell local serien més fàcilment observables en l'obesitat induïda per dieta de cafeteria.

4.4.3 Discusió general

En el present capítol hem vist un comportament oposat pel que fa al metabolisme de proteïnes segons el tipus d'obesitat: Un increment en la massa i contingut de proteïnes en els músculs més gran quan més predominància en fibres glicolítiques. Per contra, en els músculs d'animals amb obesitat genètica es mostra una disminució de massa i contingut en proteïnes, la qual és més important quan més gran en sigui la proporció de fibres oxidatives. El primer cas es pot justificar pels increments en síntesi de proteïnes suggerits per altres autors (Zamora 1988) (Estornell et al., 1994). El segon, s'ha de justificar per

un increment en la taxa de degradació com la demostrada per Dunn et al (1982).

Ambdós tipus d'obesitat incrementen el potencial oxidatiu sense que en els músculs es produeixin canvis en el potencial glicolític ni en la velocitat contràctil, de manera que no és obvia una alteració en la composició fibril·lar dels músculs. La relació entre un increment en le capacitats oxidatives dels músculs i en la taxa de degradació de proteïnes (Garlick et al., 1989) sembla explicar el descens en el contingut proteïnes a l'obesitat genètica, però no en la causada per una dieta de cafeteria, de manera que , en aquesta última situació, cal atribuir-ho un increment en la taxa de síntesi.

Per últim en ambdós tipus d'obesitat semblen més freqüents alteracions ultraestructurals en el múscul similars a les que es produeixen en l'exercici. En l'obesitat genètica són freqüents les disrupcions mitocondrials a nivell local, les quals suggereixen disfuncions que explicarien la contradicció de tenir una maquinària oxidativa elevada i una oxidació muscular efectiva disminuïda com la mostrada per Champion et al (1987). En l'obesitat nutricional s'observen amb més freqüència dilatacions locals del reticle sarcoplasmàtic i inflamacions també locals dels mitocondris. Cas que la hipòtesi de Byrd (1992) fos certa, això suggeriria una acidosi i/o una peroxidació lipídica, produïda pels radicals lliures generats en reaccions oxidatives, incrementades en l'obesitat nutricional com a causes d'aquests desordres. Alhora pot significar una alteració en els fluxs de calci (Lee et al 1991) tendents a un increment de la concentració intracel·lular d'aquest catió, que afavoriria l'acció de proteïnes depenents de calci.

En ambdós tipus d'obesitat s'observen més desestructuracions locals del sarcòmer que en els animals primis, suggerint una major degradació miofibril·lar.

4.5 Bibliografia

- Ashley C.C., Mulligan I.P., Lea T.J. *Quat. Rev. Biophys.* (1991),24, 1:1-73
- Barr H.G., McCracken K.J. *Br. J. Nutr.* (1984),51 : 379-387
- Belcastro A.N., MacLean I., Gilchrist J.S. *Int. J. Biochem.* (1985),28 : 452-457
- Bell G.E., Stern J. *Growth* (1977),41 : 63-80
- Bergen W.G., Kaplan M.L., Merkel R.A. *Am. J. Clin Nutr.* (1975),28 : 157-161
- Bertrán M.A., Estornell E., Barber T., Cabo J. *Int. J. Obesity* (1992),16 : 555-564
- Brooke M.H., Kaiser K.K. *J. Histochem. Citochem* (1970),18 : 670-672
- Bruce A.C., McNurlan M.A., McHardy K.C. *Int. J. Obes.* (1990),14 : 631-646
- Byrd S.K. *Med. Sci. Sports. Exercise* (1992),24 5 : 531-536
- Byrd S.K., McCutcheon L.J., Hogson D.R., Gollnick P.D. *Am. J. Physiol.* (1989),67 : 2072-2077
- Caballero B., Wurtman R.J. *Metabolism* (1991),40 : 51-58
- Campion D.R., Shapira J.F., Allen C.E., Hausman G.J., Martin R.J. *Growth* (1987),51 : 198-206
- Carbó N., López-Soriano F.J., Argilés J.M. *Biochem. Int.* (1991),24, 6 : 1043-1049
- Carpenter S., Karpati G., New York; Churchill Livingstone eds. (1984), : 1-38
- Cleary M.P., Vasselli J.R. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* (1981),167 : 616-623.
- Crettaz M., Prentky M., Zaninetti D., Jeanrenaud B. *Biochem. J.* (1980),186 : 525-534

- Cunningham J., Calles J., Giering P., Felig P. Clin. Res. (1983),31, 2 :
241A
- Chan Ch., Stern J.S. Am. J. Physiol. (1982),242 : E445-E450
- Chi M.M.Y., Hintz C.S., Coyle E.F., Martin III W.H., Ivy J.L., Nemeth
P.M., Holloszy J.O., Lowry O.H. Am. J. Physiol. (1983),244 (Cell
Physiol. 13), : C276-C287
- Dayton W.R., Reville W.J., Goll D.E., Stromer M.H. Biochemistry
(1976),15 : 2159-2165
- DeLuise M., Harker M. Horm. Metab. Res. (1986),18 : 290-295
- Demes G.L., Buskirk E.R., Alpert S.S., J. L. Loomis. Int. J. Ob.
(1991),15 : 375-385
- Dunn M.A., Hartsook E.M., J. Nutr. (1980),110 : 1865-1879
- Dunn. M.A., Houtz S.K., Hartsook E.W. J. Nutr. (1982),112 : 1862-
1875
- Durschlag R.P., Layman D.K. Growth (1983),47 : 282-291
- El-Saleh S.C., Warber K.D., Potter J.D. J. Muscle. Res. Cell. Motil.
(1986),7 : 387-394
- Esteve M., Rafecas I., Remesar X., Alemany M. Int. J. Obes. (1992),16 :
237-244
- Estornell E., Barber T., Cabo J. Br. J. Nutr. (1994),72 : 509-517
- Garlick P.J., Maltin Ch. A, Baillie A. G.S., Delday M.I.,Grubb D.A. Am. J.
Physiol. (1989),257 (Endocrinol. Metabol. 20), : E828-E832
- Glore S. R., Novakofski J., Layman D.K., Bechtel P.J. Nutr. Res.
(1992),12 : 289-296
- Goll D.E., Kleese W.C., Szpacenko A. in: Animal Growth Regulation,
edited by D.R. Campion, G.J. Huasman and R.J. Martin. Plenum
Pres, New York (1989), : pp. 141-182

- Goll D.E., Robson M.R., Stromer M.H. *Dukes' physiology of domestic animals* (1984), 10 ed. Cornell Univ. Pres. Ithaca. N.Y. : 548-580
- Hamm T.M., Nemeth P.M., Solanki L., Gordon D.A., Reinking R.M., Stuart D. G. *Muscle Nerve* (1988), 11 : 1988
- Hartsook E.W., Morrow F.D., Houtz S.K. *Int. J. Obes.* (1978), 2 : 370.
- Hasselgren P-H., James J.H., Benson D.W., Hall-Angueras M., Angueras U., Hiyama D.T., Li S., Fischer J.E. *Metabolism* (1989), 38, 7 : 634-640
- Hintz C.S., Coyle E.F., Kaiser K.K., Chi M. M-Y, Lowry O.H. *J. Histochem. Citochem.* (1984), 32 : 655-660
- Huxley A.F. *Rev. Lec. J. Physiol.* (1974), 243 : 1-43
- James D.E., Jenkins A. B., Kraegen E.W. *Am. J. Physiol.* (1985), 248 : E567-E574
- Jensen MD, Haymond M.W. *Am. J. Clin. Nutr.* (1991), 53 : 172-176
- Kim Y., Tamura T., Iwashita S., Tukuyama K., Suzuki M. *Biochem. Biophys. Res. Com.* (1994), 202, 1 : 519-526
- Klein M., Kaminski P., Walker P.M., Staczer J., Barbe F., Duc M., Burlet C. *Am. J. Physiol.* (1994), 266 (Endocrinol. Metab 29), : E410-E417
- Lanza-Jacoby S., Kaplan M.C. *Int. J. Obes.* (1984), 8 : 451-456
- Levin B.E. *Int. J. Obes.* (1990), 14 : 689-700
- Levin B.E., Sullivan C. *Int. J. Obes.* (1989), 13 : 235-246
- Lexell J., Heriksson-Larsen K., Winblad B.T., Sjostrom. *Muscle Nerve* (1983), 6 : 588-595
- Lobley G.E., Webster A.J.F., Reeds P.J. *Proc. Nutr. Soc. (abs.)*, (1978), 37 : 20A
- Loewy A.G., Sikevitz P. Holt. Rinehart & Winston eds. (1970), :

- Lompre A.M., Nedal-Ginard B., Madova V. *J. Biol. Chem.* (1984),259 : 6437-6446
- Lowry C.V., Kimmey J.S., Felder S., Chi M.M.-Y, Kaiser K.K., Passoneau P.M., Kirk K.A., Lowry O.H. *J. Biol. Chem.* (1978),253 : 8269-8277
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.J., Randall A.J. *J. Biol. Chem.* (1951),193 : 265-275
- Lillioja S., Young A.A., Culter C.L., Ivy J.L., Abbott W.G.H., Zawadski J.K., Yki-Jarvinen H., Christin L., Secomb T.W., Bogardus C. *J. Clin Invest.* (1987),80 : 415-420
- Maltin Ch. A, Delday M.I., Baillie A. G.S., Grubb D.A., Garlick P.J. *Am. J. Physiol.* (1989),257 (Endocrinol. Metabol. 20), : E823-E827
- Nair K.S., Garrow J.S., Ford C. *Diabetologia* (1983),25 : 400-403
- Nair K.S., Halliday D., Ford G.C. *Int. J. Obes.* (1987),11 : 537-544
- Nemeth P.M., Rosser B W.C, Choksi R.M., Norris B.J., Baker K.M. *Am. J. Physiol.* (1992),262 (cell physiol: 31), : C282-C286
- Nwoye L.E., Mommaerts E.F.H.M., Simpson D.R., Seraydarian R., Marusich M. *Am. J. Physiol.* (1982),242 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 11), : R401-R408
- Pénicaud L., Ferré P. *J. Obes. Weight Regul.* (1988),7, 2 : 91-109
- Pénicaud L., Ferré P., Terrataz J., Kinebanyan M.F., Leturque A., Doré E., Girard J., Jeanrenaud B., Picon L. *Diabetis* (1987),36 : 626-631
- Peter J.B., Barnard R.J., Edgerton V.R., Gillespie C.A., Stempel K.E. *Biochemistry* (1972),11 : 2627-2633
- Prats E., Monfar M., Argilés J.M., Alemany M. *J. Obes. Weight Reg.* (1986),5, 2 : 77-88.
- Pujol A., Lefaucheur L., Ecolan P., Pénicaud L. *Comp. Biochem. Physiol.* (1993),106B, 2 : 269-272
- Pullar J.D., Webster A. J. F. *Br. J. Nutr* (1974),31 : 377-392

- Pullar J.D., Webster A. J. F. Br. J. Nutr (1977),37 : 355-363
- Radcliffe J.D., Webster J.F. Br. J. Nutr. (1976),36 : 457-469
- Radcliffe J.D., Webster J.F. Br. J. Nutr. (1978),39 : 483-492
- Radcliffe J.D., Webster J.F. Br. J. Nutr. (1979),41 : 111-124
- Rafecas I., Esteve M., Fernández-López J.A., Remesar X., Alemany M.
Nutr. Res. (1994),14, 7 : 1077-1088
- Rafecas I., Esteve M., Ramesar X., Alemany M. Biochemistry
International (1992),26, 4 : 687-694
- Rechsteiner M. Adv. Enzyme Regul. (1987),27 : 135-151
- Reeds P. J., Haggarty P., Whale K. W. J., Fletcher J. M. Biochem.J.
(1982),204 : 393-398
- Rothwell N.J., Stock M.J. Nature (1979),281 : 31-35
- Rozen R., Brigant L., Apfelbaum M. Am. J. Clin. Nutr. (1994),59 : 560-
565
- Rutschmann M.B., Dahlmann, Reinauer H. Biochem. J. (1984),221 :
645-650
- Schemmel R., Hu D., Mickelsen O., Romsos D.R. Am. J.Physiol.
(1969),216, 2 : 223-230
- Shapira J.F., Kircher I., Martin R.J. J. Nutr. (1980),110 : 1980
- Trostler N., Amin R., Shafrir E. Int. J. Obesity (1982),6 : 557-566
- Trostler N., Romsos D. R., Bergen W. G., Leveille G.A. Metabolism
(1979),28, 9 : 928-933
- Wardlaw G.M., Kaplan M.L. Am. J. Physiol. (1984),247 (Regulatory
Integrative Comp. physiol. 16), : R911-R917
- Welle S., Barnard R.r., Statt M., Amatruda J.M. Metabolism (1992),41,
9 : 1028-1034

Welle S., Nair K.S. Am. J. Physiol. (1990),258 : E990-E998

Welle S., Nair K.S. Int. J. Obes. (1990),14 : 701-710

Zamora F. Tesis Doctoral (1988), : 161.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

**5.- Activitats enzimàtiques del sistema calpaïna en músculs
individuals de rates obeses nutricionalment i genética**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

5.1 Introducció.

Com a sistema calpaïna es coneix al conjunt d'enzims proteolítics intracel·lulars, i els seus reguladors naturals, els quals són actius a pH neutre i precisen certes concentracions de calci per a desenvolupar la seva activitat. Es tracta d'un sistema amplament distribuït: s'ha trobat en tots aquells teixits dels vertebrats on s'ha buscat (Goll et al., 1992). Fins i tot també és present a *Drosophila* (Pinter et al., 1988) i a *Schistosoma mansoni* (Andressen 1991). No s'ha trobat, però en plantes (Wolfe et al., 1989), tot i que s'hagi purificat una cisteïn-proteasa dependent de calci amb propietats enzimàtiques similars a les calpaïnes a partir d'un fong aquàtic, *L'Allomices arbuscula* (Ojha et al., 1991).

El sistema calpaïna està format, en cèl·lules musculars de mamífers, d'un mínim de quatre tipus d'enzims funcionals:

m-Calpaïna. Purificada per primer cop en múscul esquelètic porcí, aquesta proteasa intracel·lular és te un pH òptim al voltant de 7,5 i requereix una concentració entre 1 i 3 mM de calci per a tenir màxima activitat. a l'hora perd la seva activitat a concentracions de calci inferiors a 100µM. (Dayton et al., 1976 a , 1976 b).

µ-Calpaïna: De característiques similars a la m-Calpaïna només necessita concentracions de calci de l'ordre de 10µM per obtenir l'activitat semimàxima (Goll et al., 1986).

n-Calpaïna: S'ha identificat un mRNA amb fragments de gran homologia seqüencial amb els de les isoformes abans relacionades (Sorimachi et al., 1989). Tot i que s'expressa específicament al múscul i en grans quantitats, no s'ha pogut purificar cap proteïna expressada per aquest, fins i tot imposant nivells de calci d'ordre nanomolar (nivells per sota dels quals el calci ja no es pot quelar amb agents complexants com el EGTA o EDTA). La ràpida autòlisi que les calpaïnes pateixen en absència de substrate i en presència de les concentracions de calci a les quals són actives, ha fet que es postuli una activitat màxima per aquesta isoforma específica del múscul a concentracions de calci nanomolars (Sorimachi et al., 1993). Els

mRNA d'aquesta espècie, s'han trobat fonamentalment al nucli de cèl.lules musculars, però també al citosol i al citoesquelet on ràpidament és inactivada per autolisis. (Sorimachi et al., 1994). Degut a aquestes característiques, poques dades més de les característiques de la seva funció s'han pogut esbrinar fins a la data.

Calpastatina: n'és l'inhibidor natural i específic de les dues isoformes de calpaïnes que s'han pogut caracteritzar funcionalment (Otsuka et al., 1987).

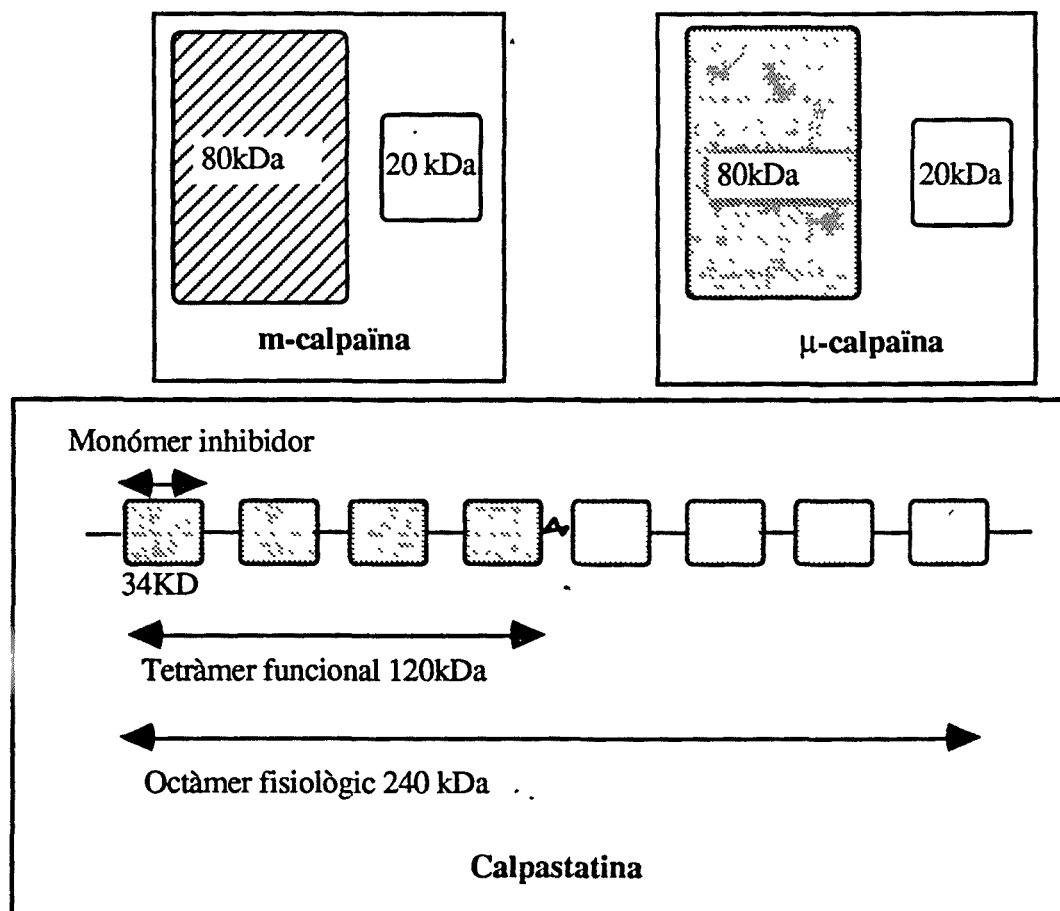
Tret de la n-calpaïna, les concentracions de calci necessàries pel funcionament d'aquestes proteases són molt superiors a les que fisiològicament es poden trobar. Això ha fet, entre altres possibilitats, esmerçar molts esforços en la recerca d'un possible activador que faci compatible els nivells de calci fisiològics amb els requeriments observats "in vitro". En plaquetes i cervell, s'ha trobat un péptid activador de l'activitat calpaïna. Actua, però, incrementant la $V_{m\acute{a}x}$. de l'enzim sense variar-ne els requeriments de calci. (Shiba et al., 1992). Pontremolli et al 1990, fan referència a un possible activador en múscul esquelètic, el mecanisme del qual consisteix en reduir els requeriments de calci. Aquest resultat no ha estat confirmat per cap altre grup, fins i tot posat en dubte per alguns autors (Goll 1992).

Estructuralment ambdúes isoformes, m i μ , de la calpaïna són semblants. Consten de dues subunitats. La petita, de 28kDa, és idèntica per ambdós isoenzims. L'altra, de 80 kDa, té una homologia seqüencial del 50% entre ambdós tipus de calpaïna purificades a partir del mateix teixit. Ambdúes subunitats contenen, en el domini C-terminal, regions amb seqüències d'aminoàcids homòlogues a la de la calmodulina, seqüències que generen estructures de "barril- α/β " o "mans E-F" segrestadores de calci (Suzuki et al., 1990). Mentre que la subunitat gran conté la cisteïna del centre actiu, la subunitat petita, implicada en diversos esdeveniments reguladors, barraria el pas del substrat mentre no s'assoleixin els nivells de calci que indueixin un canvi conformacional.(Thompson et al., 1990).

Pel que fa a la calpastatina, es tracta d'un inhibidor polipeptídic polifuncional que pot inhibir fins a quatre mols de calpaïna per mol

(Maki et al., 1987). Es tracta d'un polímer de múltiples dímers de 68 kDa (tot i que, per migració en SDS-PAGE, se li atribueixen 110 kDa) la unitat monomèrica dels quals té 34 kDa.(Emori et al., 1987).

Representació esquemàtica dels principals elements del sistema calpaïna



Estudis d'immunolocalització han demostrat que els tres components bàsics del sistema, les dues isoformes de la calpaïna i el seu inhibidor, són intracel·lulars en múscul de rata i en condicions normals, lligats a orgànuls subcel·lulars, més que no pas lliures al citosol, i preferentment propers al disc-Z. Sembla que a la superfície interior de la membrana sarcoplasmàtica, el component majoritari del sistema és la m-calpaïna, tot i que la presència sigui minoritària respecte de la que hi ha a l'interior de la cèl·lula (Kumamoto 1992). De fet, però mentre que estudis similars semblen refermar la idea que la calpastatina no està compartimentalitzada a l'interior, tot i mantenint una concentració uniforme per tota la cèl·lula, a l'hora que es detecta la presència de l'inhibidor també a l'espai extracel·lular (De Santis 1992), altres autors defensen el contrari (Lane 1985, 1992). Fins i tot existeix la postura intermitja : La m-calpaïna es distribuïria un 60% a

estructures membranoses i un 40 % al citosol, la μ -calpaïna seria fonamentalment citosòlica (40% a estructures membranoses, 60% al citosol), i no hi haurien preferències per la localització de la calpastatina. (Bánik, 1992).

Aquest patró, doncs, no és estàtic : hi ha tot un seguit d'esdeveniments lligats a variacions dels nivells de calci, els quals poden alterar tant la distribució subcel·lulars com les funcions dels diversos components del sistema. Segons requeriments de calci creixents, les calpaïnes presenten quatre propietats conegudes:

1) Unió a orgànuls i membrana citoplasmàtica (0,5-2 μ M per la μ Calpaïna) (Kuboki 1990). El mecanisme és un canvi conformacional induït per la complexació del calci que n'incrementa notablement la hidrofobicitat de la molécula (Gopalakrishna & Barski 1986).

