

TESI DOCTORAL

JOAN AURELI CADEFAU SURROCA

**ADAPTABILITAT DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC A
L'EXERCICI DE CURTA DURADA: METABOLISME
ENERGÈTIC**

Juny, 1992

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Adaptabilitat del múscul esquelètic a l'exercici de curta durada: Metabolisme energètic.

Memòria presentada per JOAN AURELI CADEFAU SURROCA per accedir al Grau de Doctor en Biologia.

Treball realitzat a la Unitat de Bioquímica de la Facultat de Medicina, Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició, sota la direcció de la Dra. ROSER CUSSÓ FRESQUET.



L'autor



El director

ÍNDEX

1. CARACTERÍSTIQUES MUSCULARS	1
1.1. TIPUS DE FIBRES	7
1.2. CONTRACCIÓ MUSCULAR	7
1.2.1. Obtenció d'energia	10
1.2.1.1. Utilització d'ATP i CP	10
Paper del cicle dels nucleòtids d'adenina	11
1.2.1.2. Utilització de carbohidrats	13
Glicogenòlisi	14
Glicogenogènesi	18
Transport de glucosa	21
Glucòlisi	23
Paper de la Glucosa 1,6-P ₂	28
Paper de la Fructosa 2,6-P ₂	31
Regulació del flux glucolític per la Glu 1,6-P ₂ i la Fru 2,6-P ₂	33
Gluconeogènesi	37
1.3. FATIGA MUSCULAR	40
1.3.1. Causes de la fatiga	41
1.3.2. Metabolisme energètic i fatiga	42

1.4. ADAPTABILITAT DEL MUSCUL ESQUELÈTIC	47
1.4.1. Efectes de l'exercici	48
1.4.1.1. Modificacions dels tipus de fibres	48
1.4.1.2. Modificacions metabòliques	50
1.4.1.3. Canvis deguts a l'exercici aeròbic	51
1.4.1.4. Canvis deguts a l'exercici anaeròbic	56
1.4.1.5. Modificacions dels substrats energètics	58
1.4.2. Estimulació elèctrica	61
1.4.2.1. Modificacions morfològiques	64
1.4.2.2. Modificacions metabòliques	67
1.4.2.3. Modificacions dels substrats energètics	75
2. MATERIALS I MÈTODES	79
2.1. REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS	79
2.2. METODOLOGIA EMPRADA AMB ANIMALS DE LABORATORI	81
2.2.1. Protocol anestèsia	81
2.2.2. Estimulació elèctrica	82
2.2.2.1. Característiques dels elèctrodes	83
2.2.2.2. Implantació dels elèctrodes	84
2.2.2.3. Obtenció dels músculs <i>Tibialis anterior</i> i <i>Extensor digitorum longus</i> .	86
2.3. METODOLOGIA EMPRADA AMB HUMANS	87
2.3.1. Tipus d'exercici i entrenament	88
2.3.2. Obtenció de les biòpsies musculars d'humans	90
2.4. PREPARACIÓ DEL TEIXIT PER ANÀLISI	91
2.4.1. Extractes neutres	92
2.4.2. Extractes àcids	93
2.4.3. Extractes bàsics	94
2.5. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES	96

2.5.1. Determinació de l'activitat glicogen sintasa I i D	96
2.5.2. Determinació de l'activitat glicogen fosforilasa a i b	97
2.5.3. Determinació de l'activitat hexoquinasa	98
2.5.4. Determinació de l'activitat fosfofructoquinasa	99
2.5.5. Determinació de l'activitat fructosa 1,6-bifosfatasa	100
2.5.6. Determinació de l'activitat piruvat quinasa	102
2.5.7. Determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa	103
2.5.8. Determinació de l'activitat creatina quinasa	104
2.5.9. Determinació de l'activitat aspartat amino transferasa	105
2.5.10. Determinació de l'activitat alanino amino transferasa	106
2.6. DETERMINACIÓ DE NIVELLS DE METABÒLITS	107
2.6.1. Determinació del glicogen	107
2.6.1.1. Mètode de l'antrona	107
2.6.1.2. Determinació enzimàtica	109
2.6.2. Determinació de la glucosa	109
2.6.3. Determinació d'ATP i creatinafosfat	110
2.6.4. Determinació de creatina	112
2.6.5. Determinació de fosfat inorgànic	113
2.6.6. Determinació de lactat	114
2.6.7. Determinació de glucosa, glucosa 6-P, glucosa 1-P i fructosa 6-P	116
2.6.8. Determinació de fructosa 1,6-P ₂ , dihidroxiacetona fosfat i gliceraldehid 3 fosfat	117
2.6.9. Determinació de piruvat	119
2.6.10. Determinació d'IMP, ATP, ADP, hipoxantina, AMP, NADP, inosina i NAD	120

2.6.11. Determinació de glucosa 1,6-bifosfat	121
2.6.12. Determinació de fructosa 2,6-bifosfat	122
2.7. DESSALAT D'ENZIMS	124
2.8. PREPARACIÓ DE Fru 6-P LLIURE DE Fru 2,6-P ₂	125
2.9. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES	125
3. EFECTES DE L'ESTIMULACIÓ CRÒNICA A BAIXA FREQUÈNCIA EN MÚSCULS DE CONTRACCIÓ RÀPIDA	126
3.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	126
3.2. MODEL EXPERIMENTAL	128
3.3. RESULTATS	128
3.4. DISCUSSIÓ	132
4. METABOLISME ENRGÈTIC EN PRESÈNCIA DE CONCENTRACIONS ALTES DE FRUCTOSA 2,6-BISFOSFAT I GLUCOSA 1,6-BISFOSFAT	135
4.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	135
4.2. MODEL EXPERIMENTAL	136
4.3. RESULTATS	138

4.4. DISCUSSIÓ	147
5. ADAPTACIONS METABÒLIQUES EN HUMANS A ENTRENAMENTS DE CURTA DURADA: PAPER DE LES HEXOSES BISFOSFORILADES	154
5.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	154
5.2. MODEL EXPERIMENTAL	156
5.3. RESULTATS	157
5.4. DISCUSSIÓ	176
6. CONCLUSIONS	186
7. BIBLIOGRAFIA	189

ABREVIATURES

En aquesta memòria s'han utilitzat les següents abreviatures, a més de les habituals en la literatura científica:

Ald	Aldolasa
ALAT	Alanino amino transferasa
ASAT	Aspartat amino transferasa
BSA	Albúmina bovina sèrica
CK	Creatina quinasa
CP	Creatina fosfat
Cre	Creatina
DHAP	Dihidroxiacetona fosfat
EDL	Extensor digitorum longus
EDTA	Etilenodiaminotetraacetato
EGTA	Etilenglicol-bis(β -aminoetilèter) tetraacetato
Fru 6-P	Fructosa 6-fosfat
Fru 1,6-P ₂	Fructosa 1,6-bisfosfat
Fru 2,6-P ₂	Fructosa 2,6-bisfosfat
Fru 1,6-bifosfatasa	Fructosa 1,6-bifosfatasa
G3PDH	Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa
GF	Glicogen fosforilasa
Glu 1-P	Glucosa 1-fosfat
Glu 6-P	Glucosa 6-fosfat
G6PDH	Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa
Glu 1,6-P ₂	Glucosa 1,6-bisfosfat
GLY3P	Gliceraldehid 3-fosfat
GS	Glicogen sintasa
HK	Hexoquinasa
LDH	Lactat deshidrogenasa
MDH	Malat deshidrogenasa
MK	Mioquinasa
PEP	Fosfoenolpiruvat
PFK	Fosfofructoquinasa
PGI	Fosfoglucoisomerasa
PGM	Fosfoglucomutasa
Pi	Fòsfat inorgànic
PK	Piruvat quinasa
RC	Pulsacions per minut
TA	Tibialis anterior
TPI	Triosa fosfat isomerasa
Tris	Tris(hidroximetil)aminoetano
VO ₂ màx	Volum màxim de captació d'oxigen

OBJECTIUS

L'any 1988 vàrem presentar la Tesina "Avaluació de l'entrenament d'uns grups d'atletes per canvis morfològics i bioquímics musculars" en la qual presentàvem els canvis enzimàtics soferts per efecte de l'entrenament al múscul.

Davant la impossibilitat d'aprofundir mitjançant aquesta estratègia en l'estudi dels canvis que es donen en el procés d'adaptació a l'esforç, ens vam plantejar iniciar una nova línia de recerca que ens permetés assolir aquesta fita.

La posada a punt del model d'estimulació elèctrica del múscul va ser un dels objectius prioritaris. Aquest model, que es realitza en animals de laboratori, consisteix a sotmetre un múscul determinat a una estimulació contínua fins a 50 dies, sense que l'animal estigui privat de moviment, conseguint la transformació del múscul, de contracció ràpida a lenta.

S'ha descrit que la glucosa-1,6-bisfosfat és un fort regulador del metabolisme dels carbohidrats en múscul (Beitner, 1990), a l'igual que la fructosa-2,6-bisfosfat (Bassols *i col.* 1986). Per aquesta raó, el primer objectiu que ens vàrem plantejar va ser la caracterització dels canvis en les concentracions d'aquests dos activadors alostèrics de la fosfofructoquinasa en el múscul *Tibialis anterior* de conill amb

l'estimulació a baixa freqüència al llarg del temps.

Posteriorment, degut als resultats obtinguts i a que en el procés d'adaptació del múscul els canvis que es donen ho fan de forma seqüencial i ordenada, ens vàrem interessar pels canvis en les concentracions dels diferents metabòlits a les fases inicials d'un període d'estimulació, d'entrenament o d'augment de l'activitat contràctil.

Finalment, amb el propòsit de poder extrapolar les dades obtingudes en els experiments fets amb animals ens vam interessar pels canvis metabòlics que es donen durant els primers dies d'entrenament en humans.

CAPÍTOL 1

INTRODUCCIÓ

1. CARACTERÍSTIQUES MUSCULARS

1.1. TIPUS DE FIBRES

Una característica fonamental del múscul esquelètic és la gran diversitat que presenta. No hi ha cap múscul idèntic a un altre, músculs homòlegs de diferents espècies i fins i tot dins del mateix animal presenten diferències en la composició fibril·lar. Aquesta heterogeneïtat reflecteix l'alt grau d'especialització i a més, és la base de la seva plasticitat funcional.

Gràcies al sistema contràctil del múscul esquelètic, hi ha la possibilitat d'executar tota una varietat de moviments amb els mateixos grups musculars, ja siguin moviments d'habilitat, de força o de resistència. Això va lligat a l'existència en el múscul d'unitats motrius. Les fibres d'una mateixa unitat motriu presenten les mateixes característiques morfològiques i funcionals. És entre les diferents unitats que apareixen les variacions.

