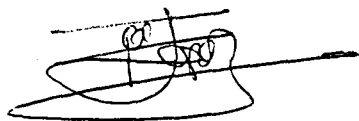


DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y FISIOLOGIA
UNIDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR B
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

ESTUDIO DE LA UTILIZACION DE LA ALANINA Y
OTROS AMINOACIDOS POR EL TEJIDO ADIPOSEO
MARRON INTERESCAPULAR DE LA RATA

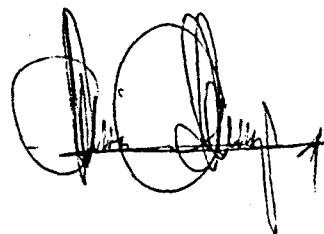
FRANCISCO JAVIER LOPEZ SORIANO

EL INTERESADO

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.

FRANCISCO JAVIER LÓPEZ SORIANO

VISTO BUENO DEL DIRECTOR

A handwritten signature in black ink, featuring two large, prominent loops followed by a series of smaller, more intricate strokes.

MARIA ALEMANY LAMANA
CATEDRATICO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada íntegramente en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular B del Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Universidad de Barcelona.

Desde estas líneas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido a la realización de la presente Tesis.

Muy especialmente al Dr. Marià Alemany Lamana, por su inestimable dedicación a la dirección de este trabajo y por todos los valiosos consejos que me ha dado durante todo este tiempo.

A todos y cada uno de los miembros de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular B, por la ayuda y comprensión que he recibido de ellos en todo momento. A Teresa Mampel, Roser Iglesias y Francesc Villarroja, gracias a cuya colaboración fue posible la realización de los experimentos "in vivo". A Josep Argilés, por su apoyo y sus consejos. A Julia Peinado y Antonio Felipe, con quienes he compartido muchas horas de trabajo, por su amistad y por la ayuda que me han brindado.

Y especialmente a mis padres, por el cariño y la comprensión que me han dedicado durante toda mi vida.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. El tejido adiposo marrón	2
1.1.1. Balance energético: Papel del tejido adiposo marrón	2
1.1.1.1. Concepto de balance energético	2
1.1.1.2. Termogénesis no temblorosa termorreguladora	3
1.1.1.3. Termogénesis inducida por la dieta	4
1.1.1.4. Consideraciones históricas	5
1.1.2. Distribución y morfología del tejido adiposo marrón	6
1.1.2.1. Distribución	6
1.1.2.2. Anatomía	7
1.1.2.3. Estructura celular	7
1.1.3. Tejido adiposo marrón y termogénesis	8
1.1.3.1. Mecanismos termogénicos	8
1.1.3.2. Mecanismos termogénicos en el tejido adiposo marrón	9
1.1.3.3. Termogenina	10
1.1.3.3.1. Características generales	10
1.1.3.3.2. Formas activas e inactivas	11
1.1.3.3.3. Regulación de la actividad de la termogenina	11
1.1.4. Regulación de la termogénesis	13
1.1.4.1. Control neural	13
1.1.4.1.1. Receptores adrenérgicos	13
1.1.4.2. Control de la respuesta trófica	14
1.1.4.2.1. Situaciones de termogénesis activada	14
1.1.4.2.2. Situaciones de termogénesis disminuída	15
1.1.4.3. Control hormonal	16
1.1.4.3.1. Insulina	16
1.1.4.3.2. Glucagón	16
1.1.4.3.3. Hormonas tiroideas	16
1.1.4.3.4. Glucocorticoides	17
1.1.5. Metabolismo del tejido adiposo marrón: substratos energeticos	17
1.1.5.1. Metabolismo de los ácidos grasos	17
1.1.5.1.1. Vías de degradación	17
1.1.5.1.2. Vías de suministro	19
1.1.5.1.3. Síntesis del glicerol-3-fosfato	21
1.1.5.2. Metabolismo de la glucosa	22
1.1.5.3. Metabolismo de los cuerpos cetónicos	23
1.1.5.4. Metabolismo de los aminoácidos	23
1.2. Efectos metabólicos del frío y del ayuno	24
1.2.1. Efectos metabólicos del frío	24
1.2.1.1. Metabolismo glucídico	24
1.2.1.2. Metabolismo lipídico	25
1.2.1.3. Metabolismo de los aminoácidos	26
1.2.2. Efectos metabólicos del ayuno	27
1.2.2.1. Reservas energéticas	27

1.2.2.2. Etapa post-absorbtiva	28
1.2.2.3. Ayuno a corto plazo	28
1.2.2.4. Ayuno prolongado	29
1.3. Metabolismo de la alanina	31
1.3.1. Vías del metabolismo de la alanina	31
1.3.2. Relaciones inter-órganos	31
1.3.2.1. Intestino	31
1.3.2.2. Hígado	32
1.3.2.3. Músculo	33
1.3.2.4. Riñón	34
1.3.2.5. Tejido adiposo blanco	35
1.3.2.6. Papel de la compartimentación sanguínea	35
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	37
3. MATERIALES Y METODOS	40
3.1. Parte 1: Estudio de las actividades enzimáticas y composición del acervo de aminoácidos libres del tejido adiposo marrón in- terescapular	41
3.1.1. Animales	41
3.1.2. Sacrificio y obtención de las muestras	42
3.1.3. Determinación de las actividades enzimáticas	43
3.1.3.1. Preparación de los homogenados	43
3.1.3.2. Alanina transaminasa	43
3.1.3.3. Aspartato transaminasa	45
3.1.3.4. Glutamato deshidrogenasa	46
3.1.3.5. Glutamina sintetasa	46
3.1.3.6. Transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada	48
3.1.3.7. Adenilato-desaminasa	50
3.1.3.8. Otras actividades enzimáticas	51
3.1.4. Determinación de aminoácidos libres	51
3.1.5. Determinaciones en tejidos	54
3.1.5.1. Determinación de proteínas	54
3.1.5.2. Determinación de lípidos totales	55
3.1.5.3. Determinación del contenido de agua tisular	55
3.1.6. Determinaciones en sangre y plasma	56
3.1.6.1. Determinación de glucosa	56
3.1.6.2. Determinación de urea	57
3.1.6.3. Determinación de ácidos grasos libres	58
3.1.7. Determinación de la tasa de recambio proteico	59
3.2. Parte 2: Estudio de la utilización de alanina por el tejido adiposo marrón interescapular "in vitro"	61
3.2.1. Animales y grupos experimentales	61
3.2.2. Sacrificio y toma de muestras	61
3.2.3. Composición del medio de incubación	61
3.2.3.1. Preparación del tampón	61
3.2.3.2. Preparación de las hormonas	62
3.2.4. Proceso de incubación "in vitro"	62
3.2.5. Valoración del $^{14}\text{CO}_2$	63
3.2.6. Valoraciones en tejido	63
3.2.6.1. ^{14}C -lípidos totales y ^{14}C -hidrosolubles	64
3.2.6.2. ^{14}C -ácidos grasos y ^{14}C -glicerol de glicéridos	64
3.2.6.3. Residuo seco deslipidado	65
3.2.7. Contaje de la radiactividad	65
3.2.7.1. Líquido de centelleo	65
3.2.7.2. Cálculo de la eficiencia	65

3.3. Parte 3: Estudio de la captación/liberación de aminoácidos y glucosa por el tejido adiposo marrón interescapular "in vivo" .	67
3.3.1. Animales y grupos experimentales	67
3.3.2. Determinación de las diferencias arteriovenosas	67
3.3.2.1. Anestesia y toma de muestras	67
3.3.2.2. Determinación del hematocrito	68
3.3.2.3. Procesamiento de las muestras	68
3.3.2.4. Cálculo de la compartimentación sanguínea	69
3.2.3. Determinación del flujo sanguíneo	69
3.2.3.1. Fundamento del método	69
3.2.3.2. Administración de las microesferas y toma de muestras	69
3.2.3.3. Contaje de la radiactividad y cálculo del flujo sanguíneo .	70
3.4. Cálculos estadísticos	71
4. RESULTADOS	72
4.1. Parte 1: Estudio de las actividades enzimáticas y composición del acervo de aminoácidos libres del tejido adiposo marrón interescapular	73
4.1.1. Peso y composición del tejido adiposo marrón interescapular .	73
4.1.2. Actividades enzimáticas en el tejido adiposo marrón interescapular: comparación con otros tejidos de la rata	74
4.1.3. Actividades enzimáticas en el tejido adiposo marrón interescapular: efectos del ayuno y del frío	74
4.1.4. Composición del acervo de aminoácidos libres en el tejido adiposo marrón interescapular: efectos del ayuno y del frío .	75
4.1.5. Concentraciones de aminoácidos circulantes: efectos del ayuno y del frío	76
4.1.6. Recambio proteico en el tejido adiposo marrón interescapular	77
4.2. Parte 2: Estudio de la utilización de alanina por el tejido adiposo marrón interescapular "in vitro"	87
4.2.1. Determinación de las condiciones de incubación y validación del método	87
4.2.2. Efecto de la glucosa sobre la utilización de la alanina por el tejido adiposo marrón interescapular "in vitro"	87
4.2.3. Efecto de la insulina, noradrenalina y glucagón sobre la utilización de la alanina por el tejido adiposo marrón interescapular	88
4.2.4. Utilización de la alanina por el tejido adiposo marrón interescapular "in vitro": efectos del ayuno y del frío	99
4.3. Parte 3: Estudio de la captación/liberación de aminoácidos y glucosa por el tejido adiposo marrón interescapular "in vivo" .	112
4.3.1. Flujo sanguíneo a través del tejido adiposo marrón interescapular	112
4.3.2. Concentraciones de aminoácidos y glucosa en sangre y plasma arterial	112
4.3.3. Captación/liberación de aminoácidos por el tejido adiposo marrón interescapular "in vivo"	112
4.3.4. Captación/liberación de glucosa por el tejido adiposo marrón interescapular "in vivo"	114
5. DISCUSION	125
5.1. Parte 1: Estudio de las actividades enzimáticas y composición del acervo de aminoácidos libres del tejido adiposo marrón interescapular	126
5.1.1. Peso y composición del tejido adiposo marrón interescapular .	126

5.1.2. Actividades enzimáticas y composición del acervo de aminoácidos libres en el tejido adiposo marrón interescapular.....	127
5.1.3. Efecto del ayuno y del frío sobre las actividades enzimáticas y la composición del acervo de aminoácidos libres del tejido adiposo marrón interescapular	131
5.1.3.1. Efecto del ayuno	131
5.1.3.2. Efecto del frío	133
5.1.4. Recambio proteico en el tejido adiposo marrón interescapular	135
5.2. Parte 2: Estudio de la utilización de alanina por el tejido adiposo marrón interescapular "in vitro"	137
5.2.1. Justificación de la metodología utilizada	137
5.2.2. Efecto de la glucosa sobre la utilización de la alanina por el tejido adiposo marrón interescapular "in vitro"	139
5.2.3. Efecto de la insulina, noradrenalina y glucagón sobre la utilización de la alanina por el tejido adiposo marrón interescapular	140
5.2.4. Efecto del ayuno y del frío sobre la utilización de la alanina por el tejido adiposo marrón interescapular "in vitro" ...	143
5.3. Parte 3: Estudio de la captación/liberación de aminoácidos y glucosa por el tejido adiposo marrón interescapular "in vivo" .	146
5.3.1. Flujo sanguíneo a través del tejido adiposo marrón interescapular	146
5.3.2. Concentraciones de aminoácidos y glucosa en sangre y plasma arteriales	146
5.3.3. Captación/liberación de aminoácidos por el tejido adiposo marrón interescapular "in vivo".....	147
5.3.4. Captación/liberación de glucosa por el tejido adiposo marrón interescapular "in vivo"	152
6. CONCLUSIONES	154
7. BIBLIOGRAFIA	156

o-----oOo-----o

1. INTRODUCCION

1.1 EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON.

1.1.1. BALANCE ENERGETICO: PAPEL DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON.

1.1.1.1. CONCEPTO DE BALANCE ENERGETICO.

El balance energético puede definirse como la diferencia entre la energía química utilizable que entra en el organismo a través de la dieta y la que éste gasta, todo ello en un periodo determinado. Matemáticamente lo podríamos expresar como:

$$E \text{ entrada} = E \text{ gastada} \pm \Delta E \text{ almacenada}$$

El término energía entrada se refiere a la energía química que el animal obtiene por medio de la ingesta de alimentos, o más concretamente por la oxidación de los componentes metabólicos aportados por su dieta y que será transformada en intermediarios ricos en energía como el ATP para ser utilizado en los procesos metabólicos, o bien será almacenada en forma química, principalmente como reservas grasas, glucógeno o incluso proteína. Esta energía la utilizará el animal para satisfacer sus necesidades energéticas, que pueden ser clasificadas en dos categorías (Girardier y Stock, 1983):

- Energía neta, que será la que utilizará el animal para el mantenimiento y eventual incremento del contenido energético de su cuerpo: biosíntesis de materiales para mantenimiento, procesos de transporte activo, trabajo mecánico y almacenamiento de materiales y reservas.
- Energía térmica, que será la correspondiente a las inevitables pérdidas de energía en forma de calor en los distintos procesos metabólicos, tanto a nivel del trabajo muscular como en los procesos de asimilación de nutrientes, especialmente de grasas y proteínas.

En los animales homeotermos, y más concretamente en los mamíferos, el componente de energía térmica incluye, a su vez, otros dos aspectos adaptativos:

- Termogénesis termorreguladora, que corresponde a la energía que el animal disipa en forma de calor cuando la temperatura ambiental se encuentra por debajo de la correspondiente a la termoneutralidad para dicha especie (Hey, 1975), y que a su vez puede diferenciarse en termogénesis temblorosa, en la que la generación extra de calor se debe a contracciones repetidas involuntarias del músculo esquelético (temblor) (Hemingway, 1963), y la termogénesis no temblorosa, cuyo principal efector es el tejido adiposo marrón (Foster y Frydman, 1978b).
- Termogénesis inducida por la dieta, que corresponde a la producción de calor que permite al animal disipar parte de la energía metabolizable ingerida en exceso con respecto a sus necesidades energéticas, y que también es mediatizada por el tejido adiposo marrón (Rothwell y Stock, 1979), si bien recientemente también han sido implicados en este proceso el hígado (Berry et al., 1985) y el músculo esquelético (Astrup et al., 1986).

A partir de estos datos se comprende el interés que en los últimos años ha despertado el estudio del tejido adiposo marrón (TAM), el único tejido de los mamíferos cuya principal función es la producción primaria de calor, cuando para los demás tejidos éste es un subproducto metabólico. De acuerdo con lo señalado el TAM es el principal efector (y quizás el único) tanto de la termogénesis no temblorosa termorreguladora como de la termogénesis adaptativa inducida por la dieta, convirtiéndose así este tejido, al menos en algunos mamíferos, en un efector en la regulación de la temperatura corporal y de la regulación de la eficiencia nutricional (Seydoux, 1984).

1.1.1.2. TERMOGENESIS NO TEMBLOROSA TERMORREGULADORA.

La termogénesis no temblorosa puede descomponerse en dos componentes: basal y regulador (Jansky, 1973). La termogénesis no temblorosa basal corresponde a la producción de calor por parte de todos los procesos que en conjunto constituyen la tasa metabólica basal, mientras que la termogénesis no temblorosa reguladora es la que se genera como respuesta a una necesidad específica de calor de naturaleza termorreguladora.

La termogénesis no temblorosa reguladora juega un papel especialmente importante en los neonatos de muchas especies de mamíferos (Smith y Horwitz, 1969), así como en los mamíferos hibernantes (Jansky, 1973). Asimismo desempeña un papel fundamental en la regulación de la temperatura corporal de los adultos de muchas especies con relación a la temperatura ambiental (Landsberg y Young, 1983), modificándose en función de cambios puntuales de la temperatura ambiental y también como consecuencia de la exposición crónica al frío.

La identificación definitiva del órgano responsable de la termogénesis no temblorosa termorreguladora no se produjo hasta los estudios de Foster y Frydman (1978b). Ya se había descrito este proceso como un mecanismo de producción de calor de base metabólica, que era inducido por el frío y era independiente de la actividad muscular; su existencia fue demostrada inicialmente en animales aclimatados al frío (Sellers et al., 1954; Cottle y Carlson, 1956), comprobándose que esta capacidad termogénica era debida a la elevada capacidad que tenían estos animales de incrementar su tasa metabólica como respuesta a la noradrenalina (Depocas, 1960). Se estableció también el papel mediador del sistema nervioso simpático (Cottle y Carlson, 1956). Las investigaciones encaminadas hacia la identificación del efector responsable de estos procesos termogénicos señalaron inicialmente al músculo esquelético, mientras que el TAM, pese a ser conocida su función termogénica (Smith y Horwitz, 1969), se consideraba que no contribuía de forma significativa dado su pequeño tamaño relativo. El empleo de la técnica de las microesferas radiactivas para la determinación del flujo sanguíneo real (Foster y Frydman, 1978a, 1978b, 1979) permitió atribuir al TAM un papel protagonista en la responsabilidad del incremento de la tasa metabólica inducida tanto por la administración de noradrenalina como por exposición al frío. Esto permitía explicar la mayor resistencia al frío de los animales tratados crónicamente con noradrenalina (LeBlanc y Pouliot, 1964), el crecimiento del tejido observado como resultado de la aclimatación al frío (Bukowiecki et al., 1982) y su control por el sistema nervioso - adrenérgico- simpático (Barnard et al., 1980).

1.1.1.3. TERMOGENESIS INDUCIDA POR LA DIETA.

La termogénesis inducida por la dieta (TID) es un término que hace referencia al incremento de la tasa metabólica que sigue a la ingestión de alimento, así como a los cambios asociados con alteraciones crónicas en el nivel de energía ingerida. En la TID puede distinguirse un componente obligatorio o basal, que incluye el costo energético de la digestión, absorción y asimilación de los nutrientes, y un componente adaptativo implicado en la disipación de la energía consumida en exceso con relación a las necesidades del animal, constituyéndose así como un mecanismo regulador del balance energético.

Fue Neumann (1902) el primero en señalar que el consumo de alimentos estimulaba la producción de calor, dando como resultado una pérdida de energía útil que era disipada, acuñando para este fenómeno el término *luxuskonsumption*. Otros autores confirmaron posteriormente la existencia de un incremento adaptativo en el gasto energético en situaciones de sobrealimentación (Gulick, 1922). La existencia del componente adaptativo de la TID se puso en evidencia en los experimentos de Miller y Payne (1962) mediante la administración a cerdos de una dieta hipoproteica. Estos experimentos fueron más tarde confirmados por otros autores en otras varias especies, incluido el hombre (Miller y Munford, 1967; Stirling y Stock, 1968; Gurr et al., 1980).

La mayor parte de los estudios recientes llevados a cabo sobre la TID facultativa se han realizado en animales alimentados con dietas de *cafetería* (Sclafani y Springer, 1976). Estas dietas son de naturaleza hipercalórica, hiperglucídica e hiperlipídica; inducen una hiperfagia voluntaria y traen consigo un incremento del peso corporal, si bien se pudo observar que éste era inferior al que cabría esperar en función de la ingesta de alimento, que en términos energéticos llegaba a ser prácticamente el doble de la de los animales alimentados con el pienso control (Rothwell y Stock, 1979). Esta diferencia es atribuible al incremento en el componente facultativo de la TID, debido a la acción disipadora de energía del TAM, y que se encuentra bajo el control del sistema nervioso simpático (véase Rothwell y Stock, 1982a). Este modelo de la dieta de *cafetería* presenta inconvenientes asociados a las variaciones en su composición en los experimentos realizados en distintos laboratorios, así como a las diferencias debidas a distintos factores como el sexo de los animales (Castellà y Alemany, 1985) o al componente genético (Rothwell et al., 1982c), e incluso a variaciones entre individuos dentro de una misma cepa (Rothwell y Stock, 1980b). Estos problemas han hecho sugerir a algunos autores que las conclusiones obtenidas en los estudios llevados a cabo con este modelo pueden ser en realidad artefactos experimentales (Hervey y Tobin, 1981; Barr y McCracken, 1984). Sin embargo, un estudio de la ingesta de ratas sometidas a una dieta de *cafetería* realizada en nuestro laboratorio (Monfar, 1985; Prats, 1985; Prats et al., 1986; Monfar et al., 1987) con una dieta de 10 alimentos, demostró la uniformidad real de la ingesta diaria de proteína, lípidos, glúcidos y agua, así como de energía por parte de los animales, a pesar de existir amplias variaciones en la ingesta de determinados alimentos individuales. Según esto, las ratas, además de controlar de algún modo su ingesta energética, serían capaces de controlar la proporción de proteínas, lípidos y glúcidos ingeridos diariamente con muy escasa variación (Monfar, 1985; Prats, 1985). La dieta de *cafetería* conduce a un claro incremento de la termogénesis (Castellà y Alemany, 1986; Castellà et al., 1986), y

constituye un buen modelo de dieta controlada esencialmente hiperlipídica, normoglucídica y algo hiperproteica (Monfar, 1985; Prats, 1985).

Con relación a los mecanismos fisiológicos implicados en la TID, ya en 1968 se había sugerido que podían ser similares a los de la termogénesis no temblorosa (Stirling y Stock, 1968), como podría demostrarse algunos años más tarde (Rothwell y Stock, 1980a). De esta manera, se sabe que la exposición al frío provoca un aumento de la actividad nerviosa simpática, que es la principal responsable del incremento observado en la tasa metabólica de estos animales (Jansky, 1973). De un modo similar las ratas hiperfágicas alimentadas con una dieta de *cafetería* muestran una mayor capacidad de respuesta a la noradrenalina, y al igual que en aquéllos esta capacidad puede ser suprimida por agonistas β -adrenérgicos (Rothwell y Stock, 1979), lo que condujo a la suposición de que ambos fenómenos estaban basados en un mismo mecanismo termogénico y que los estímulos podían ser interactivos (Rothwell y Stock, 1980a).

Al igual que en la exposición al frío (Bukowiecki et al., 1982), las ratas alimentadas con una dieta de *cafetería* muestran un incremento en la masa total de TAM, debido a una hipertrofia del tejido, con acúmulo de triacil-glicerol y un aumento significativo del contenido de proteínas (Monfar, 1985; Prats, 1985), si bien en los animales jóvenes también se observa una hiperplasia del mismo (Tulp et al., 1980). También se observa en estos animales un incremento del flujo sanguíneo a través del TAM (Rothwell y Stock, 1981), similar al observado como consecuencia de la aclimatación al frío (Foster y Frydman, 1978b).

1.1.1.4. CONSIDERACIONES HISTÓRICAS.

Hasta hace apenas veinte años el TAM era un tejido al que no se le había podido asignar un papel fisiológico claro. Sin embargo, a raíz del descubrimiento de que podía actuar como efector termogénico en determinadas circunstancias, se multiplicaron espectacularmente los estudios sobre su metabolismo y su función en distintas situaciones fisiológicas y patológicas.

Fue en 1551 cuando Conrad Gesner describió por vez primera la existencia del TAM, concretamente el el área interescapular de la marmota. Sin embargo, durante varios siglos su papel fisiológico no pudo ser descubierto, ya que si bien se le había atribuido una función durante la hibernación, también se había podido describir la presencia de este tejido en mamíferos no hibernantes. De todas formas la confirmación de la implicación del TAM en el proceso del despertar de la hibernación es mucho más reciente (Smith y Hock, 1963).

Los primeros datos relativos a una posible implicación del TAM en la termorregulación aparecen en 1912, cuando Polimanti propuso una hipótesis en este sentido, aunque sin el adecuado soporte experimental. Los estudios sobre su metabolismo en los años siguientes permitieron en 1950 a Pagé y Babineau llegar a la conclusión de que el TAM era funcional bajo condiciones de stress, especialmente durante la exposición al frío. Algunos años más tarde Johansson (1959) ya estuvo en condiciones de establecer que el TAM podía jugar un importante papel en la regulación de la temperatura corporal, al menos en algunos animales.

Los primeros datos concluyentes relativos al papel fisiológico del TAM se pusieron en evidencia a partir del estudio de la termogénesis no temblorosa, que se iniciaron en la década de los años 60 y que se llevaron a cabo fundamentalmente en neonatos de distintas especies de mamíferos. De

este modo Hull y colaboradores demostraron que en el conejo el TAM era responsable del 60% de la termogénesis no temblorosa (Hull y Segall, 1965; Heim y Hull, 1966), hecho que también se pondría en evidencia en el caso de la oveja (Alexander y Bell, 1975). No obstante, estos estudios no resolvían el problema de la función que el tejido pudiese tener en el animal adulto. De hecho, fueron los estudios llevados a cabo por Foster y Frydman (1978b), mediante la utilización de la técnica de las microesferas para la determinación del flujo sanguíneo, los que evidenciaron la alta capacidad oxidativa y termogénica que el TAM puede desarrollar bajo condiciones de estimulación, como pueden ser la aclimatación al frío, confirmándose así el TAM como el principal responsable de la termogénesis no temblorosa.

Fue también a finales de la década de los 70 cuando se pudo asignar al TAM un papel en la termogénesis facultativa inducida por la dieta (Sclafani y Springer, 1976; Rothwell y Stock, 1979). Estos autores indujeron en animales experimentales una hiperfagia voluntaria mediante la administración de una dieta de *cafetería*, observando que los animales mostraban una marcada resistencia al desarrollo de la obesidad. De esta forma se pudo comprobar que el TAM jugaba un papel en la disipación de la mayor parte de la energía que el animal ingería por encima de sus necesidades energéticas. Estos hallazgos despertaron inmediatamente el interés general sobre el papel que pudiese tener este tejido con relación a la génesis de la obesidad. Este interés se ha visto reforzado al comprobarse que en distintos modelos de obesidad en roedores, tanto genética (ratones ob/ob y db/db y ratas Zucker fa/fa) como inducida por lesiones hipotalámicas, la aparición de la obesidad se relaciona con una deficiente respuesta termogénica del TAM de estos animales (Himms-Hagen, 1983).

Por lo tanto, las funciones que hasta el momento se le han podido atribuir de modo claro al TAM en los mamíferos se centran en la salida de la hibernación hipotérmica, la adaptación fisiológica al frío, la defensa contra la hipotermia en los neonatos y la eliminación del exceso de energía (prevención de la obesidad) en animales que ingieren dietas con exceso de nutrientes con relación a las necesidades fisiológicas. En la actualidad están siendo revisados otros aspectos tales como su participación en el control de la glucemia y en la producción sistémica de triyodotironina.

1.1.2. DISTRIBUCION Y MORFOLOGIA DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON.

1.1.2.1. DISTRIBUCION.

El TAM es un tejido característico de algunos grupos de mamíferos. Hasta la fecha se ha descrito en la mayor parte de las especies estudiadas, tanto en euterios (Rowlatt et al., 1971) como incluso en los marsupiales (Loudon et al., 1985), siendo probable que este presente en todos los mamíferos.

En las aves también ha sido descrito por algun autor (Oliphant, 1983), si bien dicha presencia no ha podido ser confirmada de un modo concluyente y los datos disponibles hasta la fecha son contradictorios (Johnston, 1970).

La filogenia del TAM es desconocida, pero parece que aparece tradíamente en el curso de la evolución, paralelamente al desarrollo de la homeotermia o, más concretamente, con la aparición de la capacidad termogénica no temblorosa de carácter termorregulador.

1.1.2.2. ANATOMIA.

El TAM aparece en los mamíferos hibernantes, roedores y quirópteros como depósitos definidos de color marrón, manteniendo este mismo aspecto a lo largo de la vida del animal. Sin embargo en la mayor parte de las restantes especies (y entre ellas el hombre) presenta este aspecto sólo durante las primeras etapas de la vida, ya que en el adulto su apariencia es similar a la del tejido adiposo blanco.

El color marrón característico es debido principalmente a la hemoglobina sanguínea, dado que se trata de un tejido sumamente vascularizado, así como al elevado contenido de citocromos y flavinas de sus células, que son excepcionalmente ricas en mitocondrias. Asimismo presenta una rica inervación simpática, sin que existan evidencias claras de otro tipo de inervación (Barnard et al., 1980); dichos nervios forman un denso plexo en el tejido, que afecta tanto a los adipocitos como a los vasos sanguíneos, y se encuentran bajo el control del hipotálamo (véase Girardier y Seydoux, 1986).

Desde un punto de vista topológico, el TAM se localiza principalmente en las regiones interescapular y cervical, a lo largo de los grandes vasos sanguíneos torácicos, del cuello y de las axilas, así como en las regiones intercostal, suprailíaca y perirrenal (Afzelius, 1970). El TAM aparece de este modo estratégicamente situado, permitiendo el calentamiento de la médula espinal toracocervical, los ganglios simpáticos, el corazón y los riñones (Smith, 1964), protegiendo este núcleo de estructuras vitales frente a posibles fluctuaciones térmicas durante la exposición al frío. Otras veces el TAM presenta una distribución atípica, como es el caso de las crías de foca, en las que aparece en forma de una capa subcutánea continua (Grav et al., 1974).

La masa de TAM presente en un animal varía con la especie, el estado de desarrollo y factores nutricionales y ambientales. Cuantitativamente el TAM representa aproximadamente el 1% del peso corporal en la rata adulta, aunque esta proporción puede ser mayor en los casos de aclimatación al frío (Foster y Frydman, 1979) o a una dieta hipercalórica (Rothwell y Stock, 1979). En general, raramente representa más del 2% del peso corporal, si bien en las crías de conejo y en ciertos murciélagos adultos puede llegar hasta el 5% (Smith y Horwitz, 1969).

1.1.2.3. ESTRUCTURA CELULAR.

Las células del TAM aparecen al microscopio como células poligonales de 20 a 45 μm de diámetro, que se diferencian de las del tejido adiposo blanco (TAB) por su menor tamaño (Hassi, 1977), así como por presentar un citoplasma densamente granular por la presencia de un elevado número de mitocondrias (Nedergaard y Lindberg, 1982) en consonancia con su elevada capacidad oxidativa. Otro carácter diferenciador con respecto al TAB es el carácter multilocular de sus vacuolas lipídicas, aspecto adoptado por las reservas grasas del TAM salvo en situaciones de termogénesis disminuida (Bukowiecki y Collet, 1983). Otra diferencia a nivel citológico relacionada con este último aspecto es la posición central y no excéntrica de sus núcleos.

Los adipocitos no son, sin embargo, el único tipo celular que aparece en los depósitos de TAM, ya que aparecen también otras células, como preadipocitos y, sobre todo, células endoteliales. La proporción de estas

últimas aumenta considerablemente bajo situaciones en las que se produce una activación de la función termogénica del tejido.

Al microscopio electrónico se observan numerosos terminales axónicos que permiten a las células del TAM estar innervadas directamente por las terminaciones de los nervios simpáticos (Barnard et al., 1980). Se observan también un gran número de uniones intercelulares del tipo *gap junction*, lo que da a la organización celular una naturaleza en gran medida sincitial. Estas uniones permiten el intercambio de pequeñas moléculas (de pesos moleculares de hasta 1000) entre los distintos adipocitos, y si bien su función no ha podido ser confirmada sí que ha sido señalada la existencia de un acoplamiento electrostático a nivel celular (Revel y Sheridan, 1968; Girardier y Schneider-Picard, 1983). También se ha señalado que hay una clara correlación entre la actividad del tejido y su capacidad de comunicación intercelular. Posiblemente la función de estas uniones intercelulares sea la de contribuir a la difusión de señales activadoras o de intermediarios metabólicos entre distintas células. Otros aspectos ultraestructurales que han podido ponerse en evidencia son la elevada capacidad de pinocitosis del TAM (Girardier y Seydoux, 1971), cuyo significado no ha podido ser determinado con claridad, así como la existencia de canales en la membrana, que posiblemente están implicados en el transporte de ácidos grasos (Blanchette-Mackie y Scow, 1982).

1.1.3. TEJIDO ADIPOSO MARRÓN Y TERMOGENESIS.

1.1.3.1. MECANISMOS TERMOGENICOS.

El término termogénesis hace referencia a la producción de calor por disipación de energía química. La oxidación de sustratos metabólicos por parte de las células, ya sean glucosa, ácidos grasos o aminoácidos, tiene como principal objetivo proveer a la célula de una forma de energía utilizable, principalmente ATP. En la mitocondria, y de acuerdo con la teoría quimiosmótica de Mitchell, el flujo de electrones en la cadena respiratoria genera un gradiente electroquímico de protones a nivel de la membrana mitocondrial interna, hecho que facilita la síntesis de ATP a través de la entrada de protones por la ATP-sintetasa. En una mitocondria convencional existe un acoplamiento entre la cadena respiratoria y la síntesis de ATP, y el control respiratorio es automático, de tal modo que la tasa de respiración y la demanda de ATP serán interdependientes.

Los procesos termogénicos requieren la existencia de algún mecanismo que pueda evitar el control respiratorio, para permitir de este modo unas elevadas tasas respiratorias no condicionadas por un acúmulo de ATP. Tres son los posibles mecanismos termogénicos que pueden aparecer a nivel celular (véase Nicholls y Locke, 1984):

- Hidrólisis acelerada del ATP: el control respiratorio se mantiene inalterado, pero algún mecanismo permite la rápida hidrólisis del ATP formado sin que ello comporte ni acúmulo de productos finales ni generación de trabajo útil. Ejemplos de este tipo de mecanismo serían la tiritación o contracciones involuntarias del complejo actina-miosina sin generación de trabajo mecánico útil (Hemingway, 1963), los ciclos de sustrato, en los que dos metabolitos son interconvertidos por vías distintas (p.ej., el ciclo fructosa-6-fosfato/ fructosa-1,6-bis-fosfato o el ciclo lipólisis/ reesterificación) y los ciclos iónicos a través de

la membrana plasmática (p.ej., el ciclo del Na^+) (Newsholme y Crabtree, 1976).

- Cadenas respiratorias modificadas: permiten altas tasas respiratorias sin la concomitante síntesis de ATP, debido a una falta de acoplamiento entre el flujo de electrones en la cadena respiratoria y la translocación de protones. El ejemplo mejor estudiado es el de algunas plantas como el del espádice de *Arum maculatum* (Moore y Rich, 1980). En animales no se ha podido constatar ningún caso similar, si bien se ha propuesto una vía de transferencia de electrones no conservadora en las mitocondrias hepáticas de ratas aclimatadas al frío (Mokhova et al., 1977).
- Mitocondrias con vías alternativas (cortocircuito) de reentrada de protones: incrementan la normalmente baja permeabilidad a los protones, permitiendo así su reentrada en la matriz evitando el paso normalmente obligado a través de la ATP-sintetasa direccional. Este mecanismo es precisamente el responsable de la capacidad termogénica del TAM.

1.1.3.2. MECANISMOS TERMOGENICOS EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON.

De entre los distintos mecanismos termogénicos señalados en el apartado anterior, se propuso en un principio como responsable de la capacidad termogénica del TAM la existencia de un mecanismo extramitocondrial de hidrólisis de ATP. En este sentido se han implicado a la actividad de la ATPasa (Na^+/K^+) de la membrana plasmática (Horwitz, 1973), al ciclo lipogénesis/ reesterificación (Dawkins y Hull, 1965) y al ciclo síntesis/ degradación de ácidos grasos (Trayhurn, 1981). De estos mecanismos el más estudiado ha sido el de la actividad de la ATPasa (Na^+/K^+), tanto en el contexto de la termogénesis inducida por las hormonas tiroideas (Smith y Edelman, 1973) como en el de la inducida por la noradrenalina (Horwitz, 1973; Horwitz y Eaton, 1975); sin embargo la actividad que presenta este enzima en el TAM no es lo suficientemente elevada como para explicar las elevadas tasas oxidativas que se observan en el tejido (Nicholls y Locke, 1984). Asimismo se ha podido establecer *in vitro* que la inhibición de la ATPasa (Na^+/K^+) con uabaína tan solo determina una disminución del 10-15% de la respiración estimulada por noradrenalina (Bukowiecki y Collet, 1983). En general se puede argumentar contra cualquier mecanismo termogénico que implique una hidrólisis acelerada de ATP, que la actividad de la ATP-sintetasa de la pared mitocondrial interna del TAM es en casi todos los casos muy baja con relación a la elevada capacidad de la cadena respiratoria (véase Cannon y Nedergaard, 1985).

A finales de la década de los años 60 se había podido comprobar *in vitro* que las mitocondrias del TAM podían actuar fosforilando el ADP a ATP con una estequiometría convencional, siempre y cuando en el medio de incubación se hubiese añadido albúmina deslipidada que pudiese captar los ácidos grasos endógenos, o bien si se preincubaban adecuadamente las mitocondrias para facilitar la oxidación de estos compuestos (Guillory y Racker, 1968; Hittelman et al., 1969). Estos hechos, unidos al ya conocido efecto desacoplador de los ácidos grasos sobre la fosforilación oxidativa (Pressman y Lardy, 1956), promovieron la aparición de una hipótesis según la cual los ácidos grasos podían ser los responsables del desacoplamiento

observado en las mitocondrias del TAM (Drahota et al., 1968; Hittelman y Lindberg, 1970). Sin embargo Rafael y colaboradores observaron que la presencia de nucleótidos de purina en el medio favorecían la reversión del estado desacoplado (Rafael et al., 1969), verificándose que GDP, GTP, ATP, ADP e incluso IDP e ITP podían incrementar la síntesis de ATP y el control respiratorio, mientras que los purín-nucleótidos monofosfato y todos los pirimidín-nucleótidos carecían de efecto en este sentido.

Fue David G. Nicholls quien en 1974 demostró que el desacoplamiento mostrado por las mitocondrias del TAM era debido a la presencia en dichos orgánulos de una vía de conductancia iónica regulable, capaz de permitir la reentrada en la matriz mitocondrial de los protones extruidos por la cadena respiratoria, con lo que se evitaba su paso a través de la ATP-sintetasa direccional, paso obligado en una mitocondria convencional. De esta manera se podía explicar el desacoplamiento entre el flujo de protones en la cadena respiratoria y la síntesis de ATP. Poco tiempo después se pudo detectar en la cara externa de la membrana mitocondrial interna de las células del TAM la existencia de un componente capaz de unirse con alta afinidad a los nucleótidos de purina (Nicholls, 1974), que en 1978 pudo identificarse como una proteína de membrana de peso molecular 32.000 gracias a la utilización de una técnica de marcado por unión covalente de un derivado del ATP marcado con ^{32}P y fotosensible a la luz ultravioleta, y posterior electroforesis en gel de poliacrilamida (Heaton et al., 1976). Esta proteína, inicialmente bautizada con el nombre de proteína desacopladora (*uncoupling protein* o UCP), también ha recibido los nombres de proteína 32k, proteína ligante de GDP (*GDP-binding protein*) y termogenina; precisamente será esta última denominación la que será utilizada en la presente memoria.

1.1.3.3. TERMOGENINA.

1.1.3.3.1. CARACTERISTICAS GENERALES.

La termogenina es un polipéptido de peso molecular unitario 32.000 (Ricquier y Kader, 1976; Heaton et al., 1978), si bien existen evidencias hidrodinámicas que sugieren que en la membrana mitocondrial es funcional como dímero (Lin et al., 1980). Presenta la capacidad de unirse con alta afinidad con los nucleótidos de la purina extramitocondriales, principalmente con ATP y GDP (Nicholls, 1976), existiendo un solo punto de unión por dímero. En definitiva, puede definirse la termogenina como un protonóforo sensible a los nucleótidos y un complejo conductor de haluros, que confiere a las mitocondrias del TAM su capacidad termogénica.

La termogenina ha sido purificada a partir de distintas especies, como la rata (Ricquier et al., 1979), el hamster (Lin y Klingenberg, 1980), el conejo (Freeman y Patel, 1984) y el hombre (Lean y James, 1983). De esta forma se ha podido estudiar con detalle, habiéndose incluso determinado su estructura primaria completa en la rata (Bouillaud et al., 1986) y el hamster (Aquila et al., 1985). Estos estudios han podido poner de manifiesto una cierta homología con el transportador de ADP/ATP de la membrana mitocondrial interna. También se ha observado *in vitro* que es sintetizada directamente, y no como un precursor de peso molecular mayor (Freeman et al., 1983), a diferencia de lo que sucede con la mayoría de las proteínas de la membrana mitocondrial interna.

El nucleótido de purina que se une con mayor afinidad a las mitocondrias aisladas de TAM es el GDP (Nicholls, 1976; Heaton et al.,

1978), si bien las afinidades por los distintos nucleótidos presentan variaciones en función de la especie estudiada y, además, la termogenina aislada muestra mayor afinidad por el ATP (Lin y Klingenberg, 1982). Los primeros estudios determinaron la existencia de un solo lugar de unión de alta afinidad, con un valor de K_d de 2 μM aproximadamente, si bien hay variaciones según la especie y en las estimaciones de diversos autores (Sundin y Cannon, 1980; Lin y Klingenberg, 1980; Goodbody y Trayhurn, 1981). Más tarde se definió un segundo lugar de unión de muy alta afinidad ($K_d = 0,05 \mu\text{M}$) (Bryant et al., 1983), e incluso se ha descrito un tercer lugar de unión (Rial y Nicholls, 1983), aunque éste probablemente represente la unión no específica. De todas formas tan sólo se ha podido confirmar en la termogenina purificada el lugar de unión mencionado en primer lugar (Lin y Klingenberg, 1980), y las últimas interpretaciones del problema sugieren la existencia de un solo punto de unión de alta afinidad (Milner et al., 1986).

La purificación de la termogenina ha hecho posible la preparación de anticuerpos y el desarrollo de técnicas inmunológicas como el radioinmunoensayo (RIA) (Lean et al., 1983) y el análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Cannon et al., 1982b). Estas técnicas han sido utilizadas en la cuantificación de la termogenina, y han permitido demostrar que esta proteína se encuentra exclusivamente en las mitocondrias del TAM.

1.1.3.3.2. FORMAS ACTIVAS E INACTIVAS.

La capacidad que presenta la termogenina de unirse con alta afinidad a los nucleótidos de la purina constituye la base de la técnica más utilizada en la determinación de la capacidad termogénica del TAM y que recibe en la bibliografía el nombre de *GDP-binding*. Al comparar los resultados obtenidos con esta técnica con los observados utilizando paralelamente métodos más directos, como puede ser la determinación electroforética de la proteína mitocondrial de peso molecular 32.000 en gel de poliacrilamida en presencia de lauril-sulfato sódico (Ricquier y Kader, 1976), se ha podido comprobar que en determinadas situaciones fisiológicas existen diferencias en los resultados obtenidos (Desautels et al., 1978; Himms-Hagen et al., 1981). Este hecho ha dado lugar a una hipótesis que señala la existencia de formas inactivas o "enmascaradas" de termogenina que se activarían bajo estímulos adecuados, lo que explicaría cambios observados en el *GDP-binding* que no se reflejarían en variaciones en la cantidad absoluta de termogenina. Sin embargo este hecho no ha sido observado por otros autores que han utilizado técnicas mucho más sensibles como las de tipo inmunológico (Rial y Nicholls, 1984; Nedergaard y Cannon, 1985). Muy recientemente se han añadido nuevas evidencias a favor de la existencia de termogenina "enmascarada", al haberse observado rápidos cambios en la medida del *GDP-binding* como respuesta a una exposición aguda al frío, hecho que sugiere la activación de moléculas de termogenina preexistentes (Gribskov et al., 1986; Swick y Swick, 1986).

1.1.3.3.3. REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TERMOGENINA.

Independientemente de la posible existencia de formas activas e inactivas de termogenina, el grado de unión de los nucleótidos de la purina a la termogenina modulará el grado de apertura de la vía de conductancia a los protones y, consecuentemente, la capacidad termogénica. De alguna forma se puede decir que los nucleótidos de la purina inhiben la termogénesis en la mitocondria intacta, actuando por lo tanto como moduladores negativos de

la actividad termogénica. Dada la alta afinidad de la termogenina por los nucleótidos de la purina y que la concentración citosólica de estos compuestos es muy superior a la K_m (Cannon et al., 1973), cabe suponer que el lugar de unión de la termogenina con los nucleótidos de purina se encuentra normalmente saturado. Por lo tanto es poco probable que cambios en la concentración de estos nucleótidos puedan modular eficazmente la vía de conductancia a los protones *in vivo*, si bien algunos autores consideran que sí podrían tener un papel en este sentido los cambios en los niveles de ATP y ADP, concretamente un descenso en los niveles de ATP durante la termogénesis (LaNoue et al., 1982). Esta hipótesis se basa en que estos nucleótidos son los predominantes a nivel citosólico, y la concentración necesaria para que inhiban la vía de conductancia a los protones está dentro de los márgenes de sus niveles fisiológicos (Locke y Nicholls, 1981).