2) Unió Calpaïna-Calpastatina (400 μ M per una unió semimàxima en m-Calpaïnes, 42 μ M per μ -Calpaïna) (Kapprell 1989). Cal remarcar que en el cas de la μ -Calpaïna aquests nivells són lleugerament superiors als necessaris per una activitat semimàxima, per la qual cosa els autors postulen que és possible que "in vivo" (on els nivells de calci més alts detectats són de 0,2-1 μ M) la μ -calpaïna podria escapar a la inhibició de la calpastatina. Per altra banda, pel cas de les formes autolitzades, els nivells de calci per a la unió semimàxima a la calpastatina sempre són superiors als requerits per a la activitat semimàxima (Kapprell 1989), per la qual cosa els autors posen en dubte l'autòlisi com a mecanisme d'activació de les calpaïnes "in vivo".

3) Activitat proteolítica (760 μ M per la m-Calpaïna, 34 μ M per la μ -Calpaïna). A aquestes concentracions de calci la molécula pateix un canvi conformacional que desbloqueja l'accés del substrat al centre actiu. (Thompson 1990). En aquesta situació, si no està ja unida la calpastatina, no hi ha cap impediment per una immediata unió de la calpastatina a l'enzim, inactivant-lo.(Maki 1990). Tot i així s'han demostrat (Barrett et al 1991) lleugeres variacions en els requeriments de calci per a l'activitat calpaïna in vitro, en funció del substrat que s'empri.

4) Autòlisi. Els requeriments de calci són lleugerament superiors que per la proteolisi. En aquest punt els anteriors esdeveniments tindran lloc, en cas de increments sobtats de la concentració de calci.(Thompson et al., 1990, Edmund et al., 1991). En aquest procés la subunitat gran passa a tenir 78 KDa i 76kDa , mentre que la petita passa de 28kDa a 18kDa. Com a conseqüència d'això es redueixen els requeriments de calci per l'activitat proteolítica i unió a calpastatina unes 10 vegades, sense afectar a l'activitat específica (Edmunds et al., 1991). Autolisis posteriors inactivaran l'enzim (Nishimura et al., 1991).

L'interacció amb fosfolípids (fosfatidilinositol) redueix els requeriments per iniciar l'autòlisi unes 10 vegades (Cong et al., 1989). Això, junt amb els ja esmentats estudis sobre localització immunohistoquímica, ha portat a la hipòtesi segons la qual, in vivo, el sistema calpaïna és regulat per medi d'un mecanisme d'activació a membranes (Mellgren et al., 1987). Ara bé estudis recents demostren que les calpaïnes, quan s'uneixen a orgànuls, ho fan a proteïnes de membrana més que a fosfolípids. (Kuboki et al., 1990) i que aquesta unió no modifica els requeriments de calci dels diversos esdeveniments esmentats (Goll et al., 1992).

Per últim, diverses modificacions post-traduccionals poden alterar la funcionalitat dels diferents elements d'aquest sistema proteolític. Això explicaria la manca de correlació entre els nivells de mRNA i activitat trobats en diverses situacions fisiopatològiques (Illian et al., 1992; Speck et al., 1993) Entre ells s'ha demostrat que la fosfosforilació és un mecanisme de modulació de l'activitat en calpaïnes , in vivo (Kuo et al., 1993) i de la distribució subcel.lular de la calpastatina (Adachi et al., 1991), també in vivo.

In vitro s'ha demostrat la pèrdua d'activitat calpaïna després d'una oxidació indiscriminada amb oxidants inespecífics com el iodoacetat. Quan s'empren reactius que en oxidar la calpaïna no introdueixin cap cadena orgànica lateral, com el tetracionat de sodi, l'activitat calpaïna perduda es pot recuperar parcialment amb una incubació amb agents reductors amb grups sulfhidril com el ditiotreitol. En aquestes condicions els requeriments de calci per la unió a la calpastatina

varien: es redueixen per la m-calpaïna i s'augmenten per la μ -calpaïna, de manera que, donat que no varien els requeriments de calci per a la proteolisi, aquesta és possible per μ -calpaïna oxidada i reconstituïda amb DTT (Kapprell et al., 1989). No hi han, fins a la data, evidències de que això es produeixi in vivo, ni tant sols in vitro emprant agents redox amb relevància fisiològica.

D'altra banda aquest sistema proteolític pot estar implicat en molts altres processos, a la vista de quins són els seus substrats i de la manera en que produeix la proteolisi. De fet, la calpaïna, combina una alta especificitat de substrat amb una proteolisi limitada. Emprant péptids artificials com a substrats de la calpaïna, Sasaki et al (1984) formularen una hipòtesi general, segons la qual cal una seqüència específica d'aminoàcids pel reconeixement del substrat (P₂) a banda d'una altra en el lloc de trencament de l'enllaç peptídic (P₁) per què la proteolisi sigui possible. De la troballa per Rogers et al (1984) de que un gran nombre de proteïnes de vida mitjana curta (inferior a 2 h.) contenen una o més regions riques en prolina (P), àcid glutàmic (E), àcid aspàrtic (D), serina (S) i treonina (T) (Regions PEST), i a partir de l'estudi de les seqüències dels substrats de la calpaïna, de proteïnes amb propietats funcionals similars que no en són, Wang et al (1989) han desenvolupat una hipòtesi sobre aquestes seqüències. En aquesta hipòtesi es postula que (P₂) és una regió amb puntuació PEST positiva i que el punt de tall es produeix en una zona situada a un centenar de residus de distància, adjacent a un domini d'unió a la calmodulina o a la Troponina C. Les regions amb una puntuació PEST positives generen estructures tridimensionals altament hidrofòbiques que poden facilitar la unió a la calpaïna. (Reichsteiner 1987). En cas de fer-se efectiva aquesta unió s'activaria el domini catalític. Donat que en certs casos la unió del substrat a calmodulina en modifica de diferent manera la fragmentació per la calpaïna, s'ha postulat (Seubert et al 1987) que la calmodulina variaria l'accessibilitat del lloc de escisió via canvis conformacionals.

Examinant els diferents substractes possibles de la calpaïna, es postulen les següents funcions:

A) Regulació enzimàtica per proteolisi limitada:

Enzim	Efecte de la proteolisi per calpaïna
Protein quinasa C	Activació, independència de Ca^{2+} i PIP_2
Calcineurina	Activació, independència de Calmodulina
Kinasa de la cadena lleugera de miosina	Activació, independència de Calmodulina, Ca^{2+}
Fosforilasa Quinasa	Activació, independència de fosforilació
Factors V i XIII	Activació anàloga a la que esdevé en coagulació
pp ³⁹ mos	Inactivació de la quinasa de C-mos, proto-oncogen que manté a la cèl.lula en metafase.
C-Jun C-Fos	Inactivació de la unió a DNA

B) Remodelació, desestructuració del citoesquelet

Sistema	Efecte de la proteolisi per calpaïna
Múscul estriat	Inici del recanvi metabòlic de proteïnes miofibril.lars
Citoesquelet de cèl.lules no musculars	eliminació dels cossos densos i plaques d'ancorament a la membrana.
Plaquetes	Reorganització del citoesquelet/membrana
Mitosis	Ca^{2+} intracelular s'incrementa a l'inici del procés. La intervenció de les calpaïnes podria ser crucial per al desmantellament del fus acromàtic i en la citoquinesi.
Plaques d'Alzheimer	Producció del péptid β -amiloid a partir de proteïnes precursors, el qual podria ser el nucli de les plaques neurítiques.

C) Proteolisi de receptors hormonals

Receptor	Efecte de la proteolisi per calpaïna
Factor de Creixement de l'Epidermis	No en varia la capacitat d'unió de l'hormona
Estrògens	No en varia la capacitat d'unió de l'hormona
Progesterona	No en varia la capacitat d'unió de l'hormona
Glucocorticoids	No en varia la capacitat d'unió de l'hormona
PDGF	Pèrdua de l'activitat Tirosina quinasa i llocs d'autofosforilació.
Proteïnes dels Canals de Calci tipus L	Destruïx la capacitat de transportar calci.

Dades obtingudes de (Goll et al 1992).

A continuació presentarem esquemàticament, a tall de resum del ja relatat al capítol 1., els arguments que recolzen la hipòtesi del paper regulador del sistema calpaïna en la degradació miofibril·lar i els trets bàsics del mecanisme de degradació miofibril·lar .

Evidències que suggereixen un paper decisiu del sistema calpaïna en el recanvi de proteïna muscular, com iniciadors del desestructuració miofibril·lar

(Però no de la degradació fins a amino àcids)

A.- Les miofibril·les creixen i es recanvien per addició i substracció de filaments de la seva superfície. (Easy released myofilaments).

Aquest procés, in vitro, s'incrementa en excés de Ca^{2+} , i és inhibït amb inhibidors específics de calpaïnes (E-64 ó Leupeptina).

B.- Una de les alteracions estructurals del múscul distròfic és la desorganització i degradació del Disc-Z, sense degradar-se els filaments d'actina o miosina.(tal i com revelen les SDS-PAGE's de miofibril·les isolades de músculs amb atròfia ràpida).

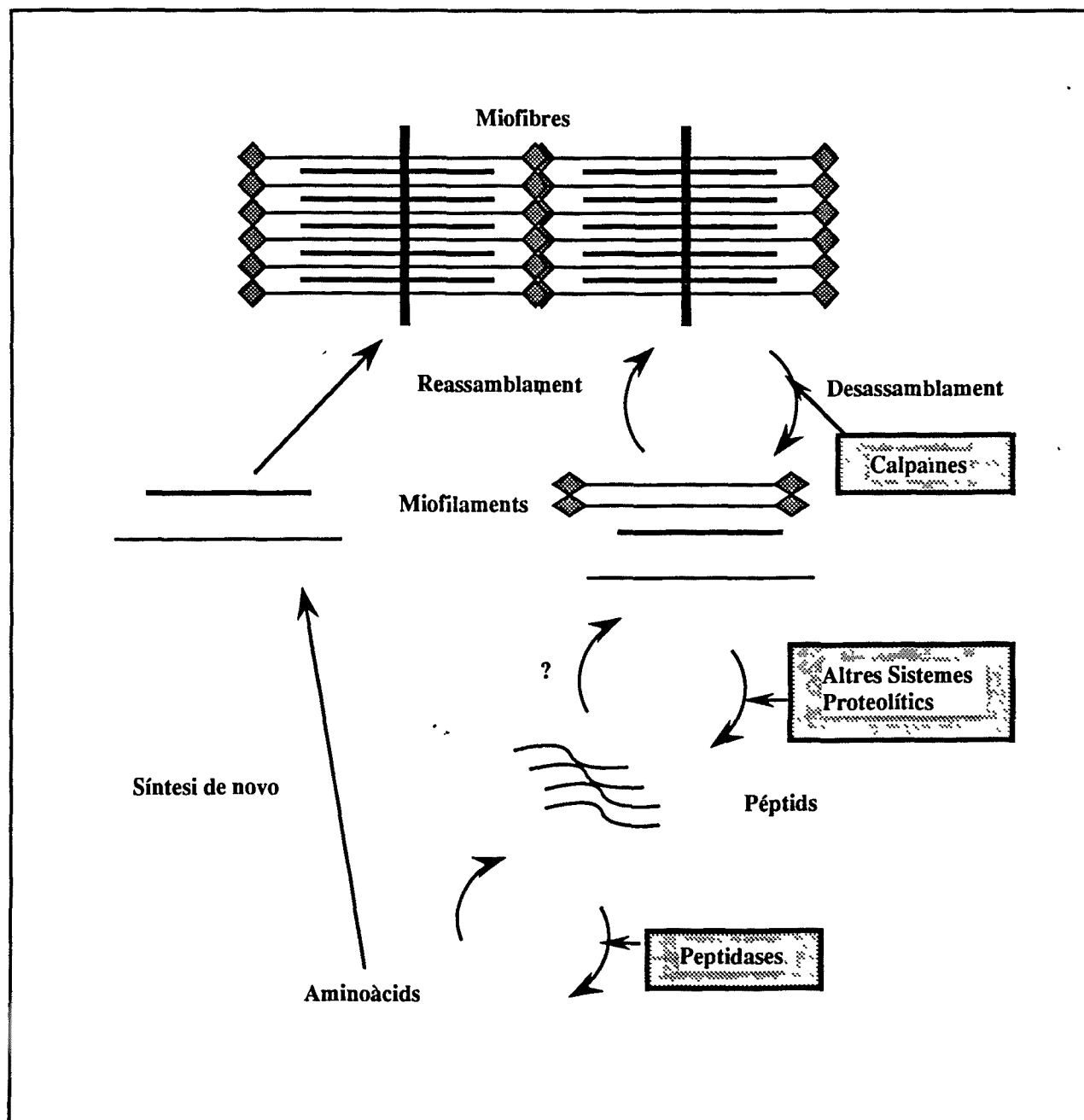
La única proteasa coneguda que ha pogut reproduir aquest procés "in vitro" és la calpaïna.

C.- Estudis d'immunolocalització revelen que les calpaïnes són predominants a la zona del disc-z.

D.- Les calpaïnes fan proteolisi selectiva dels seus substrats, els quals són limitats, per tant no poden ser responsables de la degradació dels miofilaments fins a aminoàcids.

E.- La degradació de les miofibril·les creix amb concentracions creixents de Ca^{2+} , però no varia en presència de concentracions variables d'inhibidors de calpaïnes.

Les calpaïnes, malgrat ser òptimament actives a pH i força iònica intracel·lulars, no ho són als nivells intracel·lulars de Ca^{2+} .



Mecanisme de recanvi miofibrillar i el paper proposat pel sistema calpaïna

Esquema elaborat a partir de dades del capítol.1

5.2 Mesura de les activitats m-calpaïna, μ -calpaïna i calpastatina.

En certs teixits, com el fetge i el cor, l'activitat de l'inhibidor, calpastatina, és superior a la de calpaïna. Com a conseqüència d'això no és possible la detecció d'activitat proteasa depenent de calci, en els homogenats crus d'aquests teixits.(Murachi et al., 1981). A més, tot i que aquesta correlació de nivells en permetés la detecció de calpaïnes en l'homogenat cru, la presència de l'inhibidor n'impedeix una acurada quantificació. És per això que per mesurar l'activitat real de les calpaïnes en un teixit calgui separar-les primer de la calpastatina.

Els mètodes de purificació inicialment emprats implicaven cromatografies de bescanvi iònic amb columnes de DEAE-Celulosa (Dayton 1976), els quals només detectàren la m-calpaïna. L'optimització d'aquesta metodologia va permetre separar-ne dos fraccions que eluïen a diferent força iònica, essent la primera notícia de l'existència de la μ -calpaïna.(Dayton 1981). Tot i així, la fracció que eluïa a menor concentració catiònica (μ -calpaïna) necessitava una segona cromatografia de filtració en gel amb Sepharose-6B®, per tal d'obtenir la μ -calpaïna lliure d'inhibidor. Altres autors optimitzàren aquest últim pas emprant una cromatografia d'interacció hidrofòbica, Phenyl-sepharose -4B®. (Mellgren 1982). Aquesta metodologia necessita de grans quantitats de mostra, obtenint-se una alta qualitat en la purificació, tot i quantitativament és dubtosa. La caracterització de les propietats de l'enzim, en especial la troballa que la calpaïna era una cisteïn proteasa fortament inhibida per la Leupeptina (Mellgren et al., 1982), i que el seu cDNA contenia seqüències similars a les de la calmodulina, per tant amb possibilitats d'incrementar la seva hidrofobicitat en presència de concentracions de Ca^{2+} (Ohno et al., 1984), portaren a Golapakrishna & Barsky (1985) a dissenyar una estratègia de purificació, basada en la cromatografia per interacció hidrofòbica depenent de calci. Els autors afirmaven emprar 0.5 g i 1g de múscul de rata, obtenir purificacions 64 vegades superiors a les que s'obtenien per bescanvi iònic, recuperacions del 85% i, el més important, les fraccions lliures de calpastatina i leupeptina en tant que eluïen en els rentats inicials. Aquest mètode ha estat qüestionat per alguns autors (Kawashima et al., 1988), els quals havien estat implicats

en el desenvolupament del mètode de bescanvi iònic, adduint que l'ús de calci pot provocar l'autòlisi de les calpaïnes, en entendre que la concentració de leupeptina és insuficient, o que no s'havia demostrat suficientment la manca d'inhibició en la primera fracció que es recollia, la qual cosa explicava que els percentatges m/ μ fossin invertits. Altres autors, però, l'han emprat amb èxit per a determinació de calpaïnes en petites mostres (Ou & Forsberg 1991). El mètode té l'al·licient que la calpaïna és prou concentrada com per no necessitar substrats marcats isotòpicament en la quantificació de la seva activitat. Per altra banda, els detractors del mètode d'interacció hidrofòbica dependent de calci, tot i haver desenvolupat mètodes FPLC (Iversen et al., 1993) per a bescanvi iònic mai han referenciat l'ús de quantitats inferiors a 3g de múscul (Kawashima et al., 1988), de manera que no ens servien per a la mesura d'ambdúes activitats calpaïna en músculs individuals com el tibialis (0,4 g) o el soleus (0,2g).

Tot i així calia resoldre'n alguns dels interrogants plantejats per aquests autors. Veïem però en què consisteix el mètode que ens proposavem validar

5.2.1. Protocol de purificació de les activitats calpaïna:

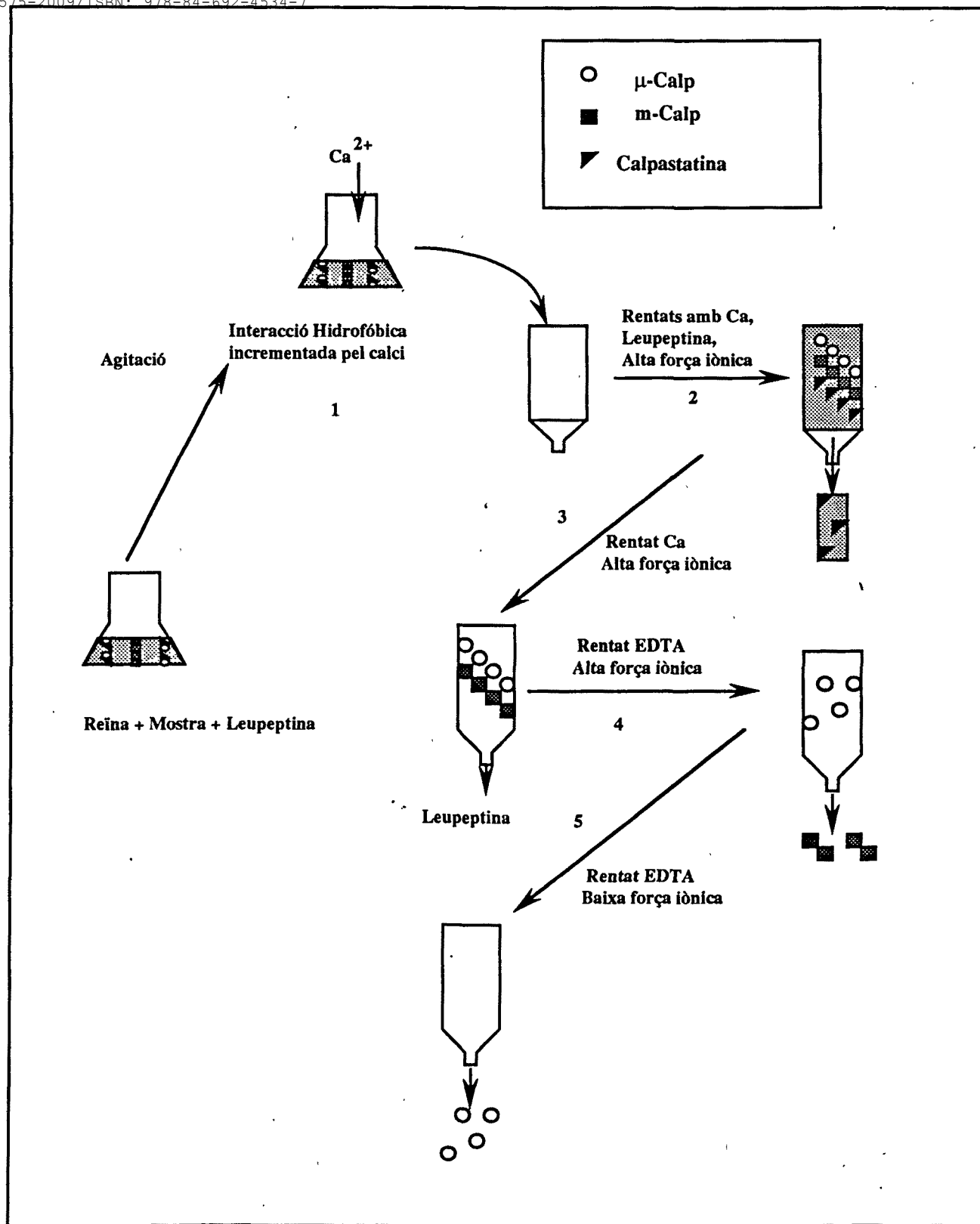
Tot el procés calia fer-ho a 4°C: Després de retirar el teixit connectiu, els músculs foren esmicolats i homogeneitzats en 5 volums de tampó d'homogeneització (Tris-HCl 50mM, EGTA 1mM, β -mercaptoetanol 10mM i Pepstatina A 150nM, a pH 7,4) a 4°C, emprant un OMNImixer (OMNI International, Inc., Waterbury, CT) a la meitat de potència durant 20 segons i en dos cops. Durant aquest procés es tingué cura de què el tub restés inmers en un bany de gel. Els homogenats foren aleshores centrifugats a 20000g durant 30 min a 4°C (Sorvall RC-5).

Mentre, es preparava la reïna Phenyl-sepharose -4B ® de la següent manera: prèviament s'equilibrava amb Tampó A (Tris-HCl 20mM, CaCl₂ 0,1mM, β -mercaptoetanol 10mM, ajustat a pH 7,4 a 4°C). que contenia NaCl 0,25 M i Leupeptina 20 μ M. Posteriorment a cada ml de reïna escurrida, se li adicionaven 20 μ l de Leupeptina 1mM i 0,6ml de NaCl 5M .

Tres al·líquotes de 50µl del sobrenadant eren destinades a la determinació de proteïnes (Lowry et al 1951), pel càlcul de l'activitat específica .

1ml de reïna, preparada tal i com s'ha esmentat, es barrejava amb 5ml de sobrenadant, filtrat amb una gassa de nylon per tal d'eliminar el greix que surava, i es mantenia en agitació durant 10 minuts. En aquest moment eren afegits 0,4ml de CaCl₂ 0.1M. i es mantenia en agitació. Passats 20 minuts, es transferia la suspensió a una columna de polipropilè de 8mm de diàmetre (Poliprep, Bio-Rad).