Fins al moment, la classificació de les fibres musculars depèn de mètodes on l'avaluació és subjectiva i la resolució està restringida a distingir un baix nombre de grups de fibres. Però, encara que la classificació de les fibres sigui subjectiva ha estat molt útil per a poder relacionar les característiques contràctils amb les bioquímiques.

Les diferències entre fibres es van observar fa molts anys. Al 1678, S.Lorenzini va comentar l'existència de diferents tipus de músculs en animals, en base a la seva diferència de color, es va referir al múscul vermell i al múscul blanc. A la segona meitat del segle XIX es va provar d'explicar aquesta variació en el color de les fibres musculars per factors fisiològics i estructurals. Ranvier va suggerir una diferència fisiològica entre les fibres blanques i vermelles en el conill i va correlacionar aquestes amb la contracció ràpida i lenta respectivament. Gützner al 1884 va arribar a la conclusió que els músculs de tots els vertebrats inclòs l'home, estaven compostos per dos tipus de fibres: unes primes i fosques, i unes altres més amples i clares.

Al 1891 Knoll va mantenir que la diferència de color era deguda a una major quantitat de protoplasma entre les miofibrilles de les fibres fosques que en les clares, i va dividir les fibres musculars en riques i pobres en protoplasma respectivament. Va observar que en animals superiors, només els músculs menys actius tendien a ser blancs.

Al 1919, Bullard va realitzar tincions amb Sudán III per lípids, i va mostrar que hi havien fibres clares, fosques, i intermèdies, que es trobaven en diferent proporció i que eren de diferent tamany en els diferents músculs.

Paul i Sperling al 1952 van demostrar que el múscul blanc tenia un baix contingut en mitocondris i baixa activitat respiratòria i que el vermell era

ric en mitocondris i tenia una activitat respiratòria elevada.

Posteriorment, els avenços en les tècniques histoquímiques han fet possible la localització de sistemes enzimàtics i altres constituents químics de la cèl.lula, la qual cosa ha fet possible una correlació entre l'activitat funcional de les fibres i la seva morfologia.

Els enzims que han tingut particular interès en l'estudi del múscul, són enzims relacionats amb la síntesi i degradació del glicogen (tals com la fosforilasa) i oxidoreductases (com deshidrogenases del cicle de Krebs). Dubowitz i Pearse al 1960 van demostrar la relació entre l'activitat fosforilasa i l'activitat de diversos enzims oxidatius, i van dividir les fibres del múscul humà en dos tipus: les de tipus I, que eren molt oxidatives i poc glucolítiques, i les de tipus II que eren poc oxidatives i molt glucolítiques. Engel al 1962 també va dividir les fibres en dos tipus, però basant-se en l'activitat ATPasa: les de tipus I tenien poca activitat ATPasa i les de tipus II en tenien molta.

Encara que els mètodes histoquímics fan possible distingir un nombre limitat de tipus de fibres, no està clara la relació entre la classificació mitjançant l'ATPasa i la que es recolza en els enzims del metabolisme aeròbic i anaeròbic.

Barnard *i col.* (1971) i Peter *i col.* (1972), basant-se en els dos tipus de mètodes van classificar tres grans grups de fibres en conills perquè i conills: SO (contracció lenta oxidatives), FOG (contracció ràpida oxidatives glucolítiques) i FG (contracció ràpida glucolítiques). Un altre mètode basat en la depleció del glicogen va relacionar les propietats metabòliques i la fatigabilitat, descrivint els grups: FF (contracció ràpida, fatigables), FR (contracció ràpida, fatiga resistents) i S (contracció lenta,

fatiga resistents), (Burke, 1981).

Brooke i Kaiser (1970a) van definir tres tipus de fibres en el múscul, basant-se en l'activitat ATPasa amb preincubació a diferents pH's (9,4, 4,6, i 4,3): fibres de tipus I i les de tipus II subdividides en dos grups, IIa i IIb. S'ha definit també un altre subtipus de la fibra II, la IIc que dóna una reacció positiva de l'ATPasa a pH 4,3. La característica per a poder diferenciar un tipus d'un altre es basa en la diferent intensitat de coloració que s'obté a cada un dels pH's.

La barreja de tots els sistemes de classificació anteriorment esmentats ha creat una gran confusió. A més, s'ha de tenir en compte que els esquemes de classificació s'han fet a partir de descripcions en pocs tipus de músculs i en un baix nombre d'espècies. La idea que les propietats metabòliques d'un tipus de fibres es correspon exactament amb la classificació ATPàsica no està justificada. Segons quina sigui l'espècie estudiada, aquests límits metabòlics entre els diferent tipus de fibres estan poc definits, amb la complicació que entre espècies també es poden donar diferències.

Reichmann i Pette (1982) descriuen un ampli ventall d'activitats succinat deshidrogenasa en els tipus I, IIa i IIb, donant-se superposició entre els diferents tipus de fibres. En ratolí les fibres tipus IIb tenen una capacitat oxidativa més alta que les de tipus IIa, a la rata es dóna el cas invers i en humans es presenta un estadi intermedi. És possible que aquestes diferències siguin degudes a l'existència d'un tipus de fibra intermedi, les IIx, que estarien metabòlicament situades entre les IIa i les IIb (Schiaffino *i col.* 1990).

La mateixa incompatibilitat existeix entre la tinció ATPàsica i les fibres de tipus I. En alguns mamífers, en humans i gats, són les més oxidatives

i amb una capacitat aeròbica molt elevada, mentre que en altres com la rata, el conill porquí i el cavall, les fibres de tipus I estan en una situació intermèdia.

Anàlisis comparatives d'activitats enzimàtiques han revelat que una certa activitat enzimàtica existeix en una proporció similar en diversos músculs independentment de la variació en la concentració absoluta. Aquest nivell d'activitat enzimàtica és un reflex dels requeriments funcionals. Així, les fibres de tipus I o de contracció lenta o fatiga resistents tindrien un alt contingut de mitocondris i d'enzims relacionats amb el metabolisme oxidatiu. Mentre que les de tipus II o de contracció ràpida tendeixen a tenir una activitat més elevada dels enzims glucolítics, és a dir una capacitat anaeròbica més alta.

Malgrat les diferències que s'han descrit anteriorment, actualment s'utilitzen majoritàriament dos tipus de metodologies histoquímiques per a la diferenciació dels diferents tipus de fibres. Un dels mètodes es basa en l'activitat miofibril·lar actomiosina adenosina trifosfatasa (ATPasa) descrit per Brooke i Kaiser (1970b), que divideix les fibres en I, IIa, IIb, i IIc, i l'altre mètode fa referència als enzims del metabolisme aeròbic i anaeròbic.

Així, en línies generals, podem correlacionar les diferents nomenclatures fisiològiques amb la histoquímica (Taula 1.1).

També es pot relacionar la velocitat de contracció amb el tipus de fibres. A les fibres de tipus II és més ràpida que a les altres, això està en funció de la velocitat amb la qual el complex actomiosina hidrolitza l'ATP (Bárány, 1967).

Taula 1.1: Correlació entre les nomenclatures fisiològiques i histoquímiques.

Tipus histoquímics	Nomenclatura fisiològica		
	Barnad <i>i col.</i> (1971)	Peter <i>i col.</i> (1972)	Burke <i>i col.</i> (1973)
I	Cont.lenta intermèdia oxidativa	SO Cont.lenta	S Cont. lenta
Ila	Cont ràpida vermella oxidativa glucolítica	FOG Cont. ràpida fatiga resis.	FR Cont. ràpida
Ilb	Cont. ràpida blanca glucolítica	FG Cont. ràpida fatiga sensi.	FF Cont. ràpida
Ilc			

La resistència a la fatiga és una característica del tipus de fibra, de manera que els músculs compostos per fibres glucolítiques, estan capacitats per esforços curts, però de molta intensitat. Això s'ha comprovat també en unitats motores aïllades, és a dir, grups de cèl.lules innervades per la mateixa placa motora. Es creu que totes les fibres de cada unitat motora són de la mateixa classe (Kugelber i Edström, 1968). Les unitats motores A (fibres Ilb) sofreixen un 90-100% de disminució de la potència de contracció després de 1800 contraccions a una freqüència de 10 Hz, mentre que les C (fibres I) no mostren cap senyal de fatiga i les

B (fibres IIa) mostren una reacció intermèdia. (Edström i Kugelber, 1968). (Per revisió: Pette i Staron 1990; Duvowitz, 1985).

1.2. CONTRACCIÓ MUSCULAR

El múscul esquelètic s'ha de considerar com un sistema molt eficient de reconversió energètica. Es produeix la transformació de l'energia química de l'ATP en energia mecànica, necessària per a provocar la contracció muscular.

És un teixit únic quant a l'habilitat per canviar d'una baixa a una alta demanda energètica i això crea l'obligació d'un complicat sistema de control del flux energètic a través de les vies metabòliques.

La contracció es dona gràcies a l'acoblament entre els filaments de miosina i els d'actina.

Quan el múscul és estimulat es produeix un alliberament de Ca^{2+} , el qual s'uneix a la troponina, quedant l'actina lliure per combinar-se amb el cap de miosina. És un complex molt estable que tendeix a despendre energia al medi.

El pont transversal format entre l'actina i la miosina altera la relació angular amb l'eix del filament gruixut provocant el lliscament d'un filament sobre l'altre, donant-se així l'escorçament del sarcòmer.

L'activitat ATPasa de la miosina hidrolitza l'ATP utilitzant l'energia per poder canviar de conformació.

Una molècula d'ATP proporciona probablement l'energia necessària per

provocar un cicle d'interacció entre els miofilaments, a més també es necessita ATP en el procés de relaxació pel transport de Ca^{2+} .

La demanda energètica depèn de la intensitat i duració de la contracció. Per exemple, un exercici intens resulta en una acceleració de la degradació de l'ATP, inclou també un augment de l'activitat de la miosina, Ca^{2+} i $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPases. Amb aquest increment s'ha de correspondre un augment similar en el procés de la refosforilació de l'ADP.

L'ATP que s'utilitza en el repòs és menys de l'1% del màxim que s'utilitza durant la contracció. (Åstrand i Rodalh, 1986).

Per la recuperació de l'ATP que va sent hidrolitzat, la fibra muscular disposa en essència de dos mecanismes: una via ràpida que suposa la transferència d'enllaços fòsfor ja preformats a molècules de creatinafosfat presents en el múscul, i una via menys ràpida ja que requereix la participació del potencial oxidatiu de la fibra muscular. En aquest cas no s'utilitzen enllaços fòsfor preexistents sinó que se'n fan de nous.