Otra hipótesis propuesta para explicar la regulación de la actividad de la termogenina hace referencia a que una alcalinización del citoplasma podría actuar como factor modulador positivo (Chinet et al., 1978). De hecho se ha comprobado que existe una dependencia entre pH y la capacidad de unión del ATP a la termogenina (Klingenberg, 1984), de manera que una alcalinización del citoplasma podría liberar el ATP unido. Sin embargo uno de los principales inconvenientes de esta hipótesis es que no se ha podido establecer ningún proceso estimulado por hormonas que promueva una alcalinización citoplasmática.

En la actualidad la hipótesis que parece más aceptada es la que propone a los ácidos grasos como moduladores de la actividad de la termogenina. De hecho se sabía que los ácidos grasos podían mimetizar la estimulación de la termogénesis por la noradrenalina (Prusiner et al., 1968), lo que hizo pensar en una acción desacopladora directa por parte de estos compuestos, teoría que se abandonó tras el descubrimiento de la termogenina. Esta acción desacopladora no era debida a una acción detergente sino a que de alguna forma los ácidos grasos interactuaban con la termogenina y provocaban la "apertura" de la vía de conductancia de los protones (Locke y Nicholls, 1981; Rial et al., 1983). Según recientes interpretaciones, la acción de los ácidos grasos no se debería a una interacción competitiva con el lugar de unión de los nucleótidos de la purina con la termogenina (Locke y Nicholls, 1981) sino interfiriendo directamente con el polipéptido en un lugar alostérico para los ácidos grasos y que modularía la permeabilidad a los protones.

Una hipótesis alternativa sugiere que los acil-CoA podrían ser los moduladores de la vía de conductancia de los protones (Cannon et al., 1977). Según esta hipótesis, dado que el coenzima A presenta en su estructura un derivado del ADP, los acil-CoA podrían tener un papel antagonista sobre la unión de los nucleótidos de la purina con la termogenina, compitiendo con éstos y actuando de este modo como moduladores positivos. Aunque esta hipótesis fue inicialmente criticada dada la capacidad detergente de los acil-CoA (Locke et al., 1982), la concentración crítica micelar del palmitil-CoA es muy superior a las que presentan el efecto competidor; este hecho, unido a la demostración de la acción inhibidora específica sobre la unión a los nucleótidos de la purina (Strieleman y Shrago, 1985), han reforzado el interés por la acción reguladora de los acil-CoA. En cualquier caso, sean los ácidos grasos o los acil-CoA los moduladores de la permeabilidad a los protones, estas hipótesis presentan la ventaja de que la estimulación de la lipólisis propiciaría la aparición de la señal estimuladora de la termogénesis.

1.1.4. REGULACION DE LA TERMOGENESIS.

1.1.4.1. CONTROL NEURAL.

El control neural del TAM se verifica a través del sistema nervioso simpático, quedando así integrados el control de la termorregulación y del balance energético, e incluso el control de la respuesta al fotoperíodo en el caso de los mamíferos hibernantes. Este control neural de la termogénesis es ejercido por el hipotálamo ventromedial (Rothwell y Stock, 1982a), si bien podrían también estar implicados otros centros nerviosos superiores.

1.1.4.1.1. RECEPTORES ADRENERGICOS.

La respuesta a una estimulación aguda o crónica del TAM tiene como principal modulador a la noradrenalina liberada por los terminales nerviosos simpáticos; incluso ya antes del descubrimiento del papel del TAM en la termogénesis no temblorosa ya se sabía que dicha termogénesis se encontraba bajo control simpático (Hsieh y Carlson, 1957). La noradrenalina interactúa con los receptores adrenérgicos, que en el caso del TAM pueden ser de los tipos α y β , siendo ambos necesarios para una máxima respuesta *in vivo* (Foster, 1984).

RECEPTORES β .

Los receptores adrenérgicos β juegan un papel predominante en la respuesta termogénica (Mohell et al., 1983), papel que ha sido bien establecido. Estos receptores corresponden al subtipo β_1 (Bukowiecki et al., 1978), aunque también se ha determinado la existencia de receptores β_2 (Rothwell et al., 1982a) e incluso de un tercer subtipo (Arch et al., 1984).

Cuando la noradrenalina se une a estos receptores se inicia una cascada de reacciones que empieza por la activación de la adenilato ciclasa, con la correspondiente formación de AMPc, que se une a la subunidad reguladora de una proteína quinasa que, a su vez, activa la lipasa sensible a las hormonas, responsable de la lipólisis de los depósitos de triacilglicérols y la liberación consiguiente de ácidos grasos (vease Bukowiecki, 1984). En este sentido se ha demostrado un estrecho acoplamiento entre formación de AMPc e incremento de la respiración (Svartengren et al., 1982).

RECEPTORES α .

La respuesta que se desencadena como resultado de la unión de la noradrenalina a los receptores adrenérgicos del subtipo α_1 comporta la despolarización de la membrana plasmática, situación que se mantiene mientras esté presente la noradrenalina (Girardier et al., 1968), y que va asociada a un incremento de la permeabilidad al Na^+ y a la estimulación de la ATPasa (Na^+/K^+) (Rothwell et al., 1982b). Asimismo aumenta el recambio de fosfatidil-inositol (Mohell et al., 1984), la movilización del Ca^{2+} (Connolly et al., 1984) y la estimulación de la triyodotironina 5'-desyodasa (Silva y Larsen, 1983).

La función que desempeña la estimulación α_1 -adrenérgica en el TAM no ha podido ser definitivamente establecida, si bien podría jugar un papel accesorio importante en la termogénesis durante la aclimatación al frío (Foster, 1984), pudiendo también intervenir en la proliferación celular y en la regulación a largo plazo.

También se ha demostrado la existencia de receptores adrenérgicos del subtipo α_2 , cuyo significado funcional no ha sido determinado por el momento, y que podrían actuar a través del GMPc y por inhibición de la adenilato ciclasa (Sundin y Fain, 1983).

1.1.4.2. CONTROL DE LA RESPUESTA TROFICA.

1.1.4.2.1. SITUACIONES DE TERMOGENESIS ACTIVADA.

El control de la termogénesis en situaciones de activación por el frío se verifica a través del sistema nervioso simpático, que responde a los receptores de temperatura periféricos y centrales, siendo integrada la respuesta por el sistema nervioso central (Himms-Hagen, 1984); en el caso de la hipernutrición se ha comprobado que tanto los glúcidos como los lípidos pueden actuar activando el sistema nervioso simpático (Vander Tuig y Romsos, 1984). La respuesta trófica que presenta el TAM a la estimulación por parte del sistema nervioso simpático es mediada por la noradrenalina, si bien parece ser que están implicados otros factores (Barnard et al., 1980). De hecho en situaciones en las que se incrementa la actividad termogénica del tejido, como pueden ser la aclimatación al frío (Desautels et al., 1978; Bukowiecki et al., 1982; Rial y Nicholls, 1984; Nedergaard y Cannon, 1985) o por sobrealimentación con una dieta hipercalórica como la de cafetería (Rothwell y Stock, 1979; Himms-Hagen et al., 1981; Tulp, 1981), se observa una hipertrofia e hiperplasia del TAM, que van unidas a un incremento de la cantidad de mitocondrias y de la capacidad termogénica, determinada por métodos directos o indirectos. Del mismo modo, en animales tratados crónicamente con noradrenalina se observa una hipertrofia del tejido a la que acompaña una proliferación mitocondrial pero no un incremento en la cantidad de termogenina aunque sí del *GDP-binding* (Desautels y Himms-Hagen, 1979).

Algunos aspectos de la respuesta trófica no han sido definitivamente confirmados. Por ello existen aun dudas sobre si hay o no hiperplasia del tejido (Tulp, 1981; Bukowiecki et al., 1982) y sobre si hay o no un aumento en la cantidad de termogenina o sólo del *GDP-binding* (Himms-Hagen et al., 1981; Nedergaard et al., 1984). En este sentido se ha observado que una exposición aguda al frío o un tratamiento agudo con noradrenalina aumentan el *GDP-binding* pero no la cantidad de proteína mitocondrial correspondiente a un peso molecular de 32.000. Con la exposición crónica al frío aumentan ambos parámetros, si bien estudios más recientes señalan aumentos paralelos entre el incremento del *GDP-binding* y la termogenina, determinada inmunológicamente (Nedergaard et al., 1984; Nedergaard y Cannon, 1985) o bien por la síntesis de su ARN mensajero (Ricquier et al., 1984).

Al intentar mimetizar los efectos de una respuesta termogénica crónica mediante tratamientos crónicos con noradrenalina se ha observado que si bien se produce una proliferación celular y un aumento del *GDP-binding*, no se ha podido observar un aumento en la cantidad de termogenina determinada por métodos directos (Desautels y Himms-Hagen, 1979). Igualmente, la implantación de dos tipos de feocromocitomas en ratas no provoca siempre una respuesta comparable a la observada en la aclimatación al frío (Ricquier et al., 1983). Estos hechos parecen señalar que si bien la noradrenalina interviene en la respuesta trófica, en la síntesis de la termogenina intervienen también otros factores independientes del mecanismo adrenérgico. Sin embargo, la administración crónica de noradrenalina en las

proximidades del TAM mediante la implantación de minibombas osmóticas (Mory et al., 1984; Ricquier y Mory, 1984) y la administración de drogas simpaticomiméticas de acción prolongada (Young et al., 1984b) induce tanto la hipertrofia del TAM como un incremento en la concentración de termogenina, por lo que tal vez la explicación de la falta de efecto en este sentido de la noradrenalina administrada radique en su rápida metabolización y consiguiente corta vida media.

1.1.4.2.2. SITUACIONES DE TERMOGENESIS DISMINUIDA.

En situaciones fisiológicas o patológicas de actividad termogénica disminuida se observa un comportamiento trófico opuesto al anteriormente señalado y en el que también juega un papel clave el sistema nervioso central. De este modo la aclimatación a una temperatura dentro del margen de termoneutralidad provoca un descenso de la cantidad de proteína total y mitocondrial y de la termogenina determinada por el método del *GDP-binding* (Sundin, 1981). Un efecto parecido se puede observar como consecuencia del ayuno en la rata (Rothwell y Stock, 1982b; Rothwell et al., 1984), que es acompañado por una reducción de la actividad simpática (Young et al., 1982). Por contra, en el ratón, se presenta un efecto opuesto debido a variaciones circadianas que comportan cambios de la temperatura corporal por modificaciones en el metabolismo basal (Himms-Hagen, 1985).

Otra situación en la que se observa un descenso en la actividad termogénica del TAM se presenta en ciertos modelos de obesidad, entre los que se incluyen casos de animales genéticamente obesos como los ratones ob/ob (Trayhurn et al., 1982) y db/db (Goodbody y Trayhurn, 1981) y la rata Zucker fa/fa (Holt et al., 1983); en estos animales se observa un descenso de la cantidad de proteína mitocondrial y del *GDP-binding*. Otro modelo de obesidad en el que se observa un descenso de la capacidad termogénica es el de aquellos animales en los que se han inducido lesiones a nivel hipotalámico, ya sea por métodos quirúrgicos como la rata lesionada en el hipotálamo ventromedial (Hogan et al., 1982) o por métodos químicos como el ratón tratado con GTG (Hogan y Himms-Hagen, 1983).

En los modelos de obesidad el descenso en la capacidad termogénica del TAM se asocia con una disminución de la actividad simpática del tejido, tanto en los casos de obesidad genética (Knehans y Romsos, 1982; York et al., 1985) como en los de obesidad hipotalámica (Vander Tuig et al., 1985), si bien en este último caso no va acompañada por una disminución de la capacidad de respuesta a la noradrenalina (Duloo y Miller, 1984). No se ha podido establecer que este descenso de la actividad simpática sea la principal causa de la disminución de la capacidad termogénica del tejido en estos animales, o bien que sea tan sólo una de ellas. En este sentido debe señalarse que también se ha observado la aparición de resistencia a la insulina como una de las primeras alteraciones aparecidas en el desarrollo de la obesidad (Mercer y Trayhurn, 1983), ya que se ha propuesto que la resistencia y/o la deficiencia de insulina contribuyen a la patogénesis de la obesidad (Felig, 1984).

Por lo tanto, aunque parece claro el papel que juega la noradrenalina en la termogénesis y en los procesos tróficos en el TAM, no debe excluirse la posibilidad de que otras hormonas, en especial la insulina, puedan jugar un papel significativo en las adaptaciones del tejido a largo plazo.

1.1.4.3. CONTROL HORMONAL.

Se ha relacionado la actividad de distintas hormonas con la respuesta termogénica del TAM; de entre ellas las más estudiadas han sido la insulina y las hormonas tiroideas.

1.1.4.3.1. INSULINA.

La insulina ha sido implicada en la regulación de la termogénesis en el TAM, en especial en situaciones adaptativas; de este modo se ha descrito un incremento en el *GDP-binding* y en el número de mitocondrias en ratas tratadas crónicamente con insulina (Seydoux et al., 1984), así como un descenso del *GDP-binding*, acompañado por una atrofia del tejido en animales diabéticos (Seydoux et al., 1983), similar al observado en distintos modelos de obesidad genética asociados con una resistencia a la insulina como los ratones ob/ob (Hogan y Himms-Hagen, 1980) y db/db (Goodbody y Trayhurn, 1981). Por otro lado, se ha asociado la hiperplasia del TAM de los animales tratados con dieta de *cafetería* con el mantenimiento de la tolerancia a la glucosa y con una sensibilidad normal a la insulina (Cunningham et al., 1983).

En realidad la insulina tiene una doble acción sobre el TAM: por una parte activa directamente el metabolismo de la glucosa, promoviendo la lipogénesis (McCormack, 1982) aunque también su oxidación (Czech et al., 1974), y por otro lado regula la actividad nerviosa simpática del TAM. La acción anticatabólica de la insulina en el TAM, disminuyendo el incremento de los niveles de AMPc inducido por la noradrenalina, es probable que se genere por un incremento de la actividad fosfodiesterasa, como sucede en el tejido adiposo blanco.

1.1.4.3.2. GLUCAGON.

Aunque se ha propuesto que el glucagón desempeña un papel en la respuesta termogénica y trófica del TAM (Kuroshima et al., 1984), habiéndose observado que induce la liberación de ácidos grasos por el tejido *in vivo* (Kuroshima et al., 1977a), este efecto podría ser simplemente el resultado de la liberación de catecolaminas. También se ha observado un efecto termogénico del glucagón *in vitro* (Kuroshima y Yahata, 1979), aunque para concentraciones de hormonas muy superiores a las fisiológicas. De todas formas la correlación existente entre las concentraciones de glucagón y la respuesta del TAM sugieren que esta hormona, al menos durante la aclimatación al frío, podría tener algún papel regulador sobre el tejido.

1.1.4.3.3. HORMONAS TIROIDEAS.

Clásicamente se ha señalado que las hormonas tiroideas tienen un papel permisivo sobre la respuesta termogénica del TAM a la noradrenalina, de tal forma que las ratas hipotiroideas son incapaces de responder termogénicamente al frío (Triandafillou et al., 1982) o a la estimulación nerviosa (Seydoux et al., 1982). Este hecho se ve confirmado por la circunstancia de que basten solamente cantidades permisivas de tiroxina para que se produzca una respuesta termogénica y trófica normal en animales tiroidectomizados (Triandafillou et al., 1982); sin embargo, un exceso de hormonas tiroideas administradas a animales normales puede suprimir la

termogénesis y provocar un acúmulo de triacil-gliceroles en el TAM (Triandafillou et al., 1982).

Por otra parte el TAM presenta el enzima triyodo-tironina 5'-desyodasa del tipo II, que sintetiza la forma activa de las hormonas tiroideas 3,3',5-triyodo-tironina (T_3) a partir de la tetrayodo-tironina o tiroxina (T_4), siendo controlada esta actividad por la noradrenalina (Silva y Larsen, 1983) por vía α_1 -adrenérgica (Leonard et al., 1983). Se ha sugerido que este enzima podría actuar como una fuente generadora de T_3 en situaciones de alta actividad termogénica (Silva y Larsen, 1985), jugando un papel importante en la respuesta trófica al frío a través de la producción endógena de la hormona (Kopecki et al., 1986), así como en la producción extratiroidal de T_3 durante la etapa perinatal (Iglesias et al., 1987). De este modo la 5'-desyodasa es estimulada por la exposición aguda o crónica al frío (Silva y Larsen, 1983, 1985; Kopecky et al., 1986), aunque no en el ratón genéticamente obeso ob/ob (Kates y Himms-Hagen, 1985), por lo que se supone que también en este caso la 5'-desyodasa pueda jugar un papel en la disminuida respuesta termogénica del TAM de estos animales. Otra situación en la que se observa un descenso en la actividad 5'-desyodasa paralelo a una disminución de la actividad termogénica se presenta durante la etapa perinatal (Giralt et al., 1986). Los cambios en la actividad 5'-desyodasa en función de la situación termogénica del animal se correlacionan con cambios coincidentes de los niveles de T_3 en sangre, observados durante la aclimatación al frío, la administración de noradrenalina o en animales que reciben una dieta de *cafetería*.

1.1.4.3.4. GLUCOCORTICOIDES.

El papel que juegan los glucocorticoides en el TAM no está demasiado claro. Se sabe que el tejido presenta receptores para este tipo de hormonas (Feldman, 1978), y que un exceso de glucocorticoides tiene un efecto supresor de la termogénesis (Holt et al., 1983). De todas formas el hecho de que el TAM de animales hipofisectomizados presenten respuestas tróficas y termogénicas normales durante la aclimatación al frío parece indicar sólo una acción limitada de esta hormona sobre el tejido (Laury et al., 1984).

1.1.5. METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON; SUBSTRATOS ENERGETICOS.

Clásicamente se ha considerado a los ácidos grasos como el principal sustrato energético del TAM. Evidencias posteriores han permitido demostrar que otros sustratos pueden jugar un importante papel en este sentido, especialmente la glucosa.

1.1.5.1. METABOLISMO DE LOS ACIDOS GRASOS.

1.1.5.1.1. VIAS DE DEGRADACION.

LIPOLISIS.

Los ácidos grasos constituyen el principal sustrato endógeno consumido por el TAM durante la termogénesis (Smith y Horwitz, 1969). Estos ácidos grasos proceden de la acción de la lipasa sensible a las hormonas sobre las reservas de triacil-gliceroles del tejido. La secuencia de acontecimientos metabólicos que propician la lipólisis se inicia con la

interacción de la noradrenalina con los receptores β_1 de la membrana plasmática, lo que determina un incremento de la concentración citosólica de AMPc por acción de la adenilato ciclasa (Pettersson y Vallin, 1976), lo que activa distintas proteína quinasas que fosforilan diferentes proteínas endógenas, entre ellas la lipasa sensible a las hormonas (Skala y Night, 1977), enzima que presenta una elevada actividad en el tejido (véase Bukowiecki, 1984). Los ácidos grasos así liberados actúan como sustrato termogénico y, a la vez probablemente, como señal que propicia el desacoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (Rial et al., 1983), hecho que explica el incremento en paralelo observado en la respiración (Prusiner et al., 1968; Pettersson y Vallin, 1976).

Se ha señalado que en algunos casos esta activación de la lipólisis podría propiciar una exportación parcial de ácidos grasos (Bieber et al., 1975; Nedergaard y Lindberg, 1979), e incluso se ha sugerido que el TAM podría llevar a cabo un papel de secreción de ácidos grasos que serían utilizados como combustible termogénico por otros tejidos (Cannon et al., 1978). De este modo Hardman y Hull (1970) observaron en conejos muy jóvenes una exportación de ácidos grasos *in vivo*, si bien otros autores han señalado que en la rata dicha liberación tan sólo es significativa en situaciones de muy alta estimulación por noradrenalina (Ma y Foster, 1986). De todas formas el principal destino de los ácidos grasos liberados como consecuencia de la lipólisis es su oxidación endógena, lo que implica su entrada en la mitocondria previa activación por las acil-CoA sintetetasas y su paso a través de la membrana mitocondrial interna por el sistema de las carnitina acil transferasas, enzimas ambos de los que el TAM presentan una elevada actividad (Normann y Flatmark, 1978).

β -OXIDACION MITOCONDRIAL.

Las mitocondrias del TAM están bien preparadas para la oxidación de los ácidos grasos. La actividad de la β -oxidación mitocondrial se incrementa, al igual que la peroxisomal, durante la aclimatación al frío (Nedergaard et al., 1980). Su regulación no ha sido bien estudiada, aunque sí se ha podido determinar un incremento de la β -oxidación tanto en situaciones de estimulación por noradrenalina (Bukowiecki et al., 1981) como por la insulina (Seydoux et al., 1984).

β -OXIDACION PEROXISOMAL.

La existencia de peroxisomas en las células del TAM fue puesta de manifiesto por Ahlaba y Barnard (1971). Se pudo comprobar también que estos orgánulos presentaban los enzimas implicados en la β -oxidación de los ácidos grasos (Kramar et al., 1978), y que esta capacidad oxidativa de los ácidos grasos se incrementaba durante la aclimatación al frío (Nedergaard et al., 1980).

Aunque el papel de la β -oxidación peroxisomal no está claro, éste no parece ser cuantitativamente importante en los procesos termogénicos sino que su incidencia parece ser más bien sólo de tipo cualitativo (Cannon et al., 1982a), ya que el máximo consumo de oxígeno atribuible a este proceso tan sólo representa el 2% de la respiración total del tejido (Nedergaard et al., 1980). La afinidad por los ácidos grasos de la β -oxidación peroxisomal es diferente de la mitocondrial, de tal forma que mientras la β -oxidación peroxisomal presenta una mayor afinidad por los ácidos grasos de cadena larga e insaturados, la mitocondrial presenta una alta afinidad por los de

cadena media y saturados. Este hecho ha permitido sugerir la posibilidad de que los peroxisomas intervengan en la estandarización de los ácidos grasos de los triacil-glicerol (Cannon y Nedergaard, 1982), ya que al activarse la termogénesis se observa un enriquecimiento de ácidos grasos insaturados en los depósitos de triacilglicerol del TAM (Moriya e Itoh, 1969), que da paso a una posterior recuperación de los niveles relativos iniciales coincidiendo con una proliferación de estos orgánulos.

DESTINO DEL ACETIL-CoA.

El acetil-CoA producido en la β -oxidación mitocondrial puede ser metabolizado por tres enzimas de la matriz: citrato sintetasa, acetil-carnitina transferasa y acetil-CoA hidrolasa. De acuerdo con los estudios de Bernson (1976) la citrato sintetasa es el aceptor más efectivo de este acetil-CoA, por lo que si no hay limitación de cofactores el principal destino de este compuesto es su oxidación por el ciclo de Krebs, proporcionando así sustratos reducidos a la cadena respiratoria. La oxidación terminal del acetil-CoA depende por lo tanto de la disponibilidad de oxalacetato o de su precursor malato (Bernson y Nicholls, 1974), lo que explica la necesidad de incrementar el acervo de intermediarios del ciclo de Krebs en situaciones de elevada lipólisis y β -oxidación.

Se han descrito elevadas actividades de los enzimas del ciclo de Krebs en las mitocondrias del TAM, especialmente de la citrato sintetasa y del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa (Cooney et al., 1986), de un orden de magnitud superior a las descritas en hígado o tejido adiposo blanco, y que son coincidentes con la elevada capacidad oxidativa del tejido. De hecho, se ha sugerido que la actividad 2-cetoglutarato deshidrogenasa podría utilizarse como índice cuantitativo de la máxima capacidad termogénica del TAM (Cooney y Newsholme, 1984).

El acetato es el principal producto final en aquellas situaciones en las que hay limitaciones de intermediarios del ciclo de Krebs. Se ha sugerido que esta vía podría tener un especial significado en el TAM de mamíferos hibernantes, permitiendo la oxidación de los ácidos grasos y la termogénesis a temperaturas a las que los enzimas del ciclo de Krebs no son funcionales (Bernson y Nicholls, 1974).

1.1.5.1.2. VIAS DE SUMINISTRO.

Dada la elevada capacidad oxidativa que presenta el TAM en situaciones de termogénesis estimulada, las reservas de triacil-glicerol quedarían agotadas en un corto espacio de tiempo. La reposición de estas reservas se puede verificar a través de la captación de los ácidos grasos de los triacil-glicerol de las lipoproteínas plasmáticas por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) y captación e internalización de los ácidos grasos formados, o bien por la lipogénesis a partir de diversos sustratos, preferentemente glucosa. Por su parte, el glicerol-3-fosfato necesario para la esterificación a triacil-glicerol se obtiene a partir de la glucosa como principal sustrato exógeno o por fosforilación del glicerol mediante la glicerolquinasa.

LIPOPROTEÍNA LIPASA.

La lipoproteína lipasa es el enzima responsable de la hidrólisis de los triacil-glicerol de las lipoproteínas circulantes, de forma que quedan

libres los ácidos grasos liberados y, en consecuencia, quedan en condiciones de ser utilizados por el TAM como sustrato oxidativo y sobre todo para su acúmulo. La importancia relativa de la LPL como sistema de suministro de ácidos grasos con respecto a la lipogénesis no ha sido determinada, aunque sí el efecto que sobre esta actividad puede tener la situación termogénica del animal.

En la modulación de la actividad LPL parecen estar implicadas tanto la insulina como la noradrenalina. La insulina provoca un incremento de la actividad LPL (Gouvern y Portet, 1981a), que parece estar sometida a ritmos circadianos, con valores máximos durante los periodos de alimentación en los animales control y lo contrario en los aclimatados al frío. Sin embargo parece ser más importante el control por parte de la actividad nerviosa simpática, situación en que la noradrenalina tendría un efecto regulador por vía β_1 -adrenérgica (Carneheim et al., 1984); en este sentido la modulación de la LPL del TAM presenta aspectos opuestos a la del TAB, siendo estimulada por la noradrenalina (Radomski y Orme, 1971; Ashby y Robinson, 1980).

En situaciones de elevada actividad termogénica por exposición al frío se observa un incremento de la actividad LPL (Radomski y Orme, 1971). En cambio en condiciones de sobrealimentación la respuesta está en función de la composición de la dieta. De este modo, la sobrealimentación con sacarosa no provoca un incremento en la actividad LPL del TAM sino más bien una disminución (Granneman y Wade, 1983), mientras que en la lactancia, en la que el animal tiene a su disposición una dieta con un alto contenido lipídico, la actividad del enzima está aumentada (Hemon et al., 1975).

La correlación entre termogénesis y actividad LPL se mantiene en situaciones de baja actividad termogénica como el ayuno, en el que se observa un descenso de la actividad de la LPL (Fried et al., 1983), recuperándose durante la realimentación. Por su parte en los animales genéticamente obesos la actividad de la LPL es menor que la de los controles correspondientes, y presenta un comportamiento inverso al observado en el tejido adiposo blanco, tanto en la rata Zucker fa/fa (Horwitz et al., 1984) como en el ratón ob/ob (Rath et al., 1974); estos resultados son consistentes con la reducción de la actividad termogénica y por lo tanto de la oxidación de los ácidos grasos.

LIPOGENESIS.

La maquinaria enzimática de la lipogénesis en el TAM se caracteriza por su elevada capacidad. De esta manera se han descrito altas actividades de los enzimas acetil-CoA carboxilasa (McCormack y Denton, 1977) y ácido graso sintetasa (Lavau et al., 1982), así como de los enzimas responsables del aporte de NADPH, tales como los de la vía de las pentosas-fosfato y el enzima málico (Mampel, 1981; Lavau et al., 1982). Estas elevadas actividades enzimáticas están de acuerdo con la alta tasa de lipogénesis observada *in vivo* en el TAM con respecto a la del tejido adiposo blanco, tanto en la rata (Agius y Williamson, 1980) como en el ratón (Trayhurn, 1981).

En el control de la lipogénesis en el TAM parece jugar un papel clave la insulina. De esta manera la insulina determina la estimulación del transporte de glucosa *in vitro* (Czech et al., 1974) y un incremento en la lipogénesis del TAM (McCormack y Denton, 1977) por activación de la piruvato deshidrogenasa y de la acetil-CoA carboxilasa, de forma similar a la observada en el tejido adiposo blanco (McCormack, 1982), al tiempo que inhibe la lipólisis y la respiración (Nedergaard y Lindberg, 1982). Un

efecto similar de la lipogénesis ha sido observado en situaciones de sobrealimentación con sacarosa (Granneman y Wade, 1983), situación asociada a una hiperinsulinemia, mientras que por contra las dietas hiperlipídicas provocan una disminución de su actividad (Goubern y Portet, 1981b). Por su parte la aclimatación al frío provoca un incremento de la actividad de la acetil-CoA carboxilasa del TAM pero no de la del hígado o del tejido adiposo blanco (Goubern, 1980), por lo que su mecanismo de control debe ser independiente de la insulina (Shimazu y Takahashi, 1980). También se ha propuesto como mecanismo regulador de la lipogénesis la sensibilidad de la carnitina acil transferasa del TAM al malonil-CoA (Saggerson y Carpenter, 1982), que se podría asumir como una de las primeras señales para la síntesis de triacil-glicerol.

La lipogénesis aparece estrechamente relacionada con la termogénesis, e incluso algunos autores indican que esta relación podría tener connotaciones evolutivas (Cooney y Newsholme, 1984). Estos autores postulan incluso que, dado que la lipogénesis a partir de la glucosa es un proceso en el que hay una generación neta global de ATP, en sus orígenes la termogénesis del TAM podría haber tenido como principal objetivo evitar el ATP generado en este proceso. Otros autores (Trayhurn y Mercer, 1984) no comparten este punto de vista, considerando que no siempre van ligadas la termogénesis y la lipogénesis, como sucede por ejemplo en situaciones de hiperfagia, donde el que la lipogénesis este aumentada o disminuida depende de que la dieta sea hiperglucídica (Granneman y Wade, 1983) o hiperlipídica (Rothwell et al., 1983) respectivamente.

1.1.5.1.3. SINTESIS DEL GLICEROL-3-FOSFATO.

La incorporación de los ácidos grasos a los depósitos de triacil-glicerol requiere su esterificación previa con el glicerol-3-fosfato, el cual puede proceder de la glucólisis o bien de la fosforilación directa del glicerol por la gliceroquinasa, enzima que presenta una elevada actividad en el TAM de la rata (Bertin et al., 1984) y en el humano (Chakrabarty et al., 1983), a diferencia de lo que ocurre en el tejido adiposo blanco, en el que está prácticamente ausente. Esta actividad se incrementa durante la aclimatación al frío, salvo en las ratas Zucker fa/fa, en las que se observa el efecto contrario (Bertin et al., 1984). De esta manera, si bien hay un paralelismo entre incremento de la actividad gliceroquinasa y termogénesis, el efecto recíproco no se observa.

El TAM presenta también una elevada actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, por lo que se considera que la lanzadera del glicerol-3-fosfato juega un importante papel en la oxidación del NADH generado en el citoplasma durante la glucólisis. Se ha sugerido que la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa podría jugar un papel en la regulación de la lipogénesis, ya que al ser inhibida por los acil-CoA de cadena larga se evitaría la oxidación mitocondrial del glicerol-3-fosfato y la operatividad de la lanzadera, con lo que se incrementarían las concentraciones citosólicas de NADH y NADPH y de glicerol-3-fosfato, estimulándose la síntesis de ácidos grasos y de triacil-glicerol mientras hubiese glicerol-3-fosfato disponible (Bukowiecki, 1986).

1.1.5.2. METABOLISMO DE LA GLUCOSA.

La utilización de la glucosa por parte del tejido adiposo marrón puede verificarse a través de tres tipos de procesos:

- suministro de intermediarios del ciclo de Krebs.
- oxidación directa.
- sustrato en la lipogénesis.

SUMINISTRO DE INTERMEDIARIOS DEL CICLO DE KREBS.

Ya se ha señalado la importancia que puede tener en determinadas circunstancias la síntesis de intermediarios del ciclo de Krebs para aumentar su capacidad frente a un aumento de los niveles de acetil-CoA, como, por ejemplo, durante una activación aguda de la termogénesis. La principal reacción anaplerótica en el TAM es la catalizada por la piruvato carboxilasa (Cannon y Nedergaard, 1979), en la que el piruvato puede proceder de la glucólisis o bien de la oxidación del lactato por la lactato deshidrogenasa, ya que la forma predominante en el TAM es similar a la del corazón. El piruvato así formado es transportado hasta la matriz mitocondrial por una permeasa de elevada actividad (Cannon y Nedergaard, 1982). En este sentido se ha señalado que los depósitos de glucógeno podrían tener un importante papel (Micklewright, 1950), pudiendo actuar como fuente de glucosa en situaciones de estimulación aguda, como durante la exposición al frío, los elevados niveles de este polisacárido de reserva en el TAM parecen avalar dicha hipótesis.

OXIDACION DIRECTA DE LA GLUCOSA.

Se han descrito en el TAM elevadas actividades de los enzimas clave de la glucólisis como la hexoquinasa y la fosfo-fructoquinasa (Mampel, 1981, Cooney y Newsholme, 1982; Cooney et al., 1986), actividades que se incrementan como consecuencia de la exposición crónica al frío (Cooney y Newsholme, 1984). Por contra, las actividades de los enzimas gluconeogénicos glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bis-fosfatasa son indetectables en el tejido (Cooney et al., 1986).

Estudios recientes llevados a cabo *in vivo* han evidenciado una elevada capacidad de captación de glucosa por el TAM, así como una elevada sensibilidad a la insulina (Ferré et al., 1986; James et al., 1986). Estos resultados indican que el tejido puede utilizar glucosa a elevadas tasas bajo la estimulación de la insulina, y que dicha capacidad puede estar modulada en función del estado fisiológico del animal (Ferré et al., 1986), si bien no proporcionan evidencias directas sobre si el destino final de la glucosa es su oxidación o su utilización como sustrato lipogénico.

Por su parte se ha comprobado *in vitro* un efecto estimulador de la insulina en la captación de glucosa para su oxidación o utilización como sustrato de la lipogénesis (Shackney y Joel, 1964; Fain et al., 1967; Villarroya, 1986), así como la estimulación de la glucólisis y de la vía de las pentosas-fosfato (Czech et al., 1974), mientras que la noradrenalina presenta un efecto contrario sobre la utilización de la glucosa (Kasser y Martin, 1982; Villarroya, 1986), al tiempo que esta hormona incrementa la actividad de la piruvato deshidrogenasa (Gibbins et al., 1985).

LIPOGENESIS.

La glucosa puede ser utilizada como sustrato en la lipogénesis, habiéndose observado cambios paralelos entre la actividad de la hexoquinasa y la tasa de lipogénesis (Cooney y Newsholme, 1984). En el TAM se han descrito elevadas actividades de los enzimas clave de la vía de las pentosas-fosfato como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Mampel, 1981), que proporcionan NADPH para la síntesis de ácidos grasos. Asimismo se ha descrito la existencia de la piruvato carboxilasa y de la fosfo-enolpiruvato carboxiquinasa en el tejido, que probablemente también jueguen un papel en el proceso lipogénico (Cooney et al., 1986). La fosfo-enolpiruvato carboxiquinasa podría también intervenir en la síntesis del glicerol-3-fosfato (Hahn et al., 1968) a partir del piruvato formado, y que podría ser utilizado en la reesterificación de los ácidos grasos, por lo que podría tener una especial importancia en situaciones de elevada lipogénesis, como sucede durante la etapa perinatal (Loriette et al., 1976).

1.1.5.3. METABOLISMO DE LOS CUERPOS CETONICOS.

Se ha descrito la utilización de los cuerpos cetónicos por parte del TAM (Agius y Williamson, 1981). Estos autores describen la utilización del 3-hidroxi-butirato *in vitro*, tanto con fines oxidativos como para la síntesis de lípidos, sugiriendo una elevada lipogénesis a partir de estos sustratos en situaciones de ayuno.

Las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de los cuerpos cetónicos parecen señalar una mayor importancia de la utilización del acetoacetato que del 3-hidroxi-butirato (Williamson e Ilic, 1985; Cooney et al., 1986), por lo que se ha sugerido que en situaciones de frío y ayuno combinados, el TAM podría utilizar el acetoacetato y reservaría el 3-hidroxi-butirato para el cerebro y otros tejidos (Cooney et al., 1986).

1.1.5.4. METABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS.

Las referencias relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos por parte del TAM son muy escasas. Estas referencias se limitan a las actividades enzimáticas relativamente bajas descritas para la aspartato transaminasa y la glutamato deshidrogenasa (Williamson et al., 1970), que dichos autores relacionan con una baja capacidad glucolítica del tejido. Mucho más recientemente se ha descrito la presencia del enzima glutaminasa (Cooney et al., 1986), habiéndose sugerido que el TAM podría utilizar la glutamina como sustrato metabólico. También se dispone de alguna información relativa a la síntesis de cuerpos cetónicos a partir de la leucina por parte del TAM de la rata (Yeh, 1984) y del ratón (Rous et al., 1980).

Estudios *in vivo* realizados en nuestro Departamento han permitido determinar la capacidad del TAM para utilizar la alanina (Prats, 1985; Monfar et al., 1987), utilización que podría tener una finalidad termogénica durante el ayuno en animales tratados con una dieta de *cafetería*, hecho que permitió inferir la probable utilización metabólica de los aminoácidos por parte de este tejido.

1.2. EFECTOS METABOLICOS DEL FRIO Y DEL AYUNO.

1.2.1. EFECTOS METABOLICOS DEL FRIO.

La exposición aguda o crónica al frío provoca en los mamíferos un incremento en la el consumo de oxígeno y en la producción de calor, con el fin de poder mantener la temperatura corporal. Esto representa un considerable incremento del metabolismo del animal, en especial del metabolismo lipídico (Babineau y Page, 1955; Portet, 1981) que se relaciona con una mayor secreción de catecolaminas, de forma que el animal satisface sus necesidades termogénicas a través de la movilización de las reservas de grasas y de glúcidos. Relacionado con este incremento del metabolismo energético se asocia un aumento en la ingestión de alimento. Pese a la hiperfagia observada en los animales expuestos crónicamente al frío, el peso corporal de los mismos suele ser menor que el de los controles, habiéndose postulado incluso la existencia de una deficiencia relativa en el crecimiento y en la asimilación de proteínas (Senault-Bournique et al., 1967).

1.2.1.1. METABOLISMO GLUCIDICO.

La exposición al frío provoca un considerable incremento en la movilización de las reservas de glucógeno y en la utilización de la glucosa para compensar el incremento de las necesidades termogénicas (Depocas y Masironi, 1960; Himms-Hagen, 1972); también se producen cambios en la regulación hormonal del metabolismo glucídico. Las reservas hepáticas de glucógeno sufren un rápido descenso (Smith, 1984), estando relacionada esta movilización de las reservas glucídicas con la utilización de la glucosa con fines termogénicos, en especial para la termogénesis no temblorosa, incrementándose la captación de este sustrato por parte del músculo (Smith y Davidson, 1982).

La gluconeogénesis hepática está activada en los animales expuestos al frío, con un incremento en la actividad de los enzimas implicados en esta vía (Penner y Himms-Hagen, 1968; Klain y Hannon, 1969). De esta manera se ha observado, tanto en el hígado como en el riñón, un incremento en la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, así como en la tasa de producción de glucosa *in vitro* a partir de distintos precursores gluconeogénicos, entre ellos distintos aminoácidos (Klain y Hannon, 1969). Estudios *in vitro* han sugerido que esta estimulación de la gluconeogénesis por el frío se verifica a través de la noradrenalina por vía α -adrenérgica (Shiota et al., 1985), si bien también pueden estar implicadas otras hormonas como el glucagón, cuya concentración plasmática se incrementa en los animales expuestos al frío (Kuroshima et al., 1978). Por contra, los niveles de insulina están disminuidos en estos animales (Beck et al., 1967; Smith, 1984), probablemente por acción del sistema nervioso simpático vía α -adrenérgica sobre las células β del páncreas, protegiendo de este modo al animal contra la hipoglucemia. Debido al incremento en la captación de glucosa por los tejidos periféricos durante la exposición al frío, se ha sugerido que el descenso de los niveles de insulina en estos animales se relaciona con un aumento de la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos y un incremento de la tolerancia a la glucosa. Por lo tanto, la insulina es necesaria para una adecuada respuesta termogénica, hecho que se confirma

por la incapacidad de las ratas diabéticas de mantener su temperatura corporal (Macari et al., 1986).

1.2.1.2. METABOLISMO LIPIDICO.

Las reservas grasas de los animales expuestos al frío sufren un considerable descenso como consecuencia de dicha exposición (Portet, 1981), por un incremento en la actividad de los procesos lipolíticos a través de la acción de la noradrenalina, que promueve la movilización de ácidos grasos (Hannon y Larson, 1962). Estas reservas son utilizadas preferentemente como combustible termogénico, y por ello las dietas hiperlipídicas determinan una mayor tolerancia al frío (Kuroshima et al., 1977b). La hidrólisis de los triacil-glicerolés de reserva provoca un incremento de los niveles de ácidos grasos (Beauvallet et al., 1976; Macari et al., 1986) y cuerpos cetónicos en sangre (Goubern y Cadot, 1983), mientras que disminuyen los de los triacil-glicerolés circulantes y la incorporación de los ácidos grasos en las lipoproteínas VLDL (Radomski, 1966). La degradación de los triacil-glicerolés afecta sobre todo al tejido adiposo blanco (TAB) (Babineau y Page, 1955), observándose cambios en el número, tamaño y composición de los adipocitos, así como alteraciones bioquímicas de la membrana plasmática (Cherqui et al., 1979), hechos que parecen estar relacionados con el incremento de la actividad metabólica del tejido. También se observan cambios similares en el tejido adiposo marrón (TAM), con un descenso en los lípidos tisulares y aumentos en el contenido de proteínas y de ADN, y cambios en la composición de los ácidos grasos de los triacil-glicerolés (Smith y Horwitz, 1969). La contribución del TAM al incremento observado en los ácidos grasos circulantes no es tan importante como la del TAB, si bien es significativa en algunas especies (Hardman y Hull, 1970; Heldmaier y Seidl, 1985).

La actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) está incrementada en el músculo y el corazón de los animales aclimatados al frío (Radomski y Orme, 1971). En el TAB los resultados son contradictorios, pues mientras algunos autores observan una disminución en la actividad (Radomski y Orme, 1971), otros indican que se produce un incremento (Goubern y Portet, 1981a); esta discrepancia es atribuible a las variaciones circadianas observadas en este enzima con relación al estado nutricional del animal (Goubern y Portet, 1981a). Más importante es el incremento descrito en la lipoproteína lipasa del TAM de los animales aclimatados al frío (Radomski y Orme, 1971), también en este caso con variaciones circadianas similares a las observadas en el corazón y contrapuestas a las del TAB.

La lipogénesis aparece estimulada durante la aclimatación al frío especialmente en el TAM, y en menor escala también en el TAB y el hígado (Trayhurn, 1979). De la misma manera se observa un aumento en la actividad de diversos enzimas implicados en el proceso lipogénico, como el enzima málico y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en especial en TAM y TAB aunque no en el hígado (Goubern y Portet, 1981b). La acetil-CoA carboxilasa también presenta un notable incremento en el TAM de los animales aclimatados al frío, sin observarse cambios ni en el TAB ni en el hígado (Goubern, 1980).