A continuació es feien els següents rentats successius: 2ml de Tampó A amb NaCl 0,25 M i Leupeptina 20µM (Fracció B) i 2ml de Tampó A amb NaCl 0,25 M sense Leupeptina (Fracció C). La m-calpaïna es recollia en addicionar 4ml de TampóB (Tris-HCl 20mM, EGTA 1mM, β-mercaptoetanol 10mM, ajustat a pH 7,4 a 4°C) que contenia NaCl 0,25 M. (Fracció D). Després d'un rentat de 2ml amb Tampó B sense NaCl (Fracció E), es recollia la µ-calpaïna addicionant 4ml de Tampó B (Fracció F). Les fraccions es recollien en tubs de polipropilè.



Esquema del protocol emprat per a l'isolament de les isoformes de calpaina, basat en la interacció hidrofòbica dependent de calci.

5.2.2 Assaig de les activitats calpaïna

Tot seguit s'assajava l'activitat de cada fracció segons el següent protocol:

	Activitat	Control	Concentració a l'assaig
Casseïna 25mg/ml	0,4ml	0,4ml	4mg/ml
Mostra	1,5ml	1,5ml	
Tampó incubació	0,5ml	0,5ml	50mM Tris pH=7,6 30°C
CaCl₂ 0.1M	0,1ml		4mM
EDTA 50 mM		0,1ml	2,6mM
Volum final : 2,5ml			

Aquesta mescla s'incubava a 30°C durant 30 min, després dels quals s'aturava la reacció amb 1ml TCA 17,5% a 4°C deixar 30 min en bany de gel a la cambra freda per tal que floculessin les proteïnes i es centrifugaven 10 min 3000g a temperatura ambient.

0,8ml de sobrenadant eren adicionats a 0,2 ml de reactiu de Bradford concentrat (BIO-RAD), tal i com recomana la mateixa casa comercial per al micromètode que permet la determinació de nivells de proteïna inferiors a 20 µg, per triplicat en tubs de poliestiré,

s'agitava i, al cap de 15min es llegia l'absorbància a 595nm en cuveta de poliestiré.

L'activitat es calculava per diferència entre l'absorbància de la fracció que ha reaccionat en presència de calci menys la que ho ha fet en presència d'EDTA. Nosaltres definírem una unitat de calpaïna com un increment d'absorbància d'una unitat en d'absorbància en 30 min a 30°C.

5.2.3. Determinació de l'activitat calpastatina

La calpastatina era parcialment purificada partint del fet que és termoestable i se'n quantificava la seva capacitat inhibidora sobre l'activitat calpaïna: 0,5 ml de sobrenadant obtinguts com s'ha relatat per l'isolació de calpaïna eren incubats a 100°C durant 5 min per tal d'inactivar tant les calpaïnes com altres proteases o inhibidors de proteases presents (Nakamura et al., 1988). Un cop centrifugat a 15000g durant 10 min a 4°C es separaven tres al·líquotes de diferents volums i s'incubaven en presència de 0,5 unitats de μ -Calpaïna obtinguda com s'ha relatat anteriorment. Es definí una unitat de calpastatina com l'activitat inhibidora que suprimia una unitat de μ -Calpaïna. L'ús de μ -calpaïna es justifica per la possibilitat que al sobrenadant també fos present l'activador postulat per Pontremollí et al (1990), al qual també califiquen de termoestable i d'impedir l'acció de la calpastatina sobre la m-calpaïna.

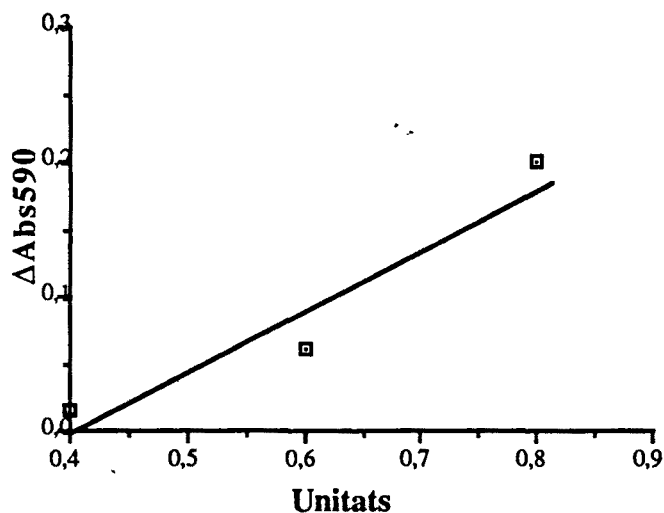
5.2.4. Validacions del mètode i altres característiques

5.2.4.1. Linialitat de l'assaig per a la quantificació de l'activitat calpaïna

L'assaig feu per triplicat com s'ha descrit anteriorment, tot i que s'emprà Calpaïna II de conill, subunitat de 80kDa, subministrada per Sigma. Les unitats que s'esmenten a l'assaig foren calculades a partir de la dilució i de l'activitat nominal que assegurada per la casa comercial. (la casa comercial emprava la següent definició: 1 unitat: Increment de 0,1 unitats d'absorbància a 280nm en una incubació d'una hora a 25°C quan s'empra NNdimetil-casseïn, de Sigma)

Mostra	Abs590	ΔAbs
0,8 U Ca ²⁺ +2mM	0.791± 0.012	0.20±0.01
0,8 U 1mMEGTA	0.587±0,001	
0,6 U Ca ²⁺ +2mM	0.651±0.013	0.06±0.02
0,6 U 1mMEGTA	0.591±0.007	
0,4 U Ca ²⁺ +2mM	0.605±0.005	0.015±0.006
0,4 U 1mMEGTA	0.587±0.001	

$$y = -0,18583 + 0,46250x \quad R^2 = 0,919$$



Altres sistemes de detecció, Espectrofotometria a 280nm o Fluorimetria, no són tant sensibles en aquest rang d'activitats i amb el substrat habitual.

Comprovació de la qualitat de l'aïllament

Per comprovar que les fraccions recollides contenen les isoformes de la calpaïna convenientment separades, es seguí el protocol d'aïllament abans mostrat per un gram de múscul i s'assajaren les fraccions en

condicions en les que el calci lliure era 4mM, activitat total, i 30µM, activitat µ-Calpaïna. els resultats obtinguts es mostren a continuació:

[Ca ²⁺]	Fracció D	Fracció E	Fracció F
a l'assaig	Unitats/ml	Unitats/ml	Unitats/ml
4mM	3,5	0,8	4,4
30µM	0,5(14%)	0,8	3,6(82%)

Segons això, a la fracció D es recolleix la Isoforma II (mM), mentre que a les fraccions E i F, la isoforma I (µM). A partir d'aquest moment es recollirien ambdúes fraccions, E i F, juntes.

5.2.4.2. Proporcionalitat en el protocol d'aïllament i recuperació.

g Teixit de partida	unitats m-Calp	Unitats µ-Calp
2	0,71	1,33
4	1,37	2,7

El teixit en aquest cas fou múscul de cama. D'un pool inicial s'agafaren dues fraccions de dos i quatre grams respectivament, s'homogeneïtzaren en 5 ml de tampó d'homogeneïtzació i s'aplicaren a 1 ml de reïna humida segons el protocol relatat anteriorment. Aquest resultat demostra, per un cantó, que el protocol d'aïllament permet una recollida proporcional a la calpaïna existent. Per un altre, que la seva eficiència no depèn de la càrrega de proteïna a la reïna, com a mínim en aquests marges. Per últim, els resultats suggereixen que la leupeptina ha de haver estat eluida en els rentats, ja que, en cas contrari, no es podria parlar de proporcionalitat en la primera fracció en tant que la leupeptina present en ambdues suspensions prèvies als rentats és la mateixa. Aquests resultats foren confirmats en aplicar idèntiques quantitats de calpaïna, ambdúes isoformes, a diferents quantitats d'homogenat muscular i restant-los dels valors d'activitat obtinguts dels homogenats sense calpaïna addicional. La recuperació calculada d'aquesta manera fou del 89±4 % i 90±4 % per la µcalpaïna i la m-calpaïna, respectivament. És significatiu que la recuperació baixa dràsticament, quan s'aplica calpaïna aïllada prèviament, directament a la columna. Però que en un rang de concentracions de proteïna

muscular entre 0,5 i quatre vegades l'habitual, la recuperació és constant.

Per altra banda, també es detectaren pèrdues importants d'activitat en ambdós isoenzims parcialment purificats segons el protocol d'aïllament esmentat, quan es sometien a operacions com: gel filtració o congelació. La ultrafiltració, en canvi, semblava un procés respectuós amb l'estabilitat de l'enzim. Aquesta última operació no altera les concentracions locals dels components de la solució tamponadora, de manera que ni la força iònica, ni la relació Ca^{2+} - EGTA són modificades.

Calia veure si aquest protocol era factible pel petit tamany de mostra que significava el soleus o caldria fer pools de músculs de diferents animals, per altra banda també volíem saber si el protocol funcionava pels diferents tipus de músculs o calia optimitzarlo per a cada. Per això és realitzà una prova preliminar:

5.2.4.3. Diferències d'activitats calpaïnes entre músculs:

Múscul	m-Calp U/g (%)	μ Calp U/g (%)
Soleus	8 (40%)	11.8 (59%)
Tibialis	3.4 (42%)	4.7(58%)
Gastrocnemius Blanc	2(23%)	6.6(77%)

Pel soleus varen ésser emprats 0,75ml procedents de 0,19g. i 0,5 ml de reïna humida. El soleus tenia més del doble d'activitat que els músculs amb majoria de fibres de contracció ràpida, per una banda això en facilitava la detecció. Per altra desaconsellava l'anàlisi en petits músculs de contracció ràpida com l'Extensor Digitalis Longus. Si aquests resultats es confirmaven, implicaria una correlació entre nivells de calpaïnes i taxes de degradació, en tant que els músculs amb majoria de fibres lentes i oxidatives tenien taxes de degradació el doble de grans que els músculs amb predomini de fibres ràpides i glicolítiques.(Garlick 1989).

Donat que la congelació afectava a la estabilitat de l'enzim, quan aquest estava parcialment purificat, calia veure que passava en congelar el

teixit immediatament després de ser extret, ja que aquesta era una pràctica habitual en la bibliografia consultada:

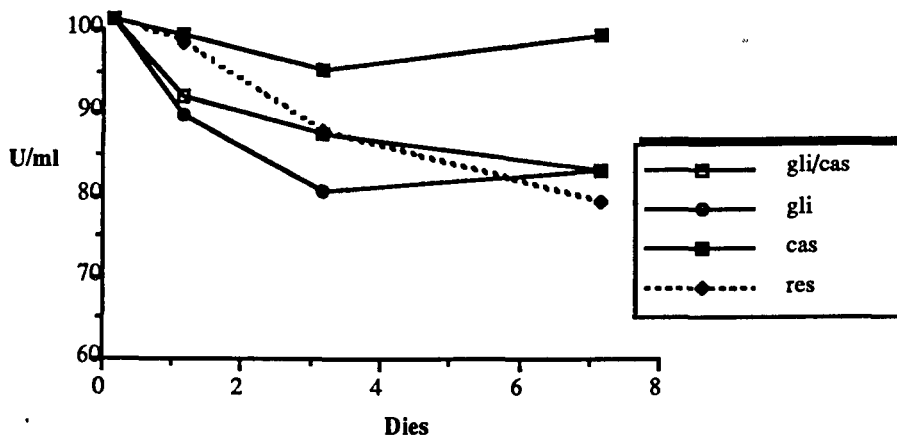
	Teixit fresc	T.Magatzemat amb N ₂ (l)
CalpII	2,08 U/g	0,5 U/g
Calp I	4,4 U/g	3,2 U/g

Aquests resultats aconsellaven fer tot el protocol d'aïllament i determinació de l'activitat el mateix dia del sacrifici, la qual cosa condicionà tot el disseny experimental.

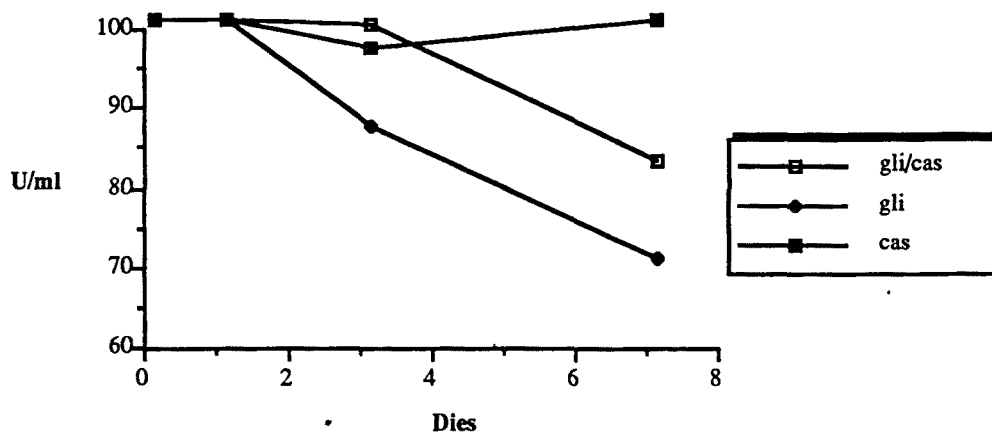
5.2.4.3. Condicions de magatzematge de l'enzim purificat.

Per tal de poder determinar l'activitat calpastatina calia obtenir una bona quantitat d'activitat calpaïna, per la qual cosa calia garantir la seva conservació. Donat que a 4°C l'enzim mantenia intacte la seva activitat durant com a mínim un dia, tal i com s'observà durant les proves de recuperació, s'assajaren diferents condicions: Glicerol 10% (gli), Casseïna 1mg/ml (cas), ambdós compostos (gli/cas), cap aditiu (res).

Percentatge de manteniment de l'activitat calpaïna I segons les condicions de magatzematge



Percentatge de manteniment de l'activitat calpaïna II segons les condicions de magatzematge

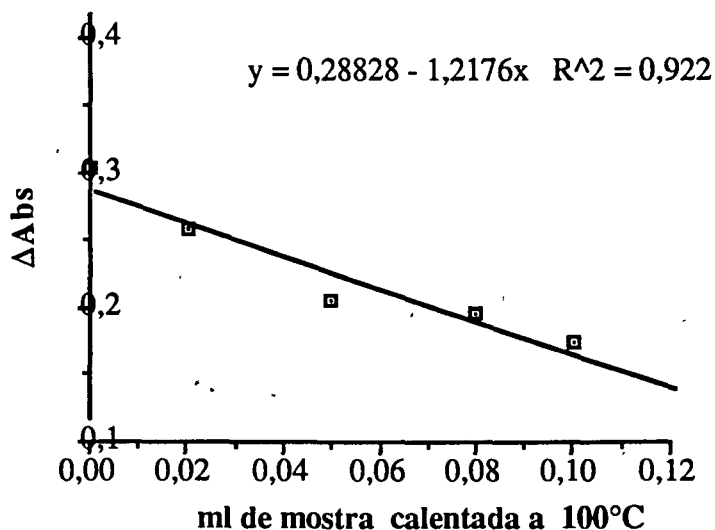


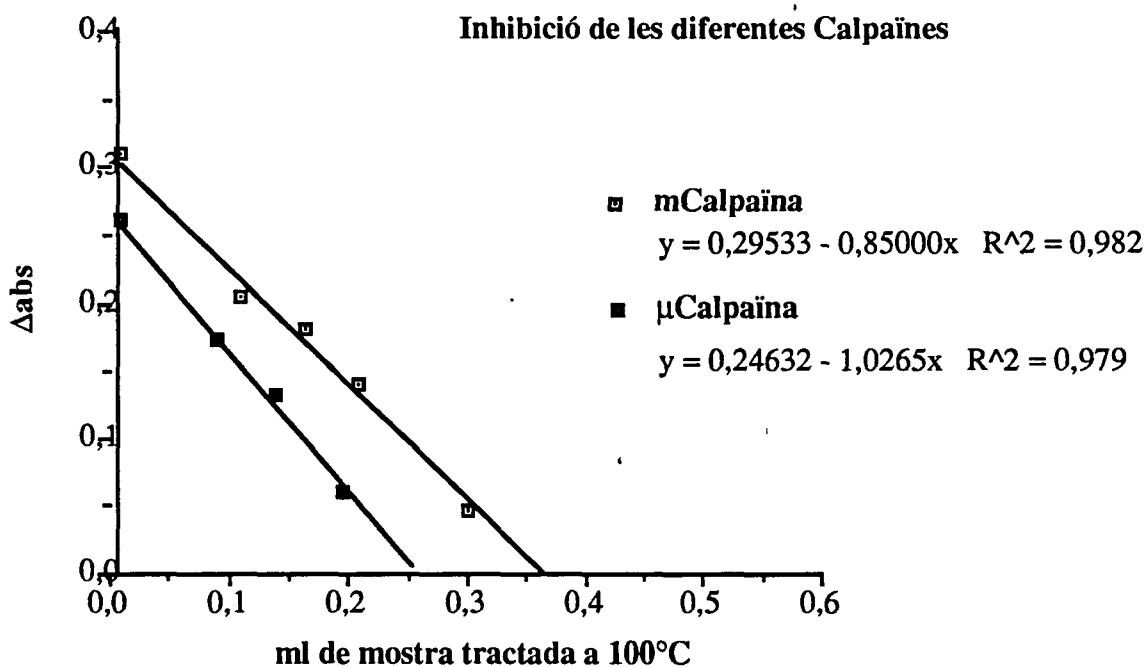
La millor manera de magatzemar les dues isoformes de calpaïna és a 4°C amb 1mg/ml de casseïna. Tantmateix això aquesta dada ajudava a refermar la sospita que, quan s'isolen les activitats calpaïna en presència de substractes es minimitza l'autòlisi, sospita que es despenia de la alta recuperació que es trobava quan la calpaïna parcialment purificada s'addicionava a homogenats musculars, mentre que la recuperació era molt pobre quan es repetia el protocol amb calpaïna prèviament purificada. Això explica els baixos percentatges de recuperació de Ou & Forsberg (1991).

Amb aquesta informació s'estava en condicions de validar el protocol de determinació de la calpastatina:

5.2.4.4. Linialitat de l'inhibició

Per comprovar que l'assaig de l'inhibidor era proporcional a la quantitat de calpastatina present, es mesuraren l'activitat d'al.líquotes equivalents de μ -calpaïna, prèviament aïllada per nosaltres, en presència de diferents quantitats de sobrenadants procedents d'homogenat muscular sotmesos a tractament tèrmic. Aquest experiment es repetí emprant ambdues isoformes de calpaïna, per tal de comprovar el seu comportament diferenciat respecte de l'inhibidor.





Els resultats demostren que l'assaig és lineal en el rang d'inhibició assajat, aquest rang coincideix amb el referenciat per (Cottin et al 1983) entre el 20-50%. De totes maneres, si s'havien trobat diferents nivells de calpaïna segons els teixits que s'analitzaven també es pot esperar que succeeixi el mateix amb el seu inhibidor. Per tant caldria fer l'assaig amb diferents quantitats de mostra tractada i prendre com a bons els resultats que pertanyessin a aquest rang.

Per altra banda nos'observaren pèrdues significatives d'activitat degudes al magatzematge a -80°C del sobrenadant procedent de la mostra tractada a 100°C .

Tot i que Cottin et al (1983) demostraven que la μ -calpaïna necessitava el triple d'inhibidor que la m-calpaïna, quan la calpastatina era purificada, nosaltres trobàrem una inhibició un 20% superior en la isoforma μ -calpaïna. Això ens feu pensar en la possibilitat de la presència de l'activador referenciat per Pontremolli et al. (1990), el qual sembla actuar reduint els requeriments de calci de la m-calpaïna i impeding els efectes inhibitoris de la calpastatina. Davant d'aquesta

possibilitat en el protocol rutinari preferirem mesurar l'inhibició sobre la μ Calpaïna.

Si aquest activador existia calia quantificar-lo. A partir del protocol descrit per Pontremolli et al (1990) i d'altres notícies posteriors del mateix grup (Michetti et al., 1991, Salamino et al., 1993) intentàrem repetides vegades de purificar-lo per tal de poder dissenyar un protocol optimitzat de quantificació. El protocol es basaba en la termoestabilitat del péptid, en la possibilitat de solubilitzar-lo de la membrana, lloc on és anclat habitualment, amb EGTA i/o amb NaCl 1M i/o amb sonicació, i en el fet que l'activador no es retenia en una columna de DEAE-Celulosa a baixa força iònica, mentre que sí ho feien la resta de components del del sistema. Donat que els diversos intents han estat infructuosos, i donat el fet que, fins a la data, cap altre grup no n'ha referenciat la seva existència, purificació o quantificació, desistirem de l'intent.

5.3. Disseny experimental

Per aquest experiment s'empràren rates mascles de la soca Zucker. Setze dels animals s'escolliren fenotípicament prims (*Fa/?*), i vuit obesos (*fa/fa*). Tots ells s'obtingueren de Harlan Olac Ltd. (Bicester, U.K.) amb 5 setmanes d'edat. Després de dos dies d'aclimatació a les noves condicions d'estabulació, els animals prims es separaren en dos grups de vuit animals cada un, de manera que els pesos promig no fóssin estadísticament diferents, i foren engabiats per parelles. Un d'aquest dos grups (grup CAF) s'alimentà "ad libitum", a partir d'aquest moment, amb dieta de Cafeteria, tal i com es relata en el capítol 3. Tant els animals prims restants (grup CON), com els genèticament obesos (grup FA) els fou subministrat "ad libitum" pinso per a rata (A04, Panlab, Barcelona). En condicions de constància tant en la temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$), com en el cicle llum-fosc (08:00-20:00h) de l'estabulari, durant 30 dies. En aquest moment els pesos promig dels animals dels grups CAF i FA foren clarament superiors als dels del grup CON. (320 ± 4 g, 381 ± 11 g, 253 ± 5 g, respectivament).

El fet que la congelació dels músculs alterés els continguts de les diferents activitats calpaïna, implicà que en un dia només es

puguessin sacrificar 6 animals, donat que, amb les condicions del nostre laboratori, només es podien processar 24 músculs en dues tandes de 12.

A les 10:00h un animal de cada grup fou pesat i mort per dislocació cervical, dues hores després d'haver-los retirat l'aliment. Els músculs d'ambdues potes, soleus gastrocnemius i tibialis, i el cor foren disseccionats i pesats individualment. A partir d'aquest moment es seguí el protocol de purificació de calpaïnes explicat en la 5.2 per a la primera tanda. Mentre es centrifugava la primera tanda, s'obtinguéren i homogeneïtzaren els músculs de la segona tanda.