La quantitat d'ATP disponible pel múscul durant la contracció es manté constant, això vol dir que aquest s'ha d'anar regenerant constantment.

Aquesta regeneració de l'ATP es fa per diferents sistemes depenent de les característiques de l'exercici: de si es realitza en condicions aeròbiques o anaeròbiques.

Margaria *i col.* (1964, 1968), varen descriure que un exercici intens de 10 - 15 sg podia fer-se sense un augment significatiu de lactat en sang i que l'energia total durant aquest curt període de temps era atribuïble a la hidròlisi de les reserves intramusculars d'ATP i de creatinafosfat. I que

només quan les reserves d'aquest últim metabòlit estaven esgotades s'activava la glicogenòlisi, subministrant ATP a través de la glucòlisi. Més tard Bergström *i col.* (1972) descriuen una baixada del 20% de creatinafosfat i un augment de lactat fins a $15 \text{ mmol} \cdot \text{Kg}^{-1}$ teixit sec, en un exercici de 6,6 sg a alta intensitat.

Altres estudis similars, s'han fet utilitzant exercicis dinàmics a màxima intensitat. En general el que s'ha vist és que la hidròlisi de creatinafosfat és molt elevada inicialment, disminuint més del 50% en els primers 10 sg, i que la glucòlisi mostra un patró similar durant els primers 10 sg disminuint significativament en un exercici de llarga durada.

En un exercici de màxima activitat, a un 130% de VO_2 màx. durant 192 sg. Bangsbo *i col.* (1990) han calculat que en els primers 30 sg d'exercici hi ha un 80% de contribució del metabolisme anaeròbic i un 20% de l'aeròbic, mentre que en els últims 70 segons passa a ser del 30 i 70% respectivament.

Com a conclusió es pot dir que la glicogenòlisi-glucòlisi estan treballant al màxim des dels primers moments.

La velocitat màxima a la qual l'ATP es pot formar pel procés anaeròbic és almenys dues vegades més alta que la formació mitjançant la fosforilació oxidativa.

La formació de l'ATP a través del procés anaeròbic és de gran importància en els processos de contracció a alta intensitat o durant la manca d'oxigen, però deixa de tenir un paper fonamental en l'exercici perllongat, en el qual la resíntesi d'ATP es dona majoritàriament a partir del metabolisme aeròbic.

1.2.1. Obtenció d'energia

La generació d'energia en el múscul, durant l'inici de la contracció o en un exercici d'alta intensitat quan no hi ha una disponibilitat d'oxigen, es dona anaeròbicament i això es pot fer gràcies a l'existència de vies d'oxidació anaeròbiques i la utilització d'ATP intramuscular, de la creatinafosfat i dels carbohidrats.

1.2.1.1. Utilització d'ATP i de creatinafosfat

El primer substrat energètic que s'utilitza per la contracció és l'ATP que hi ha emmagatzemat al múscul. La hidròlisi d'aquest metabòlit està produïda per l'activitat miosín ATPasa i com a productes dona ADP i Pi.

La concentració relativa dels nucleòtids d'adenina està regulada per l'enzim adenilat quinasa que catalitza la següent reacció:

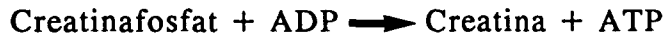


i que es considera que està pròxima a l'equilibri, per tant en augmentar la concentració d'ADP durant la contracció s'estimula la producció d'ATP.

Aquesta reacció, però, no és suficientment ràpida com per donar l'ATP necessari per la contracció, que en fraccions de segon pot augmentar gairebé 300 vegades (Saltin *i col.* 1988).

La hidròlisi de la creatinafosfat està catalitzada per l'enzim creatina fosfoquinasa. La velocitat d'aquesta reacció, en múscul de conill i en

condicions òptimes, és d'unes tres vegades més que la reacció catalitzada per l'adenilat quinasa (Noda, 1958).



Segons Hultman i Sjöholm, (1983), l'ATP intramuscular dóna l'energia suficient per cinc segons en una contracció del 50-70% de la força màxima voluntària i la creatinafosfat pot donar l'energia suficient per 14 segons més, per tant es fa necessària la utilització d'altres fonts d'energia per poder mantenir exercicis de més llarga durada.

Paper del cicle dels nucleòtids de purina

La reacció de l'adenilat quinasa està pròxima a l'equilibri. Una forma de desplaçar-lo seria la catabolització de l'AMP, augmentant així la refosforilació de l'ADP.

L'AMP pot ser desaminat per l'adenilat deaminasa de forma irreversible donant IMP i l'ió amoni (NH_3). També pot ser desfosforilat donant adenosina mitjançant la 5-nucleotidasa. L'adenosina i l'IMP poden ser degradats fins a urat. L'IMP també pot ser convertit a adenilsuccinat, el qual pot ser reconvertit a AMP amb la producció d'una molècula de fumarat. Totes aquestes reaccions constitueixen part del cicle dels nucleòtids de purina (Lowenstein, 1972).

Les funcions d'aquest cicle són diverses segons descriuen Sahlin i Katz (1988):

- 1) Regulació de la glucòlisi a través de l'acumulació de NH_3 .
- 2) Regulació de la glicogenòlisi a través de l'IMP.
- 3) Subministrament d'intermediaris al cicle de Krebs a través del fumarat.
- 4) Desaminació d'aminoàcids, a través de l'aspartat.
- 5) Manteniment d'una bona relació $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$.

L'ió amoni s'ha descrit com un activador de la fosfofructoquinasa (Sugden i Newsholme, 1975), a més pot tenir un efecte amortidor del pH durant la fatiga, però això no sembla possible ja que només podria tamponar un 3% dels H^+ produïts (Mutch i Banister, 1983).

Segons Aragon *i col.* (1980) l'IMP és un potent activador de la glicogen fosforilasa. Segons altres autors, les concentracions que s'assoleixen *in vivo* són molt baixes per poder produir una activació d'aquest enzim (Sahlin i Katz, 1988). Un efecte important que s'ha descrit en cervell és l'activació de la glucosa 1,6-bisfosfatasa per acúmuls d'IMP (Guha i Rose, 1982), aquest enzim també es troba en múscul. Una activació d'aquest enzim faria disminuir la concentració de glucosa 1,6- P_2 , la qual cosa provocaria una disminució de la inhibició d'aquest metabòlit sobre l'hexoquinasa i la glucosa sanguínia que entrés podria ser fosforilada. La concentració d'IMP augmenta considerablement a la fatiga, a les fibres musculars on s'ha esgotat el glicogen (Broberg i Sahlin, 1989). La desaminació de l'AMP està relacionada amb l'acidificació del medi, ja que un pH àcid activa l'adenilat deaminasa.

Cada vegada que es forma AMP a partir de l'IMP s'obté una molècula de

fumarat, la qual cosa podria tenir una funció anapleròtica, proveint intermediaris al cicle de Krebs. La idea és que un augment de la concentració dels intermediaris del cicle de Krebs incrementarà l'oxidació de l'acetil-CoA i la formació de NADH i per tant la producció oxidativa d'energia. (Aragón *i col.* 1981; Sahlin i Katz, 1988).

La desaminació d'aminoàcids estaria en relació al subministrament d'esquelets carbonats pel metabolisme energètic, però la baixa capacitat del cicle a les fibres de contracció lenta qüestiona aquest paper (Sahlin i Katz, 1988).

La relativa concentració de nucleòtids d'adenina és de gran importància en el metabolisme energètic (Lowenstein, 1972). Una disminució de la càrrega energètica activa la resíntesi d'ATP i també la desaminació de l'AMP. El significat de mantenir una relació [ATP]/[ADP] alta pot ser deguda a que l'energia produïda per la hidròlisi de l'ATP disminueix quan la concentració de productes (ADP i Pi) augmenta (Newsholme i Start, 1974).

1.2.1.2. Utilització de carbohidrats

Quan les contraccions musculars són sostingudes durant un llarg període de temps o en un exercici intens, la utilització de carbohidrats es fa necessària.

La glucosa sanguínia i els dipòsits de glicogen muscular i hepàtic són les principals fonts de substrats.

La glucosa sanguínia es manté constant durant l'exercici a expenses del glicogen del fetge (Vranic *i col.* 1976).

Les reserves de glicogen normalment deriven de la ingesta de carbohidrats en la dieta, això fa que els nivells d'aquest metabòlit es puguin modificar. Un dels mitjans per produir una supercompensació, fenomen pel qual s'arriba a concentracions de glicogen més altes que les inicials, consisteix primer en exhaurir-lo mitjançant un exercici intens, seguit d'una dieta alta en carbohidrats (superior al 90%) (Hultman *i col.* 1971). Aquest mateix efecte es provoca amb una dieta pobre en carbohidrats (50%) durant tres dies i després tres dies més amb un 90% de carbohidrats. (Sherman *i col.* 1984).

Un altre tipus de variacions són les que es donen amb els cicles circadians, les quals han estat ben descrites en rosegadors (Conlee *i col.* 1978; Garetto *i col.* 1983), però no són conegudes en humans, cal suposar que també s'hi donen (Bonen *i col.* 1989).

La concentració de glicogen disminueix durant l'exercici, sent la disminució proporcional a la intensitat d'aquest i estant coordinada amb les necessitats energètiques de la contracció.

Els nivells intramusculars de glicogen estan regulats per dues vies, una de síntesi i una altra de degradació, la glicogenogènesi i la glicogenòlisi.

Glicogenòlisi

La hidròlisi del glicogen en un múscul en contracció és dependent de l'activitat glicogen fosforilasa.

Aquest enzim existeix en dues formes: fosforilasa a (activa) i la

fosforilasa b (inactiva en absència d'AMP)

En el múscul en repòs es troba principalment en la forma b. La conversió de la forma inactiva a l'activa es fa mitjançant la glicogen fosforilasa a quinasa.

Segons Chasiotis (1988), com a mínim hi ha tres tipus de regulació de l'enzim:

- 1) Interconversió de la fosforilasa b a a, la qual està sota control hormonal via AMPc i per l'efecte de la contracció a través del calci.
- 2) Regulació alostèrica.
- 3) Regulació per substrat.

La glicogen fosforilasa quinasa, l'enzim que fosforila la glicogen fosforilasa convertint-la a la forma activa, és activada per un augment de pH, per Ca^{2+} i pel seguit de reaccions iniciat mitjançant l'adrenalina via adenilat ciclase.