1.2.1.3. METABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS.

Los efectos de la exposición al frío sobre el metabolismo de los aminoácidos han sido mucho menos estudiados. Distintos autores han descrito un balance nitrogenado negativo en los animales expuestos al frío, con un aumento de la excreción de urea (Bodansky y Duff, 1936; Young y Cook, 1955), observándose una correlación entre el incremento negativo del balance nitrogenado y el grado de disminución de la temperatura ambiental (Ingle et al., 1953). Asimismo el recambio proteico está activado en los animales expuestos crónicamente al frío (Yousef y Chaffee, 1970), que afecta especialmente a hígado y riñón, habiéndose sugerido incluso un papel directamente termogénico a la aceleración de la degradación proteica como un mecanismo de hidrólisis del ATP.

La oxidación hepática de aminoácidos está incrementada en los animales aclimatados al frío (Whitten et al., 1970), y los efectos catabólicos sobre las proteínas corporales debidos al frío tanto en los casos de estimulación aguda como crónica han sido atribuidos a la necesidad de utilizar los aminoácidos como sustrato para la gluconeogénesis (Beaton, 1963; Klain y Hannon, 1969) o como fuente de energía para el músculo esquelético (Lowenstein, 1972). De esta manera, aunque sean la glucosa y los ácidos grasos los principales sustratos energéticos utilizados durante la exposición al frío, es posible que el incremento en el catabolismo proteico observado en estos animales pueda contribuir parcialmente a la obtención de energía con fines termogénicos, tal como se ha descrito para la oxidación de la leucina (Goodenough et al., 1982), y también para los aminoácidos gluconeogénicos, ya sea a través de su oxidación directa o bien previa conversión en glucosa. En animales eviscerados, en los que queda interrumpida la vía normal de desaminación y excreción del nitrógeno de los aminoácidos, se observa un incremento de los niveles plasmáticos de nitrógeno 2-amínico, procedentes principalmente de la degradación proteica en el músculo esquelético (Smith, 1976), y que podrían estar relacionadas con la necesidad de síntesis de glucosa cuando las reservas de glucógeno en hígado y músculo están prácticamente agotadas. Aunque no se ha determinado de forma concluyente que haya una liberación de aminoácidos por parte del músculo durante la exposición al frío, sí se ha observado un incremento en la actividad de diversas transaminasas musculares, entre ellas la alanina transaminasa (Hannon, 1963).

Se dispone de escasa información relativa al control del metabolismo proteico durante la exposición al frío. Aunque el sistema pituitario-adrenal está estimulado por el frío (Gale, 1973), se ha descrito que la adrenalectomía no impide el balance nitrogenado negativo (You et al., 1950), y tampoco el tiroides parece jugar un papel decisivo (You et al., 1950); se desconoce el papel que pueden desempeñar en esta situación la insulina y el glucagón, aunque posiblemente este último favorezca la estimulación del catabolismo proteico de acuerdo con su papel principal de control metabólico.

1.2.2. EFECTOS METABOLICOS DEL AYUNO.

El ayuno es una situación fisiológica en la cual el organismo ha de adaptarse a la falta de alimento mediante la movilización de sus reservas, constituidas esencialmente por glucógeno, triacil-glicerol y proteínas. La respuesta del organismo a esta situación comporta una adaptación metabólica y endocrina que le permite la utilización progresiva de los triacil-glicerol y las proteínas para substituir parcialmente las necesidades energéticas de los distintos tejidos con substratos diferentes a la glucosa (Cahill, 1970), asegurando de este modo que los tejidos del organismo dispongan de aquellos substratos que necesitan para su funcionamiento, así como la disponibilidad de glucosa para aquellos tejidos que como el tejido nervioso (especialmente el cerebro), la médula renal, la médula ósea o los eritrocitos la utilizan preferentemente con finalidad energética (Ruderman, 1975). De este modo, la respuesta metabólica al ayuno implica una serie de cambios hormonales y en los substratos que están directamente encaminados hacia el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y a la conservación de las reservas proteicas.

1.2.2.1. RESERVAS ENERGETICAS.

El glucógeno constituye la reserva glucídica del organismo. Esta reserva consiste principalmente en el glucógeno hepático, ya que el glucógeno muscular no es directamente utilizable para la producción de glucosa debido a la ausencia de glucosa-6-fosfatasa en este tejido. Pese a que cuantitativamente la reserva de glucógeno del hígado es poco importante, ya que es insuficiente incluso para satisfacer las necesidades energéticas de un solo día, juega un papel fundamental en el suministro de glucosa durante la etapa post-absorbtiva, en especial para el cerebro (Saudek y Felig, 1976).

La principal reserva energética del organismo desde el punto de vista cuantitativo la constituyen los triacil-glicerol almacenados en el tejido adiposo blanco, que en conjunto representan aproximadamente en el hombre el 80% del total de las reservas energéticas corporales (Cahill, 1970), de forma que pueden satisfacer los requerimientos energéticos de un periodo superior incluso a los dos meses.

Sin embargo son las proteínas las que constituyen el factor limitante de supervivencia en las situaciones de ayuno, aunque sólo constituyan el 14% de la energía corporal teóricamente disponible (Saudek y Felig, 1976). Esto es debido a que todas las proteínas tienen asignado un papel funcional determinado: enzimático, estructural, etc. Por lo tanto, una movilización del 30 al 50% de las mismas es incompatible con la supervivencia (Ruderman, 1975), ya que se produce una disminución o cese irreversibles en ciertas funciones imprescindibles, como puede ser la funcionalidad de los músculos respiratorios. Pese a todo, las proteínas juegan un papel fundamental en el aporte de substratos gluconeogénicos durante el ayuno de márgenes fisiológicos.

La respuesta del organismo a una situación de ayuno puede considerarse como un proceso continuo de adaptación gradual, en el que se pueden distinguir tres fases caracterizadas por problemas metabólicos definidos: etapa post-absorbtiva, ayuno a corto plazo y ayuno prolongado.

1.2.2.2. ETAPA POST-ABSORBTIVA.

El inicio de la etapa post-absorbtiva tiene lugar algunas horas después de la última ingestión de alimento, dependiendo de la cantidad de alimento ingerida y de su composición.

La primera adaptación metabólica observable como respuesta a la falta de alimento es una progresiva substitución de la glucosa como sustrato energético en tejidos como el hígado, el músculo o los riñones, que pasan a utilizar con este fin los ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de los triacil-glicerol, provenientes fundamentalmente del tejido adiposo blanco (Cahill et al., 1966). La utilización de estos ácidos grasos por parte del hígado comporta su oxidación a CO_2 , así como la síntesis de cuerpos cetónicos (McGarry et al., 1981) como consecuencia del considerable aumento de los niveles hepáticos de acetil-CoA (Herrera y Freinkel, 1968).

El cerebro es, cuantitativamente, el principal consumidor de glucosa durante la fase post-absorbtiva, oxidando completamente este sustrato hasta CO_2 . Por otra parte, la producción de glucosa se limita principalmente al hígado (Felig et al., 1969a), contribuyendo también aunque en menor escala la corteza renal. En consecuencia, el mantenimiento de la glucemia se relaciona con las velocidades de producción hepática de glucosa y su utilización por parte del cerebro. En principio la generación de glucosa por parte del hígado se realiza mediante glucogenolisis, es decir a partir de la movilización de las reservas de glucógeno, proceso al que coadyuva el descenso de los niveles de insulina circulantes (Cahill et al., 1966), a que da lugar el descenso de la glucemia debido al consumo de glucosa por algunos tejidos, principalmente el cerebro. Este descenso de la insulinemia, al que acompaña un incremento de los niveles circulantes de glucagón, también actúa sobre la movilización de los triacil-glicerol del tejido adiposo y sobre la movilización de las proteínas musculares (Saudek y Felig, 1976). De este modo, se ha descrito que la insulina actúa regulando la lipólisis y la proteólisis periféricas, mientras que el glucagón tiene un papel relacionado con la glucogenolisis y la gluconeogénesis hepáticas, estimulando la movilización de las reservas de glucosa y la captación de alanina por el hígado (Saudek y Felig, 1976).

Además de la glucogenolisis hay una segunda vía de producción de glucosa en el hígado a través de la gluconeogénesis, en la que la síntesis de glucosa tiene lugar a partir de sustratos no glucídicos, principalmente lactato, piruvato, glicerol y algunos aminoácidos. La puesta en marcha del proceso gluconeogénico es fundamental dado que las reservas hepáticas de glucógeno se agotan rápidamente, en general en menos de 24 horas, y de hecho ya a las tres horas desde el inicio del ayuno se produce un marcado descenso de los niveles hepáticos de glucógeno, siendo menos acusado a partir de ese instante (Palou et al., 1981). Los aminoácidos son importantes precursores gluconeogénicos (Exton, 1972), procedentes de la movilización de las proteínas de los tejidos periféricos; esta movilización está determinada por el equilibrio entre los procesos de síntesis y de degradación proteica que, a su vez, están influidos por factores hormonales, nutricionales y neurales (Ruderman, 1975).

1.2.2.3. AYUNO A CORTO PLAZO.

En el ayuno a corto plazo se producen como respuestas características una aceleración de la gluconeogénesis, lipogénesis y cetogénesis con

relación al funcionamiento de estas vías metabólicas durante la fase post-absorbtiva.

La gluconeogénesis se convierte, una vez agotadas las reservas hepáticas de glucógeno, en prácticamente la única vía de suministro de la glucosa necesaria para el metabolismo energético de los tejidos glucolíticos obligatorios. La aceleración del proceso gluconeogenético viene favorecida por el descenso en los niveles circulantes de insulina (Cahill et al., 1966) y el aumento de los de glucagón (Marliss et al., 1970). Esta activación de la gluconeogénesis comporta una movilización de substratos precursores desde los tejidos periféricos, siendo los más importantes el lactato y los aminoácidos (Aikawa et al., 1973; Felig, 1973). En este sentido debe señalarse que, coincidiendo con el incremento en la necesidad de aporte de precursores gluconeogenéticos, se observa un aumento en la proteólisis muscular, que da como resultado una liberación neta de aminoácidos, especialmente de alanina y glutamina (Felig et al., 1970; Garber et al., 1976; Alemany, 1979); también se comprueba la existencia de una mayor captación hepática de alanina con relación a la etapa post-absorbtiva (Felig, 1973), la cual puede llegar a representar hasta la cuarta parte de los precursores gluconeogenéticos captados por los órganos del lecho espláncnico (Felig et al., 1969b). El glucógeno muscular contribuye de un modo significativo a cubrir las necesidades post-absorbtivas de glucosa, ya que el músculo cede a la sangre fragmentos de 3 carbonos (lactato, alanina, etc.) procedentes de dicho glucógeno, y éstos son luego captados por el hígado y utilizados para la gluconeogénesis como parte de los ciclos de Cori (Cori, 1931) y de la glucosa-alanina (Felig, 1973).

El descenso en los niveles de insulina determina un incremento en la movilización de las reservas de triacil-glicerol del tejido adiposo blanco, con la correspondiente elevación de la concentración de ácidos grasos circulantes, que se convierten en el principal substrato energético ya que pueden llegar a representar hasta el 90% del aporte de energía (Cahill, 1970). Esta elevación favorece del mismo modo la cetogénesis hepática, siendo utilizados los cuerpos cetónicos por el músculo (Owen y Reichard, 1971) y en parte por el cerebro (Owen et al., 1967). Por otra parte el glicerol procedente de la movilización de los triacil-glicerol puede ser utilizado de forma significativa como substrato gluconeogenético (Cahill et al., 1966).

1.2.2.4. AYUNO PROLONGADO.

La prolongación del ayuno determina un cambio en la estrategia seguida por el organismo. Ello es debido a que el mantenimiento de los niveles de la glucosa sanguínea durante la fase inicial del ayuno se consigue a expensas de una continua movilización de las proteínas corporales, dado que los animales no pueden utilizar los ácidos grasos como substrato gluconeogenético. De este modo se pasa de una estrategia gluconeogenética, en la que la respuesta básica es el mantenimiento de un mínimo de producción de glucosa para satisfacer las necesidades energéticas de algunos tejidos, a una estrategia de conservación de proteínas, dirigida a minimizar la degradación proteica (Felig et al., 1969a).

El resultado es una disminución de la gluconeogénesis hepática, al tiempo que aumentan los niveles de cuerpos cetónicos (Cahill, 1970). Dado que la continuada movilización de aminoácidos con fines gluconeogenéticos llegaría a ser insuficiente para satisfacer las necesidades mínimas de

glucosa, el cerebro, principal consumidor de glucosa presenta una disminución en la utilización de este substrato, pasando a utilizar como principal substrato energético los cuerpos cetónicos, que llegan a representar hasta el 60% de sus necesidades energéticas totales (Owen et al., 1967). Además de este papel energético, los cuerpos cetónicos también actúan como señal protectora de las proteínas musculares (Sherwin et al., 1975) y de disminución de la gluconeogénesis hepática, evitando de este modo una excesiva degradación proteica que podría tener efectos irreversibles de cara a la supervivencia del individuo. Contribuye también a la disminución de la gluconeogénesis el descenso en la disponibilidad de alanina en la sangre (Felig et al., 1970).

Pese a que la gluconeogénesis hepática disminuye en esta situación, el proceso sigue teniendo lugar por cuanto el cerebro presenta un requerimiento residual de glucosa (Owen et al., 1967). Si en la etapa inicial del ayuno es el hígado el principal órgano gluconeogénico, utilizando para ello preferentemente la glucosa (Ruderman, 1975) y eliminando el nitrógeno en forma de urea, en la fase de ayuno prolongado la gluconeogénesis renal pasa a tener una mayor importancia. Esto es debido a que la elevada cetonemia provoca una situación de acidosis metabólica, lo que origina una mayor excreción de protones por parte del riñón, que son neutralizados en parte con una mayor excreción de amonio (Pitts, 1964); este amonio procede fundamentalmente de la glutamina, cuyo esqueleto hidrocarbonado es utilizado por el riñón con fines gluconeogénicos, llegando a representar la mitad de la glucosa sintetizada en esta fase de ayuno prolongado (Owen et al., 1969). El amonio se convierte así en la forma predominante de excreción de nitrógeno, en sustitución de la urea, lo que presenta como ventaja adicional la reducción de las pérdidas de nitrógeno, al possibilitarse su reabsorción; la no eliminación de urea trae consigo también una disminución de la diuresis (Saudek y Felig, 1967).

La prolongación de esta situación de ayuno acaba finalmente con la muerte del individuo, generalmente por neumonía como consecuencia de la pérdida excesiva de proteínas plasmáticas y miofibrilares del diafragma y de los músculos intercostales, afectando la función de los pulmones (Ruderman, 1975).

1.3. METABOLISMO DE LA ALANINA.

1.3.1. VIAS DEL METABOLISMO DE LA ALANINA.

La alanina es un aminoácido no esencial desde el punto de vista nutricional, es decir que además de la hidrólisis de las proteínas de la dieta o de las endógenas, puede ser sintetizado a un ritmo suficiente como para poder cubrir las necesidades del animal a partir de distintos precursores, especialmente por transaminación del piruvato.

Dentro del organismo, el destino final de la alanina está en función de diversos factores, en especial de las disponibilidades de energía, de glucosa y de otros aminoácidos.

La utilización catabólica de la mayoría de los aminoácidos comporta la pérdida del grupo 2-amino, con el fin de que pueda proseguir la degradación de la cadena hidrocarbonada resultante. También en el caso de la alanina el primer proceso implicado en su catabolismo es la transaminación, por la cual la alanina se transforma en piruvato, transfiriéndose el grupo amino al ácido 2-cetoglutarico que actúa como aceptor.

El piruvato formado puede seguir fundamentalmente tres caminos:

- oxidación completa hasta CO_2 , previa conversión a acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa y posterior entrada en el ciclo de Krebs.
- síntesis de ácidos grasos, por la que el acetil-CoA es transformado en precursores de la síntesis de los ácidos grasos, en un proceso que tiene lugar fundamentalmente en el hígado y los tejidos adiposos. De este modo, un exceso de aminoácidos en la dieta puede originar una acumulación de reservas lipídicas.
- síntesis de glucosa mediante gluconeogénesis; en este sentido la alanina es considerada como el principal aminoácido gluconeogénico (Felig, 1973; Ruderman, 1975), teniendo especial importancia para la síntesis de glucosa en situaciones de ayuno, situación en la que la alanina procede en último término de la degradación de las proteínas endógenas y del glucógeno de los tejidos periféricos.

Por otro lado la síntesis de la alanina tiene lugar siguiendo el proceso inverso, dado que la transaminación es una reacción próxima al equilibrio. En este caso, el piruvato procede de la glucólisis, glucogenólisis o del metabolismo de otros aminoácidos, mientras que el glutamato actúa como donador del grupo amino.

1.3.2. RELACIONES INTER-ORGANOS.

1.3.2.1. INTESTINO.

El intestino juega un papel decisivo en la absorción de los nutrientes, entre ellos los aminoácidos procedentes de la hidrólisis de las proteínas de la dieta. Los aminoácidos pueden ser absorbidos como aminoácidos libres o bien formando pequeños péptidos, cuya absorción es incluso más rápida, que son hidrolizados por las células de la mucosa intestinal (Alpers, 1986).

A su vez, el intestino puede provocar cambios en la proporción de los aminoácidos que liberará a la sangre por la vena porta con relación a los que fueron absorbidos. De este modo, la glutamina puede ser utilizada como

substrato respiratorio por el intestino delgado (Windmueller y Spaeth, 1974), siendo oxidada a lactato y liberando el nitrógeno en forma de alanina, citrulina y prolina o incluso como amonio libre, que será captado, destoxificado y finalmente eliminado en forma de urea por el hígado (Aikawa et al., 1973). Además de la glutamina, el intestino puede utilizar otros aminoácidos como substratos energéticos, como es el caso del glutamato y del aspartato.

Por lo tanto, el intestino puede exportar cantidades importantes de alanina a partir de la utilización de glutamina sanguínea y, en consecuencia, este tejido está implicado en la liberación de substratos gluconeogénicos al torrente circulatorio.

1.3.2.2. HIGADO.

El hígado es, desde un punto de vista cuantitativo, el principal órgano implicado en el metabolismo de los aminoácidos, ya que en él tienen lugar los principales procesos anabólicos y catabólicos relacionados con estos compuestos, a lo que debe añadirse su importancia en la síntesis de proteínas (Elwyn, 1970) y su papel en la formación de urea como mecanismo de excreción del nitrógeno procedente del metabolismo de los compuestos nitrogenados. Por otra parte, su situación anatómica le permite recibir directamente los aminoácidos procedentes de la absorción intestinal.

El hígado juega un papel muy importante en el flujo inter-organos de aminoácidos, regulando la liberación de estos compuestos al torrente circulatorio en función de la demanda por parte de los distintos tejidos (Adibi et al., 1973), al tiempo que actúa como sistema de filtración de las sustancias absorbidas por el intestino y que le llegan directamente a través de la vena porta; de este modo se puede evitar la existencia de elevadas fluctuaciones en la concentración arterial de aminoácidos en función del estado nutricional de animal. Sin embargo, la función concreta del hígado en la retención de aminoácidos en condiciones prandiales no ha sido aún suficientemente estudiada, por lo que se carece de datos concretos sobre la realización de esta supuesta función filtradora y de retención y control del nitrógeno de los aminoácidos.

Las vías a través de las cuales los aminoácidos llegan al hígado son dos: en situaciones absorbtivas el aporte tiene lugar a través de la vena porta, en este caso los aminoácidos proceden fundamentalmente del intestino, mientras que en situaciones postabsorbtivas o de ayuno la llegada de aminoácidos tiene lugar fundamentalmente por la arteria hepática, procedentes de la degradación de las proteínas de los tejidos periféricos, especialmente del músculo (Aikawa et al., 1973; Bergman e Heitmann, 1978).

La maquinaria enzimática del hígado le permite oxidar la mayor parte de los aminoácidos, además de disponer del ciclo de la urea como mecanismo de eliminación del amonio generado en el metabolismo de estos substratos. Por otro lado, el hígado es el órgano gluconeogénico más importante (Felig et al., 1970), utilizando diversos substratos como el lactato y la alanina, la cual es el aminoácido captado de forma mayoritaria procedente sobre todo del músculo (Felig, 1973).

1.3.2.3. MUSCULO.

El papel del músculo en el metabolismo de los aminoácidos es muy importante, sobre todo considerando que este tejido representa aproximadamente el 42% del peso corporal de una rata adulta (Arola et al., 1979b), constituyendo de esta manera la principal reserva de proteínas del organismo y, por lo tanto, de aminoácidos.

Aunque el músculo puede oxidar la alanina, junto con el glutamato, el aspartato y los aminoácidos de cadena ramificada, desde un punto de vista fisiológico es más destacable su capacidad de convertir algunos aminoácidos en alanina y glutamina para su exportación (Ruderman, 1975), lo que tiene una gran importancia para el metabolismo nitrogenado del organismo (Odessey et al., 1974). De este modo, se había observado que la liberación de alanina y de glutamina por parte del músculo de animales en estado postabsorbtivo o en ayuno excedía a la que podía esperarse de la simple hidrólisis de las proteínas musculares (Ruderman, 1975), por lo que se supuso que había una síntesis *de novo* de estos dos aminoácidos a expensas de los que eran liberados en menor proporción de la esperada con relación a su presencia en las proteínas musculares (Felig, 1973).

El origen del nitrógeno de la alanina y la glutamina liberadas por el tejido muscular debe buscarse principalmente en la transaminación de los aminoácidos de cadena ramificada, ya que el músculo es el principal tejido implicado en la degradación de estos aminoácidos (Odessey y Goldberg, 1972), a diferencia de lo que sucede con la mayoría de los restantes aminoácidos esenciales, que son degradados por el hígado. Esta capacidad de oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada se incrementa en situaciones de ayuno (Goldberg y Odessey, 1972). La degradación de estos compuestos por el músculo genera amonio procedente de los grupos amino, cuya acumulación podría ser peligrosa por sus efectos tóxicos, ya que el músculo carece de los enzimas necesarios para llevar a cabo el ciclo de la urea completo; además hay otra fuente de amonio procedente de la desaminación de aminoácidos por el ciclo del purín-nucleótido, de especial importancia durante los periodos de ejercicio muscular (Lowenstein, 1972). La exportación de alanina y glutamina puede ser considerada como una forma de transporte de nitrógeno amínico en forma no tóxica, que permite su eliminación ulterior en el hígado mediante el ciclo de la urea.

Por otra parte, el esqueleto hidrocarbonado de la glutamina procede de otros aminoácidos, en especial del glutamato y del aspartato (Ruderman y Berger, 1974), así como de los aminoácidos de cadena ramificada (Goldberg y Chan, 1978); el grupo amino de estos aminoácidos es transferido al glutamato, que a su vez lo cede al piruvato por la acción de la alanina transaminasa (Odessey et al., 1974), aunque también, en función de la disponibilidad de amonio libre, puede haber una incorporación de amonio libre al glutamato para formar glutamina (Ruderman y Berger, 1974). De este modo, la glutamina puede considerarse como el principal vehículo transportador del carbono derivado de la degradación proteica en el músculo (Ruderman, 1975). El origen del esqueleto hidrocarbonado de la alanina no parece tan claro; por una parte parecen existir evidencias de que la mayor parte del piruvato procede de la oxidación parcial de la glucosa captada por el músculo o del glucógeno muscular que es transaminado a alanina (Chan y Goldberg, 1977), si bien otros autores consideran que puede proceder de diversos aminoácidos, entre ellos los de cadena ramificada (Snell y Duff, 1984).

La producción muscular de alanina parece jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa sanguínea, dado su carácter de precursor gluconeogénico (Exton, 1972). Este hecho hizo que diversos autores propusiesen la existencia de un ciclo de la glucosa-alanina (Mallette et al., 1969; Felig et al., 1970; Felig, 1973). Por medio del funcionamiento de este ciclo se produciría un transporte de la alanina desde el músculo hacia el hígado, es decir un transporte del nitrógeno procedente de los grupos amino de los aminoácidos degradados por el músculo y la cadena hidrocarbonada procedente del piruvato principalmente; una vez en el hígado el nitrógeno sería transformado en urea para su eliminación y la cadena hidrocarbonada se utilizaría con fines gluconeogénicos. Por otro lado, la glucosa sintetizada a nivel hepático sería exportada hacia los tejidos extrahepáticos, entre ellos el músculo, que podrían convertirla nuevamente en alanina.

El ciclo de la glucosa-alanina parece tener un funcionamiento claramente relacionado con las disponibilidades de glucosa. De todos modos debe tenerse en cuenta que la gluconeogénesis es una vía metabólica que es funcional principalmente en situaciones postabsorbtivas y de ayuno, mientras que la captación de glucosa por parte del músculo tiene lugar en situaciones absorbtivas.

Además de su implicación en la gluconeogénesis hepática, el papel fisiológico del ciclo de la glucosa-alanina podría estar relacionado con un mecanismo destoxicador por el que se produciría un transporte de nitrógeno en forma de alanina hacia el hígado, donde se transformaría en urea para su eliminación, evitando así una acumulación excesiva de amonio en el músculo.

Mientras la alanina exportada por el músculo parece tener como principal destino la gluconeogénesis, la glutamina exportada está más relacionada con el transporte de amonio por este tejido en aquellas situaciones en las que se produce una activa utilización de los aminoácidos de cadena ramificada, como ocurre en situaciones absorbtivas (Brosnan et al., 1983). Esta glutamina es precursora de la amoniagénesis renal (Pitts, 1964) y es utilizada como sustrato energético por el intestino delgado (Windmueller y Spaeth, 1974), además de jugar en las propias células musculares un papel regulador de la degradación proteica (Smith, 1986).

Los aminoácidos de cadena ramificada, además de ceder sus grupos amino a la alanina o la glutamina, también regulan la disponibilidad de otros aminoácidos en el músculo ya que se ha descrito que la leucina puede colaborar en el control de la degradación de las proteínas en el músculo (Buse y Reid, 1975).

1.3.2.4. RINON.

Desde el punto de vista del metabolismo de los aminoácidos, el riñón parece tener una especial importancia con relación al metabolismo de la glutamina, alanina, glicina, serina y arginina. El riñón juega un papel clave en la reabsorción de los aminoácidos (Young y Freedman, 1971) y en la producción de amonio, especialmente en situaciones de acidosis metabólica (Pitts, 1964).

El amonio excretado por el riñón procede fundamentalmente de la glutamina sanguínea; también puede proceder en parte del glutamato, ya que tanto este aminoácido como la glutamina pueden ser completamente oxidados por este órgano. La captación de glutamina por el riñón (Vinay et al., 1985)

tiene especial importancia en situaciones de ayuno y de acidosis metabólica (Pitts, 1964). Además de ser oxidada, los carbonos de la glutamina pueden ser utilizados para la síntesis de glucosa debido a la capacidad gluconeogénica de la corteza renal, especialmente en situaciones de ayuno prolongado, pudiendo utilizar para tal fin varios aminoácidos (Szepesi et al., 1970).

Por otra parte el riñón libera cantidades importantes de alanina y de serina a la sangre; estos aminoácidos son eventualmente captados por el hígado (Aikawa et al., 1973). La alanina puede actuar como un sistema transportador de nitrógeno para su eliminación, además de poder ser utilizada con fines gluconeogénicos. En este sentido también los aminoácidos implicados en el ciclo de la urea parecen jugar un papel en el transporte de nitrógeno hacia el hígado, ya que los riñones extraen de la sangre citrulina, procedente principalmente del intestino, y liberan arginina (Featherston et al., 1973), mientras que el hígado actúa en sentido contrario (Bergman e Heitmann, 1978).

El riñón capta cantidades importante de glicina, que al parecer es utilizada principalmente para la síntesis de serina, contribuyendo de este modo al mantenimiento de los niveles circulantes de este aminoácido.

1.3.2.5. TEJIDO ADIPOSEO BLANCO.

El metabolismo de los aminoácidos en el tejido adiposo blanco puede considerarse cuantitativamente importante teniendo en cuenta el importante porcentaje que representa con respecto al peso corporal. El tejido adiposo blanco presenta los principales enzimas implicados en el metabolismo de los aminoácidos (López-Soriano y Alemany, 1986). La utilización de los aminoácidos por este tejido ha sido demostrada por diversos autores, especialmente en estudios llevados a cabo *in vitro* (Feller y Feist, 1962; Goodman, 1964; Tischler y Goldberg, 1980). El comportamiento de este tejido es similar al del músculo en el sentido que utiliza los aminoácidos de cadena ramificada (Goodman, 1964; Tischler y Goldberg, 1980), no sólo con fines oxidativos sino sobre todo para la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Rosenthal et al., 1974), mientras que libera alanina y glutamina (Snell y Duff, 1977; Tischler y Goldberg, 1980), posiblemente como vía de eliminación de los grupos amino de los aminoácidos de cadena ramificada.

1.3.2.6. PAPEL DE LA COMPARTIMENTACION SANGUINEA.

La sangre desempeña un papel crucial en las relaciones inter-organales en el metabolismo de los aminoácidos, ya que es el medio por el que estos substratos son transportados de unos órganos a otros, actuando así como un sistema integrador a nivel del organismo. De este modo la sangre transporta los aminoácidos procedentes de los alimentos desde el intestino hacia el hígado por la vena porta, y desde el hígado se distribuyen a los tejidos periféricos, en especial al músculo (Aoki et al., 1973). Bajo condiciones post-absorbtivas o de ayuno este flujo se invierte, ya que el hígado sintetiza glucosa a partir de los esqueletos hidrocarbonados de distintos aminoácidos, especialmente de la alanina procedente del músculo (Felig, 1973), si bien también hay una contribución cuantitativamente menor del intestino y del riñón.

La sangre juega del mismo modo un papel fundamental en la eliminación de amonio. Los tejidos periféricos lo eliminan principalmente en forma de glutamina, que en el riñón dará lugar a amonio libre que será eliminado a través de la orina, mientras que en los órganos del lecho espláncnico será degradada, especialmente por el intestino, llegando el amonio hasta el hígado donde será utilizado para la síntesis de urea (Aikawa et al., 1973).

Sin embargo, la sangre no es un sistema homogéneo, ya que en ella pueden distinguirse una fracción celular, formada principalmente por los eritrocitos, y una fracción plasmática. Durante mucho tiempo se atribuyó al plasma el papel intercambiador de aminoácidos entre la sangre y el líquido intersticial de los tejidos (Munro, 1970); este papel parecía confirmarse por estudios llevados a cabo *in vitro* (Winter y Christensen, 1964), en los que se observaba que el intercambio plasmático era lento, a diferencia de los intercambios entre plasma y glóbulos y los tejidos, que *in vivo* parecen ser muy rápidos. Estudios posteriores contribuyeron a cambiar este planteamiento, sugiriéndose un papel dinámico por parte de los eritrocitos en el transporte de aminoácidos a los tejidos (Elwyn et al., 1972; Aoki et al., 1972; Felig et al., 1973; Soley y Alemany, 1980a; Viñas, 1986).

De esta manera, en el caso de la alanina la cuarta parte de este aminoácido transferido desde el músculo o el intestino hacia el hígado lo hace vía eritrocitos (Felig et al., 1973), por lo que las medidas realizadas sobre el plasma son una subestima de la captación hepática de este aminoácido.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En el curso de los últimos años se ha publicado un elevado número de monografías relativas a distintos aspectos del metabolismo del TAM, así como al papel que este tejido juega en los mamíferos en distintas situaciones fisiológicas o patológicas. Sin embargo, dentro de la vasta bibliografía existente sobre el tema son extremadamente escasas las referencias al metabolismo de los aminoácidos en este tejido. A la vista de la efectiva incorporación de los carbonos de la alanina a diversas fracciones del TAM observada en nuestro Departamento y ante estas perspectivas, consideramos oportuno el llevar a cabo un estudio sobre el metabolismo de los aminoácidos en el TAM, de forma que se pudiesen cubrir algunos de los principales aspectos del metabolismo de estos substratos por parte del TAM de la rata.

A efectos prácticos, este estudio ha sido dividido en tres partes:

Parte 1: El objetivo de esta parte ha sido determinar en el TAM las actividades de algunos de los principales enzimas implicados en el metabolismo de los aminoácidos: alanina transaminasa (EC 2.6.1.2), aspartato transaminasa (EC 2.6.1.1), transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (EC 2.6.1.42), glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.3), glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2), adenilato desaminasa (EC 3.5.4.6), arginasa (EC 3.5.3.1) y serina deshidratasa (EC 4.2.1.13). Estas actividades también han sido determinadas en los algunos de principales tejidos implicados en el metabolismo de los aminoácidos (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo blanco), para poder comparar así la capacidad potencial de utilización de estos substratos por el TAM con la de estos tejidos. Asimismo se ha determinado la composición del acervo de aminoácidos libres en el tejido, para complementar la información proporcionada por las actividades enzimáticas, y poder tener así una primera aproximación a la capacidad metabolizadora de los aminoácidos del TAM. Finalmente se ha determinado la velocidad de recambio proteico del TAM, que se ha comparado con la de otros tejidos de la rata.

Parte 2: En este apartado se ha pretendido estudiar la utilización de la alanina como substrato metabólico por parte del TAM *in vitro*, utilizando para ello la técnica de incubaciones de fragmentos de tejido. De esta manera se pretendía determinar distintos aspectos de la utilización de este substrato por el TAM, como son el efecto que podrían tener en su captación la concentración de glucosa o la presencia de hormonas como la insulina, el glucagón o la noradrenalina, así como el destino del carbono de la alanina dentro del tejido.

Parte 3: El objetivo de esta parte ha sido determinar la captación o liberación de los aminoácidos y la glucosa por parte del TAM *in vivo*, utilizando para ello la técnica de determinación de las diferencias arteriovenosas a través del tejido, y determinando asimismo el flujo sanguíneo mediante la técnica de las microesferas radiactivas con el fin de determinar cuantitativamente la captación/liberación de estos substratos *in vivo* en condiciones fisiológicas controladas.

En cada una de estas partes el estudio se llevó a cabo en animales sometidos a distintas situaciones fisiológicas en las que la actividad termogénica del tejido estuviese aumentada (exposición aguda o crónica al

frío) o disminuída (ayuno), para ver de que manera podían influir estos factores sobre la utilización de los aminoácidos.

Dado que, topológicamente, el TAM es un tejido complejo que aparece localizado en distintas partes del cuerpo en forma de pequeños depósitos más o menos definidos, este estudio se ha llevado a cabo íntegramente empleando la masa interescapular del TAM (TAMI). La elección de este depósito se justifica por ser el más grande y el que constituye una masa mejor definida, y porque siendo superficial es el más fácilmente accesible; asimismo es el que más se ha estudiado, habiéndose comprobado en los estudios realizados hasta la fecha que sus características bioquímicas son representativas del conjunto del TAM de otros depósitos del animal.

Por lo tanto, el objetivo general de este estudio ha sido el disponer de información a tres niveles, información que permita establecer las líneas generales del metabolismo de los aminoácidos por parte del TAM en distintas situaciones, con el fin de contribuir a determinar si los aminoácidos son utilizados efectivamente como substratos termogénicos por el TAM.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Parte 1: ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y COMPOSICION DEL ACERVO DE AMINOACIDOS LIBRES DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR

3.1.1. ANIMALES

Características

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) albinas de la cepa Wistar, procedentes del pabellón de animales de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Todos los animales utilizados fueron machos, salvo indicación en contra.

Condiciones ambientales

Los animales se mantuvieron con un ciclo diario de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (iluminación desde las 08.00 hasta las 20.00 horas).

La temperatura ambiental de los cubículos del estabulario fue de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, salvo para el caso de los animales sometidos a exposición crónica o aguda al frío, que se mantuvieron a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en una cámara frigorífica termostatzada. La humedad ambiental estuvo comprendida en todos los casos entre el 80% y el 90%.

Dieta

Los animales tuvieron en todo momento (salvo los sometidos a ayuno) libre acceso a la dieta, constituida por pienso de A04 para rata y ratón, tipo mantenimiento, de la casa Panlab (Barcelona), con un valor calorífico de 12,1 kJ/g, gránulos de 15 mm de diámetro y la siguiente composición:

Humedad	120 g/kg
Proteínas	170 g/kg
Lípidos	30 g/kg
Glúcidos metabolizables	587 g/kg
Fibra (celulosa).....	42 g/kg
Minerales	50 g/kg

Dicho pienso estaba complementado con un complejo vitamínico formado por las vitaminas A, D₃, tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxal, B₁₂, E, K₃, nicotinamida, ácido fólico, biotina y colina.

De la misma manera, los animales tuvieron en todo momento libre acceso al agua de bebida.

Grupos experimentales

En el presente apartado se estudiaron 4 grupos experimentales:

- CONTROL: animales no sometidos a ningún tipo de tratamiento.
- AYUNO: animales sometidos a ayuno las 24 horas previas al sacrificio.
- FRIO AGUDO: animales expuestos a 4°C las 12 horas previas al sacrificio.
- FRIO CRONICO: animales expuestos a 4°C durante los 15 días anteriores al sacrificio.

En el experimento de las actividades enzimáticas se incluyó un grupo control formado por ratas hembras.

Todos los animales fueron sacrificados entre las 7 y 8 semanas de edad, correspondientes a un peso de 210-220 g.

3.1.2. SACRIFICIO Y OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Todos los animales utilizados fueron sacrificados al inicio del ciclo de iluminación. En todo momento se procuró que los animales no se pusiesen nerviosos durante el traslado hasta la sala de matanzas ni tampoco en la manipulación previa al sacrificio, para evitar al máximo los efectos debidos al "stress". El sacrificio fue efectuado por decapitación, utilizando una guillotina manual de doble cuchilla. La sangre que manaba por la herida del cuello fue recogida directamente en un vaso heparinizado con 0'5 ml de heparina al 2% previamente desecados. A partir de esta sangre se separaron varias fracciones para llevar a cabo las distintas determinaciones:

- determinación del hematocrito.
- desproteinización por el método de Somogyi para determinar glucosa.
- desproteinización con ácido tricloroacético para determinar aminoácidos individuales.

El resto de la sangre se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4°C para obtener el plasma, que a su vez fue fraccionado para efectuar las diferentes determinaciones:

- desproteinización por el método de Somogyi para determinar glucosa.
- desproteinización con ácido tricloroacético para determinar aminoácidos individuales.
- el resto del plasma se fraccionó para las determinaciones de proteínas plasmáticas, urea y ácidos grasos libres.

En todo momento las muestras se mantuvieron en un baño de hielo a 4°C.

Extracción de los tejidos

Una vez decapitado el animal se procedió a la extracción del tejido adiposo marrón interescapular (TAMI) de acuerdo con el protocolo descrito por Joel (1970); para ello se extendió el cuerpo de la rata boca abajo y se le hizo en el dorso un corte longitudinal en la piel de unos 10 cm desde el cuello y hacia la cola. Al separar la piel aparece el TAMI en la región interescapular, se coge con unas pinzas, recortando los dos lóbulos con unas tijeras y dejando el tejido extraído en salino frío (4°C). Seguidamente se procedió a limpiar el TAMI de restos de tejido adiposo blanco, tejido conjuntivo y músculo. Una vez que el TAMI quedo libre de tejidos contaminantes, se procedió a su congelación con nitrógeno líquido, conservándose las muestras a -70°C hasta el momento de efectuar las determinaciones. Todo el proceso de extracción del TAMI hasta su congelación se llevo a cabo en un tiempo máximo de 2 minutos desde el momento del sacrificio.

Simultáneamente se procedió a la extracción de los otros tejidos estudiados: hígado (lóbulo izquierdo), músculo estriado (parte posterior de la pata posterior derecha) y tejido adiposo blanco (cordón lumbar derecho). Los tejidos se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido, y se

conservaron a -70°C hasta el momento de proceder a las distintas determinaciones.

3.1.3. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

3.1.3.1. PREPARACION DE LOS HOMOGENADOS

Con el fin de proceder a la determinación de las distintas actividades enzimáticas, se procedió a la homogenización de las muestras de los distinto tejidos. Como medio de homogenización se utilizó una solución de sacarosa 0,25 M, a la que se añadió 2-mercaptoetanol 2,5 mM como protector de los grupos sulfhidrilo, ajustando finalmente el pH a 7,4.

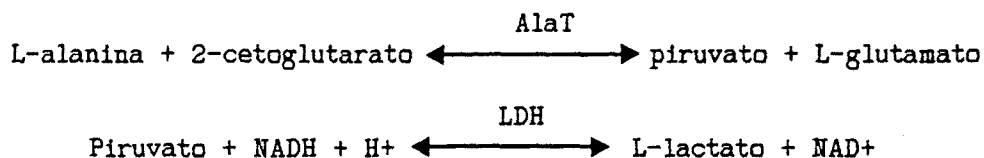
La homogenización se efectuó con homogenizadores de teflón/vidrio, acoplados a motores eléctricos de taladradora de velocidad regulable. La muestra, previamente pesada (250 mg aprox.), se introdujo en el tubo del homogenizador con 2,5 ml de medio de homogenización, y seguidamente se puso en marcha el motor, al tiempo que se procedía a mover el tubo de arriba a abajo para facilitar la rotura del tejido con las sucesivas descompresiones. Este proceso se llevó a cabo manteniendo en todo momento el tubo del homogenizador sumergido en un baño de hielo para evitar el calentamiento del medio, y se continuaba hasta que las muestras quedaban totalmente homogéneas.

Una vez homogenizadas, las muestras se filtraron a través de un tejido de malla de nylon de poro pequeño, para eliminar los fragmentos residuales que podían obturar las micropipetas. El homogenado así obtenido (homogenado "crudo") se mantuvo en frío hasta el momento de efectuar las distintas determinaciones, tras diluirlo convenientemente según cada caso. De cada homogenado se guardó congelada una alícuota de 200 μl para la determinación de la concentración de proteínas tisulares.

3.1.3.2. ALANINA TRANSAMINASA

Fundamento

El método espectrofotométrico utilizado está basado en el descrito por Wroblewski y LaDue (1956), según el protocolo de Bergmeyer y Bernt (1974b) y teniendo presentes las modificaciones descritas por Segal y Matsuzawa (1970) para las determinaciones en tejidos. La actividad del enzima se valora en función de la formación de piruvato mediante la utilización de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH, según las siguientes reacciones:



El equilibrio de la segunda reacción está fuertemente desplazado hacia la derecha, de forma que todo el piruvato formado en la primera reacción será inmediatamente utilizado por la lactato deshidrogenasa. De esta manera, la actividad de la alanina transaminasa será proporcional a la cantidad de

NADH transformado, proceso que puede seguirse por lectura de la absorbancia a 334 nm.

La alanina transaminasa necesita fosfato de piridoxal como coenzima, pero en este caso la unión del coenzima con el enzima es muy fuerte (Grein y Pfleiderer, 1958), por lo que no es necesaria la adición de dicho coenzima para las determinaciones en tejidos (Bergmeyer y Bernt, 1974b)

En la valoración se utilizó un tampón de fosfatos, que disminuye a la mitad la actividad de la glutamato deshidrogenasa, enzima que podría interferir en la determinación. Por esta razón, y como precaución adicional, se hizo necesaria la utilización de enzimas purificados libres de sales de amonio (Bergmeyer y Bernt, 1974b)

Reactivos

- Tampón de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 200 mM, pH 7,4
- 2-cetoglutarato bisódico 120 mM
- NADH sódico 6 mM
- Lactato deshidrogenasa de músculo de conejo
- L-alanina 1 M

Procedimiento

En cubetas de plástico de 1 cm de anchura y 1,5 ml de capacidad adaptadas a la lectura con luz ultravioleta, se introdujeron por este orden los siguientes volúmenes de los reactivos anteriormente citados: 650 μl de tampón de fosfatos, 100 μl de 2-cetoglutarato, 50 μl de NADH, 2 μl de lactato deshidrogenasa y 100 μl de la muestra convenientemente diluida. Las cubetas se agitaron por inversión y se leyó la densidad óptica a 334 nm, esperando que dicho valor se estabilizase.

Seguidamente se añadieron con una micropipeta de constricción 200 μl de alanina 1 M a cada una de las cubetas, mezclando bien el contenido de las mismas, y se procedió a leer el descenso de la densidad óptica en intervalos de 60 s durante 10 minutos, margen en el que la actividad mostraba linealidad. El proceso de incubación de las cubetas se realizó a la temperatura de 25°C.