Donat que a 4°C i en presència de substrat, no hi ha pèrdua significativa d'activitat, calpaïna els sobrenadants de la primera tanda es deixàren en aquestes condicions fins que fou possible l'aplicació dels 24 sobrenadants a la reïna. Prèviament s'havien enretirat les al.líquotes suficients per a la determinació de proteïnes (Lowry et al., 1951) necessària per al càlcul de l'activitat específica, i per a la determinació de calpastatina.

Les al.líquotes de sobrenadant reservades per la quantificació de calpastatina, eren tractades 5 min a 100°C, després d'un període de 30s per permetre l'equilibri tèrmic entre el bany i l'interior dels tubs, un cop centrifugat a 15000g durant 10 min a 4°C, es recollien els sobrenadants i es guardaven a -80°C fins el moment de l'assaig corresponent. L'assaig de l'activitat calpaïna es portava a terme tal i com s'ha explicat anteriorment, en la secció 5.2.

El protocol d'isolament i l'assaig de les activitats proteolítiques de dos animals per grup eren completats en una jornada. De manera que en quatre jornades, s'enllestien totes les determinacions de calpaïnes per a tots els animals participants de l'experiència.

El cinqué dia es dedicava a l'obtenció de la quantitat suficient de μ -calpaïna per tal de quantificar les activitats calpastatina. L'obtenció es feia de múscul esquelètic de la cama d'animals Zucker prims de la nostra colònia s'en determinava l'activitat i es conservava en les condicions esmentades en la secció 5.2. En aquest dia també es feren proves preliminars de calpastatina per a determinar-ne el rang

adequat de quantitat de mostra de cada múscul i cada grup per tal d'obtenir entre un 20% i un 50% d'inhibició.

El dia sisé es descongelaven les mostres i s'assajaven per triplicat segons el protocol relatat en la secció 5.2.

Estadística

La qüestió que es preten discutir és si els paràmetres, tant del grup CAF com del grup FA, són diferents respecte dels del grup CON. És per això que s'ha cregut més addient comparar les mitjanes d'aquells grups per separat amb les del grup de referència, tot i emprant un test t d'Student per a poblacions desaparellades. S'ha comprovat prèviament que els grups mostrals estan distribuïts normalment amb la prova no paràmètrica de Kolmogorov-Smirnov, i que tenen igualtat de variància mitjançant un test de Levene.

5. 4 Resultats

Quan examinem els resultats entre músculs esquelètics, als animals prims observem que el soleus té una activitat específica unes 3 vegades superior en qualsevol de les isoformes de calpaïna, que la continguda al tibialis o al gastrocnemius. Els percentatges relatius de les dues isoformes respecte del total del contingut en calpaïna no varien sensiblement entre els músculs dels animals prims, estant al voltant de 35-40% per la m-calpaïna, paràmetre que no es veu alterat significativament com a conseqüència, ni de l'obesitat genètica, ni de l'obesitat nutricional. Els gastrocnemius tenen una activitat específica inferior a la dels tibialis, la qual cosa es pot atribuir en part al fet que els gastrocnemius mostraren una concentració superior de proteïna extractable.

Soleus.

En el soleus, la obesitat genètica incrementa significativament, tant en activitat específica com quan s'expressa per gram de teixit, l'activitat μ calpaïna. Com a conseqüència de la no variació dels nivells de l'inhibidor, la raó calpaïna/calpastatina és incrementada en els soleus dels animals Zucker (*fa/fa*).

Pel que fa a l'obesitat nutricional, el soleus de les rates sotmeses a dieta de cafeteria no veu alterats les seves activitats m i μ calpaïna . La relació calpaïna/calpastatina no es veu alterada significativament.

Gastrocnemius

El gastrocnemius de l'animal amb obesitat genètica, te incrementada l'activitat μ -calpaïna, mentre que la isoforma m -calpaïna no la veu alterada. La relació calpaïna/calpastatina és incrementada, tot i no haver variacions en l'activitat inhibidora.

No s'observen modificacions significatives en cap dels paràmetres mesurats com a conseqüència de l'obesitat generada per la dieta de cafeteria.

Tibialis.

La obesitat genètica no incrementa els nivells de calpaïna total en el tibialis, mercès a increments no significatius en ambdues isoformes de la calpaïna. Tot i un manteniment en l'activitat calpastatina, la raó calpaïna/calpastatina no és incrementada significativament, pot ser per què l'error relatiu en la mesura sigui força gran en acumular l'error de dues mesures.

El tibialis és en el únic múscul on la dieta de cafeteria causa una alteració significativa en l'activitat d'ambdues isoformes de calpaïna, tot i disminuïnt-les, sense que sigui suficient per alterar la relació calpaïna/ calpastatina.

Cor

El cor dels animals prims, te uns nivells de m -calpaïna propers al del tibialis, mentre que la isoforma μ presenta uns nivells semblants al soleus. D'aquesta manera la contribució de la isoforma m -calpaïna es veu reduïda a un 29 % respecte del total. Aquest resultat pot fer pensar que, tot i la cura amb la qual s'ha portat a terme l'exanguinació, no es pot descartar la presència de cèl.lules sanguïnes, les quals són molt riques en la isoforma μ . De totes maneres, el fet que la magnitud tingui un error comparable al que presenten la resta de músculs, i

que, tant la magnitud com l'error, restin invariables en els tres grups examinats, són arguments que fan pensar en que aquesta sigui la distribució real de les isoformes de la calpaïna en el cor.

En el cor no es veuen alteracions en els nivells de cap dels elements del sistema ni com a conseqüència de l'obesitat nutricional ni com a conseqüència de l'obesitat genètica, tot i que s'aprecia una reducció no significativa de tots els paràmetres en el grup CAF.

Taula 1 Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (Caf) sobre les activitats enzimàtiques m-calpaïna, μ -calpaïna, i calpastatina en el soleus.

	Grup		
	Con	Caf	<i>fa/fa</i>
Sistema Calpaïna			
mCalpaïna (U/ g. Prot)	329±18	482±71	481±73
mCalpaïna (U / g. Teixit)	9.41±0.29	13.4±1.9	13.4±1.9
μ Calpaïna (U/ g. Prot)	620±55	781±66	887±73 *
μ Calpaïna (U / g. Teixit)	18.2±2.2	21.7±1.3	24.8±1.8 *
% m-Calp V.S. Total	35.1±2.9	37.2±4.2	35.2±3.9
Calpastatina (U/ g. Prot)	439±28	462±34	371±25
Calpastatina (U / g. Teixit)	12.1±0.7	13.6±0.8	10.8±0.9
Calpaïna/Calpastatina	2.21±0.27	2.76±0.22	4.13±0.38 **

Els valors són mitjanes \pm S.E.M.de 7-8 individus. *, **, *** indiquen diferències significatives ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, respectivament) dels grups CAF o *fa/fa* respecte del Grup CON quan es comparen les mitjanes mitjançant la prova de la *t* d'Student.

Taula 2. Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (Caf) sobre les activitats enzimàtiques m-calpaïna, μ -calpaïna, i calpastatina en el gastrocnemius

Paràmetre	Grup		
	Con	Caf	<i>fa/fa</i>
Sistema Calpaïna			
mCalpaïna (U/ g. Prot)	83.9±5.4	71.2±6.3	76.7±3.8
mCalpaïna (U / g. Teixit)	2.12±0.13	2.14±0.09	2.27±0.13
μ Calpaïna (U/ g. Prot)	116±6	112±7	154±11**
μ Calpaïna (U / g. Teixit)	3.29±0.13	3.21±0.18	4.58±0.26**
% m-Calp V.S. Total	42.2±1.9	39.0±1.5	33.0±1.1
Calpastatina (U/ g. Prot)	149±12	125±15	124±17
Calpastatina (U / g. Teixit)	4.46±0.28	3.82±0.42	3.85±0.48
Calpaïna/Calpastatina	1.37±0.08	1.58±0.17	1.93±0.17*

Els valors són mitjanes \pm S.E.M.de 7-8 individus. *, **, *** indiquen diferències significatives ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, respectivament) dels grups CAF o *fa/fa* respecte del Grup CON quan es comparen les mitjanes mitjançant la prova de la *t* d'Student.

Taula 3. Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (Caf) sobre les activitats enzimàtiques m-calpaïna, μ -calpaïna, i calpastatina en el tibialis.

Paràmetre	Grup		
	Con	Caf	<i>fa/fa</i>
Sistema Calpaïna			
mCalpaïna (U/ g. Prot)	117±5	99±6*	125±4
mCalpaïna (U / g. Teixit)	3.03±0.07	2.58±0.06*	3.19±0.09
μ Calpaïna (U/ g. Prot)	223±12	175±9**	244±14
μ Calpaïna (U / g. Teixit)	5.61±0.25	4.66±0.28*	6.26±0.32
% m-Calp V.S. Total	34.6±1.8	35.6±2.2	34.1±1.9
Calpastatina (U/ g. Prot)	213±10	336±22	200±27
Calpastatina (U / g. Teixit)	5.23±0.28	5.85±0.36	5.21±0.49
Calpaïna/Calpastatina	1.67±0.12	1.53±0.21	1.71±0.16

Els valors són mitjanes \pm S.E.M.de 7-8 individus. *, ** , *** indiquen diferències significatives ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, respectivament) dels grups CAF o *fa/fa* respecte del Grup CON quan es comparen les mitjanes mitjançant la prova de la *t* d'Student.

Taula 4. Efecte de l'obesitat genètica (*fa/fa*) i nutricional (Caf) sobre les activitats enzimàtiques m-calpaïna, μ -calpaïna, i calpastatina en el cor.

Paràmetre	Grup		
	Con	Caf	<i>fa/fa</i>
Sistema Calpaïna			
mCalpaïna (U/ g. Prot)	176±10	154±12	161±19
mCalpaïna (U / g. Teixit)	4.57±0.38	4.12±0.27	4.18±0.32
μ Calpaïna* (U/ g. Prot)	431±39	370±30	499±55
μ Calpaïna (U / g. Teixit)	11.2±0.7	10.4±0.6	12.6±1.1
% m-Calp V.S. Total	29.3±1.1	29.5±1.1	24.4±1.0
Calpastatina (U/ g. Prot)	517±55	502±63	501±54
Calpastatina (U / g. Teixit)	13.7±1.3	12.4±0.8	13.2±0.9
Calpaïna/Calpastatina	1.58±0.12	1.51±0.18	1.54±0.21

Els valors són mitjanes \pm S.E.M.de 7-8 individus. *, **, *** indiquen diferències significatives ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, respectivament) dels grups CAF o *fa/fa* respecte del Grup CON quan es comparen les mitjanes mitjançant la prova de la *t* d'Student.

A continuació mostrem les variacions percentuals dels nivells dels diferents elements del sistema calpaïna en els grups CAF i *fa/fa* respecte dels valors en el grup CON. Tantmateix, amb l'objecte d'enriquir la discussió, mostrem també els resultats del capítol anterior.

Taula 5. Percentatge de variació dels paràmetres musculars en la obesitat genètica i nutricional respecte dels animal prims.

PROTEÏNAMUSCULAR	Caf				<i>fa/fa</i>			
Pes corporal	+21				+34			
Múscul	Cor	Tib	Gast	Sol	Cor	Tib	Gas	Sol
Pes	+9	+8	+8	+3	+2	-18	-13	-20
Proteïna Total	+11	+8	+8	+3	+9	-17	-11	-21
SISTEMA CALPAÏNA	Caf				<i>fa/fa</i>			
Múscul	Cor	Tib	Gast	Sol	Cor	Tib	Gas	Sol
mCalp	-13	-13	-1	+29	-9	+6	-8	+29
μCalp	-14	-16	-3	+18	+14	+17	+28	+28
Calpastatina	-3	-12	-16	+11	-3	-5	-16	-11
Calp/Calpastatina	-16	-11	+12	+21	+7	+11	+26	+46

ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES EN MÚSCULS INDIVIDUALS

	Caf				<i>fa/fa</i>			
Múscul	Cor	Tib	Gast	Sol	Cor	Tib	Gast	Sol
Lactat deshidrogenasa	+16	+21	+7	+6	-20	-12	+7	+26
Succinat deshidrogenasa	0	+37	+38	+42	0	-25	+22	+39
β-Oxoacil-CoA deshidrogenasa	+10	-5	+29	+13	+23	-26	+20	+13
Creatina Quinasa	-6	+7	+7	-18	+39	-8	+29	+28
Adenosina Quinasa	+4	-6	+6	+8	-12	-28	-8	+12

Els valors representen la diferència entre mitjanes, en tant per cent, respecte de llurs controls. Quan aquesta diferència fou significativa (test de la t d'Student, $p < 0,05$), s'ha ressaltat el valor amb negreta.

5.5 Discussió

La diferència entre nivells dels diferents elements del sistema calpaïna entre els músculs dels animals controls pot estar associada a diferències entre el tipus de fibres predominant. En els nostres resultats el soleus, amb predominància en fibres lentes i oxidatives, te nivells de calpaïna superiors als del gastrocnemius o tibialis, amb predominància de fibres ràpides (glicolítiques-oxidatives, i glicolítiques respectivament). Aquest resultat concorda amb el mostrat per Kim et al (1993) en múscul de porc, els quals correlacionen els nivells dels diferents elements del sistema amb els nivells de SDH i, per tant amb el caracter oxidatiu de la fibra. També s'ha trobat que la taxa de degradació de proteïnes en músculs lents i oxidatius és el doble que la dels ràpids (Garlick 1989). Aquest és un bon argument per a pensar que el sistema calpaïnes estigui implicat en el control de la degradació muscular. Per altra banda, no és aquest el primer estudi que parteix d'aquesta premisa: les variacions dels nivells d'activitat calpaïna s'han mesurat en vàries situacions fisiopatològiques en un intent de correlacionar-ho amb diferències amb taxes de degradació de proteïna: en la maduració a múscul de conills (Ou & Forsberg 1991), en l'aplicació de β -agonistes a múscul de rates (Mantle et al, 1991) o corders (Kretchmar et al 1989), en la restricció dietària de proteïnes a fetges de ratolí (Goicoechea et al 1993). Altres ho han mesurat més indirectament en tant que quantifiquen l'expressió dels mRNAs dels diferents elements del sistema calpaïna: en múscul d'ovelles sotmeses a estimulació β -adrenérgica (Parr et al 1992), múscul de conills dejunats (Ilian 1992), o en múscul de corders segons el (soques que pesen més o menys durant l'alletament) i la nutrició (quantitat de llet que se'ls permet consumir) (Speck et al 1993).

La quantitat de rols fisiològics amb que pot estar lligat aquest sistema (Goll, 1992), és una altra justificació per a la seva mesura en els nostres models.

Un enfoc emprat en alguns estudis per a determinar variacions en el sistema calpaïna en diverses situacions fisiopatològiques, ha estat

quantificar-ne l'expressió dels mRNAs respectius (Parr, 1992; Ilian , 1992), o emprant tècniques immunoquímiques.(Goicoechea, 1993). Aquestes mesures, per si mateixes, no tenen en compte l'ampli, i inexcusat, ventall de possibilitats de regulació posttranscripcionals i posttraduccionals que sembla tenir el sistema. La modulació in vivo que s'indueix per fosforilació de l'activitat dels diversos elements n'és un exemple força evident.(Kuo, et al., 1993; Adachi et al., 1991). És per això que alguns d'aquests autor acompanyen els resultats extrets d'aquestes tècniques de les activitats respectives. (Goicoechea, 1993). Aquesta és la justificació del protocol emprat.

El fet que els nivells de calpaïna superin la calpastatina en tots els músculs, es pot atribuir al fet d'emprar la isoforma μ calpaïna en la seva mesura. Ja hem esmentat en la secció 5.2 que la μ calpaïna necessita el triple de calpastatina per assolir la mateixa inhibició que la mcalpaïna, quan l'inhibidor és convenientment purificat (Cottin et al ,1983). Si es té en compte aquesta estequiometria, els valors de calpaïna total que s'hauriem de comparar amb la capastatina, mesurada emprant μ calpaïna, en cada grup serien els resultants de fer $0,333[mcalp] + [\mu calp]$. Això dona les següents relacions calpaïna/calpastatina en animals prims: soleus (1,66), gàstrocnemius (0,97) , tibialis (1,23), Cor (0,94). Tot i així, pel cas del soleus i tibialis, podem constatar una activitat proteolítica neta. De forma similar Mantle et al.(1992) publica una relació calpaïna/calpastatina de 1,2 en gastrocnemius pel cas de gastrocnemius de rates de la soca Rowett hooded Lister. La significativitat estadística entre grups no variarà en calcular la relació calpaïna/calpastatina d'una o altra manera, en tant que s'interconverteixen en aplicar un coeficient diferent en la combinació lineal que permet el càlcul del numerador.

Els nostres valors de calpaïna o calpastatina expressats en U per g de múscul en els animals prims, són comparables, tot i la diferència de soca, amb els mostrats per Gopalakrishna & Barsky (1985), els quals es refereixen a múscul esquelètic de rata de la soca Sprague Dawley femella, sense especificar quin, sobre tot si comparem els valors del gastrocnemius, o tibialis.

Cap dels dos models d'obesitat semblen alterar les diferències entre músculs pel que fa a la magnitud relativa de les activitats dels elements del sistema calpaïna.

Pel que fa a l'efecte de l'obesitat genètica, tant en el soleus com en el gastrocnemius l'augment d'un 28% en els dos casos, de l'activitat corresponent a la isoforma μ -calpaïna, en tant que depèn de concentracions més petites de calci, ho hem d'interpretar com un increment en la sensibilitat a pujades transitòries dels i locals dels nivells de calci. Per altra banda, l'augment de la relació calpaïna/calpastatina, d'un 46% en el cas del soleus i d'un 26% pel gastrocnemius, implicaria un increment en el potencial proteolític net, el qual es correlaciona prou bé amb la disminució del contingut de proteïna observat en el capítol anterior (un 20% pel soleus i un 13 % pel gastrocnemius), o amb un increment en la taxa de degradació com la trobada per Dunn (1982).

En el tibialis, aquesta situació no es dona, la qual cosa suggereix que, en aquest múscul el sistema és regulat de manera diferent. D'altra banda ja hem vist que és el teixit que presenta canvis més espectaculars en enzims relacionats amb la velocitat contràctil (es torna més lent) i canvis ultraestructurals més acusats.

La dieta de cafeteria no indueix canvis significatius en el sistema calpaïna del soleus i el gastrocnemius. Novament el tibialis observa un decrement significatiu en ambdúes isoformes de calpaïna. En el soleus i el tibialis aquest fet té una bona correspondència amb l'efecte que la dieta de cafeteria té en els continguts de proteïna muscular en aquests músculs. Pel gastrocnemius calen altres justificacions.

Alguns autors (Zamora 1988) (Estornell et al. 1994) han suggerit un increment en la síntesi concordaria amb aquestes dades i les de contingut de proteïna de les diverses fraccions.

En l'adaptació del múscul a la dieta de cafeteria, es pot apel·lar també a la participació d'altres formes de regulació del sistema calpaïna, per exemple a una rellevància fisiològica de l'inhibició reversible de les calpaïnes per efecte de l'oxidació observada in vitro per Kapprell et al (1989)

Aquesta hipòtesi justificaria un increment en les activitats calpaïnes per tal de mantenir la taxa de degradació en un soleus amb un potencial red/ox oxidant, i una menor taxa de degradació miofibril·lar, malgrat un manteniment dels nivells de les activitats calpaïna en gastrocnemius dels animals sotmesos a dieta de cafeteria. Alhora, reforçaria els arguments emprats en el tibialis. Una major taxa de síntesi incrementaria els efectes.

Pel que fa a l'obesitat genètica, si, finalment l'increment en maquinària oxidativa en els músculs no es tradueix en una major oxidació de substrats, com sembla arguir Campion et al (1987), no podrem parlar d'una inhibició superior del sistema calpaïna a causa d'un desplaçament del múscul cap a estats més oxidats.

Per últim aquests canvis en els nivells del sistema calpaïna com a conseqüència d'ambdúes obesitats, es produeixen sense una variació clara del tipus de fibres, com s'ha fet palès en el capítol 4. Malgrat que, en el tibialis de rates fa/fa, únic múscul on sembla probable un canvi en el perfil de tipus de fibra, un caràcter més lent i oxidatiu, porta associat un increment en els nivells de calpaïnes. En la resta, canvis en el mateix sentit pel que fa al tipus de fibra, produirien canvis en sentits oposats en els nivells del sistema calpaïna, segons en el múscul on es produís. Per tant el mecanisme que governa l'activitat del sistema calpaïna ha de ser més ampli que el que governa els canvis de tipus de fibres, la qual cosa sembla tenir certa lògica donada la ubiqüitat d'aquest sistema proteolític.

5.5 Bibliografia

Adachi Y., Ayako I-T, Chiaki T., Takano E., Murachi T., Hatanaka M. J.Biol.Chem. (1991) 266 6 : 3968-3972

Andresen K. Tom T.D.T., Strand M. J.Biol. Chem. (1991) 266 : 15086-15090

Bank N.L., Chakrabarti A.K., Konat G.W., Gantt-Wilford G., Hogan E.L. J. Neurosci. Res. (1992) 31 : 708-714

- Barrett A.J. Mc Donald J.K. Academic Press New York (1986) Vol 1 :
- Barrett M.J., Goll D.E., Thompson V.F. Life Sciences (1991) 48 : 1659-1669
- Busch W.A., Stromer M.H., Goll D.E., Suzuki A. J. Cell. Biol. (1972) 52 : 367
- Campion D.R., Shapira J.F., Allen C.E., Hausman G.J., Martin R.J. Growth (1987) 51 : 198-206
- Cong. J-Y., Goll D.E., Peterson A.M., Kapprell H-P. J. Biol. Chem. (1989) 264 : 10096-10103
- Cottin P., Vidalenc P.L., Merdaci N., Ducastaing A. Biochim. Biophys. Acta. (1983) 743 : 299-302
- Cullen M.J., Appleyard S.T., Bindoff L. Ann. N.Y. Acad. Sci. (1979) 317 : 440
- Cullen M.J., Fulthorpe J.J. J. Pathol. (1982) 138 : 129
- Dayton W.R., Goll D.E., Zeece M.G., Robson R.M., Reville W.J. Biochemistry (1976) 15 : 2150-2158
- Dayton W.R., Schollmeyer J.V., Lepley R.A., Cortes L.R. Biochim. Biophys. Acta. (1981) 659 : 48-54
- De Santis E., Pompili E., De Renzis G., Bondi A.M., Menghi G., Collier W.L., Fumagalli L. Histochemistry (1992) 97 : 263-267
- Dunn. M.A., Houtz S.K., Hartsook E.W. J. Nutr. (1982) 112 : 1862-1875
- Edmunds T., Nagainis P.A., Sathe S.K., Thompson V.F., Goll D.E. Biochim. Biophys. Acta. (1991) 1077 : 197-208
- Emori Y., Kawasaki H., Imajoh S., Imahori K., Suzuki K. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa (1987) 84 : 3590
- Fagan J.M., Waxman L, Goldberg A.L. Biochem.Journal (1987) 243 : 335

Gerard K.W., Schneider D.L. J. Biol. Chem. (1979) 254 : 11798

Goicoechea S.M., Tabares M.I., Sabas M.E., Pucciarelli M.G., Conde R.D.
Horm. Metab. Res. (1994) 26 4 : 165-212

Goldberg A.L., Kowit J., Etlinger J., Klemes Y. Protein turnover and
lysosomal function . H.L. Segal and D.J. Doyle Eds. (1978) Academic
press N.Y. : 171-196

Goldeberg A.L. and St John A.C. Annu. Rev. Biochem. (1976) 45 : 747.