Fischer *i col.* (1971) van proposar una activació de la glicogen fosforilasa per un mecanisme dependent de calci, ja que aquest incrementa considerablement la seva concentració al citosol durant l'excitació - contracció. En aquest mecanisme intervé la glicogen fosforilasa quinasa, formada per quatre subunitats (α, β, γ i δ). Les subunitats α i β són les que es fosforilen, la γ és la que conté el centre catalític i la δ s'ha vist que és la calmodulina, la qual és Ca^{2+} dependent (Cohen *i col.* 1981). Així, en incrementar-se les concentracions de Ca^{2+} , aquest es fixa sobre la subunitat δ activant-se la glicogen fosforilasa quinasa.

Galbo *i col.* (1978) i posteriorment Richter *i col.* (1980) van veure una elevació intracel.lular d'AMP cíclic, el qual passa la fosforilasa α quinasa a la forma activa, com a resposta a l'increment d'activitat del sistema nerviós simpàtic.

El subministrament d'adrenalina en múscul humà fa que un 90% de la fosforilasa estigui en la forma activa, però el flux glicogenolític és unes 25 vegades inferior que quan es dona contracció (Chasiotis *i col.* 1983). Aquesta hormona s'ha vist que afecta en diferent grau els diferents músculs, depenent de la seva composició fibril.lar.

Les fibres de tipus I (contracció lenta) són les més sensibles a l'adrenalina, mentre que les de tipus IIb (contracció ràpida) ho són menys. (Gorski, 1978). Richter *i col.* (1982) van observar que durant un exercici d'alta intensitat en un múscul de contracció lenta vermell (fibres tipus I), si afegien adrenalina s'accentuava la degradació del glicogen durant la contracció; en canvi en un múscul de contracció ràpida vermell (tipus IIa) i un altre de blanc (tipus IIb), la resposta en el primer era molt més petita mentre que en el segon no se'n produïa. Si la contracció era a baixa intensitat tots tres tipus de múscul responien a l'estimulació per adrenalina, especialment els dos músculs de contracció ràpida.

Així, el flux glicogenolític depèn del tipus de contracció i de la quantitat d'adrenalina.

La glicogenòlisi també es dona en l'exercici i durant l'estimulació elèctrica del múscul, àdhuc amb la resposta simpàtic hormonal bloquejada. (Cartier i Gollnick, 1985). Això vol dir que hi han altres mecanismes que puguin donar una resposta ràpida d'activació de la glicogen fosforilasa a l'inici de l'exercici.

La contracció muscular activa la fosforilasa però reverteix a la forma inactiva en poc temps, amb la consegüent disminució del flux glicogenolític (Conlee *i col.* 1979).

Passoneau i Lowry (1962) descriuen que aquests canvis poden ser deguts a que disminueix la inhibició per ATP sobre la glicogen fosforilasa b i a un increment en la concentració d'AMP.

Segons Holmes i Mansour (1968) la glucosa en extractes musculars incrementa la transformació de glicogen fosforilasa a a b. La concentració de glucosa en el múscul en repòs és molt baixa. L'augment d'aquest metabòlit durant la contracció és suficient per a accelerar la reacció de la fosforilasa fosfatasa, per canvis en l'afinitat de l'enzim pel complex glucosa - glicogen fosforilasa a.

La fosforilasa b és activa en presència d'AMP, IMP i és inhibida per ATP i glucosa 6-P (Morgan i Parmeggiani, 1964).

En múscul humà s'ha descrit que la taxa glicogenolítica durant l'exercici es pot explicar per l'increment d'IMP, (Rahim *i col.* 1980), i Aragón *i col.* 1980), i l'han proposat com l'activador fisiològic de la glicogen fosforilasa, en lloc de l'AMP.

Altres autors diuen que ni un ni l'altre assoleixen la concentració necessària per a donar l'activitat màxima a la glicogen fosforilasa.

Però s'ha de tenir en compte la possible compartimentació cel.lular, és a dir la concentració citoplasmàtica d'ambdós metabòlits pot estar molt elevada, però quedar emmascarada al fer un extracte total del múscul.

El paper del Pi, derivat de la creatinafosfat, pot ser important a l'hora

d'activar la glicogenòlisi.

Chasiotis *i col.* (1983, 1985) descriuen que l'activitat màxima s'assoleix mitjançant l'activació per fòsfor inorgànic (Pi). Aquest en presència de concentracions baixes d'AMP té molta més afinitat per la glicogen fosforilasa, disminuint la Km de la fosforilasa pel Pi, podent explicar així l'increment de la taxa glicogenolítica.

Per tant, en presència de concentracions altes d'AMP, IMP i de Pi, no sempre és necessari un percentatge elevat de fosforilasa a per mantenir l'alt flux glicogenolític, especialment durant un exercici perllongat (Bonen *i col.* 1989).

Glicogenogènesi

La síntesi de glicogen es fa a partir de glucosa 6-P, aquesta convertida en glucosa 1-P mitjançant la fosfoglucomutasa. El producte, la glucosa 1-P, es combina amb UTP i forma l'UDP-glucosa, que és la que serveix de transportador de molècules de glucosa. La glucosa és transferida al residu terminal del glicogen formant-se un enllaç $\alpha(1,4)$. Aquesta reacció és catalitzada per la glicogen sintasa.

Un altre enzim, l'amilo $\alpha(1,4 - 1,6)$ transglucosidasa catalitza la formació de l'enllaç $\alpha(1,6)$ entre un fragment de sis o set residus de glucosa i el grup hidroxil d'una altra molècula de glucosa que està a la cadena de glicogen.

Així es forma el glicogen, polisacàrid de cadena ramificada amb enllaços $\alpha(1,4)$ i $\alpha(1,6)$. Aquesta estructura facilita la seva solubilitat i fa que les velocitats de síntesi i de degradació puguin ser més altes.

Es creu que el pas limitant és el pas que regula la glicogen sintasa. Aquest enzim es troba en dues formes interconvertibles per fosforilació - desfosforilació, les formes I i D (Danforth 1965; Larner *i col.* 1963). La forma activa (sintasa I) és independent de glucosa 6-P, mentre que la sintasa D n'és dependent.

La glicogen sintasa pot ser fosforilada fins a sis llocs, i ho és per diversos tipus de quinases: la proteïna quinasa dependent d'AMPc, la glicogen sintasa quinasa, la glicogen fosforilasa quinasa i la casseïna quinasa (Huang & Huang 1980; Roach & Larner 1977). La sintasa D és desfosforilada per la glicogen sintasa fosfatasa fins que és totalment activa (sintasa I).

La concentració de glicogen juga un paper fonamental en la regulació de l'activitat glicogen sintasa (Adolfsson 1973; Bergtröm *i col.* 1972; Danforth 1965). Generalment la forma I és inversament proporcional a la quantitat existent de glicogen. Quan la concentració d'aquest metabòlit disminueix, el percentatge de sintasa I augmenta. Això és degut a que tant la glicogen sintasa com la glicogen fosfatasa estan formant part d'un complex glicogen proteïna, que també inclou la glicogen fosforilasa (Fischer *i col.* 1971) i glicogen sintasa. Quan els nivells de glicogen disminueixen llavors queden lliures la sintasa i la fosfatasa, podent actuar aquesta última sobre la primera i produir-se la desfosforilació, que activa l'enzim.

Quan s'ha exhaurit el glicogen es produeix la seva resíntesi, segons Ivy (1991). Aquesta es caracteritza per presentar dues fases. La primera d'elles seria una resíntesi ràpida de glicogen que es donaria només acabat l'exercici i que estaria regulada pel mecanisme explicat en el paràgraf

anterior. La segona fase es caracteritza perquè es produeix una supercompensació de glicogen, (la concentració que s'assoleix és molt més elevada que l'existent en el repòs). Aquesta resíntesi es molt més lenta. La troballa que això només es dona en el múscul que ha exhaurit prèviament el glicogen, fa pensar en algun altre mecanisme intrínsec al mateix múscul. També fa falta una concentració elevada d'insulina, en rates diabètiques s'ha posat de manifest que la supercompensació de glicogen no es produeix en condicions en les quals aquesta estaria afavorida (Ivy *i col.* 1977).

Després de la realització d'un exercici el percentatge de sintasa I pot augmentar fins a un 80%, però quan s'arriba a la concentració normal de glicogen, la forma I torna a disminuir fins i tot per sota dels nivells inicials abans de fer l'exercici. Kochar *i col.* (1981) van trobar una forma intermèdia de glicogen sintasa que es caracteritzava per tenir una relació sintasa I/sintasa D molt baixa però que era molt sensible a l'activació per glucosa 6-P, i es suposa que aquesta és la responsable de la resíntesi de glicogen durant la supercompensació.

Un altre esdeveniment que s'ha observat és que simultàniament a la degradació de glicogen, durant l'exercici o contracció muscular també es pot donar la seva síntesi.

Amb concentracions baixes de glicogen i subministrant una dieta rica en carbohidrats tant en humans (Bonen *i col.* 1985) com en rosegadors (Kuipers *i col.* 1986), s'ha vist que el glicogen pot ser resintetitzat durant l'exercici. Més tard, sense donar carbohidrats ni exhaurint el glicogen prèviament, també s'ha manifestat que es pot donar la resíntesi de glicogen (Hutber i Bonen, 1989). Mitjançant tècniques de ressonància magnètica nuclear s'ha pogut veure, durant un exercici d'intensitat mitja

en humans, el mateix fet (Price *i col.* 1991). Hutber i Bonen, (1989) conclouen que la velocitat de síntesi de glicogen és més alta durant l'exercici que en el repòs, sense una font de carbohidrats externa, que la velocitat de síntesi està en relació a la concentració de glicogen i que la síntesi depèn de la composició del múscul, sent més alta a les fibres musculars més aeròbiques, (I > IIa > IIb).

Transport de glucosa

Els substrats necessaris per la glucòlisi estan lligats a la relativa contribució del glicogen intramuscular i de la glucosa extracel.lular. El flux glucolític depèn doncs, de l'activació de la fosforilasa, de la concentració de glicogen i de la captació de la glucosa sanguínia.

En condicions normals, les reserves de glicogen a través de la glicogenòlisi, són la principal font de substrat per la glucòlisi durant un exercici inferior a una hora (Coyle *i col.* 1988). La glucosa sanguínia contribueix amb un 20-40% en un exercici d'una intensitat del 40-50% VO₂ màxima (Stanley *i col.* 1988). El paper de la glucosa com a substrat energètic incrementa a mesura que el glicogen intramuscular va essent reduït a causa de l'exercici. A més, la utilització de glucosa està parcialment controlada per l'estat metabòlic del múscul.