Cálculos

A partir del descenso de la densidad óptica se pudo determinar la velocidad de oxidación del NADH y, consecuentemente la actividad del enzima. Para ello se utilizó el valor de $\epsilon = 6,18 \times 10^3 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de extinción del NADH a 334 nm a 25°C (Bergmeyer, 1975), utilizando la siguiente fórmula:

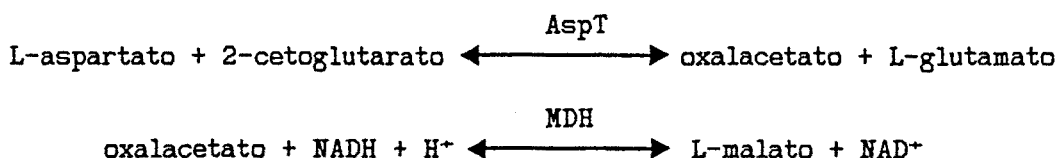
$$v = (\Delta\text{DO}/\Delta t) / \epsilon$$

En esta fórmula v es la actividad (en $\mu\text{katales}$) y $(\Delta\text{DO}/\Delta t)$ es la variación de la densidad óptica por segundo en el intervalo de linealidad. Este resultado debe corregirse por los volúmenes de medio de reacción y de muestra, por la dilución de ésta y por el peso de tejido utilizado en la preparación del homogenado, para así obtener la actividad en $\mu\text{katales}$ por gramo de tejido.

3.1.3.3. ASPARTATO TRANSAMINASA

Fundamento

El método utilizado está basado en el descrito por Karmen (1955), de acuerdo con las condiciones establecidas por Bergmeyer y Bernt (1974a). Dicho método se fundamenta en el acoplamiento de la reacción de la aspartato transaminasa con la catalizada por la malato deshidrogenasa (MDH):



El equilibrio de la segunda reacción está fuertemente desplazado hacia la derecha, de forma que todo el oxalacetato generado en la primera reacción es utilizado inmediatamente por la malato deshidrogenasa. De este modo, la disminución en la absorbancia por oxidación del NADH medida a 334 nm será proporcional a la actividad de la aspartato transaminasa.

Al igual que en el caso de la alanina transaminasa, es necesario utilizar enzimas libres de sales de amonio, para evitar posibles interferencias debidas a la glutamato deshidrogenasa.

Reactivos

- Tampón de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 200 mM, pH 7,4
- 2-cetoglutarato bisódico 120 mM
- NADH sódico 6 mM
- Malato deshidrogenasa de corazón de cerdo
- Aspartato monosódico 1 M

Procedimiento

En cubetas de plástico iguales a las indicadas en el apartado 3.1.3.2 se introdujeron por este orden los siguientes volúmenes de los reactivos anteriormente mencionados: 650 μl de tampón de fosfatos, 100 μl de 2-cetoglutarato, 50 μl de NADH, 2 μl de malato deshidrogenasa y 100 μl de la muestra convenientemente diluida. Tras agitar la cubeta por inversión, se procedió a efectuar una lectura de la densidad óptica a 334 nm, hasta que ésta dió un valor constante.

Seguidamente se añadieron con una micropipeta de constricción 200 μl de aspartato 1 M a cada una de las cubetas, mezclando bien el contenido de las mismas; acto seguido se realizaron lecturas del descenso de la densidad óptica cada 60 segundos durante un intervalo de 10 minutos, margen de tiempo en el que dicho descenso se mantenía lineal. El proceso de incubación de las cubetas se realizó a la temperatura de 25°C.

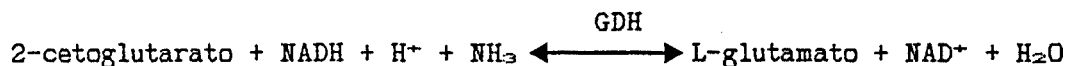
Cálculos

Los cálculos se efectuaron de la forma ya señalada en el apartado 3.1.3.2.

3.1.3.4. GLUTAMATO DESHIDROGENASA

Fundamento

El método espectrofotométrico utilizado está basado en el descrito por Schmidt (1974), fundamentado en la siguiente reacción:



determinándose la oxidación del NADH a 334 nm, que es directamente proporcional a la actividad del enzima. El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la derecha. Como coenzima se utilizó el NADH, al haberse comprobado que tiene una mayor efectividad que el NADPH (Schmidt, 1974, Arola et al., 1979a). También se añadió ADP como activador, y se efectuó una preincubación de 5 minutos con lactato deshidrogenasa para eliminar las posibles interferencias debidas al piruvato de la muestra.

Reactivos

- Tampón de trietanolamina 100 mM + EDTA disódico 6 mM, pH 8,0
- ADP bisódico 10 mM
- Bicarbonato amónico 1 M
- NADH sódico 6 mM
- Lactato deshidrogenasa de músculo de conejo
- 2-cetoglutarato bisódico 120 mM

Procedimiento

En cubetas de plástico iguales a las indicadas en el apartado 3.1.3.2 se introdujeron por este orden los siguientes volúmenes de los reactivos anteriormente citados: 650 µl de tampón de trietanolamina/EDTA, 100 µl de ADP, 100 µl de bicarbonato amónico, 50 µl de NADH, 2 µl de lactato deshidrogenasa y 50 µl de la muestra convenientemente diluida. Tras agitar la cubeta por inversión, se procedió a efectuar una lectura a 334 nm hasta que ésta dió un valor constante.

Seguidamente se añadieron con una micropipeta de constricción 100 µl de 2-cetoglutarato 120 mM a cada una de las cubetas, mezclando bien el contenido de las mismas, y se efectuaron lecturas del descenso de la densidad óptica cada 60 s durante un intervalo de 10 minutos, margen de tiempo en el que dicho descenso se mantenía lineal. La incubación de las cubetas se efectuó a 25°C.

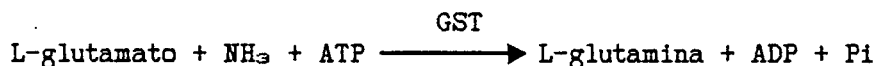
Cálculos

Los cálculos se efectuaron de la forma ya señalada en el apartado 3.1.3.2.

3.1.3.5. GLUTAMINA SINTETASA

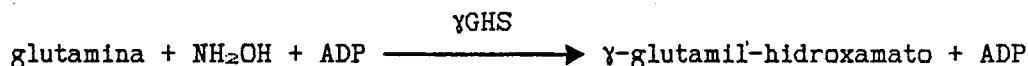
Fundamento

La glutamina sintetasa (GST) cataliza la reacción:



La glutamina sintetasa tiene, además, capacidad para la formación de γ -glutamil-hidroxamato (Woolfolk, 1966), reacción que es más fácil de valorar que la de la propia GST, por la gran interferencia de las diversas ATP-asas en la primera reacción (Elliot, 1951) y que no es tan intensa en el caso de la γ -glutamil-hidroxamato sintetasa (γ GHS) (Rowe et al., 1970). A pesar de que hay discusiones sobre si hay una total correlación entre GST y γ GHS, la utilización de esta actividad enzimática como estima de la actividad GST está muy extendida y generalmente aceptada (Webb y Brown, 1976).

La γ GHS cataliza la reacción biosintética de formación del γ -glutamil-hidroxamato a partir de hidroxilamina y glutamina en presencia de ADP y de los iones arseniato y manganeso, según la siguiente reacción:



En las condiciones de determinación el equilibrio está desplazado hacia la formación del γ -glutamil hidroxamato, compuesto que puede determinarse colorimetricamente a 500 nm, longitud de onda a la que se da la máxima absorbancia el complejo de color característico que forma al reaccionar con las sales férricas (Lipmann y Tuttle, 1945). Las condiciones empleadas han sido básicamente las descritas por Mecke (1974), mientras que el reactivo férrico ha sido preparado de acuerdo con Iqbal y Ottaway (1970).

Reactivos

- Reactivo de valoración (preparado diariamente):
 - 18 ml de tampón Tris-HCl 0,56 M, pH 7,7
 - 3,5 ml de Na_2HAsO_4 0,14 M
 - 175 μl de MnCl_2 0,14 M
 - 2,5 ml de NaOH 2 N
 - 347,5 mg de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$
 - 35,3 mg de ADP bisódico
 - 730,4 mg de L-glutamina
 Llevarlo hasta 25 ml con agua destilada.
- Reactivo férrico (preparado diariamente):
 - 10 ml de ácido tricloroacético 2,5 M
 - 10 ml de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,6 M
- Solución patrón de γ -glutamil-hidroxamato 100 mM.

Procedimiento

El método consiste en incubar la muestra con el reactivo de valoración, parar la reacción a distintos tiempos de incubación por acidificación y precipitación de las proteínas, y valorando finalmente el γ -glutamil-hidroxamato formado, colorimétricamente a partir de la formación de complejos coloreados al reaccionar con el reactivo férrico.

Se prepararon tubos de ensayo con 2,05 ml del reactivo de valoración, que se preincubaron a 37°C durante 1 minuto para equilibrar las temperaturas. A continuación se añadió a cada tubo 1 ml de muestra convenientemente diluida, agitando y extrayendo rápidamente 1 ml de la mezcla resultante, que se pasaba a tubos de centrifuga con 0,67 ml de

reactivo férrico, que se mantenían en un baño de hielo a 4°C (tiempo 0). Se extrajeron de cada tubo otras dos alícuotas de 1 ml a los 10 y 20 minutos desde el inicio de la reacción. De esta manera se conseguía detener la reacción por la acción del ácido tricloroacético y, al mismo tiempo, se iniciaba la reacción del γ -glutamil-hidroxamato formado con la sal férrica, para dar la coloración característica.

Los tubos utilizados para detener la reacción se centrifugaron a 1500 g durante 20 minutos a 4°C, y los sobrenadantes fueron filtrados a través de un trozo de algodón colocado en el interior de pipetas Pasteur. Los filtrados fueron recogidos en otros tubos para proceder a la lectura directa de las densidades ópticas a 500 nm.

Es conveniente que el tiempo transcurrido entre el final de la reacción y la lectura de la densidad óptica esté comprendido entre 35 y 90 minutos, con el fin de asegurar la completa formación del color (que requiere un tiempo mínimo) y evitar por otra parte la pérdida progresiva de color (que depende del tiempo). Para evitar los posibles artefactos debidos a diferencias de temperatura, los tubos se mantuvieron todo este tiempo en un baño de hielo a 4°C.

Cálculos

Paralelamente al procesamiento de las muestras, se confeccionó un banco de diluciones de γ -glutamil-hidroxamato, de composición idéntica a las muestras pero sustituyendo éstas por un volumen equivalente de medio de homogenización, de forma que a cada tubo de la serie patrón se le añadieron:

- 650 μ l de reactivo de valoración
- 350 μ l de medio de homogenización
- 670 μ l de reactivo férrico
- 0-20 μ l de γ -glutamil-hidroxamato (0-2 μ moles/tubo)

A partir de la recta patrón así obtenida se calculó la equivalencia entre densidad óptica y concentración (μ moles/unidad de densidad óptica). Este valor se transformó en función de los volúmenes de incubación y de determinación, para obtener el "factor diario" (F) correspondiente al enzima en las condiciones de determinación indicadas. De esta manera, con los valores de densidad óptica se calculó:

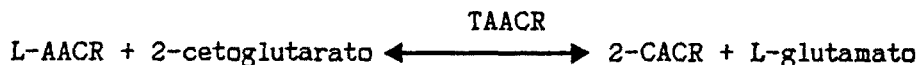
$$\begin{aligned} (DO_1 - DO_0)/t_1 &= v_1 \\ (DO_2 - DO_1)/(t_2 - t_1) &= v_2 \end{aligned}$$

siendo DO_1 las unidades de densidad óptica a tiempo t_1 . A partir de v_1 y v_2 se extrapoló la velocidad a tiempo cero (v_0), y a partir de este valor, del factor diario para el enzima y del peso del tejido utilizado en la preparación del homogenado, se pudo determinar la actividad enzimática de las muestras.

3.1.3.6. TRANSAMINASA DE AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA

Fundamento

La transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada (TAACR) cataliza la transaminación entre los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) leucina, isoleucina y valina y sus correspondientes 2-cetoácidos de cadena ramificada (2-CACR):



El método que se ha utilizado para la determinación de dicha actividad enzimática se fundamenta en que, cuando se utiliza la L-leucina como sustrato, la 2,4-dinitro-fenilhidrazona del 2-ceto-isocaproato puede ser extraída selectivamente con ciclohexano en solución ácida con un exceso de la 2,4-dinitro-fenilhidrazona del 2-cetoglutarato (Jenkins y Taylor, 1970).

Reactivos

- Tampón Tris/2-cetoglutarato: Tris-(hidroximetil)-aminometano 0,2 M + 2-cetoglutarato bisódico 0,02 M, pH 8,6
- L-leucina 20 mM
- Reactivo de la 2,4-dinitro-fenilhidrazina (DNFH): 600 mg de DNFH fueron triturados con 34 ml de HCl concentrado; el volumen resultante se llevó hasta 200 ml por adición lenta de agua destilada, y finalmente se clarificó la solución por filtración.
- NaOH 1 N
- Ciclohexano
- Suspensión de Na_2CO_3 0,95 M
- Solución patrón de 2-ceto-isocaproato 25 mM

Procedimiento

El método se basa en incubar las muestras en condiciones óptimas, parando la reacción a distintos tiempos con el reactivo de la DNFH, y separando la 2,4-dinitro-fenilhidrazona del 2-ceto-isocaproato para su determinación colorimétrica.

En una serie de tubos de ensayo se puso 1 ml de tampón Tris/2-cetoglutarato y 0,5 ml de L-leucina, y una vez equilibrada la temperatura a 37°C se añadieron 0,5 ml de la muestra de homogenado convenientemente diluido. A los 0, 10 y 20 minutos se tomaron alícuotas de 0,5 ml de la mezcla de incubación, que se llevaron a tubos Pyrex con tapón de rosca con 0,5 ml de reactivo de la DNFH para detener la reacción, dejándose durante 10 minutos a temperatura ambiente para que precipitase la hidrazona del 2-cetoglutarato. Seguidamente se añadieron 3 ml de ciclohexano y se agitaron vigorosamente los tubos durante 20 segundos, procediéndose a continuación a una centrifugación de 10 minutos a 1000 g. De la fase superior se tomaron 2 ml que se llevaron a otro tubo Pyrex con tapón de rosca que contenía 1,5 ml de Na_2CO_3 0,95 M, y se agitaron durante 5 minutos por inversión (24 ciclos/min), centrifugándose a 1000 g durante 15 minutos. De la fase inferior se tomó 1 ml, añadiéndose 1 ml de NaOH 1 N y, después de agitar, se procedió a la lectura de la densidad óptica a 440 nm a los 5 minutos.

Cálculos

Paralelamente al procesamiento de las muestras, se confeccionó un banco de diluciones de 2-ceto-glutarato, de composición idéntica a las muestras pero sustituyendo éstas por un volumen equivalente de medio de homogenización, de forma que en cada tubo de la serie patrón se añadió:

- 250 µl de tampón Tris/2-cetoglutarato
- 125 µl de L-leucina
- 125 µl de medio de homogenización

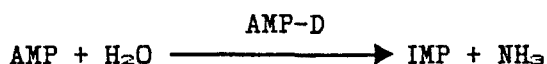
- 0-25 µl de 2-ceto-isocaproato (0-625 nmoles/tubo)

A partir de dicha serie patrón se procedió al cálculo de la actividad enzimática de la forma que se ha indicado en el apartado 3.1.3.5.

3.1.3.7. ADENILATO-DESAMINASA

Fundamento

La adenilato-desaminasa cataliza la transformación del AMP en IMP y NH_3 :



El presente método se basa precisamente en la determinación colorimétrica del NH_3 formado después de incubar las muestras en condiciones adecuadas. Para ello se hace reaccionar el NH_3 con fenol e hipoclorito en presencia de nitroprusiato, de acuerdo con el método de Berthelot (1859) perfeccionado por Fawcett y Scott (1960).

Las condiciones de incubación utilizadas son las descritas por Ogasawara et al. (1975). En el medio de homogenización se puso una elevada concentración de KCl, ya que el ión potasio es un activador del enzima (Lowenstein, 1972), y además el KCl facilita la disolución de las proteínas estructurales musculares, entre las que se encuentra la AMP-desaminasa.

Reactivos

- Tampón de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 66,6 mM con KCl 1 M, pH 7,4
- AMP sódico 75 mM
- Alcohol octílico
- Ácido tricloroacético 0,9 M
- Solución patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 mM

Procedimiento

El método consiste en incubar la muestra en condiciones óptimas, parando la reacción a distintos tiempos por precipitación de las proteínas con el ácido tricloroacético y valorando el NH_3 formado por el método del indofenol.

En tubos de ensayo se pusieron 0,75 ml de tampón fosfatos + KCl, 0,5 ml de AMP y 0,1 ml de alcohol octílico. Los tubos se dejaron en un baño a 37°C con agitación continua, dejándolo unos minutos para estabilizar la temperatura. La reacción se inició por adición de 0,25 ml de la muestra de homogenado convenientemente diluida, y se extrajeron a los 0, 8 y 16 minutos alícuotas de 0,5 ml de la mezcla, pasándolas a tubos de centrifuga que contenían 0,5 ml de ácido tricloroacético y que se mantenían en un baño de hielo.

Una vez detenida la incubación se centrifugaron los tubos a 1500 g durante 30 minutos a 4°C, y de los sobrenadantes se tomaron 0,5 ml que se transfirieron a tubos de ensayo mantenidos en un baño de hielo y tapados con Parafilm para evitar las pérdidas del NH_3 formado. Si las muestras no se valoraban el mismo día se guardaban tapadas y congeladas a -30°C.

La determinación del NH_3 es similar a la descrita para el caso de la urea (vease apartado 3.1.6.2) aunque con pequeñas modificaciones. A los 0,5 ml de sobrenadante se le añadieron 0,1 ml de NaOH 2,3 N para conseguir un pH óptimo, y se le añadieron seguidamente 2 ml de reactivo A y 2 ml de reactivo B, agitándolos y dejándolos reposar durante un tiempo mínimo de 2 horas, pasadas las cuales se leyó la densidad óptica a 590 nm.

Cálculos

Paralelamente al procesamiento de las muestras, se confeccionó un banco de diluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de composición idéntica a las muestras pero sustituyendo estas por un volumen equivalente de medio de homogenización, de forma que a cada tubo de la serie patrón se le añadieron:

- 125 μl de tampón de fosfatos + KCl
- 250 μl de ácido tricloroacético
- 85 μl de AMP
- 40 μl de medio de homogenización
- 0-25 μl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-400 nmoles/tubo)

A partir de esta curva patrón se procedió al cálculo de la actividad enzimática de la forma que se ha indicado en el apartado 3.1.3.5.

3.1.3.8. OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Aparte de la actividades enzimáticas anteriormente citadas, también se estudiaron las actividades de la arginasa y de la serina deshidratasa.

Arginasa

Se utilizó el método de Schimke (1970a), preincubando las muestras con iones Mn^{2+} a 55°C durante 5 minutos, y determinándose colorimétricamente la urea formada a los 0, 8 y 16 minutos por formación de complejos coloreados al reaccionar con la 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima en medio ácido (Oginsky, 1969).

Serina deshidratasa

Se utilizó el método de Friedman y Haugen (1943), modificado por Suda y Nakagawa (1970) y determinando colorimétricamente la osazona del piruvato formado a los 0, 8 y 16 minutos.

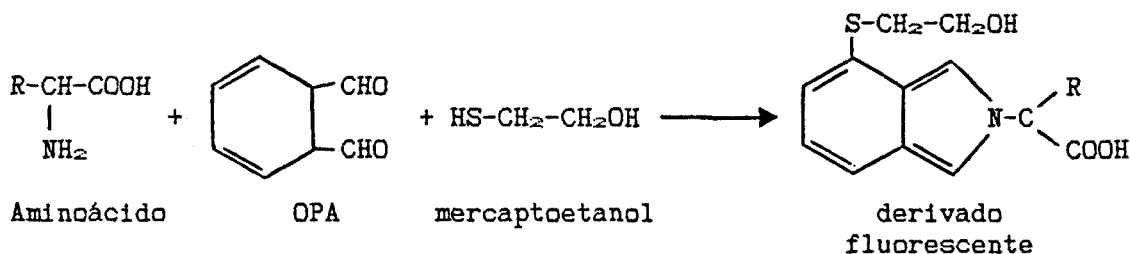
3.1.4. DETERMINACION DE AMINOACIDOS LIBRES

Fundamento

El método de autoanálisis de aminoácidos se basa en la capacidad de estos compuestos de quedar retenidos en una resina de intercambio iónico de tipo catiónico como fase estacionaria, y su posterior elución en un gradiente de pH (Morris y Morris, 1976). Cuando el pH del tampón utilizado como fase móvil coincide con el punto isoelectrico de un aminoácido, éste es arrastrado fuera de la columna. Pese a todo existen ciertas desviaciones entre el pH del tampón y el valor correspondiente al punto isoelectrico,

especialmente en el caso de los aminoácidos sulfurados y de los aromáticos, como consecuencia de interacciones con la resina.

La detección utilizada en nuestro caso es de tipo fluorimétrico, y se lleva a cabo con el ortoftaldehído (OPA) (Roth, 1971; Lee y Drescher, 1978), con el que los aminoácidos reaccionan de la siguiente manera:



La detección fluorimétrica es más sensible (en términos generales hasta 2 nanomoles) que la reacción colorimétrica de la ninhidrina, aunque la fluorescencia de los productos resultantes no es uniforme, lo que obliga a la corrección individualizada de cada aminoácido por su correspondiente valor de ϵ .

Preparación de las muestras

Como agente desproteínizante se utilizó el ácido tricloroacético 0,6 M, pues se ha comprobado que no interfiere en la detección de ningún aminoácido (a diferencia del ácido sulfosalicílico, que por su tiempo de retención puede interferir con la taurina) y además no afecta a las recuperaciones de los distintos aminoácidos.

a) Muestras de sangre y plasma:

Se mezclaron 100 μl de sangre o de plasma con 100 μl de ácido tricloroacético 0,6 M, agitando enérgicamente. En el caso de las muestras de sangre resultó conveniente efectuar una sonicación previa de 30 segundos (a 20 kHz y 180 W) para facilitar la lisis total de las células y para evitar la presencia de pequeños coágulos que pudiesen dificultar el pipeteado.

b) Muestras de tejido:

Se trituro la muestra de tejido en un mortero con nitrógeno líquido, tomándose unos 150 mg de tejido pulverizado, que se mezclaron con 1 ml de ácido tricloroacético 0,6 M en el tubo de un homogenizador tipo Tenbroeck de vidrio, siendo seguidamente homogenizados en frío.

Tanto en el caso de las muestras de plasma y sangre como en las de tejido, los tubos (que se mantuvieron en todo momento en un baño de hielo), se centrifugaron a 1500 g durante 30 minutos a 4°C. Del sobrenadante se tomo una alícuota de 75 μl , guardándose a -40°C hasta el momento de efectuar las determinaciones. En este momento se añadieron a las muestras 75 μl de una solución de norleucina 100 μM (patrón interno), inyectándose finalmente la mezcla resultante en el autoanalizador.

Aparatos y material

Las determinaciones de aminoácidos fueron realizadas en el Servicio de Análisis de Aminoácidos de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. Este servicio dispone de un aparato Rank-Hilger, que consta de los siguientes módulos:

- Unidad cromatográfica CHROMASPEK S 180, que permite separar los diferentes aminoácidos mediante una columna de intercambio iónico.
- Fluorímetro S 143, que forma parte de la unidad cromatográfica, y que lleva a cabo la detección fluorimétrica de los aminoácidos.
- Registrador CDS 111C, que realiza el registro gráfico de la elución y de la detección fluorimétrica del aminograma.
- Integrador VARIAN CDS, que cuantifica el área de los picos del aminograma.

Condiciones de trabajo

- Columna: de acero inoxidable 136 de 350 mm de largo.
- Resina: de poliestireno sulfonado (ácido fuerte) de 5-6 μm de diámetro y cargada en forma de Li^+ (Rank-Hilger).
- Soluciones amortiguadoras:
 - tampón ácido I: ácido cítrico y cloruro de litio, pH 2.
 - tampón ácido II: ácido cítrico, metanol y tiodiglicol, pH 2.
(para el lavado de la columna durante los 5 primeros minutos)
 - tampón básico: ácido cítrico, LiOH , ácido bórico y EDTA, pH 12.
- Gradiente: sigmoidal de pH 2,5 a 12.
- Flujo: $215 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
- Tiempo de elución: 4 horas.
- Temperatura: Controlada por termostato: 40°C de 0-70 min., 60°C de 70-150 min., y 40°C de 150-240 min.
- Volumen inyectado: 75 μl de muestra.

Cuantificación

Se utilizaron dos tipos de patrones:

- Patrón interno: se utilizó a tal fin la norleucina, aminoácido que no se encuentra entre los naturales, con una concentración final de 50 μM en cada muestra.
- Patrón externo: solución de 22 aminoácidos a una concentración 50 μM de cada uno, salvo en el caso del cisteato (25 μM), con norleucina 50 μM . Este patrón se valoraba cada día para calcular el factor de recuperación para cada aminoácido en función de las condiciones de la columna y de la respuesta variable de cada uno con respecto a la fluorescencia.

Con el patrón externo se calculaba la relación de cada aminoácido con respecto a la norleucina, lo que nos servía para establecer la correlación de los datos obtenidos en cada muestra:

$$K_n = \frac{A_{\text{AAn}} \times [\text{P NLeu}]}{A_{\text{NLeu}} \times [\text{P AAn}]}$$

donde K_n es la relación de la reactividad (fluorescencia) de cada aminoácido con respecto a la norleucina, A_{AAn} es el área del pico del

aminoácido "n" y A'NLeu la del pico de norleucina. Las concentraciones se refieren a la solución patrón de norleucina [P NLeu] y del aminoácido "n" [P AAn].

Como para cada muestra teníamos el área correspondiente a la norleucina (de concentración conocida) y el área problema de los diferentes aminoácidos, la concentración del aminoácido "n" en el problema resultaba:

$$[AAn] = \frac{A'AA_n}{A'NLeu} \times K_n \times [NLeu]$$

donde A'AA_n y A'NLeu son las áreas de los picos del aminoácido "n" y la norleucina en el problema, y [NLeu] la concentración de este último aminoácido añadida como patrón interno.

Una vez obtenida la concentración del aminoácido en el problema y teniendo en cuenta la cantidad de muestra inyectada y las diluciones realizadas, se obtiene el resultado que se expresa en micromoles por litro de sangre o plasma o por kilogramo de tejido.

3.1.5. DETERMINACIONES EN TEJIDOS

3.1.5.1. DETERMINACION DE PROTEINAS

Fundamento

Se utilizó el método de Lowry et al. (1951), posteriormente modificado por Zak y Cohen (1961). Este método está basado en la formación de complejos entre el ión Cu²⁺ y el EDTA, fijándose a los pares de enlaces peptídicos consecutivos de las proteínas (reacción del biuret), dando lugar a una coloración violeta. El conjunto reacciona con el el reactivo de Folín-Ciocalteau (ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico) dando color azul por el efecto reductor del complejo cobre-proteínas. Finalmente, el mismo reactivo puede reaccionar con los restos tirosinil de la cadena polipeptídica, dando color azul por reducción del fosfomolibdato en medio básico (Folín y Ciocalteau, 1927). La lectura de la densidad óptica puede efectuarse en el margen de longitudes de onda comprendido entre 500 y 700 nm.

Reactivos

- Solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA), fracción V de Cohen, al 1% en NaOH 0,1 N.
- Reactivo A: preparado de la siguiente forma:
 - 148,8 mg de CuSO₄·5H₂O
 - 201,7 mg de EDTA-Na₂
 - 0,3 ml de NaOH 2 M

Después de llevarlo a 800 ml con agua destilada se añadió:

- 20 g de Na₂CO₃
- 50 ml de NaOH 2 M

Finalmente se enrasaba a 1 litro con agua destilada.

- Reactivo B: Reactivo de Folín-Ciocalteau 1 M (Panreac) diluido 1:1 con agua destilada.
- NaOH 0,1 N

Procedimiento

Se diluyeron los homogenados con NaOH 0,1 N. De cada una de las muestras diluidas se tomó 1 ml y se le añadieron 2 ml del reactivo A, agitando y dejando reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadieron 0,2 ml del reactivo B, agitando y esperando 15 minutos para que se desarrollase el color. La lectura de la densidad óptica se hizo a 500 nm.

Patrón

Paralelamente a las muestras se realizó el proceso con una serie patrón de proteínas, con valores comprendidos entre 0 y 200 µg de proteína por tubo.

3.1.5.2. DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES

Fundamento

La determinación del contenido en lípidos totales se efectuó por extracción de los mismos, seguida de su cuantificación gravimétrica, de acuerdo con el método de Folch et al. (1957).

Procedimiento

Extracción: Se tomaron fragmentos de unos 150 mg de tejido y se colocaron en tubos de rosca (tubo A) con 3 ml de una mezcla de cloroformo y metanol (2:1, en volumen), tapándose con tapones de rosca con membrana de teflón. Los tubos se agitaron por inversión durante 6 horas a 24 ciclos/min., tras los que se centrifugaron a 1500 g durante 10 min. La fase orgánica se transfirió a otro grupo de tubos de rosca (tubo B). El proceso se repitió dos veces más añadiéndose 3 ml al tubo A, enrasándose finalmente el tubo B a 10 ml con cloroformo-metanol.

Purificación: Al extracto de lípidos del tubo B se le añadieron 2 ml de agua destilada, agitándose durante 15 minutos para desplazar las sustancias hidrosolubles no lipídicas a la fase de agua/metanol. Para separar esta fase de la de cloroformo se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos, descartándose la fase superior de agua/metanol con una pipeta Pasteur. El contenido del tubo se enrasó a 10 ml con metanol.puro. Este mismo proceso se repitió dos veces más pero con NaCl al 0,9% en lugar de agua destilada para reestablecer la fuerza iónica del medio. El extracto obtenido tras este proceso, formado por lípidos libres de sustancias hidrófilas, fue llevado a un recipiente ligero de hoja de aluminio previamente tarado, procediéndose a la evaporación total del cloroformo-metanol en una estufa a 60°C, pesando finalmente el recipiente para conocer el peso de los lípidos totales por diferencia.

3.1.5.3. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AGUA TISULAR

Para conocer el contenido en agua de los tejidos, se tomaron fragmentos de unos 150 mg, desecándolos sobre un fragmento de hoja de

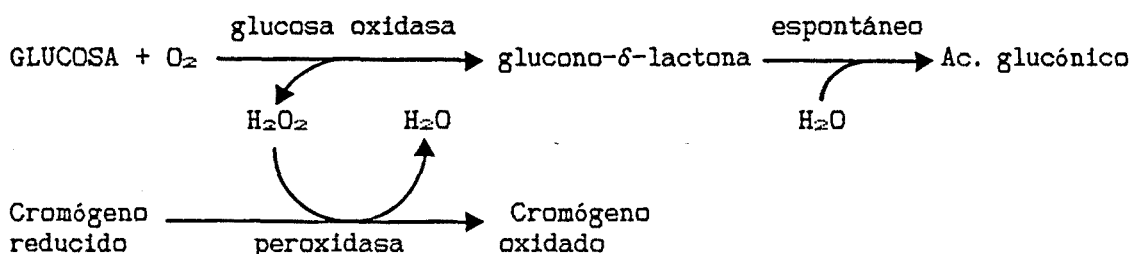
aluminio en la estufa a 100°C durante 72 horas, determinándose el contenido de agua por diferencia entre los pesos inicial y final.

3.1.6. DETERMINACIONES EN SANGRE Y PLASMA

3.1.6.1. DETERMINACION DE GLUCOSA

Fundamento

El método utilizado fue el descrito por Hugget y Nixon (1957). Dicho método está basado en la oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa, reacción en la que se produce peróxido de hidrógeno la cual, en presencia de una peroxidasa, oxida un cromógeno (o-dianisidina) que pasa de incoloro a amarillo-marrón en medio ácido, al tiempo que el ácido detiene la actividad enzimática. La intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. Las lecturas de densidad óptica se realizaron a 415 nm.



Reactivos

- Tampón de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 0,2 M, pH 7,4
- HCl 3 N
- Solución patrón de glucosa al 5,5 mM en solución saturada de ácido benzoico
- Solución enzimas-cromógeno (Sigma), preparada diariamente:
 - 1) El contenido de una cápsula con el enzima liofilizado (PGO) y el cromógeno (o-dianisidina) se disolvían por separado en 4 ml de agua destilada.
 - 2) Para preparar la solución de trabajo, en una probeta de 100 ml se ponía 50 ml de agua destilada y a continuación se añadían 3 ml del tampón de fosfatos, 1 ml de la solución de enzimas y 1 ml de la solución de cromógeno, enrasándose hasta 100 ml con agua destilada y agitando por inversión.

Procedimiento

Desproteinización de las muestras

Se utilizó la técnica descrita por Somogyi (1945), que permite la obtención de muestras de sangre y plasma libres de proteínas. Este método está basado en la formación de un precipitado finamente dividido en la reacción:



Dada la propiedad adsorbente de dicho precipitado, al centrifugar se consigue su desaparición, quedando un sobrenadante neutro y transparente, libre a la vez de proteínas y de agentes desproteinizantes.

Para llevar a cabo la desproteinización se tomaron 100 µl de las muestras de sangre y plasma y se pusieron en tubos de centrifuga con 700 µl de agua destilada (manteniéndolos en todo momento en un baño de hielo), agitando por inversión. Seguidamente se añadieron 100 µl de ZnSO_4 0,2 M y 100 µl de Ba(OH)_2 0,2 M, agitándose cada vez por inversión. Finalmente se centrifugaron los tubos a 1500 g durante 30 minutos a 4°C, guardándose los sobrenadantes a -40°C.

Determinación de la glucosa

En tubos pequeños de vidrio se pusieron 100 µl de las muestras de sangre o plasma desproteinizadas. A cada tubo se le añadieron 250 µl de tampón de fosfatos y 1 ml de la solución de enzimas-cromógeno, procediéndose a agitar bien el conjunto. Se dejó reposar durante 45 minutos exactos a temperatura ambiente, para que tuviese lugar el proceso enzimático. Pasado este tiempo se añadieron a cada tubo 250 µl de HCl 3 N, para detener la reacción y dar lugar a la aparición del color, cronometrando el proceso para que todos los tubos fuesen incubados el mismo tiempo. Pasados 5 minutos desde la adición del ácido, se procedió a la lectura de sus densidades ópticas a 415 nm.

Patrón

Paralelamente al procesamiento de las muestras, se realizó el proceso con una serie patrón de glucosa, con concentraciones comprendidas entre 0 y 222 nmoles de glucosa por tubo.

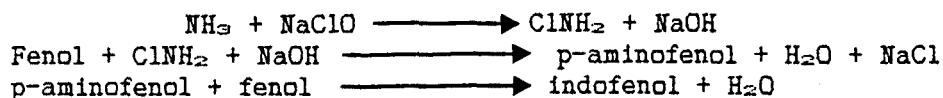
3.1.6.2 DETERMINACION DE UREA

Fundamento

El método utilizado es el descrito por Fawcett y Scott (1960), basado en la conversión enzimática de la urea en NH_3 por acción de la ureasa:



El NH_3 obtenido se valora por el método del indofenol, basado en la capacidad del NH_3 de reaccionar con el fenol y el hipoclorito sódico alcalino en presencia de cantidades catalíticas de nitroprusiato sódico, dando lugar a indofenol, de forma que el color azul tendrá una intensidad proporcional a la cantidad de NH_3 y, por lo tanto, a la de urea presente en la muestra. La secuencia de reacciones es:



Reactivos

- ureasa
- Reactivo A: fenol 53 mM + nitroprusiato sódico 85 μ M
- Reactivo B: NaOH 62,5 mM + NaClO 5,5 mM
- Solución patrón de urea 4 mM

Procedimiento

Las muestras de plasma se diluyeron 1:80 con agua destilada. De esta dilución se tomaron alícuotas de 250 μ l para su determinación. A cada tubo se le añadieron 0,1 ml de la solución de ureasa, tapándose rápidamente con Parafilm, para evitar que se escapase el NH_3 formado, y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Para detener el proceso se enfriaron las muestras introduciéndolas en un baño de hielo.

Para efectuar la determinación se añadieron a cada tubo 2 ml del reactivo A y, simultáneamente, 2 ml del reactivo B, mezclando por agitación y dejándolos a temperatura ambiente un mínimo de 2 horas para que se desarrollase el color, procediéndose posteriormente a la lectura de las densidades ópticas a 590 nm.

Patrón

Paralelamente al procesamiento de las muestras, se realizó el proceso con una serie patrón de urea, con concentraciones comprendidas entre 0 y 300 nmoles por tubo.

3.1.6.3 DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS LIBRES

Fundamento

El método utilizado fue el descrito por Falholt et al. (1973), basado en la formación de color como resultado de la reacción de los ácidos grasos libres con una solución de cobre-trietanolamina, color que se obtiene con la ayuda de la difenil carbazida.

Este método precisa que todo el material que se utiliza haya sido lavado durante 10 a 12 horas con HCl al 5% con posterior aclarado con agua destilada y secado a la estufa, con el fin de evitar posibles contaminaciones.

Reactivos

- Cloroformo-heptano-metanol (25:25:1) (redestilados recientemente)
- Tampón de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,3 M, pH 6,4
- Trietanolamina 1 N, pH 10,5
- Solución patrón de ácido palmítico 2 mM en cloroformo-heptano-metanol

Se prepararon diariamente las siguientes soluciones de trabajo:

- Solución de nitrato de cobre-trietanolamina:
 - 6 ml de nitrato de cobre 0,5 N
 - 6 ml de trietanolamina 1 N
 - 49,5 ml de agua destilada
 - 4,2 ml de NaOH 1 N

- 19,8 g de NaCl

Se ajustaba el pH a 8,1 con HNO_3 diluido.

- Solución de difenil carbazida:

Se preparaba una solución de difenil carbazida 16,5 mM en etanol; para ello se disolvían 0,1 g de difenil carbazida (1,5-difenil carbohidrazida) en etanol al 99% hasta 25 ml, agitando y calentando suavemente. Poco antes de utilizarla se añadían 0,1 ml de trietanolamina 1 N.

Procedimiento

Como primera etapa se procedió al fraccionamiento de los lípidos, con el fin de obtener los ácidos grasos libres. Para ello se pusieron 100 μl de la muestra de plasma en tubos Pyrex de rosca, y se añadieron 6 ml de la solución de cloroformo-heptano-metanol y 1 ml de tampón fosfato, agitando por inversión durante 15 minutos (24 ciclos/min.). Este mismo proceso se repitió para cada uno de los puntos de la patrón de ácido palmítico. Una vez agitados los tubos, se dejaron reposar durante 15 minutos y se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante. De la fase inferior se tomaron 5 ml que se transfirieron a una segunda serie de tubos Pyrex que contenían 2 ml de la solución de cobre-trietanolamina, agitándolos durante 15 minutos y centrifugándolos seguidamente a 1500 g durante 15 minutos. Del sobrenadante de esta segunda centrifugación se tomaron 3 ml, que se transfirieron a otra serie de tubos que contenían 0,5 ml de la solución de difenilcarbazida; tras mezclarlos bien se dejaron reposar en la oscuridad durante 15 minutos, pasados los cuales se procedió a la lectura de la densidad óptica a 550 nm.

Patrón

Paralelamente al procesado de las muestras, se realizó el proceso con una serie patrón de ácido palmítico, con concentraciones comprendidas entre 0 y 0'1 μmoles por tubo.

3.1.7. DETERMINACION DE LA TASA DE RECAMBIO PROTEICO

Fundamento

Con el fin de disponer de información adicional sobre el metabolismo nitrogenado del TAMI, se procedió a realizar un experimento que permitiese estimar la tasa de recambio proteico, comparándola con la de otros tejidos. Con este fin se utilizó la incorporación de un trazador a las proteínas, calculando la tasa de degradación a partir de la desaparición de las proteínas marcadas "in vivo" tras su administración (Schimke, 1970b).

Esta técnica presenta como principal inconveniente la posible reutilización de los aminoácidos procedentes de la degradación de las proteínas marcadas. Uno de los sistemas empleados para resolver este problema consiste en el empleo de aminoácidos trazadores que tengan una baja probabilidad de ser reutilizados, como es el caso de la L-(guanidino- ^{14}C)-arginina (Swick, 1958; Glais y Doyle, 1969; Bohley et al., 1977), ya que dicho aminoácido es degradado por la arginasa hepática, siendo así eliminado el marcaje en forma de urea a través de la orina.

Reactivos

- L-(guanidino- ^{14}C)-arginina monocloruro (Amersham), 55,3 mCi/mmol
- NCS (Amersham), solución 0,6 N en tolueno.
- Peróxido de hidrógeno 10 M
- Ácido acético 4,5 M
- Acetona

Procedimiento

Administración del trazador y toma de muestras

A 5 ratas Wistar macho de 220 g se les administró al principio del ciclo luminoso una única dosis traza de 10 μCi de L-(guanidino- ^{14}C)-arginina en NaCl 0,15 M (volumen total: 0,5 ml) por vía intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados por decapitación a las 6, 12, 24, 36 y 48 horas desde la administración del trazador, recogiendo seguidamente muestras de TAMI, hígado, músculo estriado, tejido adiposo blanco, riñón y corazón, que fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. La sangre se recogió en un vaso heparinizado y se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos a 4°C para obtener el plasma. Todas las muestras fueron conservadas congeladas a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Procesamiento y conteo

Fragmentos congelados de los distintos tejidos de unos 250 mg fueron homogenizados con agua destilada, y posteriormente los homogenados fueron sonicados durante 30 segundos (a 20 kHz y 180 W) para completar la rotura celular. Una alícuota del homogenado se separó para la determinación de proteínas (vease aptdo. 3.1.5.1), y el resto se desproteinizó con acetona fría, precipitando las proteínas por centrifugación a 1500 g durante 15 minutos a 4°C. Para el plasma se utilizó el mismo procedimiento.

Las proteínas precipitadas fueron solubilizadas con 250 μl de NCS durante 3 horas en un baño a 50°C. Posteriormente las muestras se decoloraron con 200 μl de peróxido de hidrógeno y finalmente se acidificaron con 50 μl de ácido acético 4,5 M. Después de dejarlas en la oscuridad durante 24 horas se procedió al conteo de la radiactividad por centelleo líquido.

Cálculos

Para cada uno de los tejidos se representó gráficamente el logaritmo de la radiactividad específica frente al tiempo, calculándose la recta de regresión correspondiente (en todos los casos el coeficiente de correlación observado fue superior al 90%). A partir de la pendiente de esta recta se calculó la tasa de recambio proteico de cada tejido.

3.2. Parte: ESTUDIO DE LA UTILIZACION DE ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO"

3.2.1. ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de características iguales a las señaladas en el apartado 3.1.1. y sometidas a la misma dieta y condiciones ambientales.

Se estudiaron 4 grupos experimentales:

- CONTROL: animales no sometidos a ningun tipo de tratamiento
- AYUNO: animales sometidos a ayuno en las 36 horas previas al sacrificio.
- FRIO AGUDO: animales expuestos a 4°C durante las 4 horas anteriores al sacrificio.
- FRIO CRONICO: animales expuestos a 4°C durante los 30 días previos al sacrificio.

3.2.2. SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS

Los animales fueron sacrificados entre las 10.00 y las 11.00 horas por decapitación, extrayéndose inmediatamente el TAMI de la forma descrita en el apartado 3.1.2., y dejándolo a continuación en tampón Krebs-Ringer-bicarbonato pH 7,4 a temperatura ambiente.

3.2.3. COMPOSICION DEL MEDIO DE INCUBACION

3.2.3.1. PREPARACION DEL TAMPON

El medio de incubación que se utilizó tenía como base el tampón Krebs-Ringer-bicarbonato (Umbreit et al., 1964), suplementado con 10 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, 5 mmoles/l de D-glucosa, 0,75 mmoles de L-alanina y 0,5 µCi de L-(U-¹⁴C)-alanina, así como las hormonas correspondientes a los distintos casos estudiados.