Goll D.E., Kleese W.C., Szpacenko A. in: Animal Growth Regulation,
edited by D.R. Campion, G.J. Huasman and R.J. Martin. Plenum Press,
New York (1989) : pp. 141-182

Goll D.E., Robson M.R., Stromer M.H. Dukes' physiology of domestic
animals (1984) 10 ed. Cornell Univ. Press. Ithaca. N.Y. : 548-580

Gool D.E., Kleese W.C., Sloan D.A., Shannon J.D., Sathe S.K., Edmunds
T. Cienc. Biol. (Luanda) (1986) 11 : 75

Gopalakrishna R., Barsky S.H. Anal. Biochem. (1985) 148 : 413-423

Gopalakrishna R., Barsky S.H. J. Biol. Chem. (1986) 261 30 : 13936-
13942

Ilian A.M., Forsberg N.E. Biochem. J. (1992) 287 : 163-171

Iversen P., Ertbjert P., Larsen L.M., Monllao S., Møller A.J. Biocchimie
(1993) 75 : 869-872

Kapprell H.P., Goll D.E. J. Biol. Chem. (1989) 264 30 : 17888-17896

Kay J., Heath R., Dahlmann B., Kuehn L., Stauber W.T. Intracellular
protein catabolism .Khairallah, Bond and Bird Eds. (1985) Allan R. Liss
N.Y. : 195-205

Kim Y.S., Sainz R.D., Lee Y.B. Comp. Biochem . Physiol. A. (1993)
105(A) 2 : 253-237

Kretchmar D.H., Hathaway M.R., Epley R.J., Dayton W.R. Arch.
Biochem. Biophys. (1989) 275 1 : 228-235

- Kuboki M., Ishii H., Kazama M. *J. Biochemistry* (1990) 107 : 776-780
- Kumamoto T., Kleese W.C., Cong J., Goll D.E., Pierce P.R., Allen R.E. *The anatomical record.* (1992) 232 : 60-72
- Kuo T., Giacomelli F., Kithier K., Malhotra A. *J. Mol. Cell Cardiol.* (1981) 13 : 1035
- Kuo W.N., Ganesan U., Walbey D.L., Davis D.L., Kuo J. *Biochem. Arch.* (1993) 9 : 281-286
- Lane R.D, Allan M.D., Mellgren R.L. *Exp. Cell Res.* (1992) 203 : 5-16
- Lane R.D, Mellgren R.L., Méricle M.T. *J. Mol. Cell. Cardiol.* (1985) 17 : 863-872
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.J., Randall A.J. *J. Biol. Chem.* (1951) 193 : 265-275
- Maki M., Takano E., Mori H., Kannagi R., Murachi T., Hatanaka M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1987) 143 : 300-304
- Mantle D., Delday M.I., Maltin C.A. *Muscle nerve* (1992) 15 : 471-478
- Mc Donald J.K. and Barrett A.J. *Academic Press New York.* (1986) Vol. 2 :
- Mellgren R.L., Repetti A., Muck T.C., Easley J. *J. Biol. Chem.* (1982) 257 : 9072-9077
- Michetti M., Viotti P.L., Melloni E., Pontremolli S. *Eur. J. Biochem.* (1991) 202 : 1177-1180
- Morkin. E., *Science* (1970) 167 : 1499
- Murachi T., Hatanaka M., Yasumoto Y., Nakayama N., Tanaka K. *Biochem. Int.* (1981) 2 : 651-656
- Nakamura M., Imahori K., Kawashima S. *Comp. Biochem. Physiol.B. Comp. Biochem.* (1989) 89 : 381-384
- Nishimura T., Goll D.E. *J. Biol. Chem* (1991) 266 : 11842-11850

- Obinata T., Maruyama K., Sugita H., Kohama K., Ebashi S. *Muscle nerve* (1981) 4 : 456
- Ohno S., Emori Y., Imajoh S., Kawasaki H., Kisaki H., Kisaragi M., Suzuki K. *Nature* (1984) 312 : 566-570
- Ojha M., Wallace C.J.A. *J. Bacteriology* (1991) 291 : 1254-1260
- Otsuka Y., Goll D.E. *J. Biol. Chem.* (1987) 262 : 5839
- Ou B.R., Forsberg N.E. *Am. J. Physiol.* (1991) 261 (Endocrinol. Metab. 24) : E677-E683
- Parr T., Bardsley R.G., Gilmour R.S., P.J. Buttery *Eur. J. Biochem.* (1992) 208 : 333-339
- Pickart C.M. and Rose I.A. *J. Biol. Chem.* (1985) 260 : 7903
- Pinter M., Friedrich P. *Biochem J.* (1988) 253 : 467-473
- Pontremolli S., Viotti P.L., Michetti M., Sparatore B., Salamino F., Melloni E. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1990) 171 : 569-574
- Reeves J.P., Decker R.S., Crie J.S., Wildenthal K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1981) 82 : 7545
- Rogers S., Wells R., Reichsteiner M. *Science* (1986) 234 : 364-368
- Salamino F., De Tullio R., Mengotti P., Viotti P.L., Melloni E., Pontremolli S. *Biochem. J.* (1993) 290 : 191-197
- Sasaki T., Kikuchi T., Yumoto N., Yoshimura N., Murachi N. *J. Biol. Chem.* (1984) 259 : 12489-12494
- Seubert P., Baudry M., Dudek S., Lynch G. *Sunapse.* (1987) 1 : 20-24
- Shiba E., Ariyoshi H., Yano T., Sakon M., Kambayashi J., Mori T. *Biochem. Biophys. Res. comm.* (1992) 182 2 : 461-465
- Sorimachi H., Imajoh-Ohmi S., Emori Y., Kawasaki H., Ohno S., Minami Y., Suzuki K. *J. Biol. Chem.* (1989) 264 : 20106-20111

Sorimachi H., Saido T.C., Suzuki K. FEBS letters (1994) 343 : 1-5

Sorimachi H., Tokayama-Sorimachi N., Saido T.C., Kawasaki H., Sugita H., Miyasaka M., Arahata K., Ishiura Shoichi, Suzuki K. J. Biol. Chem. (1993) 268 14 : 10593-10605

Speck P.A., Thomson B.C., Collingwood K.M., Gilmour R.S., Sainz R.D., Bardsley R.G., Buttery P.J., Oddy H.V. Biochimie (1993) 75 : 925-929

Suzuki K. In intracellular calcium-dependent proteolysis. Mellgren RL, Murachi eds. (1990) CRC Press. Boca Raton. Florida. : 37-54

Tanaka K., Li K., Ichihara A., Waxman L., Goldberg A.L. J. Biol. Chem. (1986) 261 : 15197

Tanaka K., Waxman L., Goldberg A.L. J. Cell. Biol. (1983) 96 : 1580

Thompson V.F., Goll D.E., Kleese W.C. Biol Chem Hoppe-Seyler (1990) 371 Suppl. : 177-185

Wang K.K.W., Villalobo A., Roufogalis B.D. Biochem J. (1989) 262 : 693-706

Waxman L., Fagan J.M., Goldberg A.L. J. Biol.Chem. (1987) 262 : 11994

Wildenthal K., Wakeland J.R., Ord J.M., Stull J.T. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1980) 96 : 793

Wolfe F.H., McGeeK., Spazenko A., Goll D.E. Life Sci. (1989) 45 : 2093-2101

Wolitsky B.A., Hudecki M.S., Segal H.L. Biochim. Biophys. Acta (1984) 803 : 106

Zeeman R.J., Kameyama T., Matsumoto K., Bernstein P., Etlinger J.D. J. Biol. Chem. (1985) 260 : 13619

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

METABOLISME PROTEICO-MUSCULAR A L'OBESITAT

Memòria que presenta

MARTÍ YEBRAS i CAÑELLAS

per optar al grau de DOCTOR EN CIÈNCIES
QUÍMIQUES.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TARRAGONA, MARÇ 1995

**6.- Estudi in vitro de la degradabilitat de les miofibres musculars
per les calpaïnes. Efecte de l'obesitat genètica i nutricional**

6.1 Introducció

En capítols anteriors hem intentat correlacionar l'activitat dels diferents elements del sistema calpaïna en el múscul, sistema al qual se li atribueix el control dels primers esdeveniments de la degradació miofibril·lar, amb les variacions observades en el seu contingut de proteïnes a causa de l'obesitat genètica i de la induïda nutricionalment. Les disminució en la isoforma μ calpaïna permet explicar en els músculs amb més contingut en fibres oxidatives, soleus i gastrocnemius, dels animals fa/fa un descens en el contingut de proteïna per sí mateixa. Tantmateix l'efecte que l'obesitat nutricional té sobre les activitats de les dues isoformes de la calpaïna, reducció en el tibialis i manteniment en el soleus, expliquen els efectes observats en aquests músculs per aquesta situació fisiològica. Ara be, cal trobar altres justificacions pel que succeeix en el tibialis per efecte de l'obesitat genètica (disminució en el contingut de proteïna malgrat el manteniment de les activitats calpaïna), o el que esdevé amb el gastrocnemius en l'obesitat nutricional, (increment en el pes malgrat el no haver cap modificació en l'activitat calpaïna).

El sistema calpaïna té, com hem vist, una regulació complexa, però en la majoria dels casos depèn de variacions transitòries, molt ràpides i locals, dels seus efectors (Ca^{2+} , fosfolípids, H^+ ,...) de manera que llur quantificació pot conduir a resultats contradictoris i no corresponents amb la realitat. La possible variació de la qualitat del substrat per efecte de les situacions d'obesitat objecte del nostre estudi representa una modulació a llarg termini d'aquest sistema proteolític.

És un corrent força assumit que les modificacions covalents de la proteïnes n'alteren la seva velocitat de recanvi (Stadman 1990). N'existeixen moltes reaccions de modificació que, in vitro, han incrementat velocitat de degradació de proteïnes per diverses proteases purificades (Rivett 1986). Oxidació de diversos residuus aminoàcídics, entre ells els grups tiol, esterificació de grups hidroxil, fosforilacions de serines o treonines, acilació de lisines, glicosilació de grups amida o hidroxil, (Stadman 1990) en són uns exemples. L'oxidació de residus tiol ha estat l'argument que han emprat Belcastro et al. (1991) per explicar una velocitat de degradació

incrementada en miofibrilles aïllades de múscul cardíac de rata obesa, quan són incubades amb una quantitat coneguda de calpaïna.

El múscul, el contingut en proteïnes del qual, varia més i de manera diferent en funció de si l'obesitat és d'origen genètic o nutricional respecte del que passa en els animals prims, és el gastrocnemius. És per aquest motiu l'hem triat per aquest estudi, en el qual no pretenem esbrinar quin és el mecanisme de modificació del substrat, si existeix, sinò si la susceptibilitat de les miofibrilles a les calpaïnes varia com a conseqüència de l'obesitat.

6.2 Materials i mètodes

Per aquest experiment s'empràren rates mascles de la soca Zucker. deu dels animals s'escolliren fenotípicament prims (*Fa/?*), i cinc obesos (*fa/fa*). Tots ells s'obtingueren de Harlan Olac Ltd. (Bicester, U.K.) amb 5 setmanes d'edat. Després de dos dies d'aclimatació a les noves condicions d'estabulació, els animals prims varen ésser separats en dos grups de vuit animals cada un, de manera que els pesos promig no fóssin estadísticament diferents, i engabiats per parelles. Un d'aquest dos grups (grup Caf) fou, a partir d'aquest moment, alimentat amb dieta de Cafeteria, tal i com es relata en el capítol 3. Tant els animals prims restants (grup Con), com els genèticament obesos (grup *fa/fa*) s'alimentaren "ad libitum" amb pinso per a rata (A04, Panlab, Barcelona). En condicions de constància en la temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), com en el cicle llum-foscor (08:00-20:00h) de l'estabulari, foren mantinguts durant 30 dies.

Obtenció de Miofibril.les

A les 10:00h els animal foren pesats i morts per dislocació cervical, dues hores després d'haver-los retirat l'aliment. Els gastrocnemius de les dues cames varen ser disseccionats i pesats individualment.

El procés d'obtenció de miofibrilles era similar al de Etlinger et al (1976), amb les variacions proposades per Tatsumi et al. (1993). Es procedí com es relata a continuació: Després de retirar el teixit connectiu, els músculs fóren esmicolats i dividits en tres pools de 3g. Més tard fóren homogeneitzats en 5 volums de tampó relaxant de pirofosfat (PRB) (KCl 100mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 2mM, Tris-Maleat 100mM, EGTA 2mM, β -mercaptoetanol 1mM i MgCl_2 2mM, a pH 6,8 a 25°C) emprant un OMNImixer (OMNI International, Inc., Waterbury, CT) a

la meitat de potència durant 10 segons i en tres cops. El teixit connectiu, fàcilment visualitzable com a grups blancs lliures de múscul, era enretirat i l'homogenat es centrifugava a 800g durant 10 min a 25°C.

El pellet era resuspès en Tampó de baixa força iònica (LSB)(KCl 100mM, Tris-Maleat 100mM, EGTA 2mM, β -mercaptoetanol 1mM i $MgCl_2$ 2mM, a pH 6,8 a 25°C) al qual se li havia addicionat Leupeptina per tal que assolís una concentració de 30 μ M. En aquest punt es comprovava l'homogeneïtat de la suspensió, bàsicament que no hagessin feixos grossos de miofibres, en un microscopi de contrast de fases. En cas que no fos homogènia, es tornava a repetir el procés d'homogeneïtzació i el resultat es centrifugava altra cop. Rutinàriament això s'aconseguia en els cinc primers rentats del pellet amb LSB.

Després de vuit rentats amb LSB, el pellet era rentat un cop amb LSB amb Leupeptina i Tritó (Tritó X-100 al 0,02% i Leupeptina 30 μ M en KCl 100mM, Tris-Maleat 100mM, EGTA 2mM, β -mercaptoetanol 1mM i $MgCl_2$ 2mM, a pH 6,8 a 25°C) i un altre en LSB amb Leupeptina i Deoxicolat Sòdic (DOC) (Deoxicolat sòdic 0,02% i Leupeptina 30 μ M en KCl 100mM, Tris-Maleat 100mM, EGTA 2mM, β -mercaptoetanol 1mM i $MgCl_2$ 2mM, a pH 6,8 a 25°C). Per últim el pellet era rentat 4 vegades amb LSB, per tal d'eliminar qualsevol residu de Tritó o DOC. En aquest punt s'agafaven tres al·líquotes 50 μ l de mostra per a la determinació de proteïnes. Rutinàriament s'obtenien 20 mg de proteïna per cada g de múscul.

Finalment el pellet era resuspès en 5volums de KCl 100mM, 250 μ M d'àcid Tioglicòlic i Glicerol 50% i magatzemat a -20°C fins el moment de procedir a la incubació amb calpaïna.

Incubacions de miofibrilles

Un cop descongelades les mostres éren centrifugades a 20000g durant 20min a 0°C. El pellet resultant era resuspes en LSB i centrifugat a 800g, 10min a 25°C. Aquest procediment es feia quatre vegades. El pellet final es resuspènia en el volum suficient de tampó d'incubació (10mM KCl, 50mM de Tris -HCl i 10mM de β -mercaptoetanol, pH= 7,5 a 25°C) per aconseguir 4mg/ml .

Durant experiències prèvies es mostrà que aquesta suspensió era lliure d'activitat proteasa tot i observant que no existien variacions en els perfils electroforètics entre les suspensions a inicials i finals de 30 minuts d'incubacions fetes en presència de calci 4mM o en presència de EDTA 1mM.

El dia abans de fer les incubacions, s'aïllava μ calpaïna segons el protocol descrit en el capítol 5. S'en mesurava l'activitat i es concentrava per ultrafiltració si calia, per tal d'aconseguir l'activitat necessària (0,4 U/ml) per les incubacions. Donat que s'havia de magatzemar sense cap additiu, el dia de l'experiment es feia una mesura prèvia de l'activitat calpaïna abans de començar el protocol d'incubació, per tal de garantir que no s'havia autolitzat.

Les incubacions es feien de la manera següent: 0,8 ml de la suspensió de miofibrilles (4mg/ml) s'addicionaven a 2,5 ml de tampó d'incubació (200mM KCl, 50mM Tris-HCl 10mM de β -mercaptoetanol) i 1,7ml de solució de μ calpaïna (0,7 unitats definides com al capítol 5 o 0,03 mg de proteïna). En aquestes condicions la suspensió era 1mg/ml de miofibrilles i la relació miofibrilles/calpaïna era 1:100 pes/pes. La concentració de KCl era de 116mM la qual cosa donava una força

iònica de 0,23. D'aquesta manera les miofibrilles eren insolubles mentre que els miofilaments alliberats eren a la fracció soluble (Goll 1991).

Per cada pool de miofibres es feien les següents incubacions duplicades: en un duplicat se li adicionaven 0,1ml de CaCl_2 100mM , a un altre 0,1ml de EDTA 50mM, i un tercer era deixat procedir sense cap addició. Les incubacions eren mantingudes en agitació a 25°C

En els temps 0, 2min, 5min, 10min, 15min, 20min 25min i 30min s'extreia una al·líqüota de 0,5ml de suspensió i era dipositada en 0,5ml d'EDTA 50mM, de manera que el procés dependent de calci era aturat. Posteriorment es centrifugaven les mostres a 800g, 10min i a 25°C per tal d'eliminar la fracció solubilitzada. Calia tenir cura de que es mantinguéssin les condicions de temperatura, car s'ha descrit que a temperatures inferiors a 10°C la α -actinina alliberada de la miofibrilla en el procés de digestió es tornava a a relligar a la fracció insoluble. Els pellets resultants eren resuspendos en 100 μ l de reactius solubilitzador de proteïnes per a SDS-PAGE (Laemli 1970) (62,5mM Tris-HCl, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 0,02mg/ml Blau de bromofenol, pH 6,8.), i eren bullits 5min. Les mostres així tractades éren guardades a -20°C

Electroforesi i anàlisi de Gels

Les mostres eren descongelades i aplicades a un gel de poliacrilamida (12% d'acrilamida) segons el mètode descrit per Laemli et al (1970). S'aplicaven 20 μ l de mostra a cada pouet del gel , tenint cura que les mostres dels cada grup i un mateix temps corressin en carrers

contigus. Es féien córrer dos gels simultàniament amb una font PROTEAN (BIO-RAD).

Un cop finalitzat el procés de tinció-destinció amb Coomasie Blue R-250, els gels eren assecats amb un assecador de gels (GEL DRYER 543 BIO-RAD®) . Els gels fóren analitzats per densitometria mitjançant el Software Integrador GELIMAGE® de FARMACIA acoblat a un Scanner Laser (EPSON-8000®).

Els pics foren assignats segons el seu pes molecular. Segons la bibliografia, ni la cadena pesada de miosina, ni l'actina, ni la a-actinina en són substrats de la calpaïna (Goll 1991), però tant la a-actinina com l'actina poden desassamblar-se de les miofibrilles com a conseqüència de la degradació per la calpaïna d'altres proteïnes que les mantenien unides a l'estructura. És per això que les dades d'àrea sota un pic es relativitzà respecte de l'area sota el pic de la cadena pesada de la miosina. D'aquesta manera evitàvem diferències degudes a diferenta quantitat de proteïna aplicada en un pou.

Estadística

Les dades d'area relatives a la cadena pesada de miosina procedents de tres incubacions fetes en tres dies diferents, fóren analitzades per correlació linial. Els diferents coeficients de correlació dels grups Caf i fa/fa fóren comparats amb els del grup Con, emprant l'estadístic T d'Student corresponent.

6.3 Resultats i Discussió

La seqüència d'esdeveniments en el perfil electroforètic de les miofibrilles sotmeses a degradació amb calpaïna és semblant al trobat per altres autors, ja amb miofibrilles procedents de múscul de conill (Goll et al 1991), ja procedents de múscul de porc (Dayton et al. 1975). En la regió de 200kDa, immediatament per sota de la banda que hom assigna a la cadena pesada de la miosina, es produïx l'aparició d'un doblet (o un triplet). Goll et al. (1991) l'atribueix a fragments de degradació d'altres péptids de gran pes molecular, (titina nebulina o filamina) els quals en són substrats de la calpaïna. De fet la intensitat de la banda de la cadena pesada de miosina no disminueix en intensitat relativa al total en el decurs de l'experiment. Aquesta raó junt amb experiments in vitro portats a terme per Dayton et al (1975) feren que Goll et al.(1991) refusin la idea que aquests polipéptids provinguin de la degradació de la miosina.