La contracció muscular provoca un increment en el transport de glucosa cap a l'interior del múscul, es creu que l'augment de la concentració de calci està implicat en l'estimulació del transport de glucosa. L'estudi del transport de glucosa a través de la membrana cel.lular és difícil. Hem de considerar que no totes les cèl.lules estan igualment exposades a la

glucosa, a més s'ha posat de manifest que la resposta en front de la glucosa és diferent per cada tipus de fibra. La captació de glucosa per un múscul de contracció lenta té una K_m més petita i una $V_{m\grave{a}x}$ més elevada, que un múscul de contracció ràpida (Klip i Pâquet, 1990). Coincidint amb aquesta afirmació, Richter *i col.* (1982) i James *i col.* (1986) varen descriure que les fibres de tipus I eren les més sensibles a la insulina, mentre que les de tipus IIa estaven en una posició intermèdia i les de tipus IIb no presentaven cap resposta, això en condicions de repòs.

La hipòtesi que l'augment de la captació de glucosa és degut a una major unió de la insulina al múscul no sembla que sigui certa, ja que després d'un exercici moderat, mentre que la captació de glucosa s'ha incrementat, la unió d'insulina al múscul no varia (Bonen *i col.* 1984). En presència de corticosterona la captació de glucosa disminueix i la unió d'insulina al múscul no està alterada (Tan *i col.* 1985).

Sasson *i col.* (1986) van observar que llargs períodes en presència d'altres concentracions de glucosa provocaven una disminució del transport de glucosa, mentre que a baixes concentracions es produïa un augment, definint-se així el concepte d'autoregulació de la captació de glucosa.

El transportador de glucosa presenta cinc isoformes, de les quals en el múscul esquelètic només es troben les GLUT-1 i GLUT-4.

S'ha hipotetitzat que els dos transportadors coexisteixen en teixits sensibles a la insulina. El GLUT-1 estaria majoritàriament a la membrana plasmàtica i seria el responsable del transport basal de glucosa. El GLUT-4, predominantment emmagatzemat al citosol, seria el responsable de l'increment del transport de glucosa després d'un estímul amb insulina (James *i col.* 1988).

És conegut que la insulina provoca un desplaçament del transportador GLUT-4, des d'un orgànu intracel.lular a la membrana plasmàtica (Simpson *i col.* 1986), però no explica l'elevat augment de la captació de glucosa, el qual no es correspon amb l'augment de GLUT-4 a la membrana (Klip i Pâquet, 1990)

Els resultats trobats per Sternlicht *i col.* (1989) no estan d'acord amb d'altres (Fushiki *i col.* 1989; Douen *i col.* 1989) que diuen que l'augment del transport de glucosa és degut, almenys en part, a la translocació dels transportadors.

Douen *i col.* (1990) recentment han observat que tant l'exercici com la insulina fan que augmenti la concentració de GLUT-4 a la membrana plasmàtica mentre que el GLUT-1 no sembla que estigui afectat per l'exercici. Aquest mateix autor hipotetitza que hi ha diferents reservoris de GLUT-4 i que segons quin tipus d'estímul rebin (per l'exercici o per la insulina) es desplaça un o altre reservori cap a la membrana (Douen *i col.* 1990).

Glucòlisi

Després de la captació de la glucosa pel múscul, aquesta s'ha de fosforilar. L'hexoquinasa és l'enzim que catalitza el pas de glucosa a glucosa 6-P, i sembla que pot jugar un paper important dins de la regulació del metabolisme.

L'hexoquinasa generalment es classifica com un enzim de la via glucolítica, en el múscul esquelètic es troben les formes isoenzimàtiques I i II, de les quals la II és la que es troba en més quantitat (Katzen *i col.* 1965).

L'isoenzim I es troba principalment en teixits on la relativa dependència de la glucosa sanguínia com a substrat energètic és més alta, com pot ser en el cervell. En canvi, l'isoenzim II és la forma predominant en teixits sensibles a la insulina. L'hexoquinasa II representa una adaptació a la disponibilitat de glucosa (Wilson, 1984). En rates diabètiques, la síntesi d'hexoquinasa II disminueix mentre que amb l'exercici o mitjançant l'estimulació elèctrica augmenta (Weber i Pette, 1988).

Aquestes dues formes isoenzimàtiques es caracteritzen per tenir una Km relativament baixa per la glucosa, sent més baixa en el cas de la hexoquinasa II.

L'ADP és un inhibidor d'aquest enzim, però les concentracions que es troben en el citosol són molt més baixes que el valor de la K_i (Wilson *et al.* 1967).

Altres metabòlits que afecten l'activitat de l'hexoquinasa són la glucosa 6-P, glucosa 1,6-P₂ i el Pi. La inhibició sobre l'hexoquinasa que tenen la glucosa 6-P i la glucosa 1,6-P₂ no són efectives en presència de concentracions fisiològiques de Pi, en el cas de l'isoenzim I. Per si sol, el Pi té un efecte inhibidor molt més accentuat en l'isoenzim II que en el I. L'hexoquinasa és un enzim que es pot trobar unit als mitocondris o lliure al citosol, sembla que la seva unió als mitocondris està en relació a l'activitat ja que els mitocondris li podrien subministrar ATP directament des de l'interior i l'hexoquinasa lliurar ADP. La glucosa 6-P i la glucosa 1,6-P₂ augmenten la solubilitat de l'enzim. (Per revisió: Wilson, 1985).

La degradació de glicogen i l'entrada de glucosa provoquen un acúmulo de glucosa 6-P, aquest metabòlit està en un encreuament de vies metabòliques, una de les quals és la glucòlisi. El rendiment d'aquesta via depèn de la procedència de la glucosa inicial, de si ve de la glucosa

sanguínia o de glicogen, obtenint-se dos o tres molècules d'ATP respectivament, i dos de lactat. Aquest procés genera deu vegades menys ATP que l'oxidació completa però és molt més ràpid.

La contracció del múscul pot incrementar la velocitat de la glucòlisi mesurada segons l'aparició de lactat, entre 10 i 100 vegades, segons la freqüència de la contracció, tal com va observar Karpatkin ja l'any (1964). En l'home s'ha calculat que la velocitat de glucòlisi del múscul en repòs és de $0,03 \mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Durant un "sprint" pot arribar a ser de $60 \mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, és a dir, 2000 vegades superior.

La regulació del flux glucolític té un punt principal de control, aquest és l'enzim fosfofructoquinasa.

L'activació de la fosfofructoquinasa està afectada per nombrosos efectors i a través de diversos mecanismes, que fa que sigui una regulació molt complexa. A més s'ha vist l'existència de formes isoenzimàtiques que resulten de la combinació de tres subunitats: M (tipus muscular), L (tipus hepàtic) i F (tipus fibroblast) (Dunaway, 1983). La sensibilitat de cadascun dels isoenzims als efectors al·lostèrics és diferent però el seu comportament és bàsicament el mateix.

Els diversos mecanismes de modulació de l'enzim són:

- 1) Regulació al·lostèrica
- 2) Regulació per interaccions protèiques
- 3) Regulació per fosforilació-desfosforilació

La seva activitat està influenciada per una gran quantitat d'efectors al·lostèrics

Taula 1.2: Efectors al·lostèrics de la fosfofructoquinasa
(Sols i col. 1980).

Inhibidors	Activadors	Desinhibidors de Citrat, ATP i Mg_{2+}
ATP	NH_4^+	AMP_c
Citrat	K^+	AMP_c
Mg^{2+}	Pi	ADP
Ca^{2+}	AMP	Pi
PEP	AMP_c	Fructosa 6-P
Glicerat 3-P	ADP	Fru 1,6- P_2
Glicerat 2-P	Fru 1,6- P_2	Glu 1,6- P_2
Glicerat 2,3- P_2		Fru 2,6- P_2
Oleat		Manosa 1,6- P_2
GMP_c		

A pH 8 l'enzim presenta una cinètica de Michaelis-Menten típica respecte als seus dos substrats (fructosa 6-P i ATP). A mesura que disminueix el pH, s'observa la corba sigmoïdal de saturació per fructosa 6-P i es posa de manifest la inhibició per ATP, a més a concentracions inhibidores d'ATP el citrat també inhibeix l'enzim. A la *Taula 2*, s'observen una gran quantitat de metabòlits que poden contrarrestar l'acció de l'ATP i del citrat.

Durant la contracció muscular, l'ió amoni, com a resultat de l'acció de l'adenilat deaminasa, i el fòsfor inorgànic, ambdós activadors de la fosfofructoquinasa, augmenten la seva concentració, mentre que

disminueix marcadament la de creatina fosfat, que és un inhibidor, encara que feble, de l'enzim.

Pel que fa als nucleòtids d'adenina, els nivells d'ATP no disminueixen gaire, els d'ADP i AMP augmenten poc a causa del fet que s'incrementa marcadament la concentració de l'IMP, per acció de l'adenilat deaminasa (Goodman i Lowenstein, 1977). A més, han assenyalat que pel fet que l'ADP s'uneix fortament a l'actina, si s'assumeix que les reaccions de la creatina quinasa i de la mioquinasa estan en equilibri, les concentracions d'AMP i ADP lliures han d'ésser molt baixes, de l'ordre del 0,1% i del 3% del total respectivament, en el múscul en repòs i del 0,5% i del 6% en exercici. Per tant, aquests compostos no sembla que puguin ser suficients per a donar la màxima activació de l'enzim.

L'estat d'agregació de l'enzim pot variar, augmentant l'activitat a mesura que augmenta el grau d'agregació. L'activitat màxima es dóna quan es troba en la forma de tetràmer.

Boscá *i col.* (1985a) han determinat l'activitat de la fosfofructoquinasa de múscul de conill en presència i absència de polietilenglicol, un agent que afavoreix l'agregació de l'enzim. En presència d'ATP 10 mM i fructosa 6-fosfat 0,1 mM, concentracions similars a les del múscul en repòs, la fosfofructoquinasa presenta una activitat que és només el 3% de la màxima i això explica la baixa velocitat de la glucòlisi en aquestes condicions. En canvi, en presència d'ATP 7,5 mM i fructosa 6-fosfat 1 mM, concentracions similars a les que es troben en un exercici intens, l'activitat en presència de polietilenglicol seria el 82% de la màxima, suficient, segons els autors, per explicar l'augment del flux glucolític "in vivo".

Altres possibilitats serien un acoblament entre el sistema contràctil i la producció de lactat, com ha suggerit Wilkie (1983). De fet, la calmodulina és capaç d'unir-se a la fosfofructoquinasa i modular el seu estat d'agregació encara que això sembla provocar una inactivació lenta (Mayr, 1984a, 1984b).

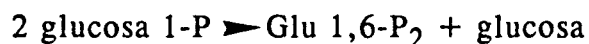
No està clar quins són els factors claus. Però, segons sembla l'estimulació de la fosfofructoquinasa durant la contracció es deu majoritàriament, als canvis en les concentracions de diversos efectors, especialment la fructosa 6-fosfat i la fructosa 1,6-bisfosfat, els quals augmenten durant la contracció.