La composición final del tampón era:

NaCl	120,32 mM
KCl	4,82 mM
CaCl ₂	0,65 mM
KH ₂ PO ₄	1,21 mM
MgSO ₄	1,21 mM
NaHCO ₃	25,39 mM

Es importante señalar que en la preparación del tampón se procedió a la mezcla de las diferentes sales siguiendo el orden indicado, con el fin de evitar la precipitación de las sales de baja solubilidad.

Una vez preparado el tampón, éste se gaseó durante 30 minutos con carbógeno (O₂/CO₂ 95:5) y se ajustó el pH de manera que estuviese comprendido entre 7,35 y 7,45. A continuación se suplementó el medio con 10 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos, cuya función era la de captar los ácidos grasos liberados por el tejido durante la incubación, evitando así su acumulación en el medio y los consiguientes efectos de inhibición de la lipólisis tisular (Herrera, 1973)

3.2.3.2. PREPARACION DE LAS HORMONAS

Los presentes estudios "in vitro" se realizaron en presencia de distintas hormonas en el medio de incubación, concretamente insulina, glucagón y noradrenalina.

Insulina

Se utilizó insulina de páncreas porcino (Novo Industri A/S), con una concentración inicial de 40 UI/ml. Esta solución original fue diluida el día del experimento utilizando un tampón fosfatos-albúmina, que tenía la siguiente composición:

1,55 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2,25 g de NaCl
250 mg de albúmina bovina libre de ácidos grasos

llevándolo a 200 ml con agua desionizada y, tras ajustar a pH 7,4 con NaOH, se llevaba hasta un volumen final de 250 ml con agua desionizada.

En 10 ml de este tampón se diluyeron 100 μl de la solución original, y de la solución resultante se tomaron 100 μl que se diluyeron en 10 ml de tampón de Krebs-Ringer-bicarbonato, tomando finalmente 50 μl por cada ml de medio de incubación (conc. final: 0,2 mUI/ml).

Noradrenalina

Se utilizó bitartrato de noradrenalina (Arterenol, Sigma). En el momento previo a la incubación se preparó una solución de 18,9 mg de Arterenol en 25 ml de tampón de Krebs-Ringer-bicarbonato, utilizando recipientes de color ámbar con el fin de evitar la foto-oxidación de la noradrenalina. La solución resultante se diluyó 1:40, tomando 125 μl de la misma y llevándolos hasta 5 ml. De la solución resultante se tomaron 50 μl por cada ml de medio de incubación (conc. final: 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

Glucagón

Algunos de los experimentos realizados en este apartado se efectuaron en presencia de glucagón en el medio de incubación. Se utilizó clorhidrato de glucagón (Novo Industri A/S), diluido con tampón de Krebs-Ringer-bicarbonato a las concentraciones deseadas.

3.2.4. PROCESO DE INCUBACION "IN VITRO"

Una vez extraído y libre de tejidos contaminantes, el TAMI se trocó con unas tijeras finas en pequeños fragmentos de unos 3-5 mg, excepto un trozo de tejido que se congeló con nitrógeno líquido, para determinar posteriormente el contenido en proteínas del tejido. De los trozos obtenidos se pesaron 5 fragmentos (unos 20 mg en total), que se colocaron en viales de vidrio que contenían 1 ml de tampón de Krebs-Ringer-bicarbonato con albúmina al 1%.

La incubación se inició por adición simultánea de la solución de hormonas, glucosa y alanina- ^{14}C + alanina "fría", tapándose seguidamente los

viales con tapones de goma que aseguraban un cierre hermético, y de los que colgaban unas cápsulas de plástico con un papel de filtro (de 8 x 125 mm) enrollado en su interior. La incubación se llevó a cabo en un baño metabólico a 37°C y con agitación continua (80 ciclos/min). Todos los viales se gasearon durante los 5 primeros minutos de incubación con carbógeno, por medio de agujas hipodérmicas clavadas en los tapones.

Una vez pasado el tiempo de incubación, que en general fue de 20 minutos, los viales se colocaron sobre hielo picado y se les inyectó, por medio de una jeringa con aguja larga, 500 µl de ácido perclórico 3 N y, seguidamente y por el mismo procedimiento, 200 µl de hidróxido de hiamina (hidróxido de metilbencetonio 1 M en metanol) (Amersham/Searle), esta vez sobre el papel de filtro situado en la cápsula de plástico. Los viales fueron incubados durante 1 hora más a temperatura ambiente y con agitación suave, con el fin de que el $^{14}\text{CO}_2$ formado fuera captado por el hidróxido de hiamina. Pasado este tiempo se destaparon los viales y se inició el proceso de cuantificación de la radiactividad incorporada al tejido o al CO_2 formado.

En cada serie diaria se procedió a la incubación de viales "blanco", en los que todo el proceso se efectuaba como en el caso de las muestras pero deteniendo el proceso a tiempo cero, es decir en el momento de añadirle el sustrato radiactivo. Los valores hallados en esta serie "blanco" se restaron a los obtenidos en las diferentes muestras.

3.2.5. VALORACION DEL $^{14}\text{CO}_2$

Una vez abiertos los viales se tomaron con unas pinzas los papeles impregnados con el hidróxido de hiamina y se introdujeron en viales de conteo de radiactividad a los que se añadieron 10 ml de líquido de centelleo, siendo agitados a continuación. El proceso de conteo de las muestras se efectuó entre las 8 y las 24 horas desde el final de la incubación, ya que tiempos más cortos daban lugar a una sobrevaloración de las cpm de la muestra por efecto de la quimioluminiscencia, y tiempos más largos provocaban un amarilleamiento de las muestras, con la consiguiente pérdida de eficiencia. Hasta el momento del conteo los viales se mantuvieron en la oscuridad (Kalbhen, 1967).

Al valor de dpm obtenido para cada muestra se le restó el correspondiente al "blanco" de la incubación correspondiente, para conocer de esta manera las dpm en forma de $^{14}\text{CO}_2$ procedentes de la oxidación de la alanina.

3.2.6. VALORACIONES EN TEJIDO

Con ayuda de unas pinzas se extrajeron de los viales de incubación los fragmentos de tejido, que se colocaron sobre filtros en un sistema multifiltro conectado a una bomba de vacío. Seguidamente se lavaron 5 veces con NaCl 0,15 M para eliminar los restos de medio de incubación, y a continuación se procesaron para determinar la incorporación de la radiactividad de la ^{14}C -alanina en las distintas fracciones tisulares.

3.2.6.1. ^{14}C -LÍPIDOS TOTALES Y ^{14}C -HIDROSOLUBLES

La extracción de la fracción de lípidos totales se efectuó de la forma señalada en el apartado 3.1.5.2., con el método de Folch et al. (1957).

Después de tres extracciones con cloroformo-metanol (2:1) y enrase a 10 ml, se procedió a la purificación de los lípidos extrayendo las sustancias hidrosolubles, para lo que se hizo un primer lavado con agua destilada y dos más con NaCl 0,15 M. Estos lavados fueron llevados a un tubo Pyrex de rosca y enrasados a 15 ml con metanol. De esta fracción de hidrosolubles se efectuó el conteo de una alícuota de 3 ml, que fue llevada a un vial de conteo con 9 ml de líquido de centelleo.

Del extracto de lípidos totales ya purificados se tomó una alícuota de 5 ml, que se llevo a sequedad en un vial de conteo en un baño a 37°C y con una corriente de nitrógeno. Una vez evaporado todo el cloroformo-metanol se añadieron 6 ml de líquido de centelleo y se procedió al conteo de las muestras.

3.2.6.2. ^{14}C -ÁCIDOS GRASOS Y ^{14}C -GLICEROL DE GLICERIDOS

Con el fin de determinar la radiactividad presente en los ácidos grasos (libres o esterificados) y en el glicerol de glicéridos, se llevó a cabo el siguiente protocolo de fraccionamiento de los lípidos totales, basado en el método de Kerpel et al. (1961).

^{14}C -Ácidos grasos

Se tomó una alícuota de 5 ml del extracto de lípidos purificado en un tubo de 10 ml y se llevó a sequedad en un baño a 37°C y con una corriente de nitrógeno. Una vez eliminados todos los restos de cloroformo-metanol, se saponificaron con 5 ml de una solución de KOH 1 M en etanol al 5%, preparada recientemente. Los tubos se cerraron y se llevaron a un baño a 100°C durante 1 hora, para obtener así las sales potásicas (jabones) de los ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de los triacilgliceroles y fosfolípidos principalmente. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les añadieron 2 ml de H_2SO_4 5 N, con el fin de transformar las sales potásicas en ácidos grasos libres. Estos se extrajeron por 2 veces con 3 ml de heptano, agitando por inversión durante 20 minutos cada vez, centrifugando y pasando la fase orgánica superior con una pipeta Pasteur a los viales de conteo. Finalmente se procedió a secar los viales con una corriente suave de nitrógeno seco, y se resuspendió el residuo con 6 ml de líquido de centelleo, para proceder al conteo de la radiactividad correspondiente a los ^{14}C -ácidos grasos.

^{14}C -Glicerol de glicéridos

Para conocer la radiactividad correspondiente a la fracción de glicerol de glicéridos se procedió a sustraer al valor de radiactividad incorporada a lípidos totales el correspondiente al incorporado en la fracción de los ácidos grasos.

3.2.6.3. RESIDUO SECO DESLIPIDADO

El residuo seco que queda después de la extracción de los lípidos se secó con una corriente de nitrógeno de todo resto de cloroformo-metanol. Una vez bien seco se humedeció con 100 µl de agua destilada y a continuación se le añadieron 250 µl del solubilizador de tejidos NCS (Amersham) (Hansen y Bush, 1967), dejando los tubos tapados en un baño a 50°C durante 3 horas con agitación periódica, consiguiéndose así la plena solubilización del tejido. La solución transparente resultante se decoloró con 200 µl de peróxido de hidrógeno 10 M (Herberg, 1960), dejándolo otros 30 minutos a 50°C. Finalmente se añadieron 50 µl de ácido acético 4,5 M como agente acidificante para neutralizar la quimioluminiscencia. Una vez se enfriaron los tubos se transfirió su contenido a los viales de contaje de radiactividad, a los que se añadieron 10 ml de líquido de centelleo. Antes de contar las muestras, éstas permanecieron durante 24 horas en la oscuridad, para reducir al máximo los efectos de la quimioluminiscencia (Turner, 1971).

3.2.7. CONTAJE DE LA RADIATIVIDAD

La radiactividad de las muestras se determinó en un contador de centelleo líquido Packard, tipo TriCarb, modelo 460 C, dotado de una fuente control de radiación gamma de ^{226}Ra de 10 µCi. Todas las muestras se contaron durante un mínimo de 5 minutos, y se les restó el valor correspondiente al "ruido de fondo", determinado con viales con líquido de centelleo y sin radiactividad añadida.

3.2.7.1. LIQUIDO DE CENTELLEO

El líquido de centelleo utilizado tenía la siguiente composición por litro de solución (Turner, 1971):

750 ml de xileno
3 g de PPO (2,5-difeniloxazol)
100 mg de POPOP (1,4-bis-(2-(5-feniloxazolil))-benceno)
250 ml de tritón X-100

Para prepararlo se disolvieron el PPO y el POPOP en xileno por agitación durante 12 horas, añadiendo posteriormente el tritón X-100 y dejándolo con agitación hasta conseguir una mezcla uniforme. El líquido se mantuvo en todo momento en la oscuridad para evitar su posible descomposición parcial por acción de la luz. Este líquido permite el contaje tanto de muestras liposolubles como hidrosolubles; en este último caso siempre que sea posible la acción detergente del tritón X-100 en función de la proporción de muestra y de líquido de centelleo (Patterson y Greene, 1965).

3.2.7.2. CALCULO DE LA EFICIENCIA

El contador nos proporciona para cada muestra un valor de radiactividad expresado en cuentas por minuto (cpm), que depende de la radiactividad de la muestra y de las condiciones en el vial de contaje. Debido al fenómeno del "enmascaramiento" de las muestras hay una pérdida en

la detección de las cpm a partir de las dpm originales, por interferencia en la producción de luz y en la transmisión de la energía lumínica dentro del líquido de centelleo. Por lo tanto para conocer las dpm de la muestra es necesario conocer la eficiencia del conteo. Para ello se seleccionaron dos canales (A y B) de distinto rango de energía, de forma que para cada muestra se pudiera conocer la relación de canales (R) frente a una fuente de radiación gamma constante (patrón externo) y la correspondiente curva de eficiencia. Esta curva se construyó periódicamente a partir de una serie de viales con 51.000 dpm de ^{14}C -tolueno, de forma que cada uno tenía distinto grado de enmascaramiento por la presencia de concentraciones crecientes de un agente enmascarador, concretamente cloroformo. A partir del conteo de estos viales, el contador construyó la curva de eficiencia (relación entre cpm detectadas y dpm presentes) frente a la relación de canales R (relación de las cpm contadas en los canales A y B debidas a la acción exclusiva del patrón externo). Así, la relación de canales sería:

$$R = \frac{A_{+P} - A_{-P}}{B_{+P} - B_{-P}} = \frac{\Delta A}{\Delta B}$$

siendo A_{+P} y B_{+P} las cpm con el patrón interno y A_{-P} y B_{-P} las cpm sin el patrón interno. Para cada muestra se determinó sobre la curva obtenida la eficiencia a partir de la relación R y las cpm, calculándose las dpm a partir de la fórmula $\text{dpm} = \text{cpm} / \epsilon$.

3.3. Parte 3: ESTUDIO DE LA CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS Y GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VIVO".

3.3.1. ANIMALES Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de características iguales a las señaladas en el apartado 3.1.1.

Se estudiaron 4 grupos experimentales:

- CONTROL: animales no sometidos a ningún tipo de tratamiento.
- AYUNO: animales sometidos a ayuno las 36 horas previas al sacrificio.
- FRIO AGUDO: animales expuestos a 4°C durante las 4 horas anteriores al sacrificio.
- FRIO CRONICO: animales expuestos a 4°C durante los 30 días el mes previo al sacrificio.

Todos los animales fueron sacrificados entre las 8 y 9 semanas de edad. Los animales de cada uno de los 4 grupos experimentales se dividieron en dos series para llevar a cabo dos series experimentales:

- Experimento A: Los animales de esta serie se utilizaron para determinar las concentraciones sanguíneas y plasmáticas de aminoácidos individuales y de glucosa en la aorta abdominal y en la vena de Sulzer, con el fin de cuantificar la captación/liberación "in vivo" de dichos substratos por el TAMI.

- Experimento B: Los animales de esta serie se utilizaron en la determinación del flujo sanguíneo a través del TAMI mediante el empleo de la técnica de las microesferas radiactivas.

3.3.2. DETERMINACION DE LAS DIFERENCIAS ARTERIOVENOSAS

3.3.2.1. ANESTESIA Y TOMA DE MUESTRAS

Los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico de 4 ml/kg de peso corporal de una solución al 1,5% en NaCl 0,15 M, administrada por vía intraperitoneal. Este anestésico, además de permitir su dosificación exacta, se ha comprobado que no modifica el flujo a través del TAM (Foster y Frydman, 1978a, 1978b, 1979). Una vez quedaron anestesiados los animales, se procedió a la extracción de las muestras de sangre arterial y venosa.

Sangre venosa

Se extrajo la muestra de la vena de Sulzer (cuarta vena torácica), que recoge la mayor parte de la sangre procedente del TAMI. Para tener acceso a esta vena se procedió a efectuar un corte longitudinal en la piel del dorso en la zona interescapular, separándola y cortando la parte en la que el TAMI está en contacto con el tejido muscular en la parte anterior. Al levantar el TAMI se visualizó la vena de Sulzer, y a continuación se procedió a efectuar una pequeña incisión, recogiendo la muestra de sangre (200 µl aprox.) con ayuda de tubos capilares de vidrio heparinizados.

Sangre arterial

Una vez extraída la muestra de sangre venosa, se procedió a abrir la cavidad abdominal, y una vez visualizada la aorta abdominal se procedió a la extracción de la muestra (1,5 ml aprox.) con una jeringa de 2 ml heparinizada.

Tanto los capilares como las jeringas y agujas fueron previamente heparinizados con una solución de heparina al 1 y 1,5% respectivamente, siendo secados en la estufa a 40-50°C.

Tejido

Una vez tomadas las muestras de sangre arterial y venosa, se extrajo el TAMI para conocer el peso total del tejido, siendo congelado en hielo seco.

3.2.2.2. DETERMINACION DEL HEMATOCRITO

El hematocrito se determinó por un método de microhematocrito (Guest y Siler, 1934). Para ello se colocaron unos 50 µl de sangre en capilares heparinizados de microhematocrito (Brand) de 75 mm de longitud y 1,1-1,2 mm de diámetro interno, que se cerraron por uno de sus extremos con plastilina (Critoseal), centrifugándolos en una centrífuga de sobremesa Sigma 101 M durante 3 minutos a 12000 g (referido al punto medio del tubo) en un rotor especial para microhematocrito de 18 cm de diámetro). Posteriormente se determinó con una regla la altura de la columna total y la de las células. Conociendo el volumen, las longitudes permitieron el cálculo de los volúmenes totales de las células sanguíneas sedimentadas.

Con el fin de determinar la fracción de plasma atrapado entre las células, se realizaron unas pruebas con (U-¹⁴C)-sacarosa (Amersham) de alta actividad específica (20,42 GBq/mmol). Para ello se mezcló una pequeña cantidad de la sacarosa radiactiva con una muestra de sangre, determinando la radiactividad presente en la fracción plasmática y la celular. En las condiciones señaladas el porcentaje de plasma atrapado fue del orden de $1,48 \pm 0,02$ µl por 100 µl de células sedimentadas.

3.2.2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

De los capilares con las muestras de sangre venosa se dejaron dos para las valoraciones en sangre, y los demás se taparon por uno de sus extremos con plastilina y se centrifugaron a 12000 g durante 3 minutos para obtener el plasma y determinar el hematocrito.

De la sangre arterial se tomaron alícuotas por duplicado para la determinación del hematocrito, otra de 100 µl se utilizó para las determinaciones en sangre, y el resto se centrifugó en las condiciones indicadas para la obtención del plasma.

Las muestras de sangre y plasma se desproteinizaron con ácido tricloroacético 0,6 M, tal como se ha indicado en el apartado 3.1.4. Los sobrenadantes se conservaron a -40°C hasta el momento de efectuar las determinaciones de aminoácidos individuales (aptdo. 3.1.4.) y de glucosa (aptdo. 3.1.6.1.).

3.2.3.4. CALCULO DE LA COMPARTIMENTACION SANGUINEA

Con el fin de determinar la concentración de los distintos aminoácidos y de la glucosa en los eritrocitos (CE), se procedió a un cálculo indirecto a partir de las concentraciones sanguínea (CS) y plasmática (CP) y del valor del hematocrito en tanto por uno (Hc), utilizando la expresión:

$$CE = (CP \times (1-Hc)) + (CS \times Hc)$$

Este método, pese a ser indirecto, es más seguro y preciso que el método directo, consistente en la lisis de los eritrocitos y posterior determinación de la concentración en el sobrenadante, pues con este método se produce una considerable pérdida de parte de los aminoácidos, principalmente los esenciales, tanto en el proceso de aislamiento como en el lavado de las células (Hagenfeldt y Arvidsson, 1980).

3.2.3. DETERMINACION DEL FLUJO SANGUINEO

3.2.3.1. FUNDAMENTO DEL METODO

La determinación del flujo sanguíneo en el TAMÍ fue llevada a cabo según el método de Foster y Frydman (1978a), modificado según Jones y Williamson (1984). El fundamento de esta técnica consiste en la administración de microesferas sintéticas marcadas uniformemente con un radionúclido emisor de radiaciones gamma y que se inyectan en la circulación a través del ventrículo izquierdo, pudiéndose determinar el flujo sanguíneo en un tejido comparando la radiactividad retenida en éste con la de una muestra de sangre de referencia, de flujo conocido durante la inyección y distribución de las microesferas. Se asume que las microesferas se mezclan uniformemente durante la inyección, distribuyéndose proporcionalmente al flujo sanguíneo en órganos y tejidos, que son totalmente retenidas en su primer paso a través del lecho vascular y que no provocan cambios hemodinámicos generales o regionales importantes.

3.2.3.2. ADMINISTRACION DE LAS MICROESFERAS Y TOMA DE MUESTRAS

Se utilizaron microesferas suministradas por NEN Research Products, de $15 \pm 1,5 \mu m$ de diámetro y marcadas con ^{46}Sc , con una actividad específica de 10 mCi/g.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico, administrado por vía intraperitoneal (aptdo. 3.3.2.1.). Una vez dormido el animal, se le administró por la vena caudal 150 μl de heparina como agente anticoagulante. A continuación se inmovilizó el animal y, tras efectuarle una incisión en la zona inguinal, se le canuló la arteria femoral con una cánula heparinizada de 0,28 mm de diámetro interno.

Para llevar a cabo la administración de las microesferas, se uniformizó la suspensión base mediante agitación vigorosa y se tomaron 150 μl de la misma (aprox. 7,5 μCi ó 3×10^5 microesferas) con una jeringa, que se agitó continuamente para prevenir su sedimentación. La administración se llevó a cabo mediante punción cardíaca, comprobando con una pequeña succión que la aguja hubiese penetrado en el corazón. A partir del momento de la inyección se recogió la sangre que goteaba por la cánula de la arteria femoral en un tubo heparinizado previamente tarado y durante un tiempo

cronometrado (60-90 s); esta muestra de referencia permitió el cálculo del flujo sanguíneo.

Finalmente se procedió a la extracción del TAMI, y una vez limpio de restos de otros tejidos y de sangre, se pesó y se colocó en un tubo con 0,5 ml de formaldehído al 10%, y seguidamente se determinó la radiactividad presente.

3.2.3.3. CONTAJE DE LA RADIATIVIDAD Y CALCULO DEL FLUJO SANGUINEO

Se utilizó para el conteo de la radiactividad gamma emitida por el ^{46}Sc un contador de centelleo sólido marca Nuclear Chicago, modelo 1185. Las muestras se contaron durante 2 minutos.

Para el cálculo del flujo sanguíneo del TAMI (ml/g/min) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\phi_{\text{TAMI}} = \frac{R_{\text{TAMI}} \times \phi_R}{R_R}$$

siendo R_{TAMI} la radiactividad en el TAMI, R_R la radiactividad de la muestra de referencia y ϕ_R el flujo de referencia. A partir de este valor se calculó el flujo por tejido total.

3.4. CALCULOS ESTADISTICOS

Los resultados presentados en esta memoria están expresados como media $\pm$ error estándar, expresándose para cada serie experimental el número de animales estudiados (Parker, 1981).

Las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales se han llevado a cabo mediante el método de la t de Student, que nos indica si las diferencias observadas entre dos grupos son debidas a la variabilidad biológica o experimental, o bien si realmente existen diferencias estadísticamente significativas. El valor de t nos permite, con ayuda de las tablas correspondientes, hallar la probabilidad (p) de que la diferencia entre medias sea debida al azar. Se considera que existen diferencias significativas a partir de $p < 0,05$.

En los casos en los que se ha comparado una media con un valor constante (0), se ha aplicado un caso especial de la prueba de la t de Student:

$$t = x / E.E.$$

siendo x la media de las muestras y E.E. el error estándar de la media. En estos casos se ha comprobado que el cociente seguía una distribución normal. Así, el resultado de este cociente se comparó con la tabla de referencia de valores de la t de Student para $n-1$ grados de libertad (siendo n = número de datos).

Todos los cálculos se realizaron con una calculadora programable Hewlett-Packard modelo HP-67, y con un microordenador Apple modelo II Europlus.

4. RESULTADOS

4.1. Parte 1: ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y COMPOSICION DEL ACERVO DE AMINOACIDOS LIBRES DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

4.1.1. PESO Y COMPOSICION DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

En la tabla 4.1 se muestran los datos correspondientes al peso corporal de los animales utilizados en los distintos grupos experimentales estudiados en el presente apartado, así como el peso del TAMI, tanto en valores absolutos como referido al peso corporal, y su composición en proteínas, lípidos y agua. Como puede observarse en la tabla, pese a las diferencias existentes en el peso del TAMI en los distintos grupos experimentales, éstas no son estadísticamente significativas cuando se expresan como porcentaje respecto al peso del animal, salvo en el de los aclimatados al frío, en los que se aprecia un claro incremento del peso del tejido.

Por lo que se refiere a la composición del TAMI, se aprecian importantes diferencias con respecto al grupo control. De este modo, el TAMI de las hembras presenta un menor contenido en lípidos que el de los machos, y un mayor contenido en agua. En los animales sometidos a ayuno se produce una clara disminución del componente lipídico acompañado por un aumento en la cantidad de agua tisular y de proteínas; de todas formas este aumento del componente lipídico no es absoluto, ya que tan sólo se incrementa su proporción con relación a la de los otros componentes pero sin que se incremente la cantidad total de lípidos del tejido. En los animales expuestos durante 12 horas a 4°C (frío agudo) la tendencia es similar, con un descenso muy marcado de los lípidos tisulares, que llegan a ser solamente la mitad de los presentes en el grupo control, y un incremento en la proporción de proteínas y agua. Finalmente, en los animales expuestos crónicamente al frío (frío crónico) se presenta un descenso en el componente lipídico y un aumento en el agua tisular, sin variar el contenido proteico.

Tabla 4.1.-

PESO Y COMPOSICION DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

	CTRL. MACHOS	CTRL. HEMBRAS	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Peso corporal (g)	216,9 ± 4,0	181,7 ± 3,2 *	177,8 ± 1,7 *	203,6 ± 4,3 *	257,3 ± 4,7 *
Peso TAMI (mg)	256,9 ± 11,6	243,3 ± 7,11	218,3 ± 9,16 *	219,9 ± 5,74 *	439,6 ± 38,7 *
% peso corporal	0,124 ± 0,01	0,139 ± 0,01	0,122 ± 0,01	0,116 ± 0,01	0,171 ± 0,02 *
Composición TAMI (mg/g):					
Proteínas	107,8 ± 8,39	115,5 ± 6,82	138,6 ± 5,30 *	148,4 ± 3,35 *	121,4 ± 8,06
Lípidos	399,0 ± 6,99	356,7 ± 9,95 *	339,8 ± 12,0 *	248,9 ± 9,98 *	303,6 ± 29,3 *
Agua	440,0 ± 5,47	472,8 ± 9,33 *	494,8 ± 12,1 *	594,1 ± 12,2 *	545,7 ± 25,2 *

Significatividad estadística de las diferencias con respecto a los controles macho: * = p<0,05.

En la gráfica 4.1 se presentan las variaciones en el peso corporal y en la ingestión de alimento de los animales expuestos crónicamente al frío, que se comparan con los correspondientes controles. El peso corporal de los animales expuestos a 4°C es inferior al de los controles, apareciendo diferencias estadísticamente significativas a partir del octavo día. Por contra, los animales expuestos al frío ingieren aproximadamente un 50% más pienso desde el cuarto día, momento en el que ya aparecen diferencias significativas entre los dos grupos.

4.1.2. ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR: COMPARACION CON OTROS TEJIDOS DE LA RATA.

En la tabla 4.2 se muestran las actividades enzimáticas correspondientes a la alanina transaminasa, aspartato transaminasa y transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, mientras que en la tabla 4.3 se presentan las de la glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa y adenilato desaminasa. Los datos presentados corresponden al TAMI de ratas de ambos sexos, y se comparan con las halladas en tejido adiposo blanco (TAB), hígado y músculo esquelético.

Para todos los enzimas estudiados, el TAMI presenta actividades mayores que las del TAB cuando se expresan por unidad de peso fresco de tejido, si bien al expresarlas en función del contenido en proteínas desaparecen las diferencias en la alanina transaminasa y la glutamina sintetasa en el caso de los machos, y en la alanina transaminasa, la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y la glutamato deshidrogenasa en las hembras.

Con relación al hígado, las actividades enzimáticas son mayores que en el TAMI en los casos de la alanina y aspartato transaminasas, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa, y menores en la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, siendo válida esta observación con independencia de la expresión utilizada en los resultados y del sexo de los animales.

Por su parte el músculo presenta actividades mayores que las del TAMI en los casos de la aspartato transaminasa, transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y adenilato desaminasa, y menores en los de la glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa y, en el caso de los machos, la alanina transaminasa. Expresadas en función del contenido en proteínas del tejido, el músculo presenta menor actividad que el TAMI en el caso de la alanina transaminasa y desaparecen las diferencias en la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, en ambos casos sólo en las hembras.

Por lo que se refiere a las diferencias entre sexos, en el caso del TAMI no aparecen diferencias significativas en ninguna de las actividades enzimáticas estudiadas; las únicas diferencias halladas se presentan en la glutamina sintetasa de TAB y de músculo esquelético.

En la presente serie experimental no se pudieron determinar actividades detectables en los ensayos de la arginasa y de la serina deshidratasa en el TAMI, por lo que no se han presentado los datos correspondientes a estas actividades enzimáticas en las tablas de resultados.

4.1.3. ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR: EFECTOS DEL AYUNO Y DEL FRIO.

La tabla 4.4 muestra las actividades enzimáticas correspondientes al

TAMI de ratas macho sometidas a ayuno o a exposición aguda o crónica al frío.

El ayuno provoca pocos cambios en las actividades de los enzimas, ya que tan sólo aumenta la actividad de la glutamina sintetasa cuando es expresada por peso de tejido; cuando los resultados se expresan por contenido de proteína se aprecian descensos significativos en el caso de la glutamato deshidrogenasa y de la adenilato desaminasa.

La exposición aguda al frío determina asimismo pocos cambios, aumentando las actividades de la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y de la glutamina sintetasa, si bien en este caso las diferencias desaparecen al expresar las actividades con relación al contenido de proteínas del tejido. Las mayores diferencias aparecen en el TAMI de los animales sometidos a una exposición crónica al frío, en los que se incrementa la actividad de la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y la de la glutamato deshidrogenasa, al tiempo que disminuyen las de la adenilato desaminasa y glutamina sintetasa, aunque en este último caso únicamente en la expresión por unidad de peso de proteínas.

4.1.4. COMPOSICION DEL ACERVO DE AMINOACIDOS LIBRES EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR: EFECTOS DEL AYUNO Y DEL FRIO.

En la tabla 4.5 se presentan las concentraciones de los distintos aminoácidos libres presentes en el TAMI de los animales de los distintos grupos experimentales estudiados. Sin embargo, debido a las importantes variaciones en el contenido de agua tisular observadas en el tejido como consecuencia del ayuno y de la exposición al frío, tal como se ha señalado en la tabla 4.1, también se presentan dichas concentraciones en función del peso de agua del tejido, datos que se indican en la tabla 4.6.

En el TAMI de los animales control el aminoácido predominante es la taurina, que representa aproximadamente el 40% del total de aminoácidos del tejido. También es especialmente importante la proporción de aminoácidos gluconeogénicos, que representa un 45% del total, destacando la contribución en este sentido de alanina, glutamato, glutamina y glicina. En conjunto los aminoácidos esenciales representan menos de la décima parte (apenas un 7,5%) del total de aminoácidos libres del tejido.

El ayuno provoca una disminución en el contenido total de aminoácidos de prácticamente una tercera parte, descenso que afecta significativamente a la alanina, glutamina, serina, treonina, arginina, taurina y metionina, mientras que solamente se incrementa la concentración de isoleucina. Al expresar los resultados en función del contenido de agua tisular, se acentúan las disminuciones indicadas, a las que se añaden las de la glicina, prolina, histidina, citrulina y ornitina, y desaparece el incremento en la concentración de isoleucina.

La exposición aguda al frío provoca un aumento en el contenido de glutamina, aspartato, serina, treonina, lisina, histidina, citrulina, ornitina, leucina, fenilalanina, tirosina y triptófano, y descensos en los de asparraguina y metionina. La expresión de los resultados en función del contenido de agua del tejido, que aumenta un 35% con relación al del TAMI de los animales del grupo control, señala un incremento en las concentraciones de serina, treonina, lisina, ornitina, fenilalanina y tirosina, y disminuciones que afectan a alanina, asparraguina, glicina, valina, taurina y metionina, así como a la concentración de aminoácidos totales.

En el TAMI de los animales expuestos crónicamente al frío se aprecia un aumento en las concentraciones de glutamato, aspartato, leucina, taurina,

"cisteína" (valor que engloba a cisteína, cistina y cisteato, expresados como cisteína), y también en la de aminoácidos totales, mientras que disminuyen los niveles de alanina, asparraguina, treonina, metionina y tirosina. Expresados por unidad de peso de agua tisular, las diferencias con relación al grupo control quedan muy marcadas, aunque no varíe el contenido total de aminoácidos del tejido; de este modo se incrementan las concentraciones de glutamato, aspartato y taurina, incremento que queda prácticamente compensado con los descensos en el contenido de alanina, glutamina, asparraguina, serina, treonina, glicina, lisina, arginina, histidina, citrulina, ornitina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano.

4.1.5. CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS CIRCULANTES: EFECTOS DEL AYUNO Y DEL FRÍO.

Con el fin de evaluar mejor los cambios observados en las actividades enzimáticas y en el acervo de aminoácidos libres en el TAMI como consecuencia del ayuno y de la exposición al frío, se determinaron las concentraciones sanguíneas y plasmáticas de aminoácidos, que se recogen en las tablas 4.7 y 4.8 respectivamente.

En el ayuno se observa un incremento en la concentración sanguínea de aminoácidos totales, mientras que a nivel plasmático se produce un descenso de la misma. Las concentraciones sanguíneas de glutamina, aspartato, asparraguina, serina, glicina, lisina, isoleucina, taurina, "cisteína" y fenilalanina muestran un incremento con relación a la de los animales del grupo control, mientras que disminuyen las de alanina, prolina, arginina, ornitina y metionina. En el plasma los cambios afectan principalmente a los aminoácidos básicos, con aumentos en las concentraciones de glicina, lisina, citrulina e isoleucina, disminuyendo las de alanina, prolina, hidroxiprolina, arginina, histidina, ornitina, metionina y triptófano.

La exposición aguda al frío no afecta a la concentración total de aminoácidos circulantes ni a nivel de sangre total ni a nivel plasmático. En la sangre las alteraciones observadas con relación al grupo control se centran en un descenso de las concentraciones de glutamina, prolina y metionina, aumentando las de glutamato, aspartato, asparraguina, serina, treonina, histidina, isoleucina, valina, taurina, "cisteína" y fenilalanina. Por su parte en el plasma se producen incrementos significativos en las concentraciones de serina, treonina, histidina, ornitina, leucina, isoleucina, valina, taurina y fenilalanina, y descensos en las de prolina e hidroxiprolina.

Los efectos más marcados aparecen en los animales expuestos crónicamente al frío, con incrementos a nivel sanguíneo de las concentraciones de asparraguina, prolina, lisina, arginina, citrulina, ornitina, leucina, isoleucina, valina, taurina, "cisteína", fenilalanina y triptófano, así como en los aminoácidos totales, mientras que tan sólo la alanina y el glutamato presentan un descenso en sus concentraciones circulantes. Los cambios en el plasma son cualitativamente similares, afectando principalmente a los aminoácidos básicos, sulfurados, aromáticos y de cadena ramificada; de este modo se aprecian incrementos en las concentraciones de lisina, arginina, histidina, citrulina, ornitina, leucina, isoleucina, valina, taurina, "cisteína", metionina, fenilalanina y triptófano, y tan sólo se producen descensos en las concentraciones plasmáticas de glutamato y glutamina.

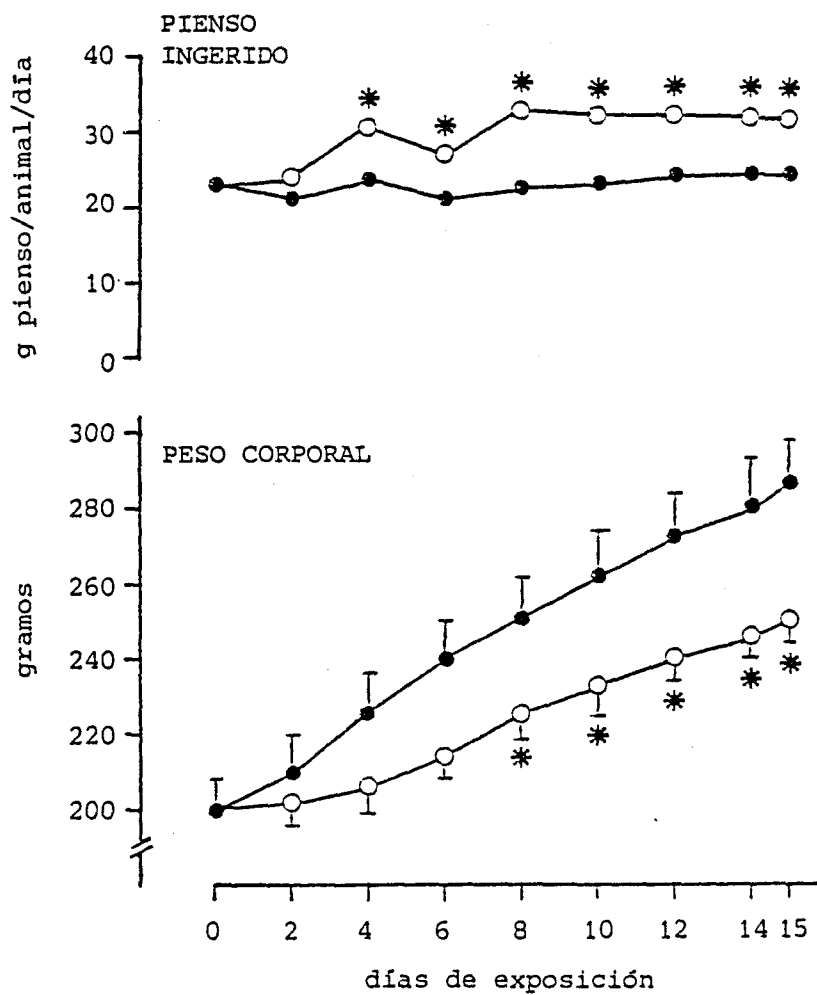
También se determinaron en los mismos animales las concentraciones sanguínea y plasmática de glucosa, así como las de proteínas, urea y ácidos grasos libres en plasma, concentraciones que se muestran en la tabla 4.9. Las concentraciones de glucosa en sangre y plasma de los animales sometidos a ayuno sufren un descenso estadísticamente significativo, lo mismo que la concentración plasmática de los animales expuestos de forma aguda al frío. Los niveles de urea plasmática son menores en los animales del grupo control que en los otros tres grupos experimentales, mientras que la de ácidos grasos aumenta considerablemente en el plasma de los animales ayunados y también en los sometidos a una exposición aguda al frío. Por su parte las proteínas plasmáticas no se presentan alteradas en ninguno de los grupos experimentales estudiados.

4.1.6. RECAMBIO PROTEICO EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

En la tabla 4.10 se presentan los valores correspondientes a la velocidad de recambio proteico en el TAMI, que se compara con la de otros tejidos de la rata, de acuerdo con el estudio realizado en animales del grupo control. Se puede observar como la vida media de las proteínas del TAMI es menor que las del músculo esquelético, tejido adiposo blanco y corazón, y mayor que las de hígado y riñón.

Gráfica 4.1.-

PESO CORPORAL Y PIENSO INGERIDO DURANTE LA EXPOSICION CRONICA AL FRIO.



CONTROL: ●—●
FRIO CRONICO: ○—○

Los valores presentados corresponden a la media $\pm$ E.S. de 8 animales.
Significatividad entre grupos: * = $p < 0,05$.

Tabla 4.2.-
ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR Y OTROS
TEJIDOS DE LA RATA.

			MACHOS	HEMBRAS
Alanina transaminasa	TAMI	T	120 ± 12	123 ± 14
		P	1,04 ± 0,17	1,08 ± 0,13
	TAB	T	21,5 ± 1,1 *	22,3 ± 0,71 *
		P	1,53 ± 0,08	1,12 ± 0,19
	HIGADO	T	338 ± 34 *	426 ± 34 *
		P	2,06 ± 0,19 *	2,67 ± 0,22 *
	MUSCULO	T	87,0 ± 3,8 *	96,6 ± 6,8
		P	0,70 ± 0,04	0,73 ± 0,05 *
Aspartato transaminasa	TAMI	T	165 ± 19	195 ± 15
		P	1,61 ± 0,15	1,71 ± 0,14
	TAB	T	5,99 ± 0,53 *	12,1 ± 3,0 *
		P	0,41 ± 0,04 *	0,50 ± 0,12 *
	HIGADO	T	1382 ± 44 *	1313 ± 63 *
		P	8,64 ± 0,17 *	8,29 ± 0,38 *
	MUSCULO	T	844 ± 42 *	828 ± 51 *
		P	7,20 ± 0,64 *	5,83 ± 0,22 *
Transaminasa aminoácidos cadena ramificada	TAMI	T	3,60 ± 0,40	6,13 ± 1,2
		P#	32,7 ± 1,5	53,8 ± 10
	TAB	T	1,20 ± 0,21 *	1,14 ± 0,33 *
		P#	96,7 ± 19 *	67,7 ± 17
	HIGADO	T	1,12 ± 0,13 *	1,01 ± 0,20 *
		P#	6,82 ± 0,80 *	6,16 ± 1,2 *
	MUSCULO	T	7,66 ± 0,19 *	11,2 ± 1,9 *
		P#	66,1 ± 6,7 *	74,4 ± 7,0

Expresión de las actividades: T = μ katales/kg tejido
P = μ katales/g proteína
P# = nkatales/g proteína

Significatividad entre grupos: Tejidos respecto a TAMI: * = $p < 0,05$.
Hembras respecto a machos: † = $p < 0,05$.

Tabla 4.3.-

ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR Y OTROS TEJIDOS DE LA RATA.

			MACHOS	HEMBRAS
Glutamato deshidrogenasa	TAMI	T	94,5 ± 12	120 ± 15
		P	0,90 ± 0,09	1,23 ± 0,22
	TAB	T	8,11 ± 0,40 *	11,6 ± 1,7 *
		P	0,56 ± 0,01 *	0,60 ± 0,07
	HIGADO	T	1597 ± 37 *	1614 ± 52 *
		P	9,80 ± 0,22 *	10,1 ± 0,47 *
	MUSCULO	T	48,3 ± 3,1 *	48,9 ± 1,6 *
		P	0,39 ± 0,03 *	0,37 ± 0,03 *
Glutamina sintetasa	TAMI	T	378 ± 38	350 ± 35
		P	3,91 ± 0,41	3,81 ± 0,19
	TAB	T	43,2 ± 1,6 *	80,7 ± 12 *†
		P	3,23 ± 0,13	3,17 ± 0,21 *
	HIGADO	T	901 ± 32 *	1223 ± 172 *
		P	5,45 ± 0,20 *	7,68 ± 1,1 *
	MUSCULO	T	13,8 ± 1,3 *	24,1 ± 1,2 *†
		P	0,111 ± 0,01 *	0,168 ± 0,02 *†
Adenilato desaminasa	TAMI	T	503 ± 173	901 ± 281
		P	6,30 ± 2,1	7,89 ± 2,5
	TAB	T	27,8 ± 10 *	28,5 ± 8,9 *
		P	1,96 ± 0,72 *	1,03 ± 0,26 *
	HIGADO	T	53,9 ± 4,5 *	43,1 ± 1,1 *
		P	0,329 ± 0,03 *	0,275 ± 0,01 *
	MUSCULO	T	22430 ± 211 *	22670 ± 238 *
		P	176 ± 19 *	169 ± 15 *

Expresión de las actividades: T = μ katales/kg tejido
P = μ katales/g proteína

Significatividad entre grupos: Tejidos respecto a TAMI: * = $p < 0,05$.
Hembras respecto a machos: † = $p < 0,05$.

Tabla 4.4.-

ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR DE LA RATA:
EFECTO DEL FRIO Y DEL AYUNO.

		CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
AlaTA	T	120 ± 12	147 ± 33	130 ± 1,6	133 ± 4,7
	P	1,04 ± 0,17	0,95 ± 0,25	0,87 ± 0,04	1,18 ± 0,04
AspTA	T	165 ± 19	193 ± 16	234 ± 28	215 ± 14
	P	1,61 ± 0,15	1,40 ± 0,13	1,56 ± 0,18	1,58 ± 0,07
TAACR	T	3,60 ± 0,40	3,84 ± 0,57	5,94 ± 0,32 *	10,2 ± 0,63 *
	P#	32,7 ± 1,5	28,6 ± 3,9	40,4 ± 2,1 *	74,0 ± 2,0 *
GluDH	T	94,5 ± 12	81,0 ± 9,8	112 ± 7,0	132 ± 10 *
	P	0,90 ± 0,09	0,59 ± 0,08 *	0,76 ± 0,07	1,17 ± 0,08 *
GlnST	T	378 ± 38	487 ± 30 *	649 ± 40 *	348 ± 23
	P	3,91 ± 0,41	3,67 ± 0,22	4,14 ± 0,27	2,60 ± 0,11 *
AMP-DA	T	503 ± 173	261 ± 53	405 ± 80	119 ± 14 *
	P	6,30 ± 2,1	1,56 ± 0,26 *	2,21 ± 0,48	0,96 ± 0,08 *

Expresión de las actividades: T = μ katales/kg tejido
P = μ katales/g proteína
P# = nkatales/g proteína

Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$

Tabla 4.5.-

COMPOSICION DEL ACERVO DE AMINOACIDOS LIBRES EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR: CONCENTRACION POR PESO DE TEJIDO.

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Ala	1866 ± 128	944 ± 56 *	1971 ± 136	1105 ± 74 *
Glu	1249 ± 195	1584 ± 175	1508 ± 71	2982 ± 163 *
Gln	1430 ± 120	1094 ± 25 *	2112 ± 142 *	1216 ± 87
Asp	378 ± 29	428 ± 26	619 ± 51 *	578 ± 29 *
Asn	87 ± 6	73 ± 10	65 ± 2 *	40 ± 5 *
Ser	314 ± 16	169 ± 6 *	585 ± 39 *	330 ± 14
Thr	376 ± 10	220 ± 5 *	679 ± 35 *	319 ± 18 *
Gly	858 ± 54	720 ± 24	774 ± 34	777 ± 64
Pro	348 ± 46	240 ± 32	407 ± 34	351 ± 23
Lys	208 ± 11	206 ± 10	387 ± 22 *	198 ± 16
Arg	172 ± 9	138 ± 5 *	205 ± 22	156 ± 18
His	96 ± 6	87 ± 5	135 ± 5 *	92 ± 5
Cit	155 ± 7	130 ± 13	184 ± 12 *	136 ± 9
Orn	94 ± 12	64 ± 5	212 ± 37 *	66 ± 4
Leu	121 ± 6	120 ± 4	163 ± 10 *	141 ± 4 *
Ile	78 ± 5	95 ± 3 *	93 ± 6	77 ± 2
Val	173 ± 20	141 ± 11	171 ± 12	214 ± 10
Tau	5875 ± 149	3988 ± 86 *	5312 ± 377	9184 ± 422 *
Cys#	24 ± 2	29 ± 5	22 ± 1	44 ± 5 *
Met	63 ± 7	41 ± 2 *	44 ± 3 *	29 ± 3 *
Phe	48 ± 2	54 ± 3	90 ± 8 *	47 ± 2
Tyr	68 ± 2	73 ± 3	107 ± 3 *	56 ± 3 *
Trp	27 ± 3	25 ± 2	43 ± 3 *	20 ± 1
Totales (mM)	14,45 ± 0,75	10,85 ± 0,36 *	16,28 ± 0,72	19,14 ± 0,84 *

Las concentraciones están expresadas como micromoles/kg de tejido.
Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$

Cys# = cisteína + cistina + cisteato, expresado como cisteína.

Tabla 4.6.-

COMPOSICION DEL ACERVO DE AMINOACIDOS LIBRES EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR: CONCENTRACION POR PESO DE AGUA TISULAR.

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Ala	4241 ± 291	1907 ± 113 *	3318 ± 229 *	2024 ± 136 *
Glu	2839 ± 444	3200 ± 353	2539 ± 120	5461 ± 299 *
Gln	3249 ± 272	2211 ± 51 *	3556 ± 239	2228 ± 159 *
Asp	858 ± 66	864 ± 53	1043 ± 87	1059 ± 53 *
Asn	197 ± 13	148 ± 21	109 ± 4 *	74 ± 10 *
Ser	714 ± 37	342 ± 13 *	972 ± 67 *	604 ± 25 *
Thr	853 ± 23	444 ± 11 *	1144 ± 59 *	584 ± 33 *
Gly	1949 ± 122	1455 ± 49 *	1302 ± 58 *	1424 ± 117 *
Pro	791 ± 104	484 ± 64 *	685 ± 56	643 ± 42
Lys	473 ± 25	416 ± 21	652 ± 38 *	363 ± 29 *
Arg	390 ± 21	279 ± 11 *	345 ± 37	285 ± 32 *
His	218 ± 14	176 ± 9 *	227 ± 9	168 ± 9 *
Cit	351 ± 15	263 ± 25 *	311 ± 20	250 ± 16 *
Orn	213 ± 27	129 ± 10 *	356 ± 63 *	122 ± 6 *
Leu	276 ± 15	241 ± 9	275 ± 17	258 ± 8
Ile	177 ± 12	191 ± 6	156 ± 10	140 ± 4 *
Val	393 ± 46	285 ± 22	288 ± 20 *	392 ± 19
Tau	13352 ± 339	8056 ± 174 *	8942 ± 635 *	16821 ± 772 *
Cys#	55 ± 6	59 ± 10	37 ± 2	80 ± 10
Met	143 ± 17	83 ± 3 *	74 ± 5 *	53 ± 5 *
Phe	109 ± 5	110 ± 7	152 ± 13 *	87 ± 4 *
Tyr	155 ± 4	148 ± 6	179 ± 6 *	103 ± 5 *
Trp	61 ± 6	51 ± 3	73 ± 5	36 ± 1 *
Totales (mM)	32,84 ± 1,70	21,92 ± 0,72 *	27,39 ± 1,21 *	35,05 ± 1,53

Las concentraciones están expresadas como micromoles/kg de agua tisular.
Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$.

Cys# = cisteína + cistina + cisteato, expresado como cisteína.

Tabla 4.7.-
CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS INDIVIDUALES EN SANGRE.

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Ala	611 ± 17	529 ± 26 *	673 ± 28	525 ± 25 *
Glu	424 ± 20	468 ± 22	520 ± 18 *	331 ± 10 *
Gln	787 ± 36	1141 ± 107 *	439 ± 39 *	804 ± 56
Asp	41 ± 3	67 ± 4 *	63 ± 4 *	39 ± 3
Asn	76 ± 3	86 ± 2 *	87 ± 2 *	96 ± 5 *
Ser	325 ± 9	355 ± 6 *	406 ± 9 *	319 ± 11
Thr	322 ± 10	296 ± 8	351 ± 8 *	356 ± 30
Gly	456 ± 21	530 ± 17 *	501 ± 5	424 ± 18
Pro	344 ± 16	236 ± 6 *	288 ± 17 *	475 ± 20 *
HPro	48 ± 6	36 ± 5	46 ± 4	N.D.
Lys	444 ± 10	498 ± 9 *	432 ± 4	527 ± 25 *
Arg	321 ± 11	284 ± 10 *	297 ± 10	389 ± 10 *
His	116 ± 4	111 ± 3	134 ± 3 *	125 ± 3
Cit	107 ± 9	95 ± 5	92 ± 4	145 ± 8 *
Orn	70 ± 3	54 ± 2 *	72 ± 4	103 ± 4 *
Leu	206 ± 12	205 ± 3	231 ± 5	260 ± 3 *
Ile	105 ± 5	125 ± 3 *	119 ± 3 *	142 ± 4 *
Val	208 ± 9	210 ± 4	250 ± 6 *	314 ± 11 *
Tau	267 ± 13	316 ± 15 *	363 ± 14 *	518 ± 25 *
Cys#	5 ± 0	6 ± 0 *	7 ± 1 *	18 ± 2 *
Met	68 ± 4	52 ± 3 *	54 ± 4 *	64 ± 2
Phe	85 ± 3	96 ± 2 *	113 ± 4 *	94 ± 2 *
Tyr	106 ± 5	111 ± 5	119 ± 6	106 ± 7
Trp	20 ± 3	15 ± 3	26 ± 1	45 ± 3 *
Totales (mM)	5,55 ± 0,18	6,13 ± 0,14 *	5,60 ± 0,12	6,30 ± 0,11 *

Las concentraciones están expresadas en micromoles/litro.

Significatividad respecto a CONTROL: * = $p < 0,05$

Cys# = cisteína + cistina + cisteato, expresado como cisteína.

N.D. = no detectado.

Tabla 4.8.-

CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS INDIVIDUALES EN PLASMA.

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Ala	561 ± 33	419 ± 44 *	490 ± 18	523 ± 30
Glu	151 ± 8	155 ± 7	162 ± 9	117 ± 7 *
Gln	1213 ± 30	1232 ± 65	1246 ± 59	747 ± 20 *
Asp	41 ± 3	42 ± 2	45 ± 1	45 ± 2
Asn	58 ± 3	54 ± 2	59 ± 2	61 ± 2
Ser	252 ± 12	224 ± 5	305 ± 12 *	264 ± 12
Thr	286 ± 9	258 ± 11	317 ± 7 *	315 ± 24
Gly	404 ± 19	490 ± 13 *	398 ± 15	372 ± 13
Pro	264 ± 11	160 ± 8 *	214 ± 14 *	274 ± 6
HPro	80 ± 6	47 ± 3 *	41 ± 4 *	N.D.
Lys	375 ± 16	442 ± 11 *	389 ± 6	455 ± 11 *
Arg	186 ± 4	165 ± 3 *	170 ± 10	270 ± 7 *
His	105 ± 4	92 ± 3 *	120 ± 3 *	124 ± 3 *
Cit	92 ± 2	105 ± 3 *	96 ± 3	124 ± 6 *
Orn	64 ± 1	57 ± 3 *	74 ± 3 *	96 ± 1 *
Leu	146 ± 7	156 ± 7	191 ± 8 *	265 ± 7 *
Ile	87 ± 4	108 ± 4 *	105 ± 4 *	151 ± 4 *
Val	188 ± 9	195 ± 7	229 ± 5 *	296 ± 8 *
Tau	268 ± 26	204 ± 7	350 ± 21 *	354 ± 11 *
Cys#	9 ± 1	10 ± 2	N.D.	43 ± 6 *
Met	72 ± 4	52 ± 2 *	73 ± 5	110 ± 2 *
Phe	75 ± 4	82 ± 4	96 ± 3 *	102 ± 2 *
Tyr	93 ± 4	96 ± 5	104 ± 6	92 ± 3
Trp	98 ± 4	78 ± 4 *	110 ± 7	136 ± 2 *
Totales (mM)	5,32 ± 0,19	4,70 ± 0,08 *	5,53 ± 0,12	5,38 ± 0,09

Las concentraciones están expresadas en micromoles/litro.

Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$

Cys# = cisteína + cistina + cisteato, expresado como cisteína.

N.D. = no detectado.

Tabla 4.9.-

CONCENTRACIONES DE OTROS METABOLITOS PLASMATICOS Y SANGUINEOS: GLUCOSA, PROTEINAS, UREA Y ACIDOS GRASOS LIBRES.

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
<u>Sangre</u>				
Glucosa (mM)	5,83 ± 0,22	4,12 ± 0,17 *	6,63 ± 0,28	5,69 ± 0,09
<u>Plasma</u>				
Glucosa (mM)	8,16 ± 0,22	6,61 ± 0,19 *	9,66 ± 0,20 *	8,14 ± 0,12
Proteínas (mg/ml)	68,9 ± 1,53	67,1 ± 0,55	71,2 ± 0,54	68,1 ± 1,02
Urea (mM)	5,70 ± 0,21	8,42 ± 0,56 *	7,49 ± 0,29 *	7,61 ± 0,17 *
Acidos grasos (mM)	0,28 ± 0,03	1,06 ± 0,08 *	0,53 ± 0,06 *	0,32 ± 0,02

Significatividad respecto a control: * = p<0,05.

Tabla 4.10.-

TASA DE RECAMBIO PROTEICO EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR Y OTROS TEJIDOS DE LA RATA

Tejido	Proteínas	Vida media (días)
TAMI	98,2 ± 4,7	1,79
Higado	166,8 ± 4,1	1,27
Músculo	135,7 ± 5,3	3,71
TAB	13,6 ± 0,7	2,74
Riñón	120,3 ± 3,1	1,46
Corazón	127,1 ± 3,0	2,27
Plasma	67,0 ± 2,23	5,41

Contenido en proteína: Tejidos: g proteína/kg tejido
Plasma: g proteína/l plasma

4.2. Parte 2: ESTUDIO DE LA UTILIZACION DE ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".

4.2.1. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE INCUBACION Y VALIDACION DEL METODO.

En la gráfica 4.2 se muestra el efecto de la concentración de alanina y de glucosa sobre la utilización de estos dos sustratos por el TAMI *in vitro*, ya sea con fines oxidativos o para su incorporación en el tejido. Como puede apreciarse en ambos casos, tanto la alanina como la glucosa son predominantemente oxidadas a CO_2 para cualquiera de las concentraciones estudiadas. La cantidad de alanina oxidada deja de incrementarse para concentraciones superiores a 0,75 mM, mientras que no se incrementa su incorporación al tejido a partir de 0,5 mM. En el caso de la glucosa, para concentraciones del orden de 10 mM todavía se apreciaba un incremento en su oxidación respecto a concentraciones inferiores, aunque no así en lo referente a su incorporación, que parece estabilizarse a partir de 7,5 mM.

La gráfica 4.3 indica la linealidad respecto al tiempo de la utilización de la alanina y de la glucosa por el TAMI, distinguiéndose entre el sustrato que es oxidado y el incorporado al tejido. Como puede apreciarse, en todos los casos estudiados hay una clara linealidad para incubaciones de hasta una hora de duración, con coeficientes de correlación del orden de 0,99 en todos los casos.

Asimismo se determinaron las concentraciones de ATP y ADP y las de lactato y piruvato presentes en muestras de TAMI a diferentes tiempos de incubación, con el fin de apreciar las posibles variaciones en las relaciones entre dichos metabolitos, y así poder de este modo evaluar el estado de las preparaciones utilizadas en los experimentos *in vitro*. Los resultados, que se presentan en la gráfica 4.4, muestran que la relación ATP/ADP se mantiene prácticamente constante a lo largo de una hora de incubación, con un valor cercano a la unidad; por su parte, en el caso de la relación lactato/piruvato se produce un claro descenso entre el inicio de la incubación y los 15 minutos, que se amortigua considerablemente a partir de ese momento, manteniéndose constante la relación a partir de los 30 minutos de incubación.

A partir de estas pruebas preliminares se fijaron las condiciones de incubación, que se señalan en el apartado 3.2.

4.2.2. EFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".

En el presente apartado se determinó de qué modo podía afectar la presencia de glucosa en el medio de incubación a la utilización de alanina por parte del TAMI, estudiándose asimismo el efecto recíproco. De este modo se pretendía determinar las interrelaciones entre ambos sustratos del tejido en condiciones de disponibilidad variable de los mismos. Para ello se procedió a efectuar distintas incubaciones en las que se variaba la concentración de cada uno de los dos sustratos, y cuyos resultados se recogen en las tablas 4.11 y 4.12.

Como puede apreciarse en los resultados de la tabla 4.11, la presencia de glucosa no parece afectar a la captación de alanina a bajas concentraciones, pero aumenta la incorporación de carbonos de la alanina en el tejido al incrementarse dicha concentración. La oxidación de alanina a CO_2 no se incrementa tan marcadamente, manteniéndose prácticamente

constante la proporción global con relación a la captación total de alanina (alanina oxidada + alanina incorporada) entre el 70% y el 80%, con independencia de la disponibilidad de alanina y de glucosa. Cuando se representa la relación entre la alanina oxidada a CO_2 y la que se incorpora al tejido (gráfica 4.5) se observa una tendencia hacia un claro descenso de la oxidación con respecto a la incorporación al aumentar la concentración de alanina para una determinada concentración de glucosa (o viceversa).

En la tabla 4.12 se presentan los resultados del experimento complementario al anterior, o sea el estudio del efecto de la alanina sobre la utilización de la glucosa por el TAMI *in vitro*. Puede observarse que la presencia de alanina en el medio de incubación determina una disminución de la utilización de la glucosa para concentraciones de ésta del orden de 0,3 M o superiores, afectando tanto a su oxidación como a su incorporación al tejido. Al igual que en el experimento anterior, la proporción de glucosa oxidada respecto a la captación total se mantiene relativamente constante, mientras que el porcentaje de glucosa incorporada al tejido se incrementa al aumentar la disponibilidad de este sustrato.

En la gráfica 4.6 se representa la relación entre oxidación e incorporación de glucosa para las distintas concentraciones de glucosa y alanina estudiadas. La tendencia general es similar a la mostrada en la gráfica 4.5, con una clara tendencia a la disminución de dicha relación conforme se incrementan los niveles tanto de glucosa como de alanina en el medio de incubación.

4.2.3. EFECTO DE LA INSULINA, NORADRENALINA Y GLUCAGON SOBRE LA UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

En el presente apartado se efectuaron incubaciones de fragmentos de TAMI en presencia de diferentes concentraciones de insulina, noradrenalina y glucagón en medios con o sin glucosa, con el fin de determinar el efecto de estas hormonas sobre la utilización de la alanina. Los resultados correspondientes a la oxidación a CO_2 , incorporación al tejido y captación total se presentan en las gráficas 4.7, 4.8 y 4.9 respectivamente.

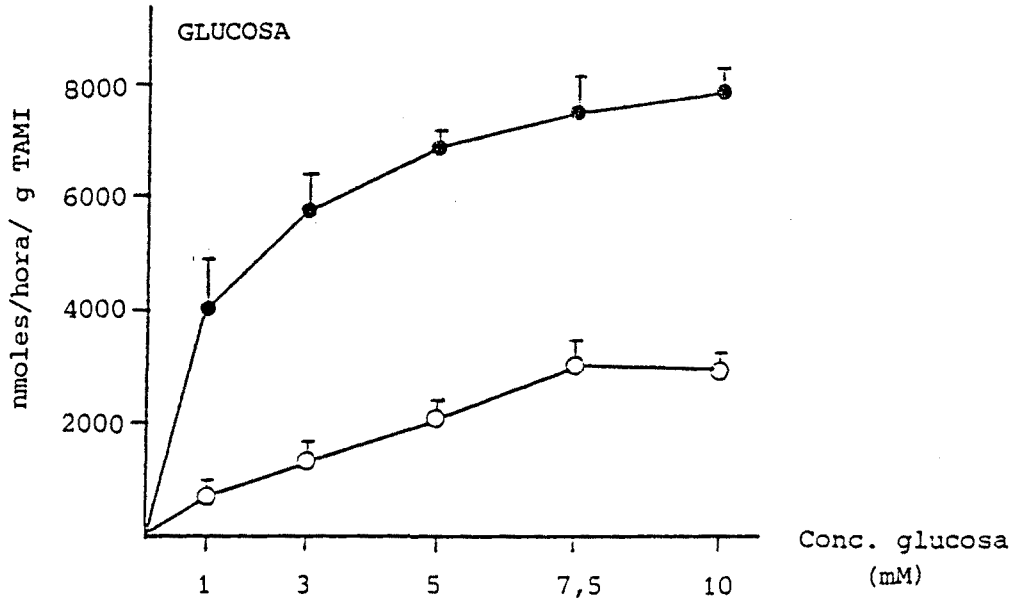
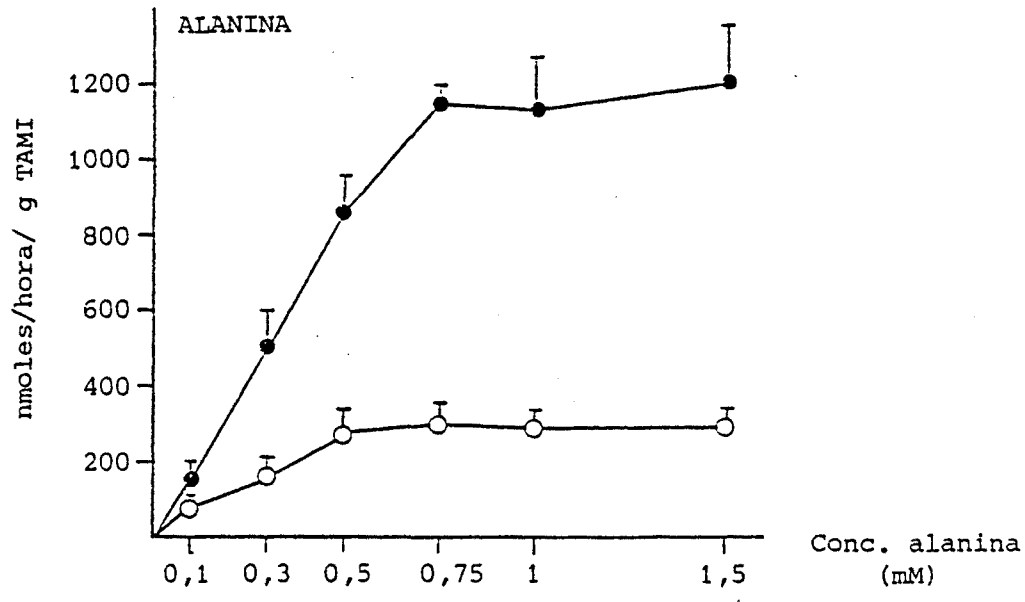
La insulina provoca un incremento en la oxidación y en la incorporación de la alanina a partir de concentraciones del orden de 200 $\mu\text{U/ml}$, aunque únicamente en aquellos casos en los que se añadió glucosa al medio de incubación, ya que en ausencia de este sustrato no se observa ningún efecto significativo.

La noradrenalina no afecta a la oxidación de la alanina independientemente de la presencia o no de glucosa en el medio de incubación, si bien provoca una marcada disminución de su incorporación en el tejido a partir de concentraciones del orden de 0,1 mg/l , presentándose también en este caso diferencias significativas en función de la presencia o ausencia de glucosa en el medio de incubación.

El efecto del glucagón es menos marcado dentro del rango de concentraciones estudiado, ya que las únicas diferencias significativas aparecen para concentraciones de 20 $\mu\text{g/l}$.

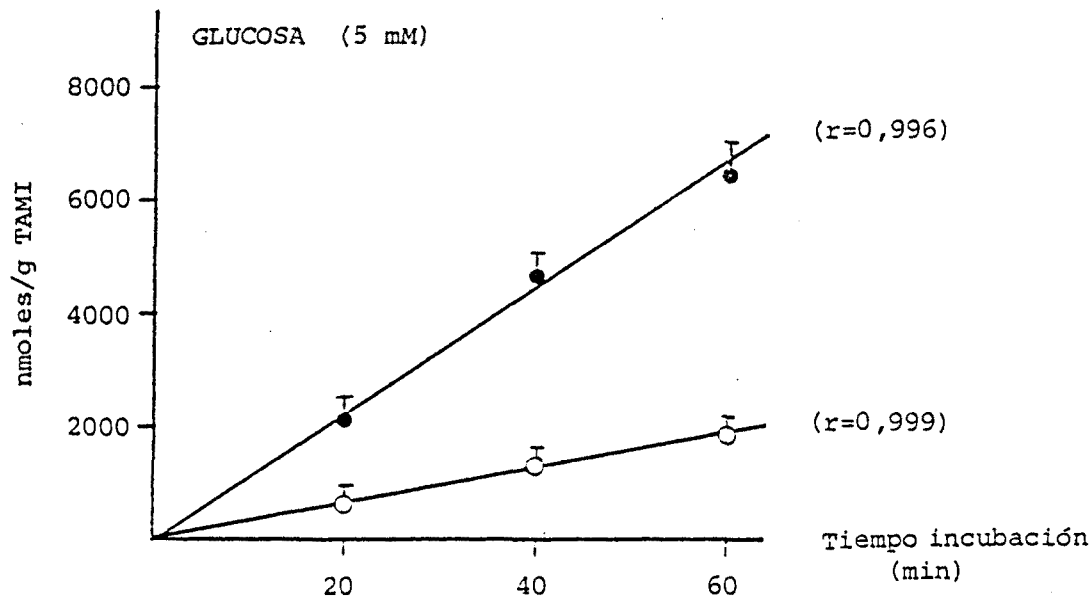
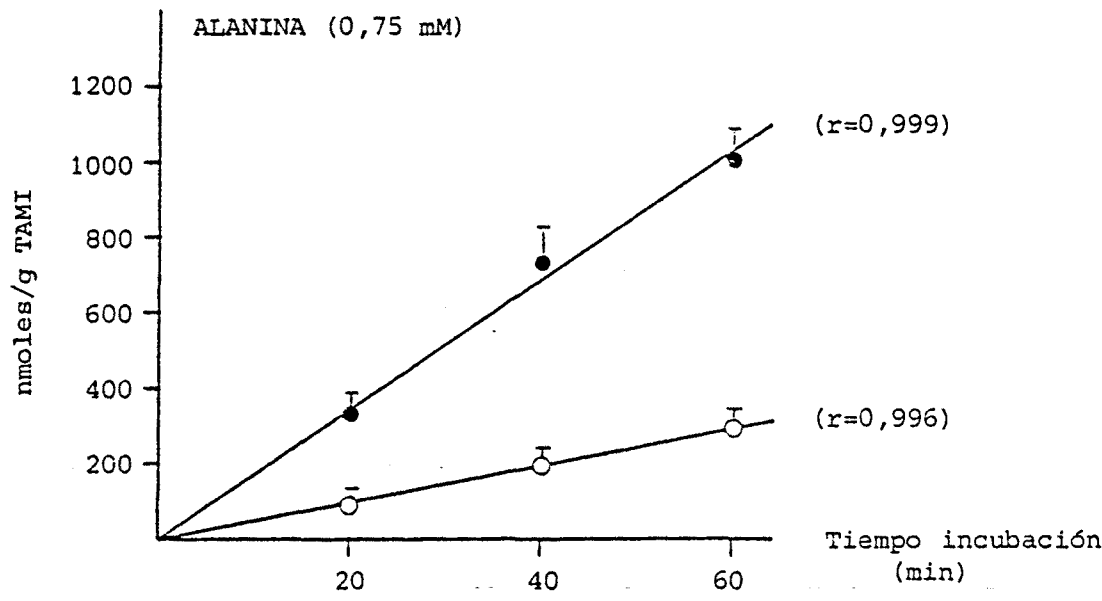
Como puede apreciarse en la gráfica 4.8, la presencia de glucosa en el medio de incubación determina un incremento notable en la captación de alanina para todas las situaciones hormonales estudiadas; por contra no afecta tanto a la oxidación de este aminoácido (gráfica 4.7), si bien la tendencia observada en todos los casos es un incremento en aquellas incubaciones realizadas en presencia de glucosa en el medio.

Gráfica 4.2.-
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ALANINA Y DE GLUCOSA SOBRE SU UTILIZACION
POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".



OXIDACION A CO₂: ●—●
INCORPORACION AL TEJIDO: ○—○

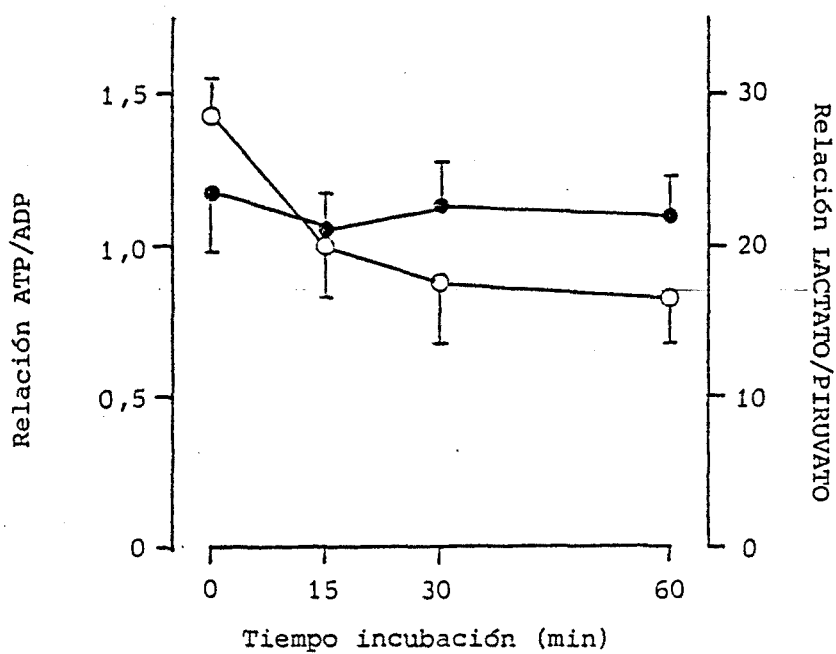
Gráfica 4.3.-
LINEALIDAD DE LA UTILIZACION DE ALANINA Y DE GLUCOSA POR EL TEJIDO
ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".



OXIDACION A CO₂: ●—●
INCORPORACION AL TEJIDO: ○—○

Gráfica 4.4.-

RELACIONES ATP/ADP Y LACTATO/PIRUVATO EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR DURANTE EL PROCESO DE INCUBACION "IN VITRO".



RELACION ATP/ADP: ● — ●
 RELACION LACTATO/PIRUVATO: ○ — ○

Tabla 4.11.-

EFFECTO DE LA GLUCOSA SOBRE LA UTILIZACION DE ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".

		[Glucosa]			
		1,0	3,0	7,5	10,0
[Alanina]					
0,3	C	1242 ± 223	985 ± 241	1143 ± 349	1584 ± 41
	T	198 ± 32	247 ± 5	230 ± 43	414 ± 32
	Σ	1440 ± 246	1232 ± 163	1373 ± 338	1998 ± 103
	%C	86,3	80,0	83,2	79,3
	%T	13,7	20,0	16,8	20,7
0,75	C	1778 ± 94	1778 ± 205	1971 ± 167	1931 ± 158
	T	311 ± 43	495 ± 86	796 ± 18	770 ± 50
	Σ	2089 ± 200	2273 ± 328	2767 ± 149	2701 ± 198
	%C	85,1	78,2	71,2	71,5
	%T	14,9	21,8	28,8	28,5
1,0	C	1413 ± 77	1922 ± 277	1742 ± 114	1386 ± 342
	T	275 ± 27	513 ± 14	648 ± 101	680 ± 90
	Σ	1688 ± 129	2435 ± 209	2390 ± 264	2066 ± 392
	%C	83,7	78,9	72,9	67,1
	%T	16,3	21,1	27,1	32,9
1,5	C	1692 ± 184	1121 ± 241	1913 ± 270	1643 ± 227
	T	405 ± 76	405 ± 40	743 ± 59	711 ± 130
	Σ	2097 ± 311	1526 ± 239	2656 ± 293	2354 ± 378
	%C	80,7	73,5	72,0	69,8
	%T	19,3	26,5	28,0	30,2

Los resultados están expresados en nanomoles de alanina oxidada a CO₂ (C) o incorporada al tejido (T) por hora y gramo de TAMI.

Σ = captación total de alanina.

C% = porcentaje de alanina oxidada respecto al total.

T% = porcentaje de alanina incorporada respecto al total.

Las concentraciones de glucosa y alanina en el medio de incubación están expresadas en milimoles/litro.

Gráfica 4.5.-
RELACION OXIDACION/INCORPORACION DE ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO
MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO" EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE
GLUCOSA Y DE ALANINA EN EL MEDIO DE INCUBACION

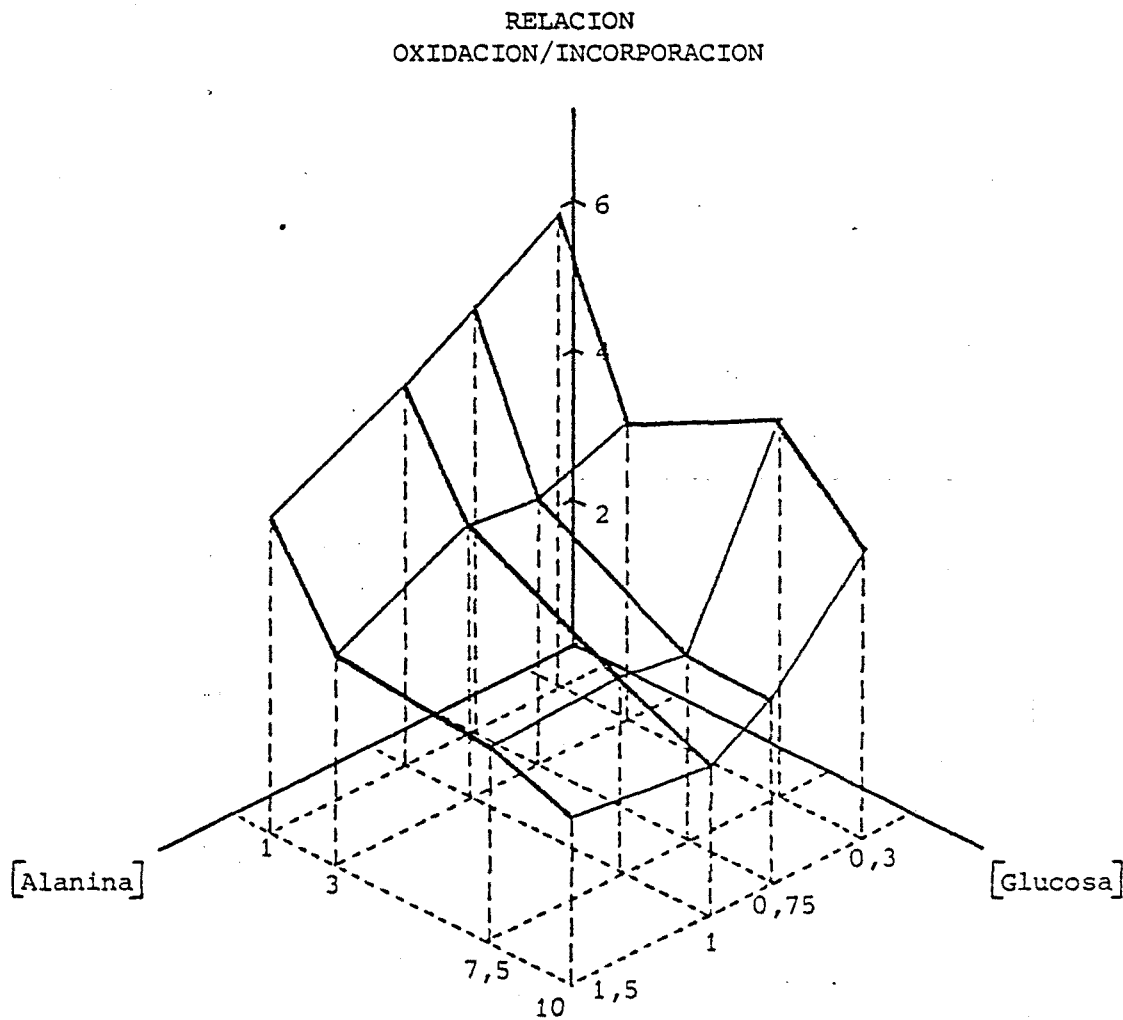


Tabla 4.12.-

EFFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA UTILIZACION DE GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".

		[Glucosa]			
		1,0	3,0	7,5	10,0
[Alanina]					
0,3	C	4747 ± 293	8556 ± 138	8254 ± 931	8524 ± 1022
	T	637 ± 48	1254 ± 211	2094 ± 138	2731 ± 139
	Σ	5384 ± 369	9810 ± 904	10348 ± 925	11255 ± 961
	%C	88,2	87,2	79,8	75,7
	%T	11,8	12,8	20,2	24,3
0,75	C	5443 ± 313	7810 ± 730	6926 ± 851	7248 ± 211
	T	612 ± 79	1255 ± 85	1686 ± 318	2499 ± 391
	Σ	6055 ± 565	9065 ± 731	8612 ± 1341	9747 ± 904
	%C	89,9	86,2	80,4	74,4
	%T	10,1	13,8	19,6	25,6
1,0	C	4751 ± 614	5868 ± 990	5655 ± 1833	5761 ± 706
	T	466 ± 42	1004 ± 105	1788 ± 370	2317 ± 267
	Σ	5217 ± 572	6872 ± 939	7443 ± 1976	8078 ± 960
	%C	91,1	85,4	76,0	71,3
	%T	8,9	14,6	24,0	28,7
1,5	C	4653 ± 805	4886 ± 246	4865 ± 552	4914 ± 1136
	T	542 ± 81	1063 ± 118	1270 ± 267	2124 ± 398
	Σ	5195 ± 838	5949 ± 480	6135 ± 993	7038 ± 1473
	%C	89,6	82,1	79,3	69,8
	%T	10,4	17,9	20,7	30,2

Los resultados están expresados en nanomoles de glucosa oxidada a CO₂ (C) o incorporada al tejido (T) por hora y gramo de TAMI.

Σ = captación total de glucosa.

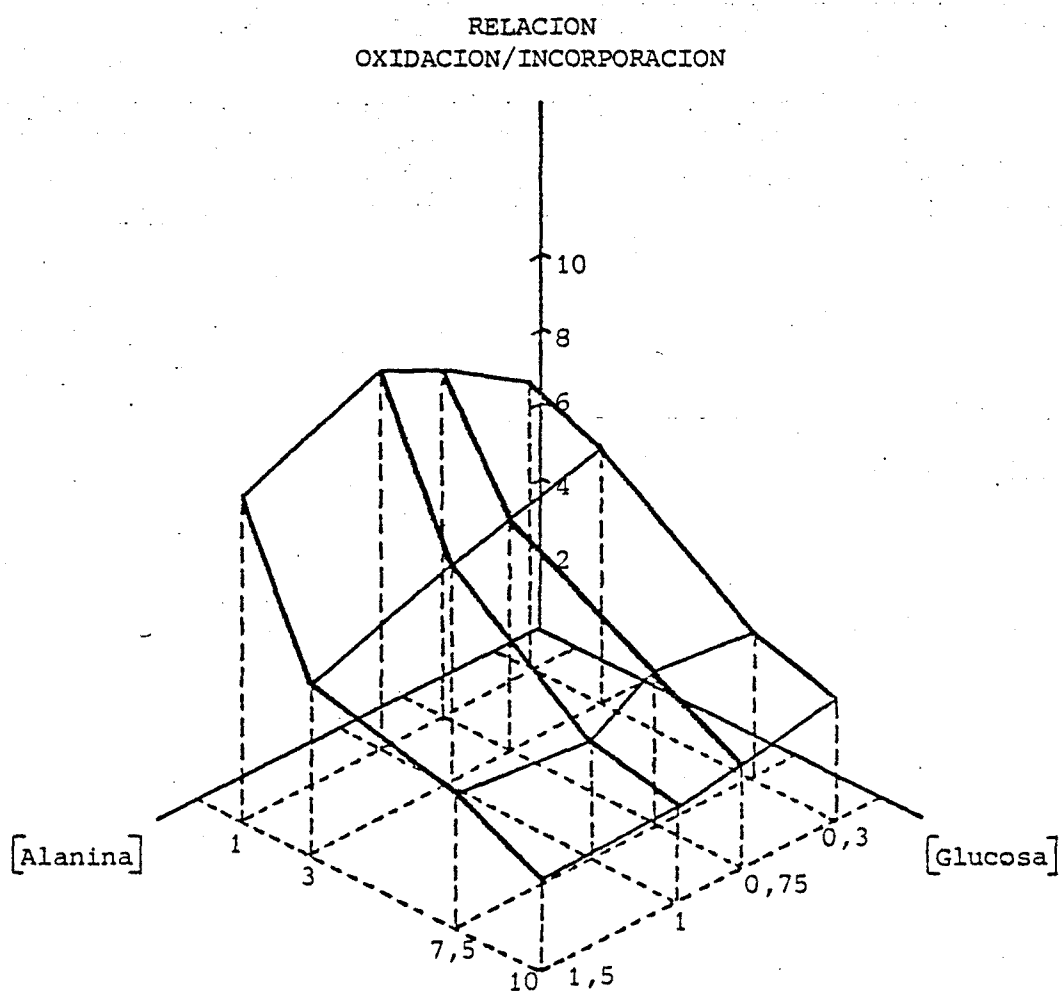
%C = porcentaje de glucosa oxidada respecto al total.

%T = porcentaje de glucosa incorporada respecto al total.

Las concentraciones de glucosa y alanina en el medio de incubación están expresadas en milimoles/litro.

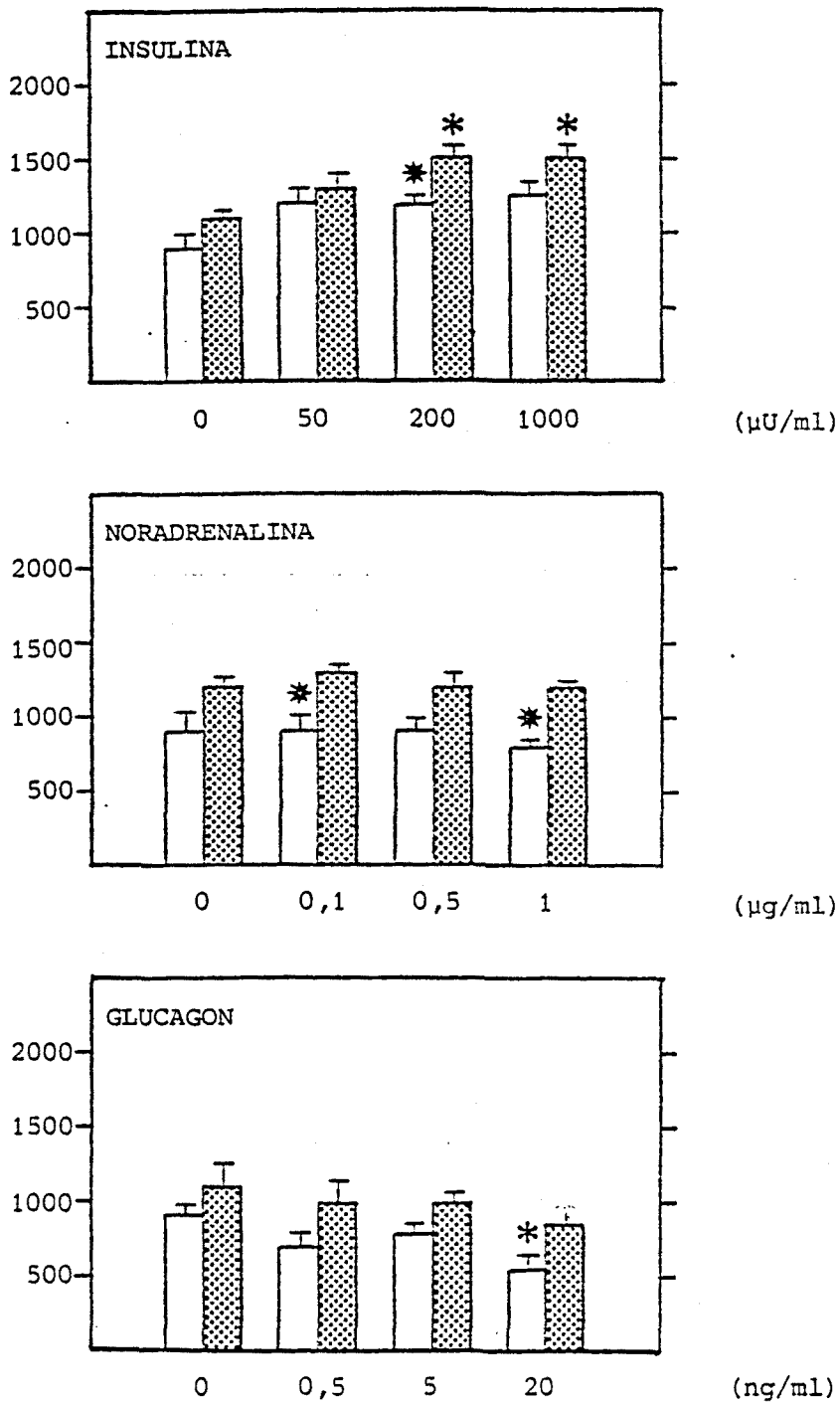
Gráfica 4.6.-

RELACION OXIDACION/INCORPORACION DE GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO" EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE ALANINA Y DE GLUCOSA EN EL MEDIO DE INCUBACION.