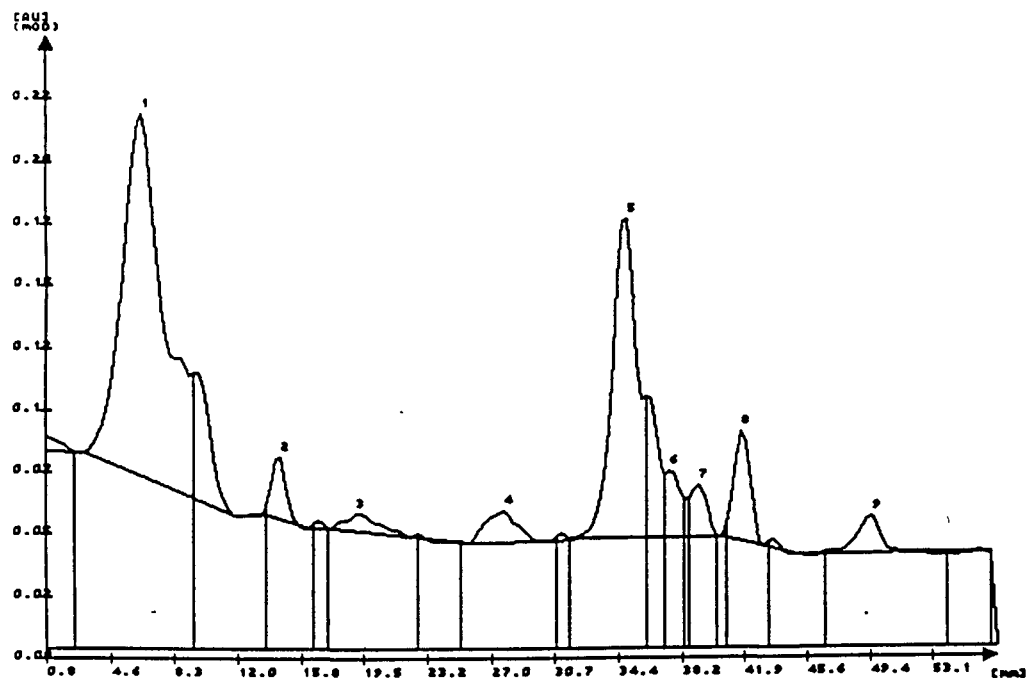
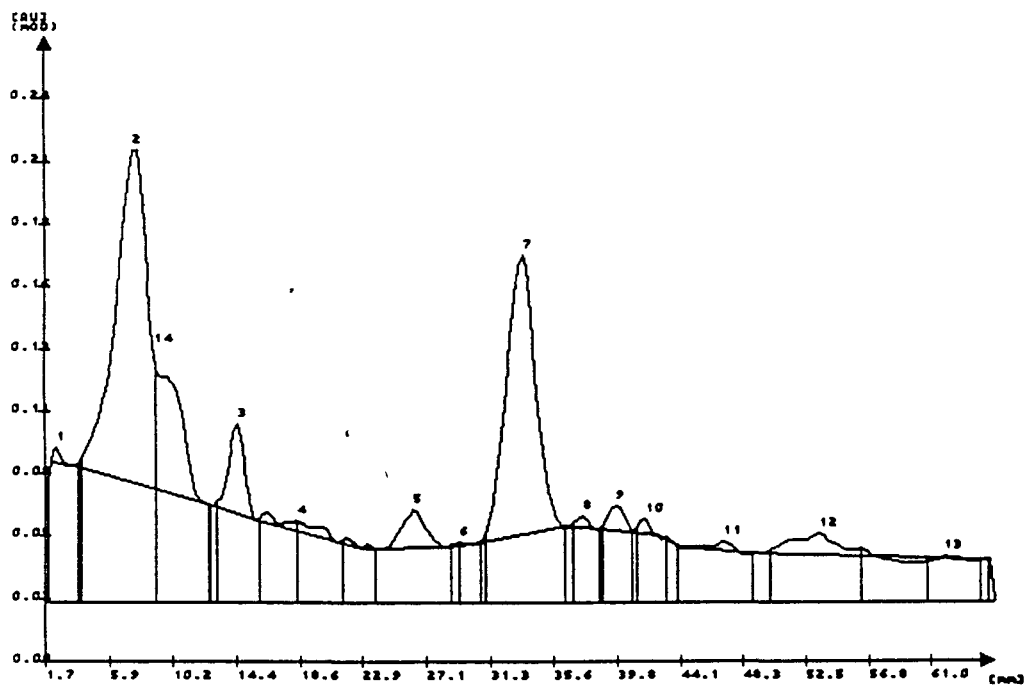
En la regió de 37 KDa apareix un doblet també assignable a productes de degradació de proteïnes més grans. La proximitat d'aquests a l'actina, de 42 kDa, fa que el càlcul de l'àrea de la seva banda sigui complex. Per altra banda, tot i que s'ha demostrat que l'actina no és substrat (Dayton et al. 1975), no es pot descartar un cert dessemblament dels filaments de F-actina en desestructurar-se el Disc-Z (Goll et al. 1991). Aquesta podria ser l'explicació de la disminució de la intensitat de la banda de 42 kDa en el decurs de la incubació.

Aquest moviment de bandes en la regió de 37 kDa emmascara també el que succeix amb la troponina-T i la tropomiosina, les quals s'han descrit com a bons substrats de la calpaïna (Goll et al. 1992).

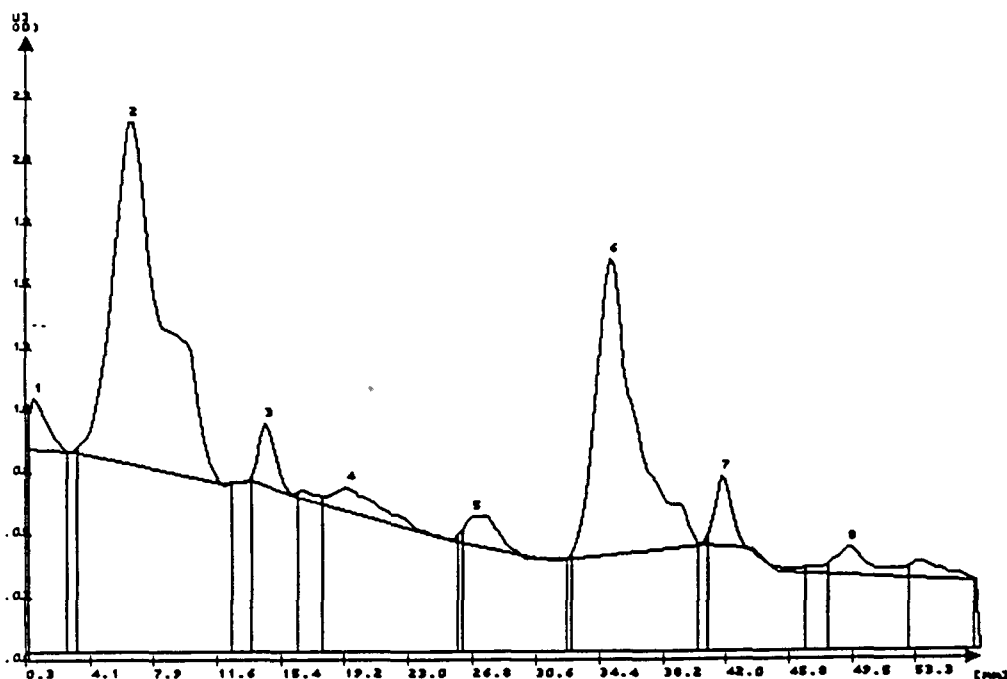
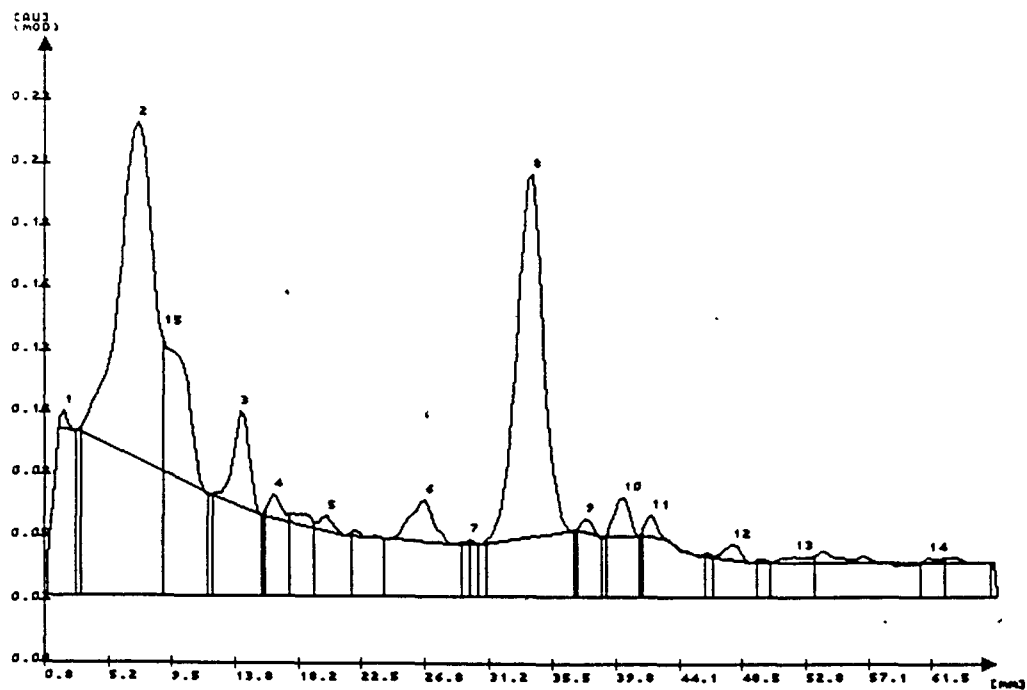
Les regions on succeeixen esdeveniments que no són emmascarats per altres són: la regió de 100kDa on una banda, la qual nosaltres hem atribuït a la α -actinina va minvant d'intensitat amb el decurs de l'experiment, i la regió de 25kDa on la banda assignada a la Troponina-I també minva d'intensitat amb el temps. Una altra desaparició, observable però a altes quantitats de proteïna aplicada, és la desaparició d'una banda molt feble a la regió de 55kDa, atribuïda a la desmina (Goll et al 1991).

Cal tenir en compte que la α -actinina no és substrat de la calpaïna, però que a causa de la degradació d'altres proteïnes que la mantenen ancorada a l'estructura miofibrillar, és el péptid majoritari del sobrenadant resultant de la degradació en incubacions semblants a la nostra. (Goll et al 1991). Donat que aquest és el principal efecte de les calpaïnes en la desestructuració del disc-Z, i a causa del fet que es tracta d'una banda ben separada, la seva àrea es prengué com a paràmetre de la degradació. També es mesurà l'àrea sota el pic atribuït a la Troponina-I.

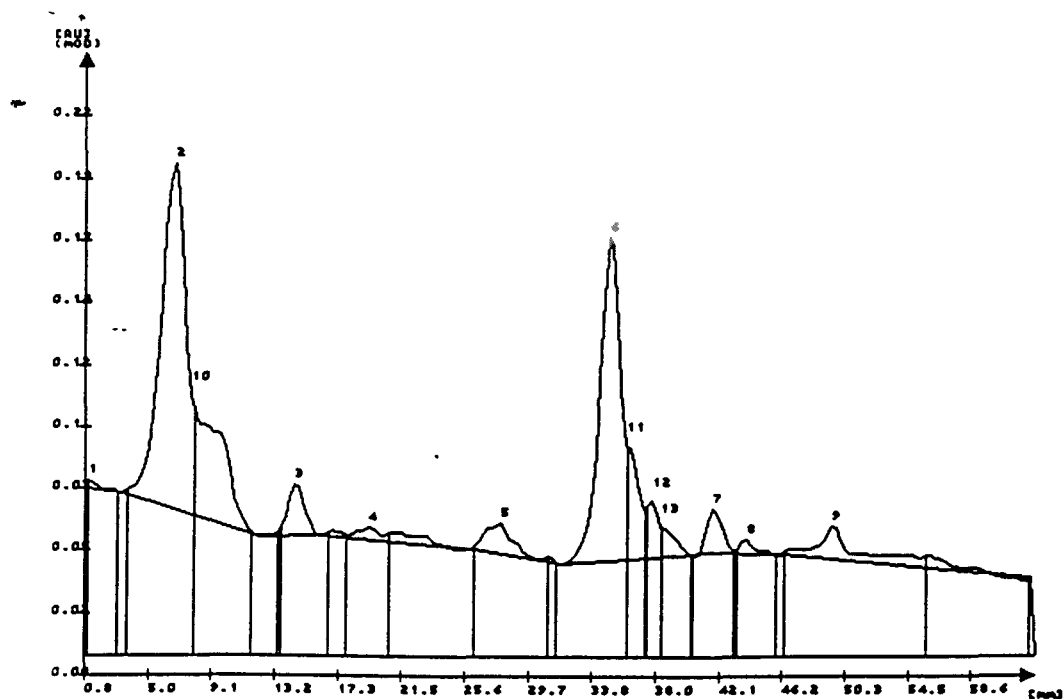
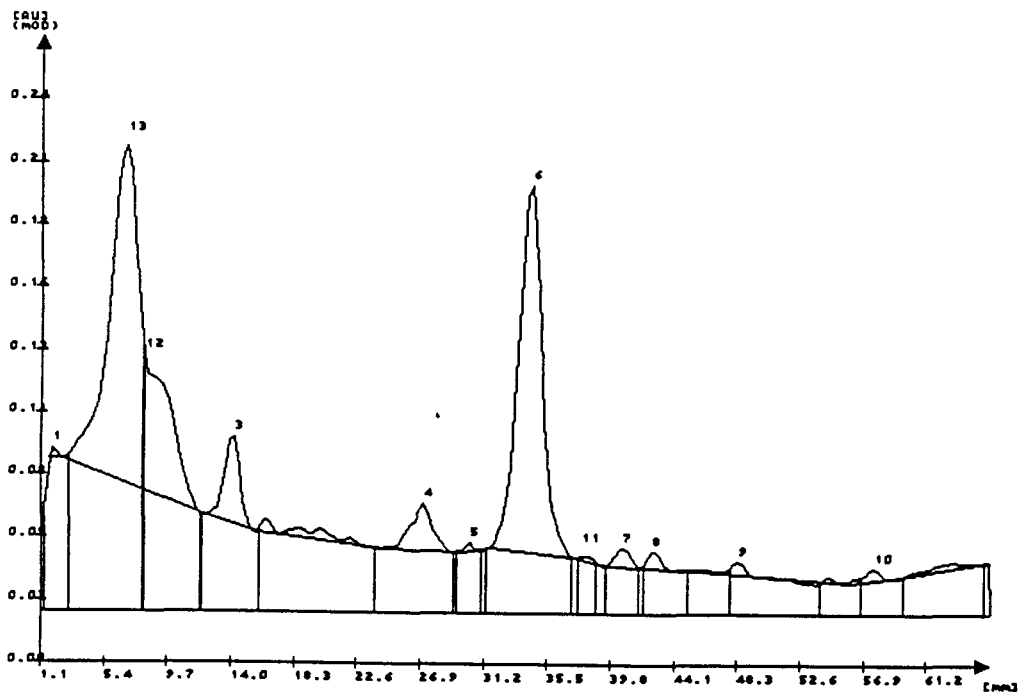
Electroforegrames d'incubacions amb calpaina de miofibril·les obtingudes de gastrocnemius del grup Control (Con). Perfils inicials i a 30 min



Electroforegrames d'incubacions amb calpaïna de miofibril·les obtingudes de gastrocnemius del grup sotmés a dieta de Cafeteria (Caf). Perfils inicials i a 30 min



**Electroforegrames d'incubacions amb calpaina de miofibril·les obtingudes de gastrocnemius del grup genèticament obès (fa/fa).
Perfils inicials i a 30 min**



Anàlisi Qualitatiu del tractament de miofibrilles amb calpaina

De la seqüència d'esdeveniments relatada en la pàgina 197, els més espectaculars són els que esdevenen en les regions de 200kDa i de 37 kDa. Arabé, donat que succeeixen en rangs molt estrets de pesos moleculars, és difícil analitzar l'evolució de l'àrea sota la banda, és per això que hem volgut mostrar el moment en que es comencen a visualitzar en el electroforegrama aquests esdeveniments.

Moment d'aparició de bandes no separables:

Pes Molecular:	200kDa		37kDa	
	(1er pic)	(2ón pic)	(1er pic)	(2ón pic)
Con	0min	30min	10min	25min
Caf	0min	ND	15min	30min
fa/fa	0min	25min	2min	25min

Moment en que es fa evident la desaparició de Bandes:

Pes Molecular:	95Kd	30Kd
Possible identificació	a-Actinina	Troponina-I
Con	15min	15min
Caf	15min	15min
fa/fa	15min	5min

Qualitativament sembla que el procés de degradació sigui igual o més lent en el grup Caf que en el Con, mentre que sembla que sigui igual (en la regió d'alts pesos moleculars) o més ràpid (en la regió de pesos moleculars petits) pel cas del grup fa/fa respecte del grup Con. De totes, maneres aquestes apreciacions cal contrastarles estadísticament.

Anàlisi de les diferències estadístiques entre els coeficients de correlació entre els grups Caf i fa/fa respecte del grup Con.

Troponina I	Grup		
	Con	Caf	fa/fa
Contingut inicial (% vs miosina)	2.99±0.28	2.78±0.11*	1.66±0.07***
Pendent (x10) (%/min)	-1.096±0.21	-0.71±0.01	-0.38±0.01**
R ²	0.896	0.887	0.871
a-Actinina			
Contingut inicial (% vs. miosina)	17.04±1.28	17.41±0.54	18.02±0.12
Pendent (x10)(%/min)	-0.53±0.07	-0.31±0.04*	0.28±0.01**
R ²	0.979	0.896	0.932

Els valors són mitjanes ± error estàndard. Per cada grup s'ha realitzat una regressió lineal (Area relativa/temps) amb vuit punts triplicats . Tenint en compte això s'han calculat els errors dels coeficients de correlació i s'ha analitzat possibles diferències segons els estadístics T d'student corresponents a cada paràmetre.

El percentatge inicial d'a-actinina respecte de la miosina, hi han diferències significatives per efecte de l'obesitat genética ni nutricional. En canvi els pendents, velocitats de degradació, són més lents en ambdúes obesitats, essent la diferència més espectacular en l'obesitat genética.

La troponina I és inicialment en menor proporció en les miofibres procedents de músculs d'animals obesos, éssent l'obesitat genética aquella on la diferència és més acusada. La obesitat genética mostra

una velocitat de degradació més petita per aquest substrat, mentre que, tot i ser més petita, el pendent en el cas dels músculs d'animals sotmesos a dieta de cafeteria no és significativament diferent.

Cal dir aquí que la proteïna aplicada en els pous dels animals amb obesitat genètica, era un 20% inferior. Això podria fer pensar que la concentració de substrats podria no ser saturant. La nostra calpaïna, però, és parcialment purificada, de manera que la relació enzim/substrat calculada de 1:100 hauria de ser superior. Aquest retret, el qual només és acceptable pel grup Fa, no es pot emprar pel cas de la obesitat nutricional. Tantmateix, però, altres autors, emprant calpaïna comercial i relacions calpaïna/miofibrilla similars obtenen una acceleració de la velocitat de degradació d'ambdúes proteïnes a causa de la diabetes (Belcastro et al.1991). Aquests autors arriben a veure desaparèixer ambdúes bandes dins el període de temps incubat per nosaltres sense perdre's la linialitat.

Certs autors han descrit que modificacions covalents dels substrats poden variar l'afinitat de la calpaïna per a ells (Rivet 1986). Tot i existir-ne una ampla gama de possibilitats, totes elles en provoquen un increment en la velocitat de degradació, essent la oxidació dels grups sulfhidril la més estudiada (Stadman 1990). Per aquesta raó, Belcastro et al. (1991) apel·len a aquest tipus d'oxidació dels substrats de la calpaïna presents a la miofibrilla cardíaca d'animals diabètics per explicar l'augment en la velocitat de degradació observat in vitro. En el nostre cas, com el d'aquests autors, mantenim la suspensió de miofibrilles en contacte d'agents reductors (β -mercaptoetanol o àcid tioglicòlic) a concentracions suficients (1mM i 250 μ M) com per trencar els ponts disulfur que s'hagin pogut generar in vivo, fins i tot la incubació es porta a terme a concentracions de β -mercaptoetanol superiors (10mM). És per això que en el nostre cas ens inclinem per una altra explicació: hem observat en el capítol 4 l'existència de desestructuracions locals en els sarcòmers dels músculs d'ambdós tipus d'obesitat. No és gens estrany, doncs, esperar que les miofibrilles obtingudes a partir d'aquests músculs tinguin una superfície exterior, lloc on esdevé el recanvi dels miofilaments (Van der Westhuyzen et al 1981), més desestructurada, amb menys substrat accessible a les calpaïnes. També hem observat un increment en la maquinària oxidativa en els gastrocnemius d'ambdós grups, en

aquest sentit s'ha descrit que les fibres oxidatives ténen menor superfície (Chi et al 1983). Per altra banda, en assajos previs, varem trobar que les miofibres aïllades del sóleus presenten una degradació més lenta que el gastrocnemius, i aquests dos es degraden amb menor velocitat que el tibialis

Tot plegat mostra un quadre favorable a pensar que les miofibrilles obtingudes dels animals obesos exposen a les calpaïnes una quantitat no saturant de substrat, be per que ja està degradat, bé per que han reduït la superfície del cilindre miofibril·lar i s'arriba a situacions de no saturació més fàcilment, de manera que, tot i incubar una quantitat de proteïna miofibril·lar similar als controls, la velocitat de degradació per les calpaïnes és inferior.

Aquest resultat contribueix a explicar com, tot i no haver-hi variacions en els nivells de calpaïna, els gastrocnemius dels animals amb obesitat nutricional ténen incrementats el seu contingut en proteïna miofibril·lar. En el cas dels gastrocnemius dels animals *fa/fa* permet explicar com l'increment en la capacitat proteolítica neta (Calpaïna/calpastatina) d'un 27% impliqui només una reducció del 8% en el contingut en proteïna miofibril·lar.

6.3. Bibliografia

Belcastro A.N., Machan C., Gilchrist J.S. 1991 The Diabetic Heart.
Nagano M. & Dhalla N.S. eds. Raven Press. New York. 301-310

Chi M.M.Y., Hintz C.S., Coyle E.F., Martin III W.H., Ivy J.L., Nemeth P.M., Holloszy J.O., Lowry O.H. 1983 Am. J. Physiol. 244 (Cell Physiol. 13) C276-C287

Dayton W.R., Goll D.E., Stromer M.H., Reville W.J., Zeece M.G., Robson R.M. 1975 Cold Spring Harbour Conf. Cell Proliferation 2 551-577

Etlinger J.D., Zak R., Fischman D.A. 1976 J. Cell Biol. 68 123-141

Goll D.E., Dayton W.R., Singh I., Robson R.M. 1991 J. Biol. Chem. 266 13 8501-8510

Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Zalewska T. 1992 BioEssays 14
8 549-556

Rivett A.J. 1986 Curr. Topics Cell. Regul. 28 291-337

Stadman E.R. 1990 Biochemistry 29 27 6323-6331

Tatsumi R., Hattori A., Takahashi K. 1993 J. Biochem. 113 797-804

Van der Westhuyzen. D.R., Matsumoto K., Etlinger J.D. 1981 J. Biol.
Chem. 256 11791

7.- Redistribució corporal a causa d'un tractament de llarga durada amb el β_2 -agonista clenbuterol i en la seva posterior retirada en la rata

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

El clenbuterol, un agonista β_2 adrenèrgic, havia mostrat, en experiments realitzats pel nostre grup i d'altres, efectes redistributius de la massa corporal, consistents en un descens de la composició en lípids i un increment en el contingut de proteïna, específicament en el múscul esquelètic.

Sembla adient investigar si l'administració de clenbuterol pot generar en rates obesas:

- 1.- Una reducció a nivell de composició lipídica corporal.
- 2.- Un increment del contingut en proteïna en el múscul, aspecte aquest interessant en tant que n'havíem comprovat una reducció com a conseqüència de l'obesitat genètica .