Altres metabòlits com són la fructosa 1,6-bisfosfat, la fructosa 2,6-bisfosfat i la glucosa 1,6-bisfosfat han estat descrits com possibles activadors al·lostèrics de la fosfofructoquinasa.

Paper de la glucosa 1,6-bisfosfat

Per la síntesi d'aquest metabòlit s'han descrit quatre vies diferents:

1) Glucosa 1-P fosfodismutasa, que catalitza la següent reacció:



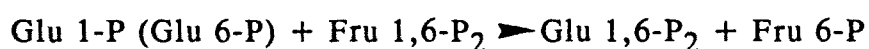
L'enzim ha estat identificat i parcialment caracteritzat en múscul (Sidbury *i col.* 1956, Climent *i col.* 1985)

2) Glucosa 1-P quinasa, catalitza la següent reacció:



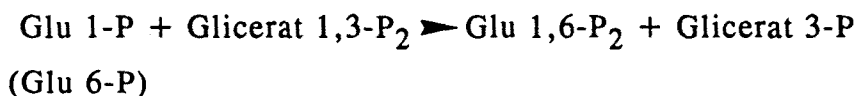
Aquesta activitat enzimàtica s'ha descrit en múscul de conill (Sidbury *i col.* 1956). Més tard es va concloure que era una activitat col.lateral de la fosfofructoquinasa (Eyer *i col.* 1971). Climent *i col.* (1985) van descriure una activitat quinasa que era separable de la fosfofructoquinasa i que no presentava activitat creuada.

3) Síntesi de Glu 1,6-P₂ dependent de Fru 1,6-P₂



Es tracta d'una activitat col.lateral de la fosfoglucomutasa i s'ha detectat en múscul esquelètic de ratolí (Passonneau *i col.* 1969) i de porc (Climent *i col.* 1985).

4) Síntesi de Glu 1,6-P₂ dependent d'1,3-bisfosfoglicerat



Es tracta d'una activitat col.lateral de la fosfoglucomutasa, la qual és específica per la síntesi de glucosa 1,6-P₂, i ha estat descrita en múscul de conill (Alpers, 1968) i de porc (Carreras *i col.* 1988).

El principal enzim responsable de la degradació de la glucosa 1,6-P₂ és la Glu-1,6-bisfosfatasa. Els productes de la reacció són la glucosa 6-P (o glucosa 1-P) i Pi.

La regulació de la Glu-1,6-bisfosfatasa ha estat revisada recentment (Beitner, 1985, 1990). Les hormones que actuen a través de l'AMPc

indueixen un augment de la concentració de glucosa 1,6-P₂, mentre que les que ho fan a través dels fosfoinositols, provoquen un augment de la concentració de Ca²⁺ i de GMPc, induint una disminució de la concentració de glucosa 1,6-P₂. L'enzim està afectat per segons missatgers. El sistema Ca²⁺-calmodulina és capaç de regular l'activitat, per tant el Ca²⁺ és un activador d'aquest enzim en múscul esquelètic de rata (Wakelam *i col.* 1982). Les concentracions efectives estan dintre dels nivells fisiològics que es poden assolir per l'acció d'hormones tals com la vasopressina o adrenalina. L'addició de trifluoroperazina (un inhibidor de la calmodulina) o l'addició d'EGTA inhibeixen l'activitat Glucosa-1,6-bisfosfatasa (Wakelam *i col.* 1982). Aquest efecte s'ha demostrat també "in vivo" (Frucht *i col.* 1984).

L'AMPc inhibeix la glucosa-1,6-bisfosfatasa (Beitner i Cohen, 1980), mentre que pel GMPc s'han descrit efectes contradictoris (Beitner i Cohen, 1980; Wakelam *i col.* 1982).

L'activitat de la glucosa-1,6-bisfosfatasa en múscul esquelètic de rata augmenta amb el dejú (Beitner *i col.* 1979a) i amb l'envelliment (Nordenberg *i col.* 1981). En ratolí també es produeix un efecte similar però a causa de la distròfia muscular (Beitner *i col.* 1979b).

Guha *i col.* (1983) van demostrar que l'activitat de la glucosa-1,6-bisfosfatasa incrementava amb concentracions altes d'IMP en el cervell de ratolí. Bassols *i col.* (1985), en múscul esquelètic de porc descriuen una glucosa-1,6-bisfosfatasa no tan específica i l'activitat de la qual no està afectada per IMP, Ca²⁺ o EGTA.

Paper de la fructosa 2,6-bisfosfat.

La síntesi i degradació de la fructosa 2,6-bisfosfat estan regulades per un enzim bifuncional, la fructosa 6-fosfat 2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2). Les reaccions que catalitza són les següents:



Han estat purificats i caracteritzats tres tipus d'isoenzims en mamífers (revisat en: Hue i Rider, 1987), el de fetge adult (L), el de múscul esquelètic (M) i el de múscul cardíac (H). Els isoenzims de fetge (L) i de múscul esquelètic (M) contenen 438 aminoàcids comuns, diferenciant-se en l'extrem amino. L'isoenzim L és fosforilable per la proteïna quinasa dependent d'AMPc, mentre que el M ho és per proteïna quinasa C (Lively *i col.* 1988, Crepin *i col.* 1989a, Darville *i col.* 1989). L'isoenzim de múscul cardíac és un polipèptid més llarg que els dos anteriors, tenint la particularitat que és fosforilable tant per la proteïna quinasa dependent d'AMPc com per la proteïna quinasa C (Rider i Hue, 1986a, Kitamura *i col.* 1987). Els dos llocs de fosforilació estan a l'extrem carboxil, a diferència del que passa amb els isoenzims L i M (Sakata i Uyeda, 1990). Aquests tres isoenzims es diferencien pels pesos moleculars, per la immunoreactivitat i per les seves propietats cinètiques (Van Schaftingen i Hers, 1986; Hue i Rider, 1987; Kitamura i Uyeda, 1988; Taniyama *i col.* 1988).

Comparacions cinètiques dels tres isoenzims mostren que l'isoenzim M en rata, té una Km per la fructosa 6-P similar a la de l'isoenzim de fetge de pollastre (Van Schaftingen i Hers, 1986) i a la de múscul cardíac de vaca

(Kitamura i Uyeda 1988). En canvi la K_m per l'ATP a l'isoenzim M és més baixa que la de cor de vaca i que la de fetge de rata, però és cinc vegades més alta que la de múscul de colom (Van Schaftingen i Hers, 1986). Pel que fa a l'activitat fosfatasa de l'isoenzim, s'observa una K_m per la fructosa 2,6- P_2 i una K_i per la fructosa 6-P similar a la fructosa 2,6-bisfosfatasa, fosforilada, de fetge de rata.

Una important observació és que l'isoenzim de múscul, ja sigui de colom o de rata presenta molta més activitat fosfatasa que quinasa. A la rata la relació quinasa/fosfatasa en el múscul és de 2,5 mentre que al fetge és de 0,8 (Kitamura *i col.* 1989).

La concentració de fructosa 6-P al múscul és pròxima de la K_m de l'activitat quinasa, la fructosa 2,6- P_2 està unes cinc vegades per sobre de la K_m del'activitat fosfatasa, però està fortament inhibida per la fructosa 6-P que a la concentració a la qual es troba és de cinc vegades la K_i de la fructosa 2,6-bisfosfatasa (Kitamura *i col.* 1989).

L'isoenzim de múscul cardíac es modifica covalentment per efecte de la fosforilació. La fosforilació de l'isoenzim de fetge provoca una inactivació de l'activitat quinasa mentre que augmenta l'activitat fosfatasa, el resultat és una disminució de la concentració de fructosa 2,6- P_2 , explicant l'efecte del glucagó. En canvi l'isoenzim de múscul cardíac quan es fosforila augmenta l'activitat quinasa i no modifica l'activitat fosfatasa (Kitamura *i col.* 1988). L'explicació d'aquest fenomen segons Sakata i Uyeda (1990) és la diferència que hi ha entre el lloc d'unió de l'enzim a la fructosa 6-P, ja que la K_m per aquest substrat, en fetge i cor és modificada en direccions oposades per la fosforilació. Disminueix la K_m a l'isoenzim H i en el L l'incrementa.

La fosforilació per proteïna quinasa dependent d'AMPc disminueix la K_m

per la fructosa 6-P i la fosforilació per proteïna quinasa C augmenta la $V_{m\grave{a}x}$, els dos tipus de fosforilació tenen un efecte additiu (Kitamura *i col.* 1988).

Regulació del flux glucolític per la Glu 1,6-P₂ i la Fru 2,6-P₂.

La glucosa 1,6-P₂ i la fructosa 2,6-P₂ no són metabòlits intermediaris de la glucòlisi, sinó que les vies metabòliques que els sintetitzen i degraden són derivacions de la via glucolítica. Actuen com a cosubstrats o efectors de reaccions de la via glucolítica.

La fructosa 2,6-P₂ ha estat trobada en tots els tipus de teixits de mamífers. En general el flux glucolític està regulat per la disponibilitat de substrat (glucosa), per la demanda energètica (anòxia) o per hormones (adrenalina i insulina).

Al fetge s'ha descrit la importància de la fructosa 2,6-P₂ com a regulador del flux glucolític/gluconeogènic (Gil, 1987; Hue i Rider, 1987; Pilkis *i col.* 1988). En el cas de la glucosa 1,6-P₂ el seu paper és dubtós (Gil, 1987). La concentració hepàtica d'ambdós metabòlits varia en diferents situacions fisiològiques en les quals es modifica el flux glucolític/gluconeogènic (dejú, realimentació i diabetes) correlacionant-se en gran manera els canvis soferts en la concentració de fructosa 2,6-P₂, però no els de glucosa 1,6-P₂ (Gil, 1987).

En el cas del múscul esquelètic hi ha controvèrsia amb els resultats que es descriuen en diferents situacions fisiològiques. L'afinitat de la fosfofructoquinasa per fructosa 2,6-P₂ és aproximadament 10 vegades superior a l'afinitat per fructosa 1,6-P₂ i unes 100 vegades superior a la

de glucosa 1,6-P₂ (Foe *i col.* 1983). Però en el teixit muscular la concentració de fructosa 1,6-P₂ i de glucosa 1,6-P₂ són superiors a la de fructosa 2,6-P₂, especialment durant la contracció, suggerint que en aquest teixit són les hexoses 1,6-P₂ les que tenen un paper fisiològic en la regulació del flux glucolític (Aragón *i col.* 1980, Minatogawa i Hue, 1984, Bassols *i col.* 1986). La quantitat de fructosa 2,6-P₂ en el múscul es pot unir només al 8% de les subunitats de fosfofructoquinasa, suposant una unió total (Foe *i col.* 1983).