Gráfica 4.7.-

EFFECTO DE LA INSULINA, NORADRENALINA Y GLUCAGON SOBRE LA OXIDACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO" EN PRESENCIA O AUSENCIA DE GLUCOSA EN EL MEDIO.



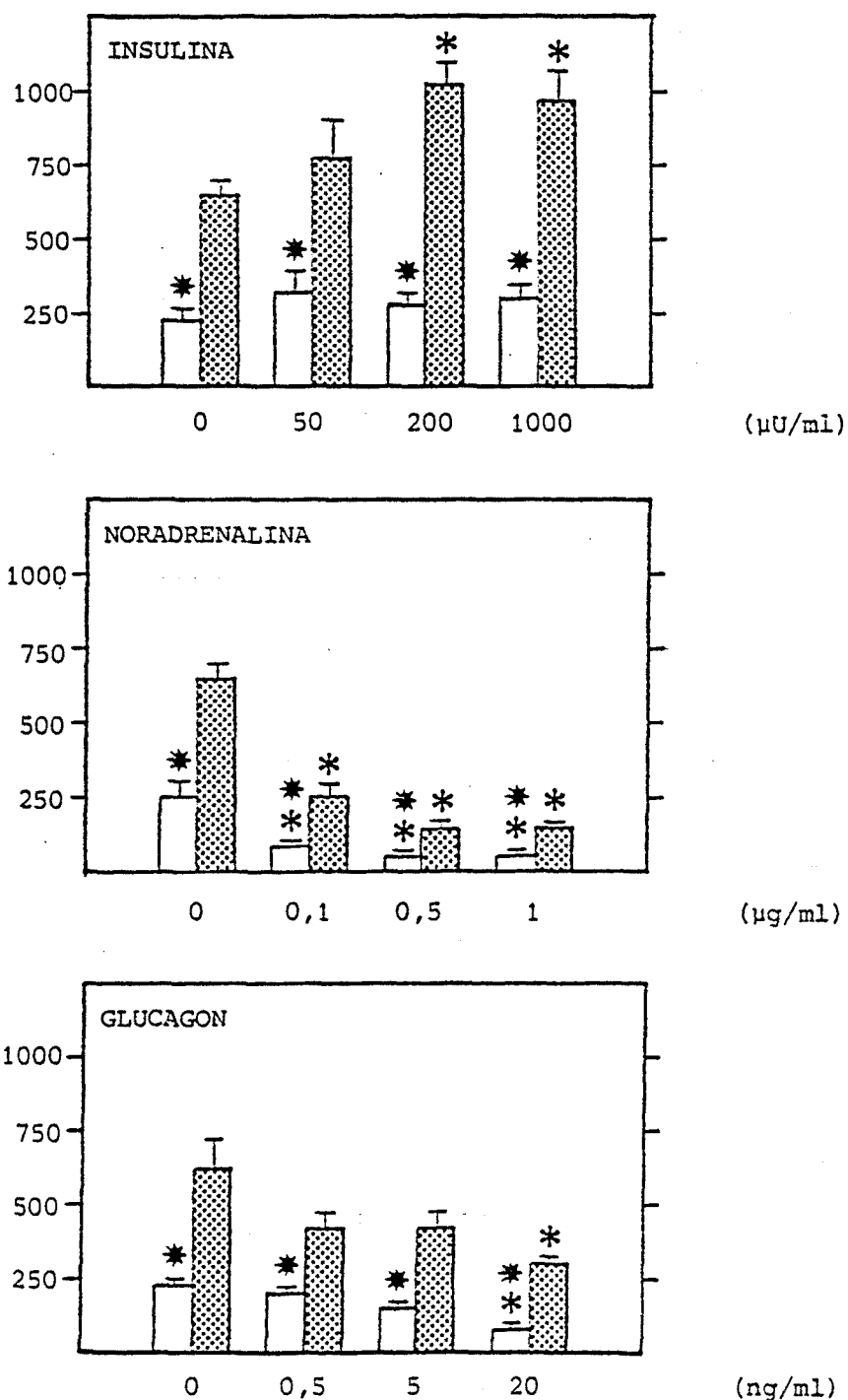
Resultados expresados en nmoles/hora/g TAMI
Significatividad entre grupos:

* = $p < 0,05$ respecto a condiciones basales.
* = $p < 0,05$ respecto a medio con glucosa.

 medio con glucosa (5mM)
 medio sin glucosa

Gráfica 4.8.-

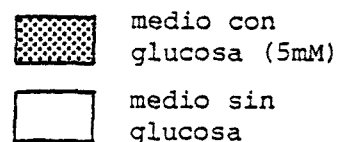
EFFECTO DE LA INSULINA, NORADRENALINA Y GLUCAGON SOBRE LA INCORPORACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO" EN PRESENCIA O AUSENCIA DE GLUCOSA EN EL MEDIO.



Resultados expresados en nmoles/hora/g TAMI
Significatividad entre grupos:

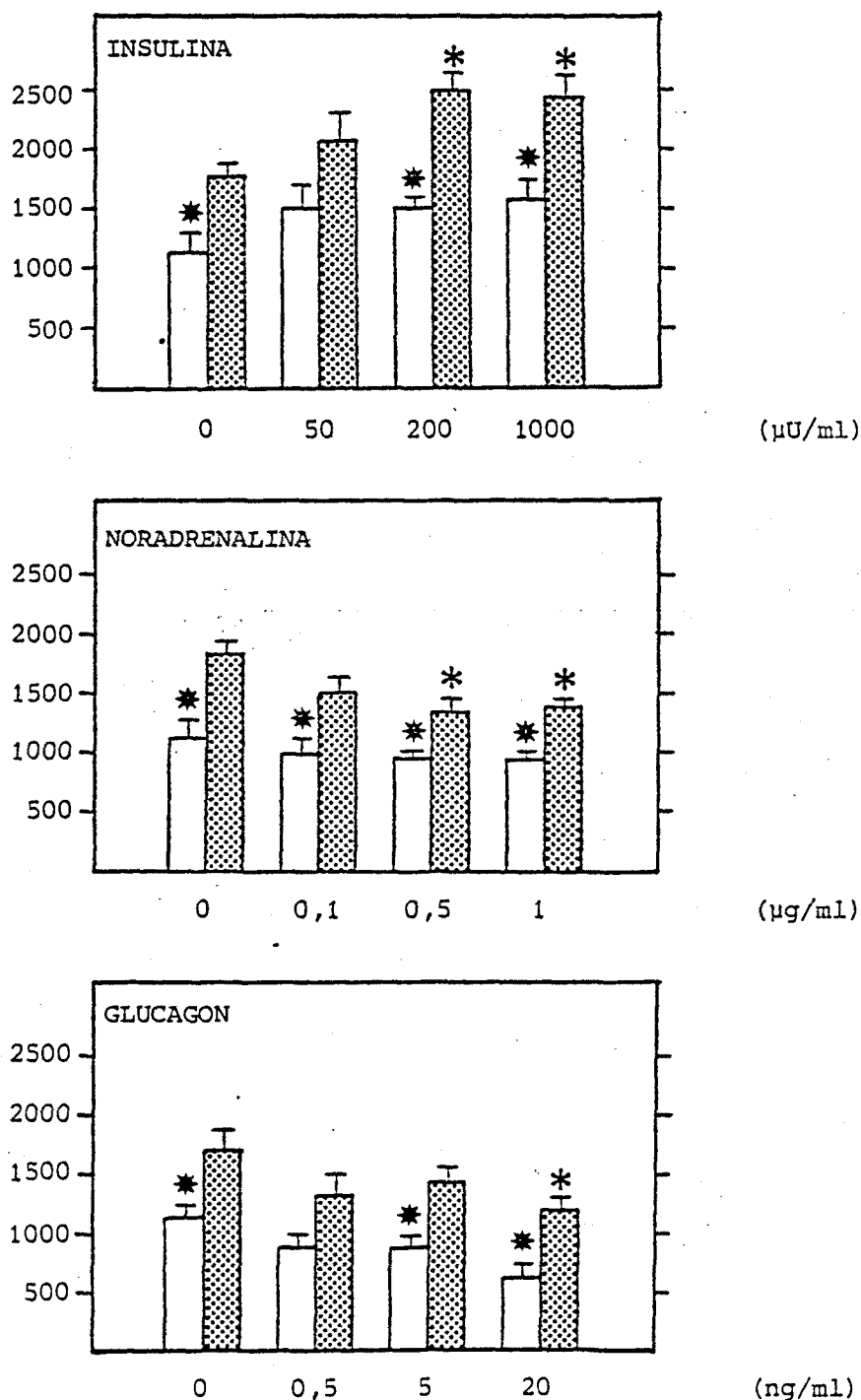
* = p 0,05 respecto a condiciones basales.

* = p 0,05 respecto a medio con glucosa.



Gráfica 4.9.-

EFFECTO DE LA INSULINA, NORADRENALINA Y GLUCAGON SOBRE LA UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO" EN PRESENCIA O AUSENCIA DE GLUCOSA EN EL MEDIO.



Resultados expresados en nmoles/hora/g TAMI
Significatividad entre grupos:

* = $p < 0,05$ respecto a condiciones basales.

★ = $p < 0,05$ respecto a medio con glucosa.

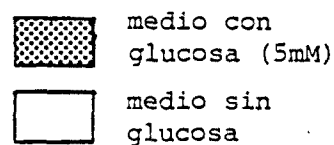


Tabla 4.13.-

PESO CORPORAL Y CARACTERISTICAS DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR DE LOS ANIMALES UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS "IN VITRO".

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Peso corporal (g)	276,0 $\pm$ 8,3	240,2 $\pm$ 8,2 *	275,8 $\pm$ 5,1	293,8 $\pm$ 6,3
Peso TAMI (mg)	343,2 $\pm$ 22,9	288,7 $\pm$ 15,0	357,7 $\pm$ 15,1	900,2 $\pm$ 26,8 *
% peso corporal	0,124 $\pm$ 0,01	0,121 $\pm$ 0,01	0,130 $\pm$ 0,01	0,307 $\pm$ 0,01 *
Proteínas (mg/g)	110,0 $\pm$ 9,07	143,3 $\pm$ 8,55	126,3 $\pm$ 5,98	132,0 $\pm$ 5,42

Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$.

4.2.4. UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO": EFECTOS DEL AYUNO Y DE FRIO.

En este apartado se procedió al estudio de la utilización de la alanina por el TAMI de animales sometidos a ayuno o a una exposición aguda o crónica al frío, en presencia de insulina y/o noradrenalina. La tabla 4.13 resume las características del TAMI de los animales utilizados en las correspondientes series experimentales; en ella puede apreciarse un notable incremento en el peso del TAMI, tanto absoluto como relativo, de los animales expuestos al frío durante 30 días, que prácticamente se triplica con relación al de los animales control.

La gráfica 4.10 muestra la linealidad respecto al tiempo de la incorporación de los carbonos de la alanina en las diferentes fracciones estudiadas. Como puede observarse, la linealidad se mantiene durante un mínimo de una hora de incubación, con coeficientes de correlación que en todos los casos superan el 98%, de forma que puede considerarse constante la velocidad de incorporación de los carbonos de la alanina durante este tiempo, salvo en el caso de la fracción hidrosoluble del tejido, en la que dicha velocidad no se mantiene constante.

Oxidación a CO₂.

En la gráfica 4.11 se presentan los resultados relativos a la oxidación de la alanina a CO₂ por el TAMI. Como puede apreciarse dicha oxidación es, cuando se presenta por peso de tejido, mayor en los animales que habían sido expuestos de forma aguda al frío que en los controles, y menor en los sometidos a ayuno o expuestos crónicamente al frío. La presencia de insulina en el medio de incubación determina un incremento de la oxidación del aminoácido en todos los grupos experimentales, salvo en el de los animales expuestos a frío agudo, en el que desaparecen las

diferencias con relación al grupo control. La noradrenalina tan sólo provoca un incremento significativo de la oxidación de alanina en los animales expuestos crónicamente al frío, mientras que en los demás únicamente se observa una tendencia (no significativa) hacia la disminución. Finalmente, la presencia combinada de ambas hormonas no afecta a la capacidad oxidativa del TAMI frente a la alanina con relación a las condiciones basales, al tiempo que desaparecen las diferencias entre los distintos grupos con relación a los controles, aunque se mantienen en el caso de los animales del grupo sometido a frío crónico.

Al expresar los resultados en función del contenido en proteínas del tejido (tabla 4.14), las tendencias se mantienen prácticamente invariables, salvo en el caso de las incubaciones en presencia de insulina + noradrenalina, en las que aparecen diferencias significativas adicionales en los animales sometidos a ayuno o a frío crónico con respecto al grupo control; en el grupo de frío crónico aparecen algunas diferencias con relación a la situación basal.

Síntesis de ácidos grasos.

La utilización de la alanina para la síntesis de ácidos grasos es notablemente superior en el grupo control y en el de los animales expuestos a frío agudo que en los otros grupos estudiados, como puede observarse en la gráfica 4.12. La adición de insulina al medio de incubación provoca un incremento de la incorporación de los carbonos del aminoácido a los ácidos grasos del tejido, si bien el incremento es estadísticamente significativo sólo en los grupos control y (especialmente) de frío crónico. Por contra, la noradrenalina determina un descenso en dicha incorporación en los grupos control, ayuno y frío agudo, manteniéndose invariable en el TAMI de los animales expuestos al frío de forma crónica. La acción conjunta de las dos hormonas determina únicamente una disminución de la incorporación en esta fracción en el tejido de los animales control, mientras que para los otros grupos se producen variaciones mínimas; de todas formas, al expresar estos resultados por peso de proteínas tisulares, se puede apreciar una disminución para el caso de los animales sometidos a ayuno (tabla 4.14).

Síntesis de glicerol de glicéridos.

Como puede apreciarse en la gráfica 4.13, la utilización de la alanina para la síntesis de glicerol de glicéridos presenta, bajo las condiciones basales, un patrón muy similar al de la síntesis de ácidos grasos, siendo considerablemente superior en el caso del grupo control y en el de los sometidos a frío agudo. La insulina no afecta significativamente dicho patrón, con pequeños incrementos no significativos en todos los grupos salvo en el control, en el que se observa la tendencia opuesta. Por su parte, la noradrenalina determina una disminución significativa en la incorporación del carbono de la alanina a esta fracción en el caso del grupo control, tendencia que se sigue manteniendo cuando esta hormona actúa conjuntamente con la insulina.

Incorporación a la fracción hidrosoluble.

Los resultados de la incorporación de la alanina a la fracción hidrosoluble del TAMI se presentan en la gráfica 4.14. Puede observarse como en las condiciones basales dicha incorporación es mayor que en el caso

de los animales sometidos a frío agudo, tendencia que se mantiene en las distintas situaciones hormonales estudiadas. La presencia de insulina o de noradrenalina en el medio de incubación determinan pequeñas variaciones que no son estadísticamente significativas, mientras que la presencia conjunta de ambas sólo provoca una disminución de en dicha incorporación en el caso de los animales sometidos a una exposición aguda al frío.

Incorporación al residuo seco deslipidado.

Bajo condiciones basales, la incorporación del carbono de la alanina al residuo seco deslipidado (fundamentalmente proteína con algo de glucógeno y otros componentes celulares) del TAMI es mayor que en el grupo de frío agudo y menor en los de ayuno y frío crónico que en el grupo control, tal como se señala en la gráfica 4.15. La presencia de insulina no afecta dicha incorporación con relación al estado basal, desapareciendo la significatividad en las diferencias que presentaban los grupos de frío agudo y crónico con relación al grupo control. En cambio, la noradrenalina produce un descenso en dicha incorporación, salvo en el caso de los animales sometidos a frío crónico. Esta acción también se presenta cuando la noradrenalina actúa conjuntamente con la insulina, tanto en el grupo control como en el de frío agudo, pero sin afectar significativamente a los otros dos grupos estudiados.

Utilización total de la alanina

En la gráfica 4.16 se muestran los resultados correspondientes a la utilización global de la alanina por el TAMI, calculada a partir de la suma de las incorporaciones de los carbonos del aminoácido a las distintas fracciones del tejido. En condiciones basales, dicha utilización es mayor en el caso de los animales expuestos al frío de forma aguda que en el del grupo control, y menores en los grupos de ayuno y frío crónico. La insulina determina un incremento en dicha utilización tanto en los animales de los grupos control como en los de frío crónico, sin variar en los otros dos casos, desapareciendo las diferencias observadas en condiciones basales entre el grupo de frío crónico y el control. La noradrenalina tiene un efecto contrario al de la insulina, disminuyendo la utilización de alanina en todos los grupos, salvo en el caso de los animales sometidos a ayuno. Al combinar la acción de las dos hormonas no se aprecian efectos significativamente diferentes con relación a las condiciones basales, si bien únicamente en el grupo de frío agudo se observan diferencias con relación al grupo control.

La expresión de los resultados en función del contenido de proteínas del tejido se recopilan en la tabla 4.14. Esencialmente no se producen diferencias importantes con relación a la expresión por peso de tejido, desapareciendo la significatividad estadística de las diferencias entre el grupo control y el de los animales sometidos a frío agudo en condiciones basales, y apareciendo diferencias significativas entre los grupos de animales ayunados y sometidos a frío crónico con relación a los controles en el caso de las incubaciones efectuadas en presencia de insulina y noradrenalina.

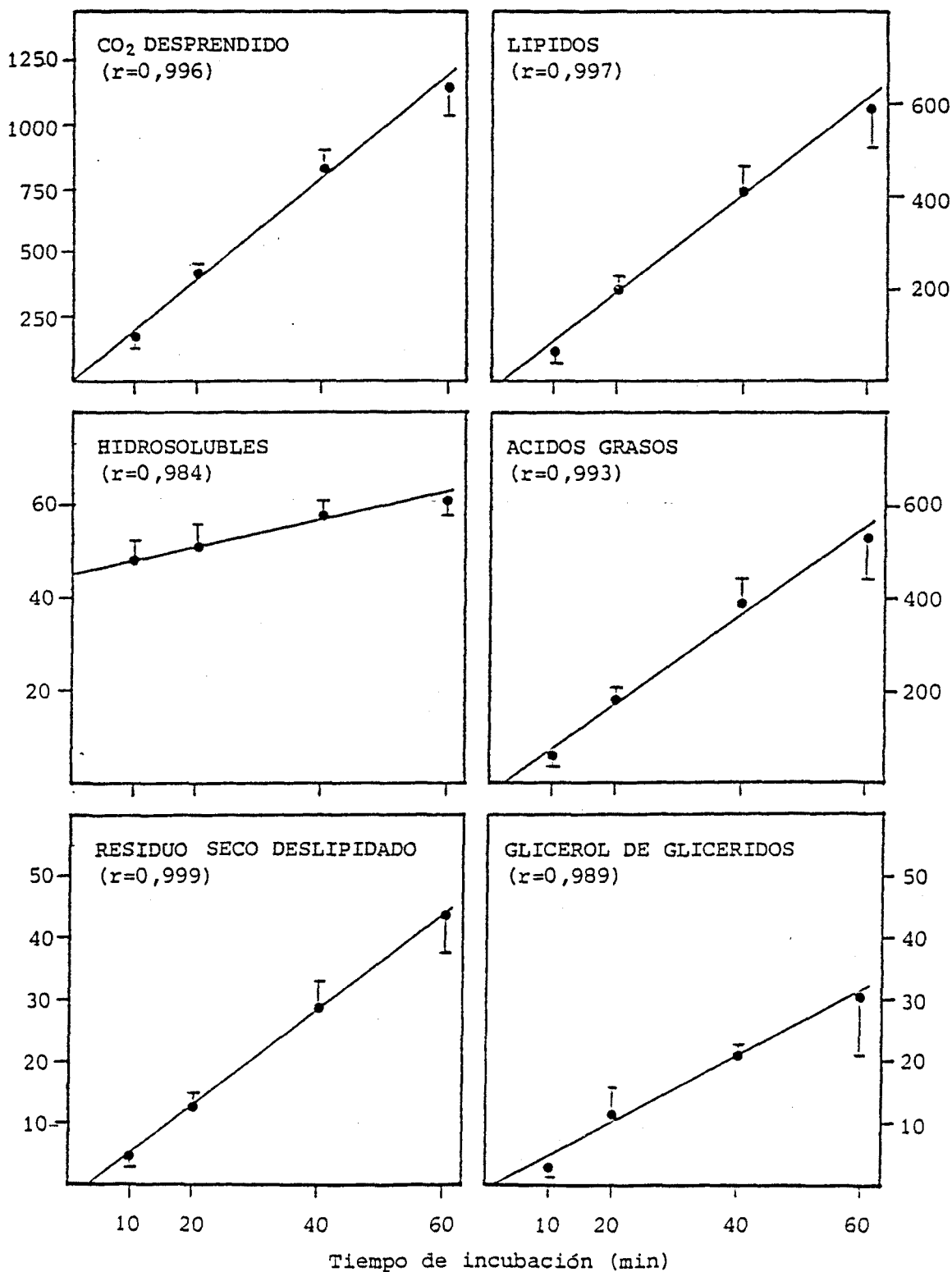
Al referir la utilización total de la alanina al tejido total (tabla 4.15), se observa que en condiciones basales la utilización es menor en el grupo de animales ayunados y mayor en de frío agudo que en el control. La insulina incrementa la utilización del aminoácido por el TAMI de los



animales ayunados y de los expuestos crónicamente al frío, mientras que la noradrenalina la disminuye en los grupos control y de frío agudo, incrementándose en el grupo de frío crónico. Al combinar la acción de ambas hormonas desaparecen las diferencias estadísticas respecto a las condiciones basales.

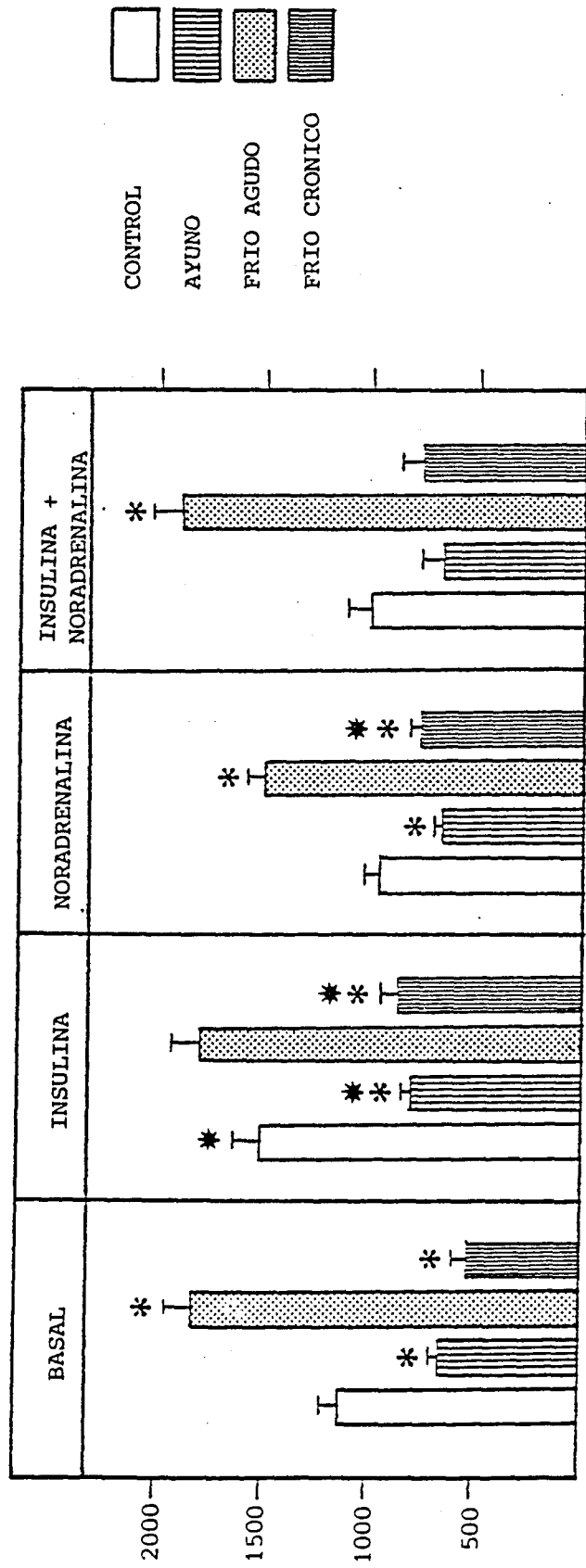
Gráfica 4.10.-

LINEALIDAD DE LA INCORPORACION DE LOS CARBONOS DE LA ALANINA A DISTINTAS FRACCIONES DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".



Resultados expresados en nanomoles/g TAMI.

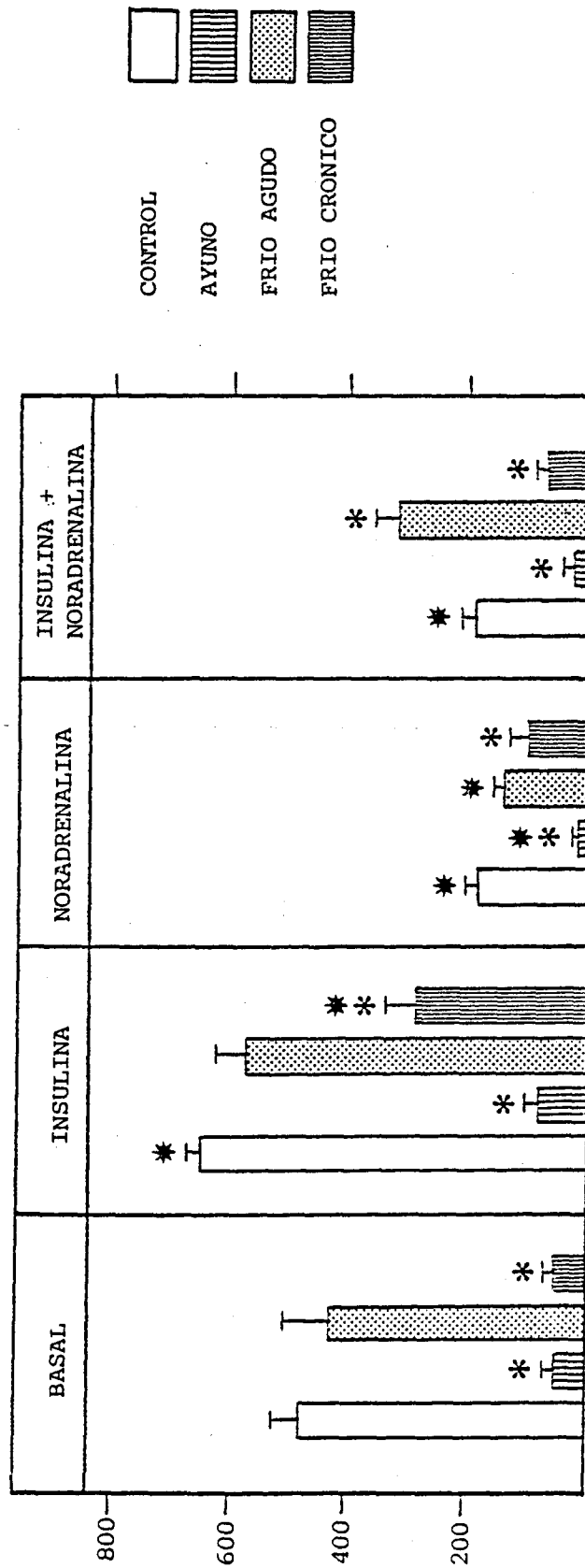
Gráfica 4.11.-
OXIDACION DE LA ALANINA A CO₂ POR EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO"



Resultados expresados en nanomoles/hora/ g TAMI.

Significatividad entre grupos: * = p<0,05 para cada situación hormonal respecto a la basal.
* = p<0,05 para una misma situación hormonal respecto a control.

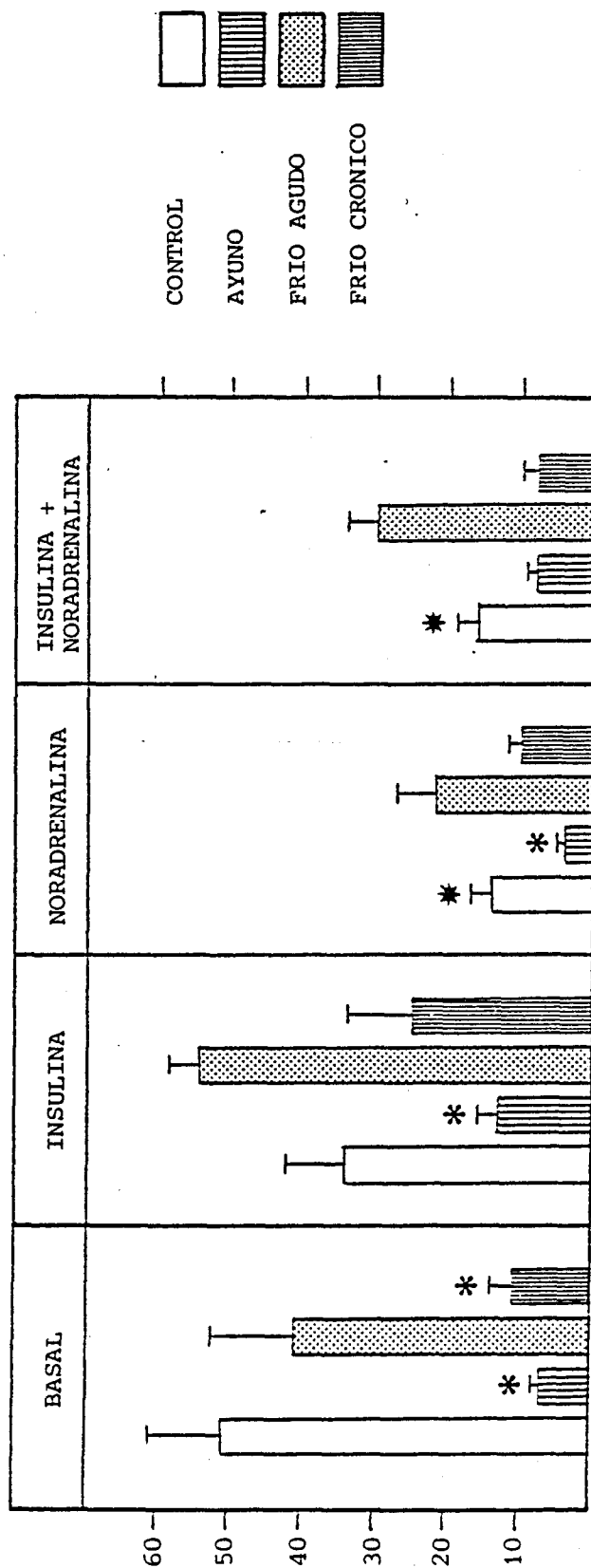
Gráfica 4.12.-
UTILIZACIÓN DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO"
PARA LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS.



Resultados expresados en nanomoles/hora/ g TAMI.

Significatividad entre grupos: * = $p < 0,05$ para cada situación hormonal respecto a la basal.
* = $p < 0,05$ para una misma situación hormonal respecto a control.

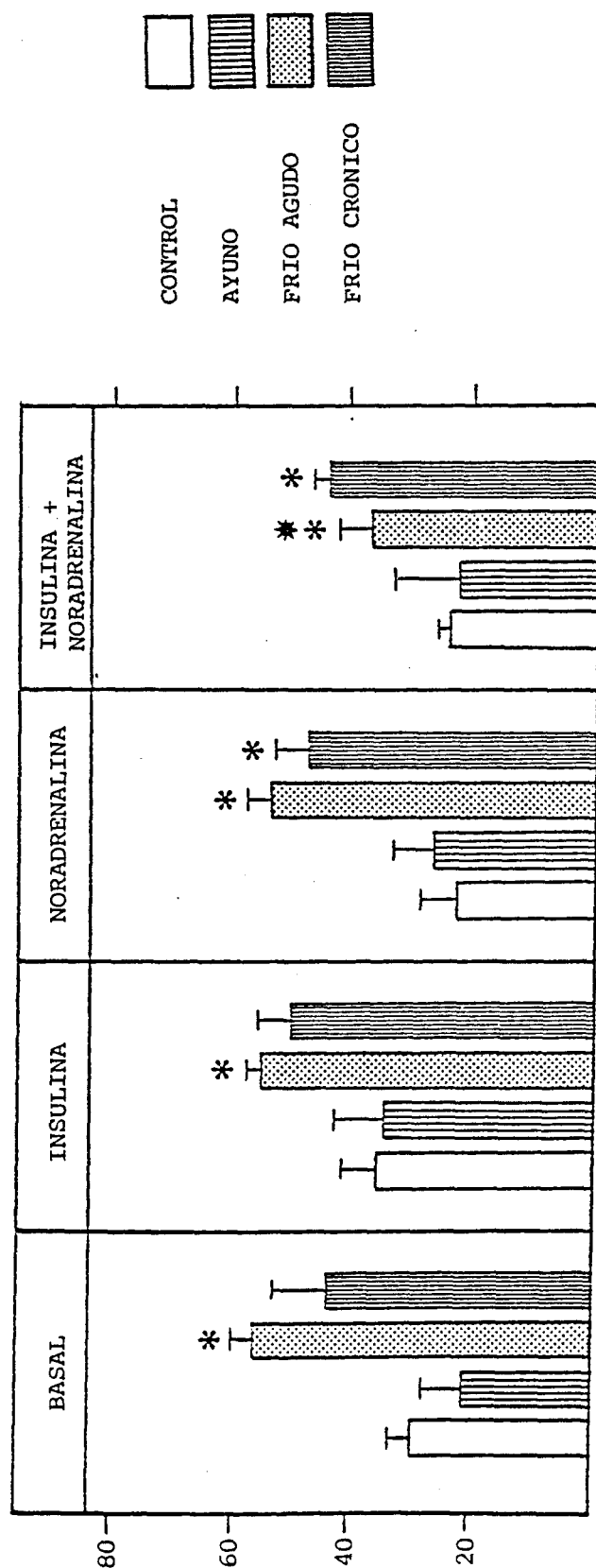
Gráfica 4.13.-
UTILIZACIÓN DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO"
PARA LA SÍNTESIS DE GLICEROL DE GLICERIDOS.



Resultados expresados en nanomoles/hora/ g TAMI.

Significatividad entre grupos: * = p 0,05 para cada situación hormonal respecto a la basal.
* = p 0,05 para una misma situación hormonal respecto a control.

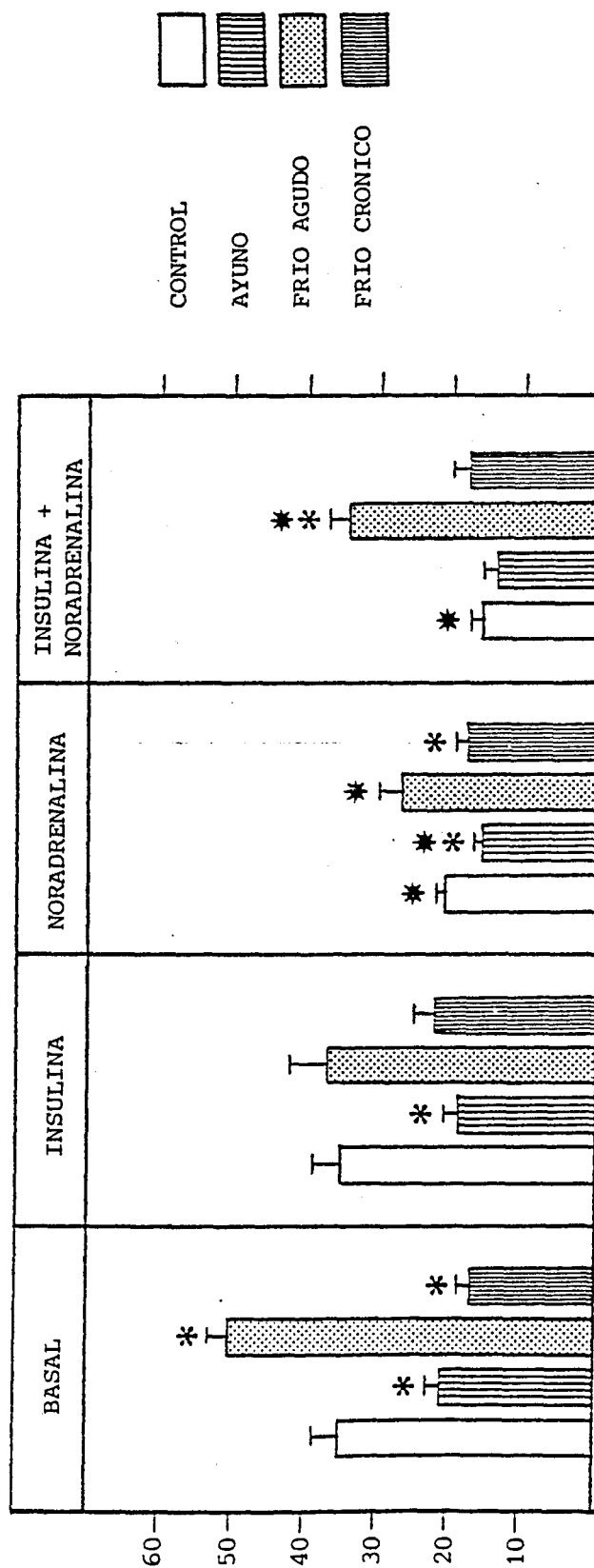
Gráfica 4.14.-
INCORPORACION DE LOS CARBONOS DE LA ALANINA A LA FRACCION HIDROSOLUBLE DEL TEJIDO
ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".



Resultados expresados en nanomoles/hora/g TAMI.

Significatividad entre grupos: * = $p < 0,05$ para cada situación hormonal respecto a la basal
* = $p < 0,05$ para una misma situación hormonal respecto a control.

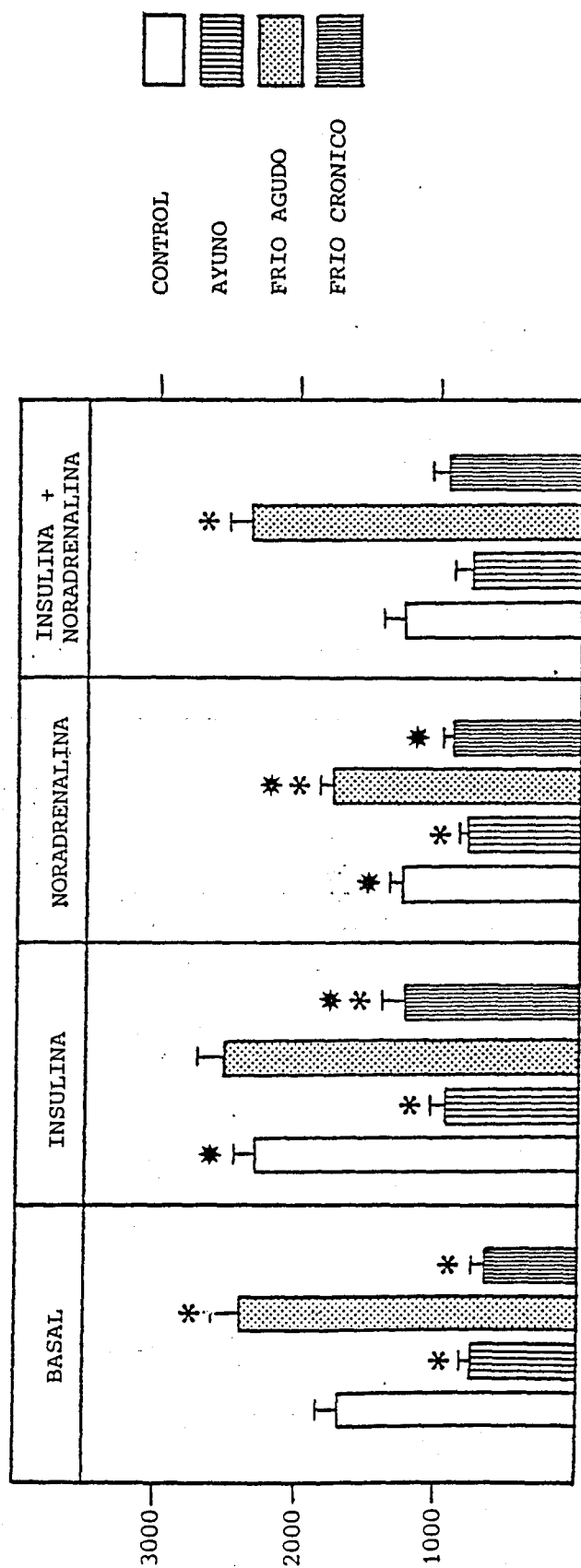
Gráfica 4.15.-
INCORPORACION DE LOS CARBONOS DE LA ALANINA A LA FRACCION DE RESIDUO SECO DESLIPIDADO DEL
TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".



Resultados expresados en nanomoles/hora/g TAMI.

Significatividad entre grupos: * = $p < 0,05$ para cada situación hormonal respecto a la basal.
* = $p < 0,05$ para una misma situación hormonal respecto a control.

Gráfica 4.16.-
UTILIZACIÓN DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO"



Resultados expresados en nanomoles/hora/ g TAMI.

Significatividad entre grupos: * = $p < 0,05$ para cada situación hormonal respecto a la basal.
 ** = $p < 0,05$ para una misma situación hormonal respecto a control.

Tabla 4.14.-

UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR
 "IN VITRO": RESULTADOS EXPRESADOS POR CONTENIDO EN PROTEINAS.

	BASAL	INSULINA	NORADRENALINA	INSUL + NA
Oxidación a CO ₂ (a):				
Control	10,10 ± 0,73	13,72 ± 1,02 †	8,72 ± 0,57	8,93 ± 0,87
Ayuno	4,49 ± 0,21 *	5,52 ± 0,29 *†	4,69 ± 0,29 *	4,73 ± 0,58 *
Frío agudo	14,35 ± 0,85 *	14,18 ± 0,99	11,80 ± 0,60 *	15,04 ± 0,84 *
Frío crónico	3,89 ± 0,36 *	6,48 ± 0,54 *†	5,73 ± 0,31 *†	5,78 ± 0,52 *†
Acidos grasos (a):				
Control	4,36 ± 0,31	5,87 ± 0,23 †	1,64 ± 0,12 †	1,72 ± 0,22 †
Ayuno	0,36 ± 0,06 *	0,59 ± 0,11 *	0,10 ± 0,01 *†	0,17 ± 0,02 *†
Frío agudo	3,40 ± 0,43	4,53 ± 0,34 *	1,10 ± 0,11 *†	2,58 ± 0,24
Frío crónico	0,45 ± 0,08 *	2,04 ± 0,28 *†	0,69 ± 0,13 *	0,54 ± 0,08 *
Glicerol de glicéridos (b):				
Control	467 ± 78	309 ± 58	127 ± 18 †	147 ± 25 †
Ayuno	50 ± 6 *	91 ± 14 *	30 ± 5 *	53 ± 8 *
Frío agudo	330 ± 70	424 ± 26 *	176 ± 29	235 ± 25
Frío crónico	80 ± 15 *	186 ± 55	77 ± 9	57 ± 10 *
"Hidrosolubles" (b):				
Control	268 ± 30	329 ± 50	207 ± 46	215 ± 12
Ayuno	149 ± 34	245 ± 49	181 ± 40	161 ± 57
Frío agudo	446 ± 29 *	439 ± 21	432 ± 28 *	294 ± 35 †
Frío crónico	332 ± 55	380 ± 34	362 ± 33	339 ± 16 *
Residuo seco deslipidado (b):				
Control	313 ± 24	312 ± 24	190 ± 19 †	147 ± 12 †
Ayuno	144 ± 13 *	132 ± 11 *	96 ± 5 *†	102 ± 10
Frío agudo	397 ± 23	295 ± 30	215 ± 22 †	270 ± 22 *†
Frío crónico	128 ± 12 *	167 ± 19 *	135 ± 3 *	138 ± 11
Utilización total (a):				
Control	15,51 ± 1,17	20,54 ± 1,38 †	10,89 ± 0,78 †	11,15 ± 1,14
Ayuno	5,19 ± 0,33 *	6,57 ± 0,47 *	5,09 ± 0,35 *	5,21 ± 0,67 *
Frío agudo	18,93 ± 1,41	19,87 ± 1,40	13,72 ± 0,79 †	18,43 ± 1,16 *
Frío crónico	4,88 ± 0,52 *	9,26 ± 0,93 *†	7,00 ± 0,49 *†	6,85 ± 0,63 *

Resultados expresados en: (a) µmoles/hora/g proteína.