Un estudi preliminar aquest és el que mostrem a continuació. En ell es relacionen els efectes del clenbuterol en rates no obesas, per tal d'establir , a nivell del que serien després el grup control:

- 1.- Les possibles diferències en els efectes entre músculs individuals, o rutes d'administració.
- 2.- El període d'administració en el qual l'efecte era màxim, segons la ruta d'administració.
- 3.- Si persisteixen els efectes després de la retirada del fàrmac per un període de la mateixa duració que el d'administració.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

Anabolic Effects of Clenbuterol After Long-Term Treatment and Withdrawal in the Rat

J. Cartaà, T. Segué, M. Yebras, N.J. Rothwell, and M.J. Stock

Injection of rats with the β_2 -adrenoceptor agonist clenbuterol (1 mg/kg/d for 15 days) stimulated an increase in body weight (9%) and protein (8%) and water (7%) content, but reduced food intake (4%) and epididymal fat pad mass (39%). Nine days after termination of treatment, ex-clenbuterol rats were heavier (5%) and had a greater protein (7%) and water (6%) content and lower fat pad mass (32%) than controls. Clenbuterol-fed rats (2 mg/kg diet for 10 days, providing an average of 0.04 mg clenbuterol/kg/d) increased body weight (7%), muscle mass (15% to 21%), and muscle protein content (9% to 26%), whereas epididymal fat pad weight and muscle glycogen content were reduced. During the withdrawal period, the greater body weight of ex-clenbuterol rats was sustained overall (ANOVA, $P < .00005$), but by day 10 this difference was no longer significant. At this point, gastrocnemius muscle mass was still higher (11%) when compared with that of control animals, but soleus muscle mass, muscle glycogen concentration, and epididymal fat pad weight had reverted to control values. These results were corroborated in a subsequent experiment using older rats. It was concluded that, unlike other β -adrenoceptor-mediated effects, muscle protein accumulated during clenbuterol treatment can be maintained in certain muscles after removal of the drug for a period of time that is at least equivalent to the duration of treatment. This could have implications for the potential therapeutic use of this class of compound, and differences in the response observed between muscle types may help to elucidate the mechanisms responsible for the muscle protein deposition induced by clenbuterol.

Copyright © 1994 by W.B. Saunders Company

SOME β_2 -SELECTIVE adrenergic agonists such as clenbuterol have been shown to be effective growth promoters in many species of animals.¹⁻⁴ They induce a repartitioning effect on the carcass by stimulating protein deposition and decreasing fat content.^{1,5} The anabolic response to clenbuterol is specific to striated muscle, and has been observed in a variety of physiological and pathological states such as diabetes,⁶ denervated muscle,^{7,8} genetic obesity,⁹ and pregnancy.¹⁰ Despite the large number of studies performed in recent years,¹¹ the mechanisms linking β -adrenoceptor stimulation and protein accretion remain unknown. Increased protein synthesis and/or decreased protein degradation have both been reported.^{1,12-14}

Irrespective of the mechanism, β_2 -agonist-induced muscle protein deposition could be a valuable tool in animal production and in various clinical conditions associated with muscle wasting, such as muscular dystrophy, burns, cancer cachexia, lengthy bed rest, and malnutrition.^{11,15} Given these potential applications, it is important to determine if the alterations caused by β_2 -agonists are maintained for a period of time after withdrawal of the treatment, or if they are quickly reversed in the absence of the drug. Sustained trophic effects would be beneficial for animal production, since a period of withdrawal would allow

clearance of the compound and metabolites before the product entered the food chain. In a clinical context, maintenance of the increase in muscle mass would allow drug treatment to be discontinued at intervals, therefore reducing the possible side effects.

Few studies have examined the maintenance of the trophic actions of β -agonists. In one study, the muscle hypertrophy (increased mass) induced by 50 days of treatment with clenbuterol in young steers partially persisted 78 days after drug withdrawal.¹⁶ In another study, intermittent clenbuterol feeding (2 days on, 2 days off) to rats did not affect the anabolic actions on growth and muscle hypertrophy.¹⁷ However, in both studies the investigators did not provide data about changes in muscle protein. Thus, the aim of this investigation was to study the persistence of clenbuterol-mediated actions on growth and body composition in rats, with special attention to muscle protein deposition. We determined the effects of the drug after withdrawal using two types of long-term treatment, administration by injection (experiment 1) and as a dietary admixture (experiments 2 and 3).

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1

Thirty-two weanling male Sprague-Dawley rats were divided into two groups of equal body weight (177 g) and injected (0.2 mL subcutaneously) with either clenbuterol (1 mg/kg body weight) or vehicle (medium-chain triglyceride) once daily at 9 AM. The animals were caged in pairs at 24°C (12-hour light/dark cycle) with free access to a pelleted stock diet (PRD, Christopher Hill Group, Dorset, UK); energy intake was calculated from the weight of food consumed and its metabolizable energy density (12.0 kJ/g). Rats were weighed on alternate days, and on day 15 half of each group of rats were killed, the right epididymal fat pad was removed and weighed, and the carcasses were retained for analysis. The remaining animals (with the same mean body weight as those killed) continued for another 9 days without injections and were then killed, and the epididymal fat pad was weighed and carcasses were retained. Frozen carcasses were freeze-dried to constant weight and homogenized, and protein content was calculated from the

From the Department de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat de Ciències Químiques, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; and the Department of Physiology, St George's Hospital Medical School, University of London, London, UK.

Submitted January 6, 1993; accepted November 8, 1993.

Supported in part by Project No. PB91-0433, Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Spanish Ministry of Culture.

Present address: N.J.R., Department of Physiological Sciences, University of Manchester, Manchester M13 9PT, UK.

Address reprint requests to T. Segué, PhD, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat de Ciències Químiques, Universitat Rovira i Virgili, Plaça Imperial Tàrraco 1, 43005 Tarragona, Spain.

Copyright © 1994 by W.B. Saunders Company
0026-0495/94/4309-0004\$03.00/0

CLENBUTEROL LONG-TERM TREATMENT AND REMOVAL

1087

nitrogen content (N × 6.25) determined by a semiautomated Kjeldahl method

Experiment 2

Twenty-six male Wistar rats weighing 90 to 100 g were caged in pairs and maintained in stainless-steel cages with a 12-hour light cycle at a temperature of 22°C, with free access to tap water. For 4 days, they were fed a powdered standard laboratory rat chow (A04, Panlab, Barcelona, Spain, energy value, 12.9 kJ/g) before being divided into two groups with the same mean body weight and body weight gain. They were then housed in pairs and allowed free access to a standard diet (control, n = 12) or a standard diet containing 2 mg/kg clenbuterol (clenbuterol, n = 14). Clenbuterol intake (estimated from food intake) ranged from approximately 0.03 to 0.05 mg/kg/d. After 10 days, half the animals in each group (each half with the same mean body weight and weight gain as the remaining rats in the group) were killed, and the rest of the animals previously fed with clenbuterol (n = 7) and their controls (n = 6) were fed the standard diet for another 10 days before they were killed. Body weight and average food intake were recorded daily between 9 and 10 AM. Energy intake and efficiency of weight gain were calculated as in experiment 1.

Animals were killed by cervical dislocation (9 to 10 AM), and the liver and the right whole leg muscle was dissected out immediately and frozen in liquid nitrogen within 30 seconds. Gastrocnemius and soleus muscles from the left leg, the liver, heart, and kidney, and the epididymal fat pad were then removed, weighed, and frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -20°C until analyzed. The protein content in muscles and heart was measured¹⁸ after tissue homogenization (OMNI mixer, maximum speed 30,000 rpm, set at half maximum position) and overnight digestion with 1N NaOH. For glycogen measurements, approximately 0.5 g frozen liver and muscle (gastrocnemius and soleus) powders was digested with 3N KOH. Glycogen was purified by precipitation with ethanol, and the resulting hydrolyzed glucose was determined by the anthrone method.¹⁹

Experiment 3

A confirmatory experiment was performed, essentially as in experiment 2, but using rats with an initial body weight (150 to 170 g) similar to those in experiment 1 to ensure that the results were not dependent on the age of the animals. Body weight changes and food intake were recorded, and after killing the rats, the soleus, gastrocnemius, heart, and epididymal fat pad weights and the protein concentration and protein content in soleus, gastrocnemius, and heart were determined.

Statistics

Results were expressed as the mean ± SEM. Differences between groups at the end of treatment were determined by Student's unpaired *t* test. To assess the body weight differences between drug-treated and control rats during the course of the experiment, a two-way ANOVA was performed after applying Levene's test for equal variance.

RESULTS

Experiment 1

Clenbuterol-injected rats (Table 1) gained significantly more weight (9%) than controls during the treatment period despite a small but significant 4% reduction in energy intake. Thus, the efficiency of weight gain (grams gained per megajoule eaten) was considerably greater (14%) in clenbuterol-injected rats. This extra weight gain was due to increases in both body protein and water content (Table 1), but the reduction in epididymal fat pad mass and greater percentage of body water indicates that the body fat content was reduced after 15 days of treatment. The excess body weight of clenbuterol-injected rats was sustained up to 9 days following termination of treatment, even though energy intake, body weight gain, and the efficiency of weight gain had returned to control values. Furthermore, rats that had been injected previously with clenbuterol maintained a higher body protein and water content than controls, although the percentage of protein in the body was no longer different. The lower epididymal fat pad mass was also still significant 9 days after withdrawal of treatment.

Experiment 2

As shown in Fig 1, the body weight of clenbuterol rats was higher than that of controls from the fourth day of treatment, with the difference increasing until the end of the drug-feeding period. After removal of the drug, the difference was still apparent, but diminished progressively. These differences were confirmed by two-way ANOVA, which showed that there was no significant interaction (*P* = .9751) between treatment and duration, whereas the difference between control and drug-treated rats was highly significant (*P* < .00005). However, at the end of the withdrawal period, a nonsignificant (*P* = .232, *t* test) difference of 4%

Table 1. Effect of Long-Term Clenbuterol Injection on Body Weight, Food Intake, Body Composition, and Epididymal Fat Pad Mass (experiment 1)

Group	Body Weight (g)			Energy Intake (kJ)	Efficiency of Gain (g/MJ eaten)	Body Protein		Body Water		Epididymal Fat Pad Mass (g)
	Initial	Final	Gain			%	g	%	g	
Treatment period (15 d)										
CON	177 ± 2	306 ± 4	129 ± 3	5,015 ± 60	25.7 ± 0.7	19.8 ± 0.2	60 ± 1	68.1 ± 0.1	208 ± 1	13 ± 0.1
CLEN	177 ± 2	318 ± 3*	141 ± 3†	4,800 ± 70*	29.4 ± 0.7†	20.5 ± 0.1†	65 ± 1†	69.8 ± 0.2‡	222 ± 1‡	0.8 ± 0.1‡
Recovery period (9 d)										
WCON	306 ± 4	350 ± 4	44 ± 2	3,030 ± 50	14.8 ± 0.5	20.2 ± 0.1	71 ± 1	67.5 ± 0.1	236 ± 1	18 ± 0.1
WCLEN	318 ± 3*	369 ± 7*	51 ± 4	3,100 ± 80	16.5 ± 0.9	20.5 ± 0.1	76 ± 1‡	68.1 ± 0.1*	251 ± 1‡	14 ± 0.1*
CLEN/CON (%)	0	4	9	-4	14	3	8	2	7	-39
WCLEN/WCON (%)	4	5	16	2	11	1	7	1	6	-32

NOTE. Results are the mean ± SEM (n = 8).

Abbreviations: CON, control group for clenbuterol-fed rats; CLEN, clenbuterol-fed rats; WCLEN, ex-clenbuterol-treated rats; WCON, control group for WCLEN.

**P* < .05, †*P* < .01, ‡*P* < .001; compared with respective controls (Student's *t* test).

1088

CARTAÑA ET AL

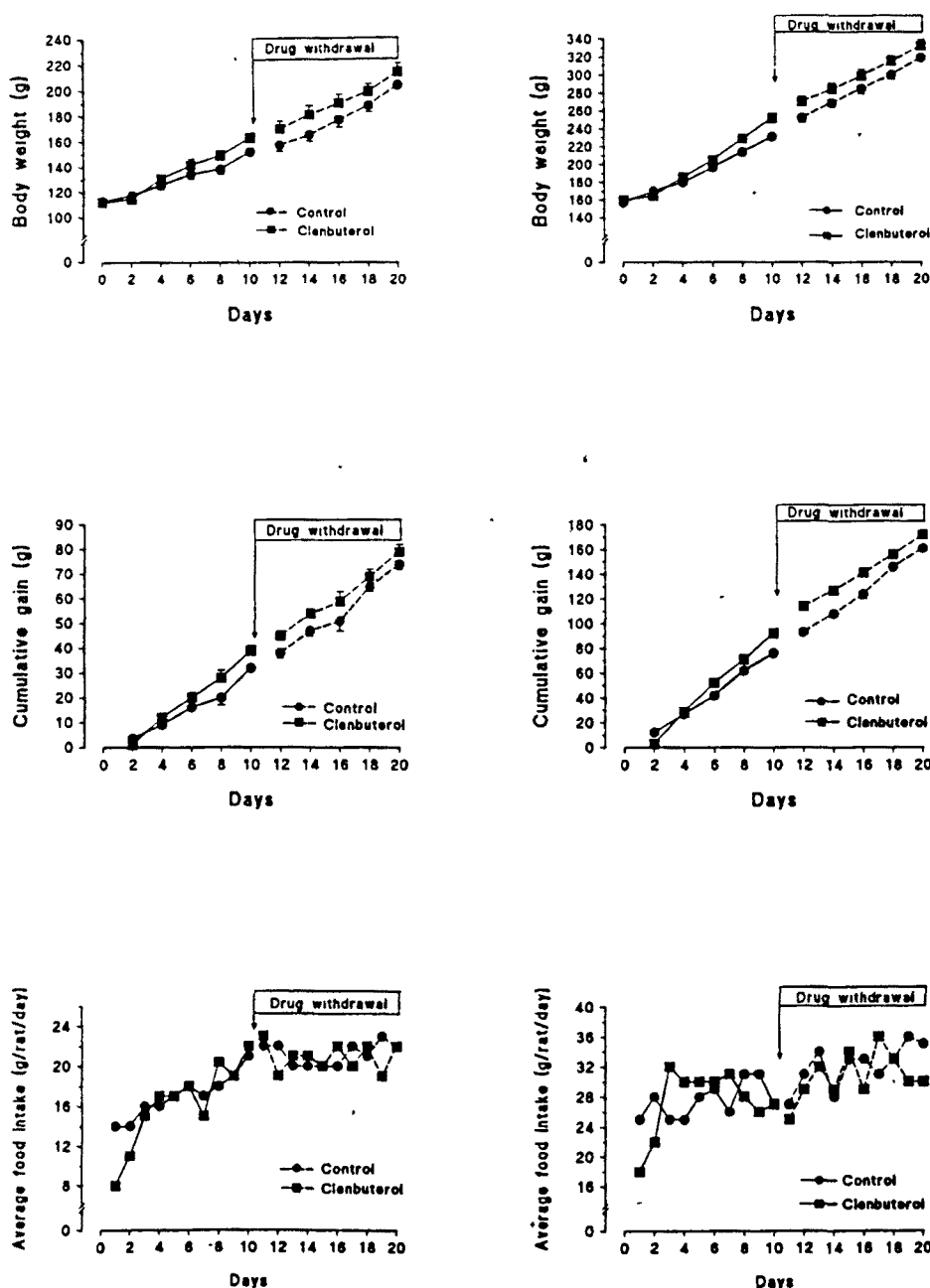


Fig 1. Body weight, cumulative weight gain, and food intake during clenbuterol feeding and withdrawal (experiments 2 and 3). Figures on the left belong to experiment 2, figures on the right to experiment 3. Body weight and cumulative weight gain are the mean \pm SEM of 14 animals for the first 10 days. At that time, half of the rats were killed, and the rest ($n = 7$) followed the drug withdrawal period. Statistically significant differences in body weight between controls and clenbuterol-treated rats were found by ANOVA.

was observed the body weight of ex-clenbuterol and control rats. A transient reduction in energy intake was found in the clenbuterol group during the first 2 days of treatment (Fig 1), but it was no different from the control intake for the rest of the experiment. The efficiency of weight gain was greater (21%) in clenbuterol-fed rats, but this difference was not observed during the recovery period.

Gastrocnemius and soleus muscle weights increased by 21% and 15%, respectively, in the clenbuterol group compared with the control group (Table 2). Heart, liver, and kidney weights were not altered by clenbuterol feeding. In contrast, epididymal fat pad weight was reduced by 23% in the clenbuterol group. Drug withdrawal completely

eliminated the differences in soleus muscle and epididymal fat pad weights achieved after 10 days of clenbuterol treatment. However, the weight of gastrocnemius muscle was significantly higher in the ex-clenbuterol-treated rats than in their controls.

Clenbuterol did not alter the protein concentration in gastrocnemius, soleus, and heart (Table 3) or the total protein content in soleus and heart. However, the protein content of gastrocnemius muscle was increased by 26%. This enhanced protein deposition in gastrocnemius was still observed 10 days after clenbuterol withdrawal (28% higher in ex-clenbuterol-treated rats than in their controls). Moreover, the gastrocnemius protein concentration in ex-

CLENBUTEROL LONG-TERM TREATMENT AND REMOVAL

1089

Table 2. Effects of Clenbuterol Feeding and Withdrawal on Body Weight Gain and Organ Weights (experiments 2 and 3)

Group	Body Weight (g)			Energy Intake (kJ)	Efficiency of Gain (g/MJ eaten)	Gastrocnemius (mg)	Soleus (mg)	Heart (g)	Epididymal Fat Pad (g)
	Initial	Final	Gain						
Experiment 2									
Treatment period (10 d)									
CON	113 ± 2	153 ± 3	40 ± 2	2,624 ± 80	15.7 ± 0.6	788 ± 28	66 ± 3	0.52 ± 0.01	1.07 ± 0.07
CLEN	115 ± 2	164 ± 4*	49 ± 3*	2,536 ± 47	19.0 ± 0.9*	956 ± 21†	75 ± 1*	0.55 ± 0.02	0.82 ± 0.04†
Recovery period (10 d)									
WCON	153 ± 3	206 ± 4	53 ± 2	3,096 ± 93	19.0 ± 0.9	1,079 ± 30	96 ± 3	0.63 ± 0.02	1.72 ± 0.09
WCLEN	164 ± 4*	215 ± 6	50 ± 3	3,015 ± 125	17.5 ± 0.8	1,202 ± 33*	96 ± 2	0.68 ± 0.02	1.80 ± 0.06
CLEN/CON (%)	2	7	22	-3	21	21	14	6	-23
WCLEN/WCON (%)	7	4	-6	-3	-8	11	0	8	5
Experiment 3									
Treatment period (10 d)									
CON	157 ± 3	231 ± 5	74 ± 3	3,657 ± 45	20.2 ± 1.0	1,230 ± 40	91 ± 2	0.70 ± 0.03	1.88 ± 0.09
CLEN	160 ± 3	252 ± 7*	92 ± 5*	3,610 ± 60	25.5 ± 1.4*	1,561 ± 40†	107 ± 3†	0.84 ± 0.04*	1.50 ± 0.08†
Recovery period (10 d)									
WCON	231 ± 5	319 ± 11	88 ± 5	4,129 ± 75	21.3 ± 0.9	1,650 ± 65	128 ± 4	0.83 ± 0.04	3.20 ± 0.13
WCLEN	252 ± 7*	332 ± 12	80 ± 5	3,997 ± 89	20.0 ± 0.7	1,892 ± 59*	135 ± 4	0.91 ± 0.05	3.37 ± 0.25
CLEN/CON (%)	2	9	24	-1	26	27	18	20	-20
WCLEN/WCON (%)	9	4	-9	-3	-6	15	5	10	5

NOTE. Results are the mean ± SEM (n = 8 and n = 7 for experiments 2 and 3, respectively). Abbreviations are as in Table 1.

*P < .05, †P < .01, ‡P < .001: compared with respective controls (Student's t test).

clenbuterol-treated rats was significantly higher (15%) than in their controls. The glycogen content of liver (Fig 2) was unaltered by clenbuterol feeding and subsequent removal, whereas muscle glycogen was severely depleted in the clenbuterol group. This effect was completely reversed 10 days after removal of clenbuterol from the diet.

Experiment 3

The results from experiment 3 (Tables 2 and 3) were essentially identical to those reported in experiment 2. The increase in gastrocnemius and soleus mass induced by clenbuterol was slightly greater in experiment 3 compared

with experiment 2, as was the increase in muscle protein content. The only obvious difference between the experiments was the heart hypertrophy, accompanied by a significant increase in the total protein, which was not seen in experiment 2. The effect of drug withdrawal was very similar to that seen in the previous experiment, with the conservation of gastrocnemius protein accumulation being the most notable effect.

DISCUSSION

As has been widely reported in the literature,^{11,20} the present results show that the β₂-adrenergic agonist clen-

Table 3. Effects of Clenbuterol Feeding and Withdrawal on Gastrocnemius, Soleus, and Heart Protein (experiments 2 and 3)

Group	Gastrocnemius		Soleus		Heart	
	mg/g wet weight	mg/tissue	mg/g wet weight	mg/tissue	mg/g wet weight	mg/tissue
Experiment 2						
Treatment period (10 d)						
CON	147 ± 9	113 ± 6	88.5 ± 7.2	5.90 ± 0.58	131 ± 7	66.4 ± 5.1
CLEN	150 ± 6	143 ± 4†	87.3 ± 7.3	6.41 ± 0.55	127 ± 5	70.1 ± 3.8
Recovery period (10 d)						
WCON	143 ± 3	154 ± 3	90.5 ± 4.5	8.75 ± 0.59	118 ± 5	72.8 ± 1.8
WCLEN	164 ± 6*	197 ± 10†	92.8 ± 5.4	8.86 ± 0.37	119 ± 4	79.6 ± 5.1
CLEN/CON (%)	2	26	-1	9	-3	6
WCLEN/WCON (%)	15	28	2	1	0	9
Experiment 3						
Treatment period (10 d)						
CON	162 ± 5	200 ± 8	104 ± 3	9.57 ± 0.41	114 ± 7	79.8 ± 4.0
CLEN	172 ± 7	268 ± 14†	102 ± 3	11.10 ± 0.46*	115 ± 5	96.6 ± 5.3*
Recovery period (10 d)						
WCON	157 ± 6	260 ± 16	98 ± 4	12.75 ± 0.35	102 ± 5	84.7 ± 3.9
WCLEN	182 ± 8*	344 ± 20†	99 ± 4	13.36 ± 0.40	104 ± 4	94.6 ± 5.5
CLEN/CON (%)	6	34	-2	14	1	21
WCLEN/WCON (%)	16	32	1	5	1	12

NOTE. Results are the mean ± SEM (n = 8 and n = 7 for experiments 2 and 3, respectively). Abbreviations are as in Table 1.