L'adrenalina i la insulina provoquen un augment dels nivells de fructosa 2,6-P₂ i lactat, en múscul esquelètic de rata (Hue *i col.* 1982), podent ser un efector important del flux glucolític en aquestes condicions, però aquest increment de fructosa 2,6-P₂ no s'observa sota l'efecte d'una estimulació elèctrica a una freqüència que provoca tetània (Hue *i col.* 1982). Minatogawa i Hue (1984), no varen trobar correlació entre l'acúmulo de lactat i l'augment de fructosa 2,6-P₂. Amb el múscul *Gastrocnemius* van veure en una primera fase un augment transitori de fructosa 2,6-P₂ als 10sg de ser estimulat a 5 Hz sense l'aparició de lactat, mentre que en una segona fase augmentava el lactat i disminuïa la concentració de fructosa 2,6-P₂. En el múscul *Extensor digitorum longus* no van trobar cap increment de fructosa 2,6-P₂. A una freqüència de 10 hz no van veure cap modificació de la concentració de fructosa 2,6-P₂. Bassols *i col.* (1986) han observat l'efecte contrari, amb l'estimulació a 25 Hz del múscul *Gastrocnemius* s'observa un augment transitori de la fructosa 2,6-P₂, mentre que amb l'estimulació a 5 Hz es dona una disminució de la concentració al final del període de contracció. En cap dels dos estudis anteriors hi ha una correlació entre l'augment de fructosa 2,6-P₂ i l'acúmulo de lactat, utilitzat com indicador de la velocitat de la via glucolítica. Recentment, Wegener *i col.* (1990), utilitzant granotes

han observat un increment d'unes quaranta vegades la concentració existent al repòs de fructosa 2,6-P₂ en el primer segon de contracció, i defineixen un període alactogènic (els primers cinc segons de contracció) en el qual no es produeix lactat, i una altra fase (a partir dels cinc segons) que es caracteritza perquè l'acúmul de lactat es correlaciona amb la concentració de fructosa 2,6-P₂.

S'ha descrit que la fructosa 2,6-P₂ és més bon protector de l'activitat fosfofructoquinasa que la glucosa 1,6-P₂ i la fructosa 1,6-P₂ (Andrés *i col.* 1988, Wegener *i col.* 1990) i que la presència de fructosa 2,6-P₂ durant l'alcalinització del múscul esquelètic a l'inici de la contracció muscular (Connett, 1987) fa que l'activació de la fosfofructoquinasa estigui afavorida (Andrés *i col.* 1990).

Segons Kitajima i Uyeda (1983) a concentracions fisiològiques d'ATP s'inhibeix fins a unes 10 vegades l'afinitat de la fosfofructoquinasa, purificada de múscul esquelètic de conill, per la fructosa 2,6-P₂, però si s'augmenta la concentració d'aquest metabòlit bisfosforilat fins a 2 µM o més, es torna a assolir l'activitat màxima de l'enzim. L'increment de fructosa 2,6-P₂ assegura que la fosfofructoquinasa estigui a la màxima activitat quan hi ha un augment de la disponibilitat de glucosa i altes concentracions de citrat i ATP (Lawson i Uyeda, 1987).

Els fets anteriorment descrits fan pensar que encara que no estigui clar, la fructosa 2,6-P₂ té un paper important en la regulació de la glucòlisi muscular.

Els nivells de glucosa 1,6-P₂ al múscul esquelètic es modifiquen en diferents condicions fisiològiques. Està involucrat en les modificacions del flux glucolític per mecanismes hormonals (revisat en Beitner, 1990), suggerint que la glucosa 1,6-P₂ pot ser un regulador de la

han observat un increment d'unes quaranta vegades la concentració existent al repòs de fructosa 2,6-P₂ en el primer segon de contracció, i defineixen un període alactogènic (els primers cinc segons de contracció) en el qual no es produeix lactat, i una altra fase (a partir dels cinc segons) que es caracteritza perquè l'acúmul de lactat es correlaciona amb la concentració de fructosa 2,6-P₂.

S'ha descrit que la fructosa 2,6-P₂ és més bon protector de l'activitat fosfofructoquinasa que la glucosa 1,6-P₂ i la fructosa 1,6-P₂ (Andrés *i col.* 1988, Wegener *i col.* 1990) i que la presència de fructosa 2,6-P₂ durant l'alcalinització del múscul esquelètic a l'inici de la contracció muscular (Connett, 1987) fa que l'activació de la fosfofructoquinasa estigui afavorida (Andrés *i col.* 1990).

Segons Kitajima i Uyeda (1983) a concentracions fisiològiques d'ATP s'inhibeix fins a unes 10 vegades l'afinitat de la fosfofructoquinasa, purificada de múscul esquelètic de conill, per la fructosa 2,6-P₂, però si s'augmenta la concentració d'aquest metabòlit bisfosforilat fins a 2 µM o més, es torna a assolir l'activitat màxima de l'enzim. L'increment de fructosa 2,6-P₂ assegura que la fosfofructoquinasa estigui a la màxima activitat quan hi ha un augment de la disponibilitat de glucosa i altes concentracions de citrat i ATP (Lawson i Uyeda, 1987).

Els fets anteriorment descrits fan pensar que encara que no estigui clar, la fructosa 2,6-P₂ té un paper important en la regulació de la glucòlisi muscular.

Els nivells de glucosa 1,6-P₂ al múscul esquelètic es modifiquen en diferents condicions fisiològiques. Està involucrat en les modificacions del flux glucolític per mecanismes hormonals (revisat en Beitner, 1990), suggerint que la glucosa 1,6-P₂ pot ser un regulador de la

fosfofructoquinasa en aquestes condicions fisiològiques.

Durant la contracció muscular s'han descrit diferents fenòmens. Hoffer i Pette, (1968) descriuen un augment de la concentració de glucosa 1,6-P₂ durant una contracció tetànica de múscul esquelètic de gos. Bauer *i col.* (1986b) descriuen una baixada del 20% de glucosa 1,6-P₂ en el múscul *Psoas* de conill perfundit i estimulat deu minuts (el tipus d'estimulació no es menciona). L'estimulació dels músculs flexors de ratolí durant 60 segons no modifica la concentració de glucosa 1,6-P₂ (Passonneau *i col.* 1969).

Bassols *i col.* (1986) van advertir que la concentració de lactat es correlacionava amb l'augment de glucosa 1,6-P₂. Utilitzant el múscul *gastrocnemius* de rata, estimulant-lo tant a 5 Hz com a 25 Hz, els nivells de glucosa 1,6-P₂ s'incrementaven en els primers 10-20 segons per després mantenir-se, al menys 1-2 minuts.

Katz *i col.* han estudiat recentment les concentracions de glucosa 1,6-P₂ en el múscul esquelètic humà en diverses situacions fisiològiques. La contracció muscular isomètrica i intensa provoca un augment de glucosa 1,6-P₂ (Katz i Lee, 1988; Lee i Katz, 1989). L'acumulació es dona principalment en les primers vint segons per després mantenir-se, coincidint amb els resultats de Bassols *i col.* (1986). En un exercici d'intensitat progressiva no observen cap augment de glucosa 1,6-P₂ (Katz *i col.* 1988).

Beitner *i col.* (1979) i Passonneau *i col.* (1969), el primer amb diafragma i el segon amb cervell de rata, observen disminucions de la concentració de glucosa 1,6-P₂ en condicions d'anòxia junt amb un descens dels nivells d'ATP i creatinafosfat. En canvi Katz *i col.* (1988) han demostrat que amb la circulació sanguínia ocluída del múscul *quadriceps* humà durant aproximadament 30 minuts no s'observa cap canvi significatiu dels nivells

de glucosa 1,6-P₂, però tampoc varien les concentracions d'ATP i de creatinafosfat. El possible descens de glucosa 1,6-P₂ pot està relacionat amb el recanvi d'ATP i l'aparició de IMP (Guha *i col.* 1983). No sembla que en condicions d'andòxia a les quals es produeix un acúmulo de lactat la glucosa 1,6-P₂ tingui un paper important en la regulació de la glucòlisi. També s'ha vist que en músculs en què predominen fibres de tipus II, com per exemple l'EDL de rata, hi ha unes tres vegades més glucosa 1,6-bisfosfat que en músculs de tipus I, per exemple el *Soleus* de rata (Bassols *i col.* 1987).

Com hem pogut observar el paper fisiològic de les hexoses bisfosforilades durant la contracció muscular no està clar. És necessari realitzar més estudis per poder esbrinar quin és el seu paper en la regulació de la via glucolítica.

Gluconeogènesi

Al 1922 es va observar que al múscul de granota es podia sintetitzar glicogen a partir de lactat, però no va ser fins uns 50 anys més tard que es va començar a considerar el paper fisiològic d'aquesta via metabòlica (Connett, 1979). Posteriorment es va veure que també es podia donar en múscul esquelètic de mamífers (McLane i Holloszy, 1979, Bonen *i col.* 1990).

La velocitat més alta de gluconeogènesi que s'ha observat en músculs de contracció ràpida (constituïts principalment per fibres de tipus II) està en relació amb la quantitat de fructosa 1,6-bisfosfatasa que es troba segons la classe de múscul (Opie *i col.* 1967), i d'espècie (Crabtree *i col.* 1972).

Newsholme *i col.* (1984) han justificat l'existència d'aquest enzim per augmentar la sensibilitat de les vies metabòliques a la demanda energètica, mitjançant el cicle fútil format per la fructosa 6-fosfat/fructosa 1,6-bisfosfat. La fructosa 6-fosfat és fosforilada per la fosfofructoquinasa donant la fructosa 1,6-bisfosfat i aquesta és hidrolitzada per la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Aquest últim enzim és inhibit per l'AMP mentre que la fosfofructoquinasa és activada. Challis *i col.* (1984) han suggerit que aquest cicle podria, almenys en algunes situacions, augmentar la sensibilitat del control metabòlic a aquest nivell. La sensibilitat és proporcional a la relació entre la velocitat del cicle i el flux net.

Però tot i que es considera el pas anterior com el pas limitant (McLane i Holloszy, 1979), la conversió de piruvat a fosfoenolpiruvat no està clara. Dyson *i col.* (1975) van demostrar que la gluconeogènesi pot ser realitzada al múscul per la reacció inversa de la piruvat quinasa, mentre que Connett (1979) va suggerir que era necessària una via alternativa per passar de piruvat a fosfoenolpiruvat i que era possible per l'existència d'un enzim extramitocondrial, l'enzim màlic. L'activitat d'aquest enzim no coincideix amb la velocitat de la via que s'ha descrit per cada tipus de múscul (McLane i Holloszy, 1979) i mitjançant càlculs van confirmar la hipòtesi de Dyson *i col.* (1975) i van correlacionar l'activitat PEPcarboxiquinasa amb la fructosa 1,6-bisfosfatasa.