(b) nmoles/hora/g proteína.

Significatividad de las diferencias entre grupos:

* = p<0,05 para una misma situación hormonal respecto a control.

† = p<0,05 para cada tratamiento hormonal respecto a la basal.

Tabla 4.15.-

UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR
"IN VITRO": RESULTADOS EXPRESADOS POR TAMI TOTAL.

	BASAL	INSULINA	NORADRENALINA	INSUL + NA
Oxidación a CO ₂ :				
Control	385 ± 26	523 ± 37 †	332 ± 21	340 ± 32
Ayuno	186 ± 8 *	228 ± 11 *†	194 ± 11 *	196 ± 23 *
Frio agudo	648 ± 38 *	641 ± 44	641 ± 32 *	680 ± 37 *
Frio crónico	462 ± 42	770 ± 62 *†	681 ± 35 *†	686 ± 60 *†
Acidos grasos:				
Control	166,2 ± 11,2	223,6 ± 7,7 †	62,5 ± 4,4 †	65,4 ± 8,2 †
Ayuno	14,8 ± 2,6 *	24,5 ± 4,4 *	4,2 ± 0,4 *†	6,9 ± 1,0 *†
Frio agudo	153,7 ± 19,4	204,7 ± 15,0	49,5 ± 4,8 †	116,8 ± 10,6 *
Frio crónico	53,9 ± 9,1 *	242,9 ± 32,5 †	82,5 ± 15,7	63,9 ± 9,1
Glicerol de glicéridos:				
Control	17,80 ± 2,90	11,77 ± 2,16	4,84 ± 0,67 †	5,59 ± 0,92 †
Ayuno	2,06 ± 0,26 *	3,75 ± 0,59 *	1,24 ± 0,20 *	2,18 ± 0,34 *
Frio agudo	14,90 ± 3,16	19,20 ± 1,17 *	7,94 ± 1,28	10,60 ± 1,12 *
Frio crónico	9,45 ± 1,70	22,10 ± 6,43	9,18 ± 1,10 *	6,78 ± 1,16
"Hidrosolubles":				
Control	10,19 ± 1,12	12,50 ± 1,86	7,89 ± 1,70	8,20 ± 0,41
Ayuno	6,15 ± 1,38	10,11 ± 1,99	7,51 ± 1,63	6,64 ± 2,36
Frio agudo	20,13 ± 1,28 *	19,80 ± 0,92 *	19,51 ± 1,23 *	13,30 ± 1,56 *†
Frio crónico	39,42 ± 6,42 *	45,10 ± 3,91 *	43,03 ± 3,79 *	40,24 ± 1,83 *
Residuo seco deslipidado:				
Control	11,91 ± 0,88	11,87 ± 0,88	7,24 ± 0,70 †	5,59 ± 0,45 †
Ayuno	5,95 ± 0,54 *	5,46 ± 0,43 *	3,98 ± 0,20 *†	4,22 ± 0,41
Frio agudo	17,92 ± 1,00 *	13,34 ± 1,34	9,73 ± 0,98 †	12,20 ± 1,19 *†
Frio crónico	15,23 ± 1,33	19,91 ± 2,19 *	16,01 ± 0,36 *	16,42 ± 1,28 *
Utilización total:				
Control	591 ± 43	782 ± 50 †	415 ± 28 †	425 ± 42
Ayuno	215 ± 13 *	272 ± 19 *	211 ± 14 *	216 ± 28 *
Frio agudo	855 ± 62 *	898 ± 62	610 ± 40 *†	833 ± 52 *
Frio crónico	580 ± 60	1100 ± 107 *†	832 ± 56 *†	814 ± 73 *

Resultados expresados en nmoles/hora/TAMI total.

Significatividad de las diferencias entre grupos:

* = p<0,05 para una misma situación hormonal respecto a control.

† = p<0,05 para cada tratamiento hormonal respecto a la basal.

4.3. Parte 3: ESTUDIO DE LA CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS Y GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VIVO".

4.3.1. FLUJO SANGUINEO A TRAVES DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

En la tabla 4.17 se presentan los valores del flujo sanguíneo a través del TAMI de los animales de los distintos grupos experimentales estudiados, y que aparecen expresados tanto por gramo de tejido como por tejido total. Como puede apreciarse, el flujo en el TAMI de los animales ayunados desciende más de un 50% con relación al de los animales del grupo control, si bien las diferencias no son estadísticamente significativas debido a la alta dispersión de los resultados de este último grupo. Si son significativos los incrementos en el flujo sanguíneo como resultado de la exposición aguda o crónica al frío para cualquiera de las expresiones utilizadas.

4.3.2. CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS Y GLUCOSA EN SANGRE Y PLASMA ARTERIAL.

Las tabla 4.18 y 4.19 muestran respectivamente las concentraciones de aminoácidos individuales y de glucosa en la sangre y plasma arterial de los animales utilizados en los experimentos de la presente serie, animales cuyo peso corporal, peso del TAMI y el valor del hematocrito se recogen en la tabla 4.16.

El ayuno es la situación en la que se observan las mayores variaciones en las concentraciones con relación al grupo control. En el caso de la sangre total estas variaciones se reflejan en un descenso de los niveles de alanina, prolina y citrulina, mientras que aumentan los de aspartato y taurina. En el plasma se observa una disminución de la concentración total de aminoácidos, la cual afecta especialmente a la alanina, y también a aspartato, asparraguina, treonina, prolina, histidina, citrulina, ornitina, metionina y triptófano. Los niveles arteriales de glucosa en el ayuno son significativamente inferiores a los del grupo control, tanto referidos al plasma como a la sangre total.

Las variaciones debidas a la exposición aguda al frío en las concentraciones arteriales de aminoácidos y glucosa son escasas, con un incremento en la glutamina sanguínea y en la alanina y el triptófano plasmáticos, sin que se modifiquen significativamente los niveles de aminoácidos totales ni los de glucosa. La exposición crónica al frío provoca un descenso significativo de los niveles en sangre arterial de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina, mientras que en el plasma hay una disminución significativa de la concentración de aminoácidos totales como resultado de los descensos parciales en los de niveles de asparraguina, serina, treonina, histidina, ornitina, tirosina y triptófano; tampoco en este caso varía la concentración arterial de glucosa.

4.3.3. CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VIVO".

En las gráficas 4.17, 4.18, 4.19 y 4.20 se muestran los resultados correspondientes a la captación (valores positivos) o liberación (valores negativos) para los distintos aminoácidos individuales por el TAMI *in vivo*, obtenidos a partir de las diferencias arterio-venosas y del flujo sanguíneo a través del tejido. En dicha gráfica se indica la contribución de las

fracciones celular y plasmática. Los datos están expresados en nanomoles captados/liberados por minuto y por gramo de tejido.

En los animales del grupo control (gráfica 4.17) se observa una captación neta a partir de la fracción plasmática de glutamato, glutamina, prolina, lisina, histidina, ornitina, leucina, isoleucina, valina y triptófano, mientras que se detecta una liberación de prolina, lisina, histidina, fenilalanina y triptófano hacia la fracción celular y de taurina hacia la plasmática.

En el caso de los animales sometidos a ayuno (gráfica 4.18) las variaciones son cuantitativamente pequeñas. Se aprecia una captación de glutamato y liberación de treonina, prolina, citrulina y taurina a partir de la fracción plasmática, mientras que hay captación de citrulina y liberación de alanina a partir de la fracción celular.

El TAMI de los animales que fueron expuestos de forma aguda al frío (gráfica 4.19) muestra una captación de los aminoácidos de cadena ramificada del plasma al tiempo que libera taurina, mientras que hay captación de taurina de la fracción celular y liberación de prolina hacia la misma.

La exposición crónica al frío determina una captación de leucina y de isoleucina y liberación de alanina y taurina plasmáticas por parte del TAMI, sin que se observen cambios significativos con respecto a la fracción celular.

Al agrupar los aminoácidos en esenciales (treonina, lisina, histidina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina y triptófano) y no esenciales (alanina, glutamato, glutamina, aspartato, asparraguina, serina, glicina, prolina, arginina, citrulina, ornitina, taurina y tirosina), así como el conjunto de los aminoácidos totales, tal como se indica en la gráfica 4.21, se observa en el caso del grupo control una captación de aminoácidos esenciales y totales a nivel de la fracción plasmática, y liberación de los mismos hacia la fracción celular. En el caso del TAMI de los animales sometidos a ayuno, las diferencias observadas no son significativas, y en conjunto los cambios son mínimos si se comparan con los observados en los otros grupos. En el grupo de los animales sometidos al frío de forma aguda se observa una tendencia hacia la captación de aminoácidos tanto esenciales como no esenciales, si bien dicha captación no es estadísticamente significativa. Finalmente, el TAMI de los animales expuestos crónicamente al frío muestra una clara liberación de aminoácidos esenciales y totales, en ambos casos únicamente hacia la fracción plasmática.

En la tabla 4.20 se presentan los resultados relativos a la captación o liberación global de aminoácidos y glucosa por el TAMI *in vivo*, sumando las contribuciones de las fracciones plasmática y celular. En el grupo control se observa una liberación de prolina y de taurina, mientras que no se presentan cambios estadísticamente significativos para los otros aminoácidos. En el grupo de los animales ayunados hay liberación de alanina, glutamina, glicina y citrulina, así como del conjunto de los aminoácidos no esenciales. El TAMI de los animales expuestos a frío agudo libera prolina, al tiempo que capta significativamente isoleucina y el conjunto de los aminoácidos esenciales. En el caso de los animales expuestos crónicamente al frío se observa una liberación de alanina, arginina y taurina, al tiempo que hay captación de glutamina y de isoleucina.

4.3.4. CAPTACION/LIBERACION DE GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VIVO".

En la gráfica 4.22 se presentan los resultados correspondientes a la captación o liberación de glucosa *in vivo* por el TAMI de los animales de los distintos grupos experimentales estudiados. Como puede apreciarse, hay una captación significativa de glucosa en el caso de los animales del grupo control, así como en los que fueron expuestos al frío de forma aguda o crónica, en todos ellos a partir de la fracción plasmática. En cambio no se observa ninguna variación en el caso de los animales ayunados.

En la tabla 4.20 se observa como el TAMI de los animales expuestos al frío, tanto de forma aguda como crónica, capta glucosa de forma estadísticamente significativa, cosa que no acontece en el caso de los animales del grupo control ni en los ayunados.

Tabla 4.16.-

PESO CORPORAL, PESO DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR Y HEMATOCRITO DE LOS ANIMALES UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS "IN VIVO".

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Peso corporal (g)	278,4 ± 7,3	237,3 ± 5,9 *	268,8 ± 8,6	219,1 ± 5,4 *
Peso TAMI (mg)	368,8 ± 13,3	262,1 ± 12,4 *	311,4 ± 17,2 *	620,3 ± 38,2 *
% peso corporal	0,133 ± 0,01	0,110 ± 0,01 *	0,114 ± 0,01 *	0,299 ± 0,01 *
Hematocrito (%)	41,6 ± 0,81	43,0 ± 0,54	42,1 ± 0,61	41,4 ± 0,54

Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$.

Tabla 4.17.-

FLUJO SANGUINEO A TRAVES DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

Grupo:	ml/min/TAMI total	ml/min/g TAM
Control	0,20 ± 0,09	0,38 ± 0,18
Ayuno	0,08 ± 0,02	0,27 ± 0,02
Frio agudo	0,70 ± 0,01 *	1,23 ± 0,11 *
Frio crónico	1,19 ± 0,11 *	1,21 ± 0,05 *

Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$.

Tabla 4.18.-

CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS INDIVIDUALES Y GLUCOSA EN SANGRE ARTERIAL DE ANIMALES SOMETIDOS A AYUNO, FRIO AGUDO O FRIO CRONICO COMPARADOS CON CONTROLES

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Ala	610 ± 58	371 ± 40 *	565 ± 54	599 ± 57
Glu	324 ± 26	352 ± 30	365 ± 33	299 ± 22
Gln	684 ± 61	686 ± 70	927 ± 91 *	747 ± 56
Asp	38 ± 5	57 ± 5 *	43 ± 4	32 ± 3
Asn	80 ± 8	65 ± 10	73 ± 7	61 ± 8
Ser	276 ± 24	294 ± 22	302 ± 38	265 ± 23
Thr	268 ± 20	244 ± 22	294 ± 34	216 ± 17
Gly	326 ± 20	385 ± 33	374 ± 37	306 ± 14
Pro	185 ± 14	120 ± 19 *	169 ± 10	190 ± 23
Lys	404 ± 23	467 ± 33	446 ± 36	434 ± 22
Arg	293 ± 33	256 ± 28	310 ± 35	314 ± 26
His	106 ± 7	103 ± 11	119 ± 8	98 ± 6
Cit	91 ± 9	61 ± 8 *	94 ± 10	89 ± 9
Orn	97 ± 9	76 ± 6	113 ± 10	84 ± 4
Leu	226 ± 25	193 ± 30	244 ± 22	192 ± 11
Ile	117 ± 13	114 ± 16	129 ± 12	96 ± 6
Val	241 ± 28	209 ± 26	247 ± 18	223 ± 10
Tau	246 ± 22	315 ± 22 *	285 ± 20	265 ± 16
Phe	92 ± 7	90 ± 10	102 ± 6	72 ± 2 *
Tyr	84 ± 8	78 ± 7	88 ± 7	58 ± 4 *
Trp	24 ± 2	20 ± 2	29 ± 1	26 ± 2
Totales	4,81 ± 0,29	4,56 ± 0,35	5,32 ± 0,30	4,67 ± 0,25
Glucosa	5,82 ± 0,31	4,10 ± 0,34 *	5,67 ± 0,24	5,84 ± 0,35

Las concentraciones están expresadas en micromoles/litro para los aminoácidos individuales y en milimoles/ litro para los aminoácidos totales y la glucosa. Significatividad respecto a control: * = $p < 0,05$

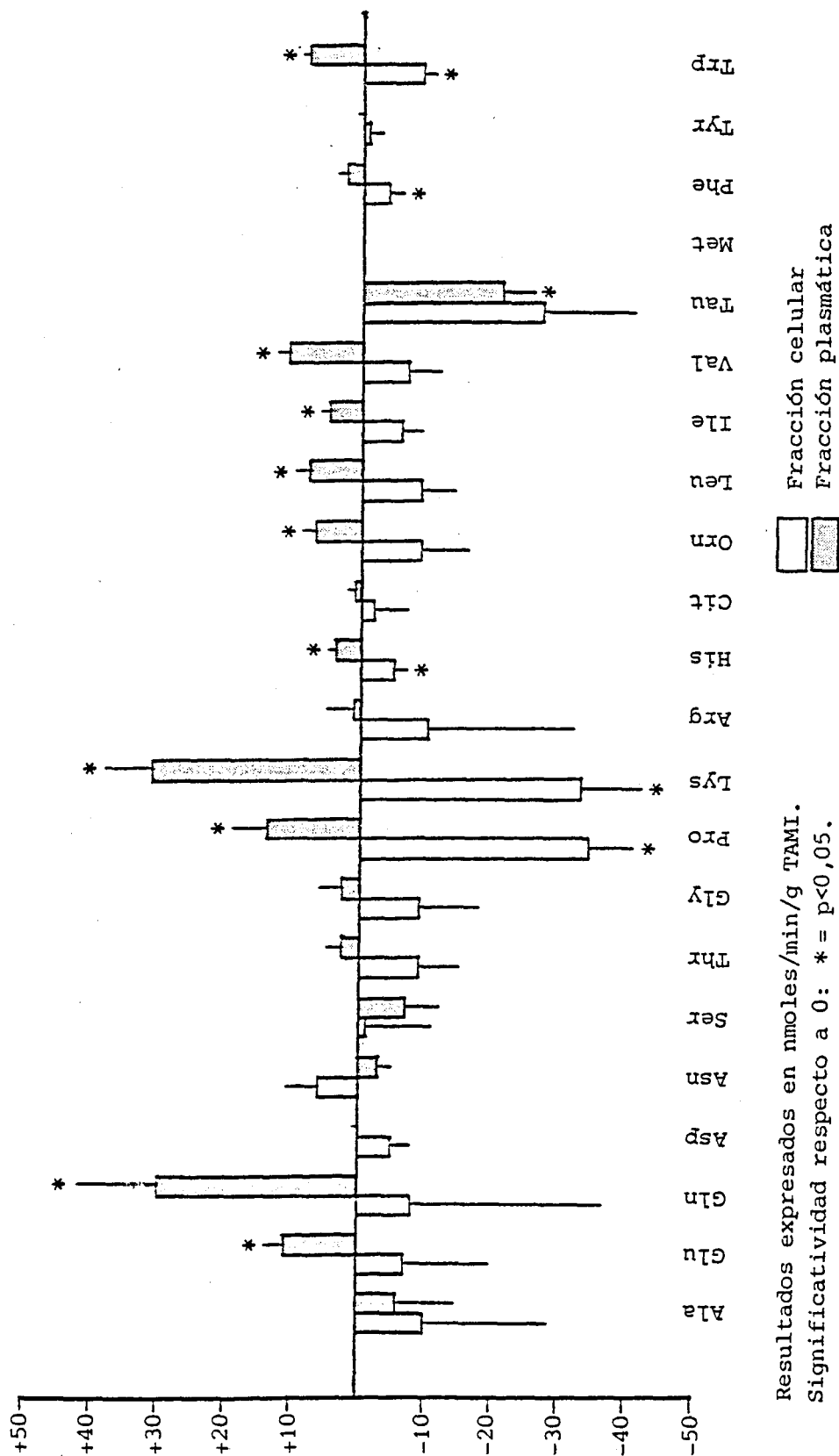
Tabla 4.19.-

CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS INDIVIDUALES Y GLUCOSA EN PLASMA ARTERIAL DE ANIMALES SOMETIDOS A AYUNO, FRIO AGUDO O FRIO CRONICO COMPARADOS CON CONTROLES

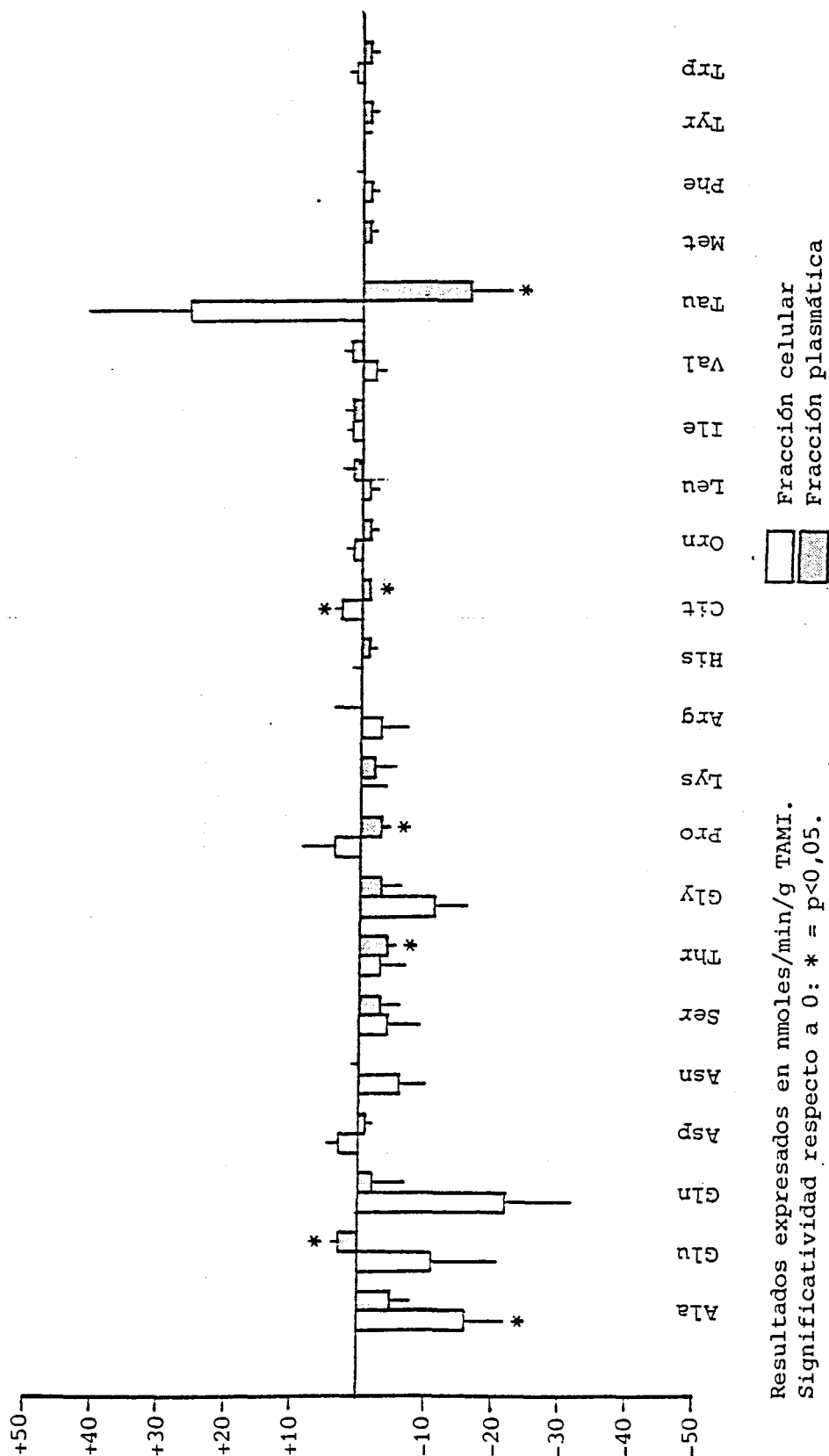
	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Ala	538 ± 40	250 ± 12 *	405 ± 39 *	448 ± 20
Glu	117 ± 15	98 ± 8	96 ± 9	74 ± 15
Gln	1099 ± 125	796 ± 73	923 ± 134	797 ± 104
Asp	32 ± 2	27 ± 1 *	29 ± 2	27 ± 4
Asn	41 ± 3	28 ± 3 *	35 ± 4	31 ± 4 *
Ser	202 ± 14	175 ± 8	189 ± 9	159 ± 14 *
Thr	209 ± 14	150 ± 6 *	173 ± 15	137 ± 8 *
Gly	304 ± 32	332 ± 30	284 ± 28	240 ± 22
Pro	188 ± 24	83 ± 5 *	158 ± 24	171 ± 17
Lys	405 ± 35	361 ± 24	346 ± 21	360 ± 22
Arg	187 ± 26	130 ± 13	151 ± 17	177 ± 16
His	104 ± 6	81 ± 5 *	98 ± 3	86 ± 3 *
Cit	88 ± 5	56 ± 4 *	80 ± 3	73 ± 6
Orn	104 ± 9	65 ± 6 *	86 ± 2	76 ± 8 *
Leu	195 ± 27	131 ± 17	209 ± 13	172 ± 15
Ile	111 ± 15	91 ± 10	123 ± 8	96 ± 9
Val	239 ± 29	173 ± 17	236 ± 15	216 ± 17
Tau	78 ± 11	104 ± 16	71 ± 8	80 ± 7
Met	58 ± 3	40 ± 2 *	57 ± 4	57 ± 5
Phe	76 ± 6	62 ± 5	83 ± 5	59 ± 5
Tyr	68 ± 6	58 ± 2	68 ± 4	46 ± 4 *
Trp	89 ± 4	56 ± 4 *	70 ± 4 *	68 ± 4 *
Totales	4,53 ± 0,28	3,35 ± 0,13 *	3,97 ± 0,17	3,65 ± 0,16 *
Glucosa	8,07 ± 0,27	6,43 ± 0,23 *	8,52 ± 0,54	8,54 ± 0,45

Las concentraciones están expresadas en micromoles/litro para los aminoácidos individuales y en milimoles/litro para los aminoácidos totales y la glucosa. Significatividad respecto a control: * = p<0,05.

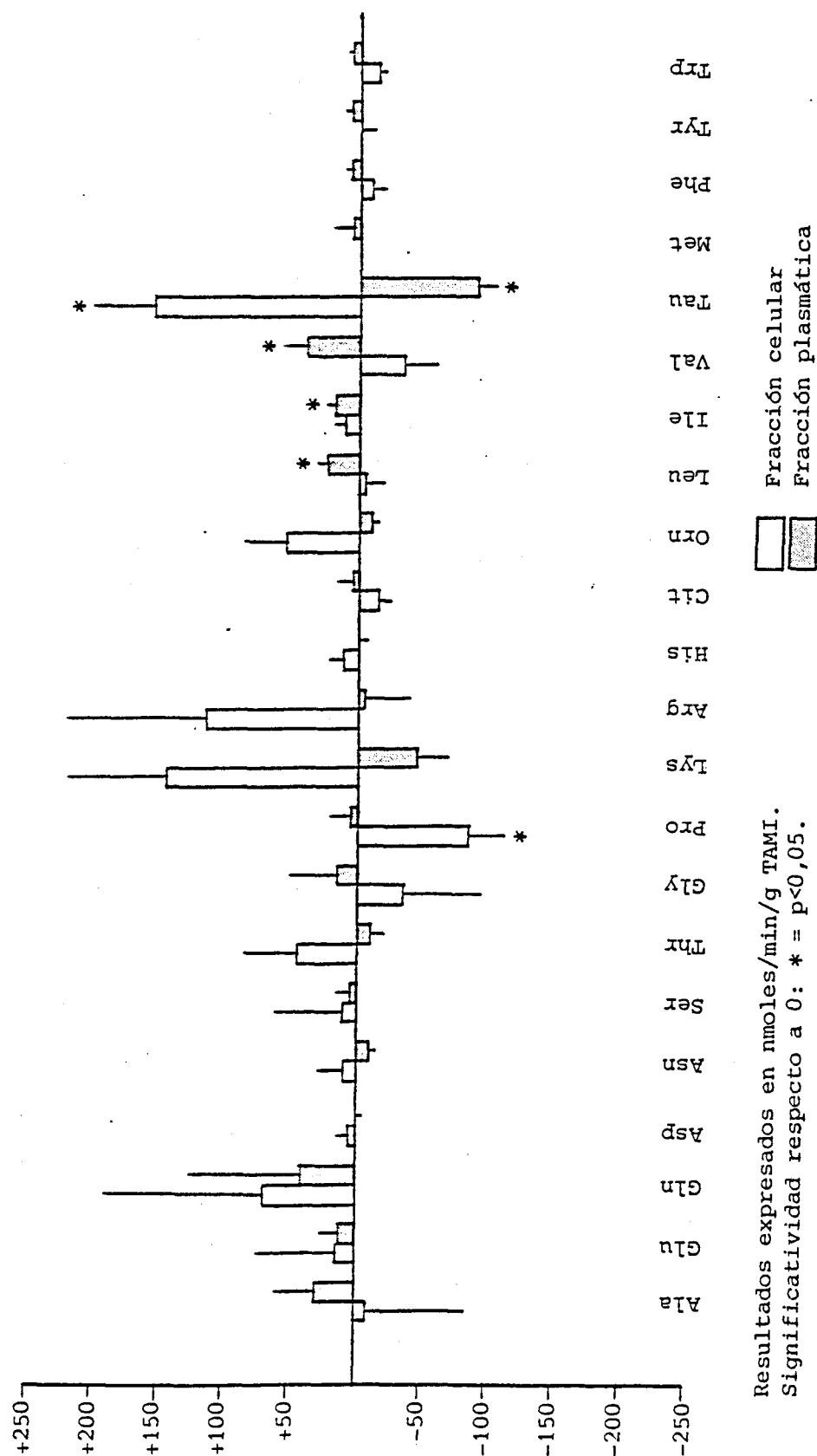
Gráfica 4.17.-
CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS "IN VIVO" POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERSCAPULAR DE
LOS ANIMALES DEL GRUPO CONTROL.



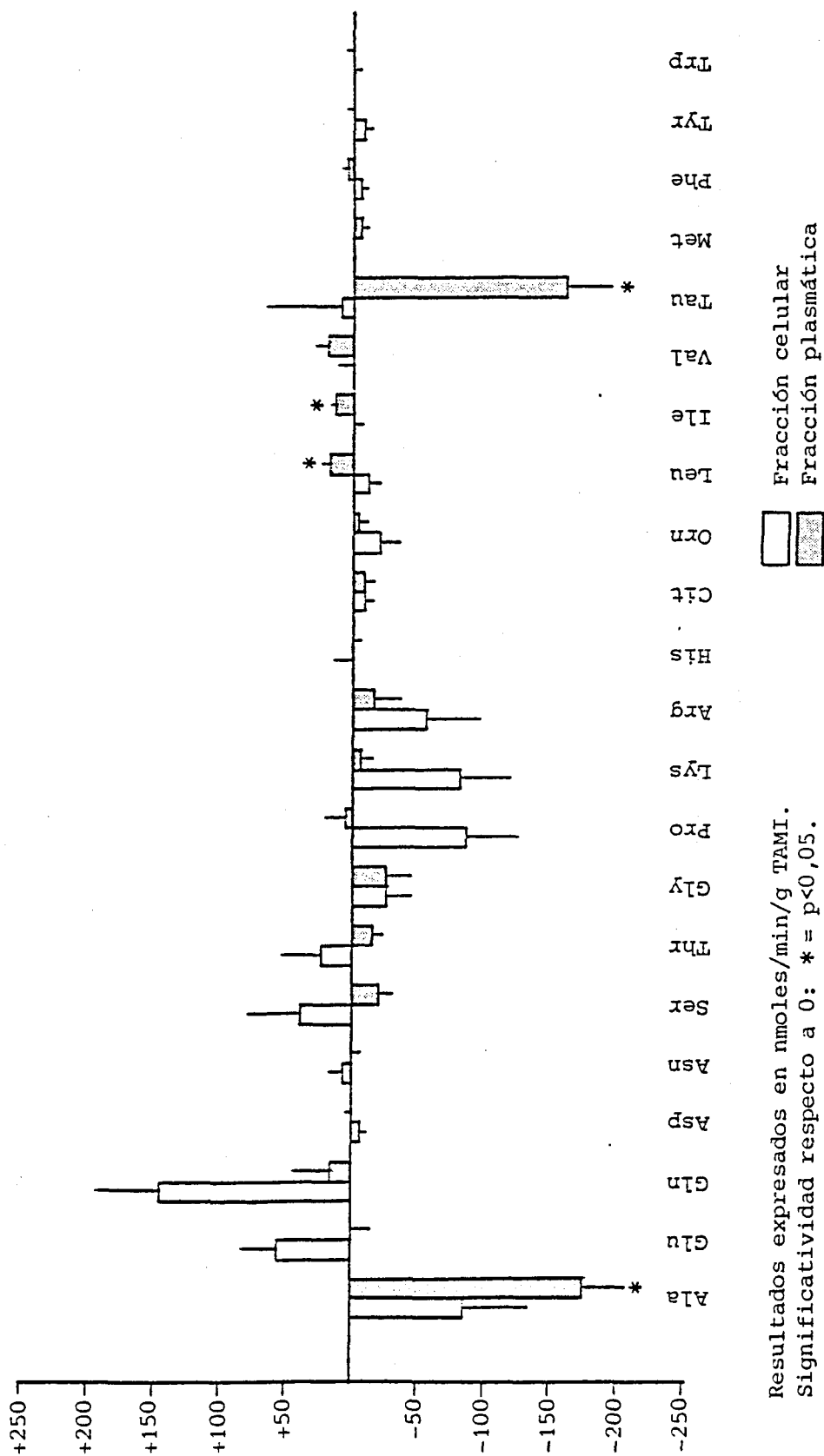
Gráfica 4.18.-
CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS "IN VIVO" POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR DE
LOS ANIMALES SOMETIDOS A 36 HORAS DE AYUNO (GRUPO AYUNO).



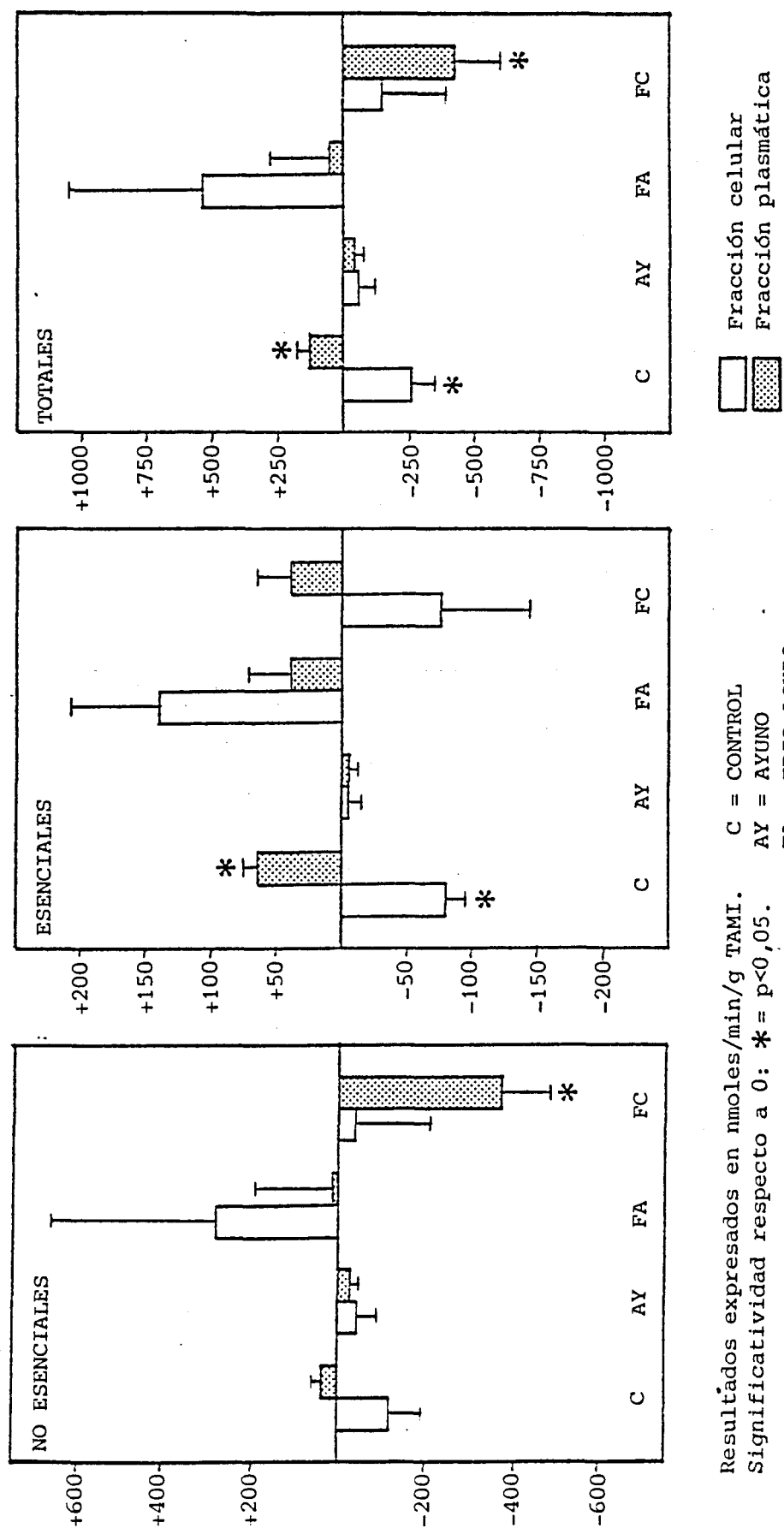
Gráfica 4.19.-
CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS "IN VIVO" POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR DE
LOS ANIMALES EXPUESTOS A 4°C DURANTE 4 HORAS (FRIO AGUDO).



Gráfica 4.20.-
CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS "IN VIVO" POR EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR DE
LOS ANIMALES EXPUESTOS A 4°C DURANTE 30 DIAS (FRIO CRONICO).



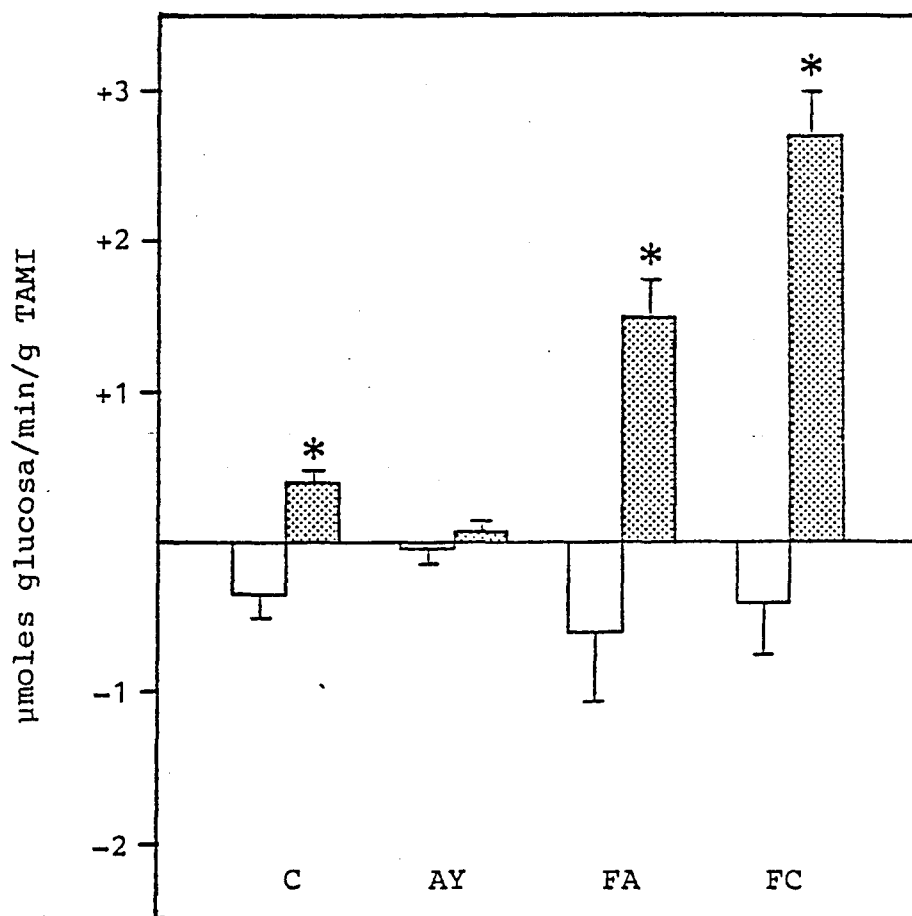
Gráfica 4.21.-
CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS NO ESENCIALES, ESENCIALES Y TOTALES POR EL TEJIDO ADIPOSO MARRON
INTERESCAPULAR "IN VIVO".



Resultados expresados en nmol/min/g TAMI.
Significatividad respecto a 0: * = $p < 0,05$.

Gráfica 4.22.-

CAPTACION/LIBERACION DE GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR
"IN VIVO".



Significatividad respecto a 0: * = $p < 0,05$.

C = CONTROL

AY = AYUNO

FA = FRIO AGUDO

FC = FRIO CRONICO



Fracción celular

Fracción plasmática

Tabla 4.20.-

CAPTACION/LIBERACION DE AMINOACIDOS Y GLUCOSA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VIVO".

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Ala	-15,5 ± 17,4	-21,0 ± 5,8 *	+24,5 ± 88,7	-258,4 ± 81,1 *†
Glu	+4,3 ± 12,4	-7,7 ± 9,7	+28,8 ± 50,2	+57,8 ± 27,2
Gln	+22,5 ± 18,9	-24,5 ± 7,6 *	+108,0 ± 93,9	+146,7 ± 55,7 *
Asp	-5,3 ± 2,3	+1,9 ± 1,4 †	+5,3 ± 6,4	-3,4 ± 5,1
Asn	+3,1 ± 6,2	-6,3 ± 3,5	+0,6 ± 16,2	+7,2 ± 11,6
Ser	-7,2 ± 7,4	-6,6 ± 3,4	+14,1 ± 51,8	+22,9 ± 38,4
Thr	-6,0 ± 6,9	-7,2 ± 3,5	+34,9 ± 43,7	+12,7 ± 3,5
Gly	-6,7 ± 10,1	-13,7 ± 3,4 *	-21,4 ± 43,1	-49,8 ± 25,2
Pro	-20,6 ± 3,6 *	+0,5 ± 4,2 †	-82,7 ± 31,6 *	-81,5 ± 38,1
Lys	-1,6 ± 4,3	-1,9 ± 3,6	+100,2 ± 65,2	-87,9 ± 40,6
Arg	-9,5 ± 20,4	-3,0 ± 3,2	+111,7 ± 95,9	-68,8 ± 28,2 *
His	-0,7 ± 1,2	-0,2 ± 0,7	+6,8 ± 8,4	+2,6 ± 12,3
Cit	-0,7 ± 4,1	-5,0 ± 1,0 *	-12,1 ± 11,5	-14,5 ± 6,9
Orn	-2,1 ± 5,9	+0,3 ± 1,3	+44,3 ± 27,2	-19,1 ± 12,0
Leu	-1,6 ± 4,2	+0,4 ± 0,9	+21,8 ± 16,7	+9,8 ± 13,2
Ile	-1,7 ± 2,8	+1,4 ± 0,7	+27,2 ± 8,7 *†	+14,4 ± 5,8 *†
Val	+3,7 ± 3,3	+0,4 ± 0,7	+2,0 ± 23,8	+21,7 ± 18,2
Tau	-47,3 ± 12,6 *	+9,7 ± 14,5 †	+61,6 ± 41,0 †	-151,5 ± 62,6 *
Met	+0,3 ± 0,4	-0,6 ± 0,4	+3,6 ± 1,4 †	-3,4 ± 1,6
Phe	-2,2 ± 1,0	-0,9 ± 0,4	-1,3 ± 12,1	-2,7 ± 4,6
Tyr	-1,0 ± 1,3	-0,7 ± 0,8	+3,4 ± 10,0	-5,8 ± 5,0
Trp	-1,6 ± 1,7	+0,3 ± 0,7	-8,3 ± 7,1	-2,8 ± 5,9
AA _{NE}	-86,5 ± 66,1	-76,4 ± 32,6 *	+292,9 ± 264,5	-415,7 ± 236,8
AA _E	-10,9 ± 12,9	-7,3 ± 6,0	+177,1 ± 63,5 *†	-34,9 ± 73,9
AA _{TOT}	-97,4 ± 70,5	-83,7 ± 36,9	+470,0 ± 318,0	-450,5 ± 299,9
Glucosa	+0,06 ± 0,17	+0,06 ± 0,07	+0,92 ± 0,24 *†	+2,35 ± 0,29 *†

Expresión de los resultados: Aminoácidos : nmoles/min/g TAMI
 Glucosa: µmoles/min/g TAMI

Significatividad respecto a 0 : * = p<0,05.

Significatividad respecto a control: † = p<0,05.

AA_{TOT} = Aminoácidos totales.

AA_E = Aminoácidos esenciales (Thr, Lys, His, Leu, Ile, Val, Met, Phe, Trp).

AA_{NE} = Aminoácidos no esenciales (Ala, Glu, Gln, Asp, Asn, Ser, Gly, Pro, Arg, Cit, Orn, Tau, Tyr).