*P < .05, †P < .01: compared with respective controls (Student's t test).

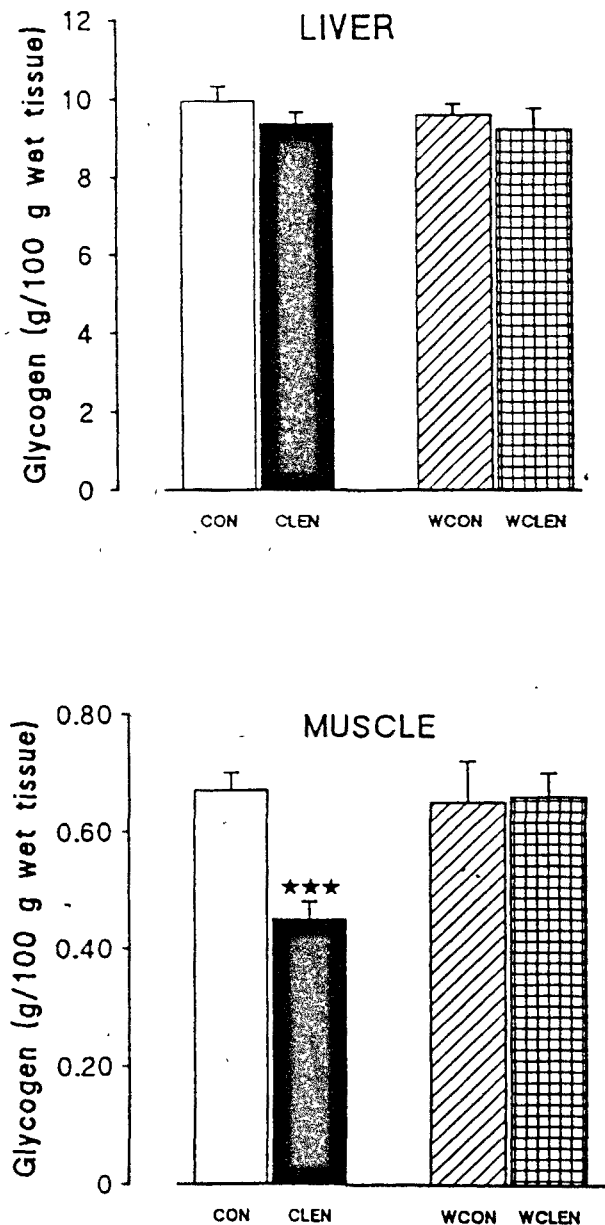


Fig 2. Liver and muscle glycogen after clenbuterol feeding and subsequent withdrawal (experiment 2). Mean \pm SEM of six to seven animals. Statistical differences comparing CLEN v CON (***) $P < .001$ were determined using Student's *t* test. CLEN, clenbuterol-fed rats; WLEN, ex-clenbuterol-treated rats; CON and WCON are their respective controls.

buterol causes an increase in body weight gain when rats are injected with it or are fed the compound as a dietary admixture. This increase was due to a larger lean body mass (protein and water) and was sufficient to offset the reduction in body fat content (as indicated by the decreased epididymal fat pad size and increased percentage of body water). This change in growth rate occurred despite the small reduction in energy intake in clenbuterol-injected rats (experiment 1), which suggests that the anabolic effects of clenbuterol override any anorectic and thermogenic actions

of the drug. When clenbuterol injections were terminated, food intake returned to normal and body weight gain remained slightly but not significantly greater than that of controls. The effect of dietary clenbuterol on growth appeared to start on about day 4, after an initial phase of hypophagia. Transient anorexia has also been observed,²¹ and may be due to stimulation of hypothalamic β -adrenoceptors.²² Rapidly developing tolerance²¹ would explain the normalization of intake seen from day 3 onward. Food intake was not measured on a daily basis in experiment 1, but in a previous study where the drug was administered subcutaneously, a slight hyperphagia was observed following the initial decrease.¹

Determining the dynamics of the anabolic response to long-term clenbuterol (or other β_2 -agonists) treatment in terms of changes in body weight must be made with caution due to the repartitioning effects of this compound, which reduces body fat content (by activating lipolysis) while simultaneously increasing skeletal muscle weight.^{11, 23} As with these earlier studies, we also observed a marked reduction in epididymal fat pad weight and an increase in gastrocnemius and soleus muscle mass in clenbuterol-treated animals. The anabolic action was restricted to skeletal muscle in experiment 2, but in experiment 3 an increase in heart similar to that reported by other investigators^{12, 24} was also observed. This difference in the cardiac response to treatment may have been due to the different age of the animals. Our results showed that clenbuterol feeding increased total muscle protein content but did not alter the protein concentration, suggesting that a concomitant increase in water content was also likely, as observed previously with carcass analysis of clenbuterol-treated rats.^{1, 9} It should be noted that there were some quantitative but not qualitative differences between the two experiments for some parameters (eg, epididymal fat pad); however, this can best be ascribed to the two routes of drug administration and/or slightly different time scales. These differences do not affect the main conclusions.

A much greater anabolic response was observed in gastrocnemius than in soleus muscle, and this may be due to fiber-type selectivity in β -agonist-induced hypertrophy.²⁰ Generally, it has been found that β -adrenergic agonists increase the cross-sectional area of fast-twitch glycolytic or fast-twitch oxidative-glycolytic fibers, with inconsistent effects on slow-twitch fibers such as those that predominate in soleus muscle.^{25, 26} Another factor that has to be considered is the influence of β -receptor density on the hypertrophic response of different muscles, as well as differences in the distribution of β -adrenoceptor subtypes.^{20, 27} In addition, most measurements are made at only one time point after long-term β -agonist treatment, and the changes observed could reflect differences in the time course of the response in different muscles.

It is generally agreed that downregulation of β_2 -adrenoceptors during long-term treatment with clenbuterol is responsible for attenuating and limiting the trophic response in skeletal muscle.²⁸⁻³⁰ Receptor downregulation probably occurred in the present 15- and 10-day experiments, although the glycogen content in muscle (an index of

CLENBUTEROL LONG-TERM TREATMENT AND REMOVAL

1091

β_2 -mediated glycogenolysis) was significantly reduced after 10 days of clenbuterol feeding (experiment 2), which suggests that there was no functional impairment in receptor responsiveness. By contrast, hepatic glycogen levels were unaffected by clenbuterol treatment. Similar findings have been reported and were attributed to enhanced Cori cycle activity,³¹ although differences in the β -adrenoceptor subtypes mediating hepatic and skeletal muscle glycogenolysis may also have to be taken into account.

Ten days after removing the drug from the diet (experiments 2 and 3), the difference in body weight seen in the ex-clenbuterol-treated group and their control group at the end of the treatment period had disappeared. Changes in muscle glycogen content and epididymal fat pad weight caused by clenbuterol feeding were no longer observed after the removal period, which suggests that the glycogenolytic and lipolytic actions of clenbuterol had been negated after the 10-day recovery period. This suggests that the clearance of clenbuterol from the body had been completed within this period. Although data on the time course of disappearance of clenbuterol in rats have not been reported, the half-life in calves³² and cows³³ is somewhere between 1 and 2 days.

Soleus muscle hypertrophy also reversed when the drug was removed, whereas the trophic response in gastrocnemius had persisted, although it was reduced by 50%. This effect was due to the maintenance of the greater protein content caused by clenbuterol feeding, but was also associated with a higher muscle protein concentration. A reduction in water content together with the sustained effect on total protein may account for this, since a further increment in protein deposition in the absence of the drug seems unlikely. However, a reduction in water content also seems unlikely, given the repletion of muscle glycogen and associated water. Since clenbuterol induces an increase in the muscle protein synthesis rate and/or a decrease in protein degradation depending on the experimental conditions,^{1,12,14} a sustained alteration either in one or both components of protein turnover could explain the persistence of the hypertrophy and the increased concentration of protein in

gastrocnemius. Another factor that has to be considered is the relative turnover times of different proteins, and this might explain why the effects on muscle protein persist, whereas those on glycogen are quickly reversed. The maintenance of the trophic response to clenbuterol in muscle after removal of the drug is in accordance with the observation that intermittent feeding of clenbuterol produces the same effect as continuous feeding.¹⁷ However, in that study, the withdrawal periods were short (2 days) and the drug was probably not cleared entirely from the body.

Drug withdrawal seems to dissociate the effects of clenbuterol on lipid and glycogen metabolism from those on protein metabolism in certain muscles. This suggests that the trophic actions on muscle involve different postreceptor mechanisms and/or β -adrenoceptor subtypes. Similar conclusions have been reached from studies of adrenaline-mediated alterations in protein and carbohydrate metabolism,³⁴ as well as from the apparent resistance to the effects of the β -receptor antagonist propranolol on the trophic responses to clenbuterol.³⁵ Inhibition of the trophic response by concurrent feeding of the β_2 -selective antagonist ICI 118551 has been reported,³⁶ but given the high dose of antagonist required, it is possible that clenbuterol exerts its effects via an atypical adrenoceptor. Moreover, the differences observed in the response and the persistence of the response between soleus and gastrocnemius suggest that even the anabolic effects may involve more than one mechanism, and elucidating these differences should lead to a better understanding of the adrenergic control of muscle protein metabolism. In addition, if the protein deposition action on certain muscles could be confirmed in other species (particularly humans), agents such as clenbuterol could prove exceptionally useful in a variety of pathophysiological conditions. A recent study has already provided some evidence that long-acting β_2 -adrenergic agonists increase muscle strength in normal volunteers.³⁷

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Ian Connolley, Mike Lacey, and Santiago Moreno for their excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, et al: Chronic effects of β_2 -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep* 4:83-91, 1984
2. Muir LA, Wein S, Duquette PF, et al: Effect of the β -adrenergic agonist L-640,033 on lipid metabolism, growth and carcass characteristics of female broiler chicks. *J Anim Sci* 61:138A, 1985 (suppl 1, abstr)
3. Williams PEV, Pagliani L, Innes GM, et al: Effects of a β -agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves. *Br J Nutr* 57:417-428, 1987
4. Macrae JC, Skene PA, Connell A, et al: The action of the β -agonist clenbuterol on protein and energy metabolism in fattening wether lambs. *Br J Nutr* 59:457-465, 1988
5. Asato G, Baker PK, Bass RT, et al: Repartitioning agents: 5-[1-hydroxy-2-(isopropylamino)ethyl]-anthranilonitrile and related phenethanolamines: agents for promoting growth, increasing muscle accretion and reducing fat deposition in meat-producing animals. *Agric Biol Chem* 48:2883-2888, 1984
6. McElligott MA, Mulder JE, Chung L-Y, et al: Clenbuterol-induced muscle growth: Investigation of possible mediation by insulin. *Am J Physiol* 252:E370-E375, 1987
7. Zeman RJ, Ludemann R, Etlinger JD: Clenbuterol, a β_2 -agonist, retards atrophy in denervated muscles. *Am J Physiol* 252:E152-E155, 1987
8. Maltin CA, Hay SM, Delday MI, et al: Evidence that the hypertrophic action of clenbuterol on denervated rat muscle is not propranolol-sensitive. *Br J Pharmacol* 96:817-822, 1989
9. Rothwell NJ, Stock MJ: Influence of clenbuterol on energy balance, thermogenesis and body composition in lean and genetically obese Zucker rats. *Int J Obes* 11:641-647, 1987
10. Maltin CA, Delday MI, Hay SM: The effect of clenbuterol administration in utero and throughout lactation on pre- and post-natal muscle development in the rat. *Growth Dev Aging* 54:143-150, 1990
11. Yang YT, McElligott MA: Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J* 261:1-10, 1989
12. Reeds PJ, Hay SM, Dorward PM, et al: Stimulation of

muscle growth by clenbuterol: Lack of effect on muscle protein biosynthesis. *Br J Nutr* 56:249-258, 1986

13. Bohorov O, Buttery PJ, Correia JHRD, et al: The effect of the β_2 -adrenergic clenbuterol or implantation with oestradiol plus trenbolone acetate on protein metabolism in wether lambs. *Br J Nutr* 57:99-107, 1987

14. Maltin CA, Hay SM, Delday MI, et al: Clenbuterol, a beta agonist, induces growth in innervated and denervated rat soleus muscle via apparently different mechanisms. *Biosci Rep* 7:525-532, 1987

15. Bergen WG, Merkel RA: Body composition of animals treated with partitioning agents: Implications for human health. *FASEB J* 5:2951-2957, 1991

16. Schiavetta AM, Miller MF, Lunt DK, et al: Adipose tissue cellularity and muscle growth in young steers fed the β -adrenergic agonist clenbuterol for 50 days and after 78 days of withdrawal. *J Anim Sci* 68:3614-3623, 1990

17. McElligott MA, Barreto A Jr, Chaung L-Y: Effect of continuous and intermittent clenbuterol feeding on rat growth rate and muscle. *Comp Biochem Physiol* 92C:135-138, 1989

18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951

19. Serafini M, Alemany M: A micromethod for the enzymatic estimation of the degree of glycogen ramification. *J Biochem Biophys Methods* 15:33-38, 1987

20. Kim YS, Sainz RD: β -Adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci* 50:397-407, 1992

21. Benson DW, Foley-Nelson T, Chance W, et al: Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol. *J Surg Res* 50:1-5, 1991

22. Borsini F, Bendotti C, Thurlby P, et al: Evidence that systemically administered salbutamol reduces food intake in rats by acting on central beta-adrenergic sites. *Life Sci* 30:905-910, 1982

23. Reeds PJ, Hay SM, Dorward PM, et al: The effect of β -agonists and antagonists on muscle growth and body composition of young rats (*rattus* sp). *Comp Biochem Physiol* 89C:337-341, 1988

24. Deshaies Y, Willemot J, Leblanc J: Protein synthesis, amino acid uptake, and pools during isoproterenol-induced hypertrophy of the rat heart and tibialis muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 59:113-121, 1981

25. Maltin CA, Delday MI, Reeds PJ: The effect of a growth

promoting drug, clenbuterol, on fibre frequency and area in hind limb muscles of young male rats. *Biosci Rep* 6:293-299, 1986

26. Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG, et al: Slow to fast alterations in skeletal muscle fibres caused by clenbuterol, a β_2 -receptor agonist. *Am J Physiol* 254:E726-E732, 1988

27. Molenaar P, Roberts SJ, Kim YS, et al: Localisation and characterization of two propranolol resistant (-)[¹²⁵I]cyanopindolol binding sites in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 209:257-262, 1991

28. Rothwell NJ, Stock MJ, Sudera DK: Changes in tissue blood flow and β -receptor density of skeletal muscle in rats treated with the β_2 -adrenoreceptor agonist clenbuterol. *Br J Pharmacol* 90:601-607, 1987

29. Elfellah MS, Reid JL: Regulation of β_1 - and β_2 -adrenoreceptors following chronic treatment with β -adrenoreceptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 173:85-92, 1989

30. Kim YS, Sainz RD: Skeletal muscle β -adrenoreceptors are reduced by chronic administration of the β -agonist, clenbuterol. *J Anim Sci* 68:318, 1990 (suppl 1)

31. MacLennan A, Edwards RHT: Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass. Evidence that clenbuterol stimulates β -adrenoreceptors to induce hypertrophy. *Biochem J* 264:573-579, 1989

32. Hooijerink H, Schilt R, Haasnoot W, et al: Determination of clenbuterol in urine of calves by high-performance liquid chromatography with in series ultraviolet and electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal* 9:485-492, 1991

33. Delahaut P, Dubois M, Pri-Bar I, et al: Development of a specific radioimmunoassay for the detection of clenbuterol residues in treated cattle. *Food Addit Contam* 8:43-53, 1991

34. Castellino P, Luzi L, Del Prato S, et al: Dissociation of the effects of epinephrine and insulin on glucose and protein metabolism. *Am J Physiol* 258:E117-E125, 1990

35. Maltin CA, Delday MI, Hay SM, et al: Propranolol apparently separates the physical and compositional characteristics of muscle growth induced by clenbuterol. *Biosci Rep* 7:51-57, 1987

36. Choo JJ, Horan MA, Little RA, et al: Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by β_2 -adrenoreceptor activation. *Am J Physiol* 263:E50-E56, 1992

37. Martineau L, Horan MA, Little RA, et al: Salbutamol a β_2 adrenergic agonist increases skeletal muscle strength in young men. *Clin Sci* 83:616-621, 1992

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

8.- Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

8.- CONCLUSIONS GENERALS

1.- En general, i pel que fa als aspectes estudiats del metabolisme nitrogenat, les rates fetes obeses amb dieta de cafeteria manifesten un comportament diferenciat de les rates obeses genèticament.

Recanvi d'alanina i obesitat.

1.- Emprant una perfusió constant per via arterial de ^3H -Alanina, marcada en el seu esquelet carbonat, i extraient mostres de sang venosa en diferents moments, es pot comprovar, quan l'activitat específica en sang arriba a un estadi estacionari, que ambdós models d'obesitat afecten a la velocitat de recanvi d'alanina en l'animal sencer, de manera diferent.

2.- Quan hom normalitza les dades respecte de la massa prima, l'obesitat nutricional no modifica la taxa de recanvi d'alanina, mentre que l'obesitat genètica ho fa tot i incrementant-la. Si s'empra com a paràmetre normalitzador el pes de l'animal sencer, la taxa de recanvi d'alanina resulta disminuïda, mentre que no se n'observen alteracions a causa de l'obesitat genètica. Aquestes diferències segons el paràmetre normalitzador escollit, palesen la importància del teixit adipós en el desenvolupament de l'obesitat.

3.- Les diferències en la taxa de recanvi d'alanina, no es justifiquen per diferències en la fracció de recanvi causada per la seva catabòlisi, sinó per la fracció atribuïble a la incorporació del seu esquelet carbonat als diferents teixits.

Obesitat i paràmetres bioquímics i estructurals al múscul.

1.- La variació dels diferents paràmetres per efecte d'ambdós models d'obesitat depèn en gran mesura del perfil fibril·lar del múscul estudiat.

2.- Els efectes en aquests paràmetres són oposats segons el model d'obesitat emprat. La massa i el contingut de proteïnes es veuen reduïts per efecte de l'obesitat genètica en més mesura quan més proporció en fibres lentes i oxidatives tingui el múscul estudiat. Per contra la obesitat nutricional causa un increment d'aquests paràmetres

preferentment en els músculs amb més proporció de fibres ràpides i glicolítiques.

3.- Els dos models d'obesitat afecten als paràmetres del metabolisme energètic i contràctil en el mateix sentit: cap dels models d'obesitat estudiat afecta a l'activitat Lactat deshidrogenasa o Adenosina quinasa, la qual cosa indica que no afecta la capacitat glicolítica o la velocitat contràctil dels músculs. Per contra, provoquen un augment de la capacitat oxidativa del múscul, en tant que incrementen l'activitat Succinat deshidrogenasa en tots els músculs, i la β -Oxoacil CoA deshidrogenasa i Creatina quinasa en el gastrocnemius. La obesitat genètica provoca un increment de l'activitat d'aquest últim enzim en el tibialis β -Oxoacil CoA deshidrogenasa, i un increment de la Creatina quinasa en soleus i gastrocnemius. Es fa palesa la diferent sensibilitat dels músculs a les alteracions fisiològiques en funció del seu perfil fibrilar.

4.- Els diferents models d'obesitat emprats indueixen alteracions ultraestructurals similars en els diferents músculs, les quals consisteixen en inflamacions mitocondrials i del reticle sarcoplasmàtic localitzades, i en desestructuracions locals del sarcòmer. Novament el diferent perfil fibrilar provoca una diferència en la freqüència amb què s'observen aquestes anomalies: els músculs amb més alta proporció de fibres ràpides i glicolítiques mostren més lesions locals en la seva ultraestructura que els de composició majoritària en fibres lentes i oxidatives.

Obesitat i Calpaïnes musculars

1.- Les activitats dels diversos elements del sistema calpaïna depèn del múscul estudiat: ténen una activitat més alta en els músculs amb un perfil fibrilar més lent i més oxidatiu. Aquest resultat concorda amb el trobat per les taxes de degradació de proteïnes trobades en els mateixos músculs per altres autors. Es referma amb aquestes dades un paper important en la regulació de la degradació de proteïnes al múscul pel sistema calpaïna.

2.- Els diversos models d'obesitat causen una adaptació diferent del sistema calpaïna, en funció el múscul estudiat: La obesitat genètica només incrementa la activitat μ -calpaïna en el soleus i gastrocnemius,

mentre que l'obesitat nutricional indueix un descens de les dues isoformes, m i μ , de la calpaïna en el tibialis.

3.- Mentre que en el soleus i el gastrocnemius dels animals obesos genètics, i en el tibialis dels obesos nutricionals, les variacions en el sistema calpaïna semblen explicar les alteracions en el contingut de proteïna muscular en les diferents situacions fisiopatològiques estudiades, no succeeix així en tots els músculs (tibialis en els animals fa/fa, o gastrocnemius en els sotmesos a dieta de cafeteria). Aquest fet palesa una elevada complexitat en els mecanismes de regulació de l'activitat dels elements del sistema calpaïna, els quals, en part, són funció del múscul estudiat.

4.- Un mecanisme de regulació factible, l'alteració de la qualitat de les miofibres com a substrat de les calpaïnes a causa de les diverses situacions metabòliques, a estat estudiat pel gastrocnemius. Amb independència del model emprat, les miofibres isolades del gastrocnemius, són pitjor substrat de les calpaïnes que no pas les isolades d'animals primis.

Efectes del clenbuterol.

1.- L'administració crònica, tant per via oral com per via intraperitoneal, de clenbuterol causa una disminució dels dipòsits lipídics i de glicògen al cap de 10 dies de tractament en la rata.

2.- També, independentment de la via d'administració, provoca una hipertròfia en els músculs esquelètics, gastrocnemius i soleus, la qual implica un increment en el contingut de proteïna.

3.- La ruta intraperitoneal causa una hipertròfia en el cor, la qual no s'observa en els animals tractats per via oral.

4.- Els efectes, pel que fa al contingut de proteïna i massa muscular, es mantenen al cap de 10 dies de retirada del fàrmac. Per contra això no succeeix amb els dipòsits lipídics i de glicògen.

5.- Un tractament amb clenbuterol té efectes perdurables i contraria als observats com a conseqüència de l'obesitat genètica en el múscul. Per contra, els efectes sobre els dipòsits lipídics i de glicògen, són

efimers, la qual cosa desaconsella l'us d'aquest fàrmac en el tractament simptomàtic de l'obesitat.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÈICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Marti Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
METABOLISME PROTÉICO-MUSCULAR A L'OBESITAT
Martí Yebras i Cañellas
DL:T-1575-2009/ISBN: 978-84-692-4534-7

Y
M
t
a