Stevenson *i col.* (1987), diuen que amb rates que tenien concentracions de glicogen baixes i concentracions altes de lactat degut a la realització d'exercici, la síntesi de glicogen a partir de lactat només es dona quan la concentració arterial de lactat és de 10,5 a 18 mmol/l. I que la importància d'aquest fenomen disminueix a mesura que baixa la

concentració de lactat o en presència d'insulina, l'absència de glucosa en el medi de perfusió dóna les millors condicions per a la síntesi de glicogen des de lactat. Aquestes condicions són extremes i alguns autors han suggerit que la gluconeogènesi en múscul només es dóna amb concentracions altes de lactat (Shiota *i col.* 1984, Johnson i Bagby, 1988). Bonen *i col.* (1990) demostren que la gluconeogènesi es pot donar en músculs en què la concentració de glicogen és normal, en presència de concentracions altes de glucosa i amb nivells baixos de lactat. Aquests autors conclouen que la glucosa és el principal substrat per la síntesi de glicogen, encara que el lactat hi contribueix considerablement, sobretot en músculs blancs (fibres de tipus II), on la gluconeogènesi està incrementada per la reducció de pH que es dóna durant l'exercici. També van demostrar que la gluconeogènesi en múscul no està regulada per les hormones que regulen la glicogènesi o la gluconeogènesi en fetge. Talmadge *i col.* (1989), en músculs crònicament actius troben que mentre unes fibres degraden glicogen n'hi ha d'altres que el sintetitzen a partir de lactat.

En humans, possiblement la gluconeogènesi també funciona però no hi ha cap prova experimental directa. Hermansen *i col.* (1975) van observar que la resíntesi de glicogen es produïa a la mateixa velocitat que la desaparició de lactat. A més, l'activitat fructosa 1,6-bisfosfatasa és d'unes 70 a 100 vegades més alta que en rosegadors mentre que l'activitat fosfofructoquinasa és similar (Hintz *i col.* 1980).

1.3. FATIGA MUSCULAR

La fatiga muscular es defineix com una disminució en la capacitat de generar força a un determinat nivell (Edwards, 1981). Aquest fenomen no apareix de sobte sinó que es va produint de forma gradual, començant al mateix temps que l'exercici, i es dona quan la força o intensitat que es requereix en un exercici ja no es pot mantenir (Bigland-Ritchie *i col.* 1986; Vollestad i Sejersted, 1988). Quan s'arriba a un punt en què la força requerida ja no es pot mantenir es dona l'esgotament, i depèn de la duració i intensitat de l'exercici.

S'ha observat que la producció de força baixa més ràpidament com a resposta a un sol o a tota una sèrie d'estímuls que durant una contracció tetànica, aquest fenomen rep el nom de fatiga a baixa freqüència (Edwards *i col.* 1977). Després d'una contracció tetànica el múscul es pot recuperar en pocs minuts mentre que si s'ha arribat a la fatiga mitjançant un estímul repetitiu, la recuperació pot trigar hores o fins i tot dies.

En el múscul en contracció es donen un gran nombre de canvis bioquímics, molts dels quals són dependents del temps, per aquesta raó es parla de procés de fatiga, després del qual el múscul ha de passar per un període de recuperació per tornar a les condicions inicials.

El fenomen de la fatiga no està totalment resolt, primer de tot caldria examinar els possibles llocs on es pot donar la fatiga. Segons Green (1990c) hi hauria dues possibilitats, una corresponent al sistema nerviós i una altra al mateix múscul. Nosaltres, per la temàtica d'aquesta memòria ens referirem al múscul, fent un repàs dels possibles llocs que poden intervenir en el procés de la fatiga però amb especial referència al metabolisme energètic.

1.3.1. Causes de la fatiga

En el múscul esquelètic podem trobar diversos llocs que podrien justificar la pèrdua de força al llarg d'un exercici (Figura 1.1).

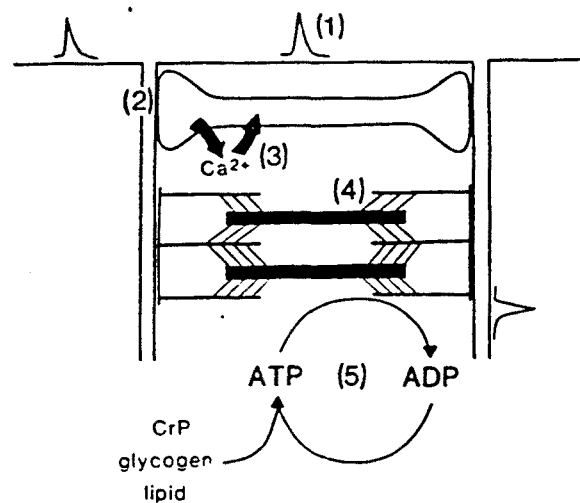


Figura 1.1: Representació dels fenòmens que es donen durant la contracció muscular. 1) Propagació del potencial d'acció a través del sarcolema i sistema-T. 2) Transmissió del senyal des del sistema-T al reticle sarcoplasmàtic. 3) Alliberament i captació de calci. 4) Interaccions entre fibres. 5) Resíntesi d'ATP.

L'activació muscular depèn de la propagació del potencial d'acció sobre el sarcolema, així qualsevol canvi de la composició iònica del citosol, del sistema T o de l'espai intersticial pot afectar aquest procés. Al següent pas, on s'acoblen els processos d'excitació - contracció, el senyal és transmès des del sistema T al reticle sarcoplasmàtic, essent el resultat l'alliberament de Ca^{2+} . La quantitat de Ca^{2+} emmagatzemada o alliberada pel reticle sarcoplasmàtic pot disminuir al llarg de l'exercici, resultant una menor interacció entre l'actina i la miosina i per tant una

disminució de la força. L'afinitat de la troponina pel Ca^{2+} també pot disminuir degut a canvis en el medi intracel·lular, produint-se el mateix efecte que en el cas anterior (Hermansen, 1981). A més, molts altres factors poden afectar la formació de ponts entre la miosina i l'actina: l'acidosis intracel·lular que inhibeix la miosin ATPasa, o per exemple tots els productes intermediaris que s'acumulen durant l'exercici (lactat, Pi, H^+ , ADP, AMP, IMP...). Finalment, el subministrament d'energia també ha estat relacionat amb el procés de la fatiga, tema que tractarem a l'apartat següent.

1.3.2. Metabolisme energètic i fatiga

Podem definir dos tipus d'exercici que es caracteritzen per la producció de lactat en el primer, i la no producció en el segon.

- 1) L'acúmulo de lactat ve acompanyat per una disminució important de creatinafosfat, en un 20-30% menys d'ATP al finalitzar l'exercici, un augment del Pi i l'ADP i una baixada del pH.
- 2) El segon tipus d'exercici es caracteritza per un esgotament del glicogen muscular que impossibilita l'oxidació de lípids i de la glucosa sanguínia (Vollestad i Sejerted, 1988).

El substrat immediat per la producció de força és l'ATP. Una disminució de la força pot ser deguda a una menor utilització de l'ATP pel sistema contràctil o una menor producció d'ATP.

Mitjançant estimulació elèctrica o en condicions on la circulació sanguínia està bloquejada, els nivells d'ATP poden disminuir fins a un 50%. La concentració d'ATP que es troba en un múscul fatigat està molt per sobre de la K_m de la actomiosina ATPasa (Nanninga i Mommaerts, 1960), a més

s'ha observat freqüentment, que la concentració d'ATP durant un exercici perllongat, en condicions normals, no es modifica o en tot cas, disminueix lleugerament. Norman *i col.* (1987) no varen observar cap disminució d'ATP en unes condicions en les quals el glicogen estava exhaurit, mentre que Broberg i Sahlin (1989) van trobar una disminució del 7%. Una possible explicació a aquestes concentracions altes d'ATP, segons va suggerir Hohorst *i col.* (1962) podria ser la impossibilitat d'utilitzar un determinat magatzem d'ATP pels mecanismes contràctils.

No està clar quin efecte pot tenir la depleció de la creatinafosfat. Quan aquest metabòlit s'ha esgotat, la velocitat de producció d'ATP disminueix, cosa que pot provocar una disminució de la força generada. Hultman *i col.* (1990) descriuen que després de 16 contraccions, durant les quals la creatinafosfat arriba a nivells molt baixos, el múscul encara és capaç de produir força durant 48 contraccions més. Katz *i col.* (1986b) en un exercici isomètric a una intensitat del 66%, van observar que la fatiga coincidia amb una concentració molt baixa de creatinafosfat, i van concloure que la fatiga està més relacionada amb la concentració de creatinafosfat que amb l'acúmul de lactat. Karlsson i Saltin, (1970) varen determinar la concentració de creatinafosfat als 2 i 16 minuts de la realització d'un exercici a una intensitat màxima i van trobar que la concentració de creatinafosfat era la mateixa. Un altre factor que va en contra de considerar la creatinafosfat com a responsable de la fatiga és que aquest metabòlit es recupera, després de l'exercici, molt més ràpidament que la capacitat de produir una determinada força de contracció (Hultman i Sjöholm, 1983; McCartney *i col.* 1986). És possible, però, que les concentracions baixes de creatinafosfat siguin crítiques per al transport d'energia des del mitocondri al sistema

contràctil, provocant que la velocitat de síntesi d'ATP estigui disminuïda.

La relació entre glicogen i la capacitat de fer un treball perllongat està ben establerta, la qual cosa suggereix que hi ha alguna connexió entre el glicogen i la fatiga muscular. Però els efectes de la depleció de glicogen no estan clars. El glicogen és un substrat essencial per a mantenir el flux glucolític i la regeneració d'ATP (Newsholme i Leech, 1983), a més la glucòlisi pot tenir la funció de proveir precursors essencials per al cicle de Krebs. Si el glicogen "per se" és important hi hauria d'haver una correlació entre la pèrdua de força i la baixada de la concentració de glicogen, però aquest no és el cas ja que s'han observat pèrdues importants de força (Hoffman *i col.* 1985), mentre que encara totes les fibres tenen glicogen (Vollestad *i col.* 1984). Possiblement la disminució de la concentració de glicogen provoca una caiguda en la producció d'ATP.

Com a resultat tenim que aquestes reserves energètiques al ser utilitzades per l'aparell contràctil són hidrolitzades produint-se tota una sèrie de metabòlits intermediaris que poden estar d'una manera o altra relacionats amb la fatiga.

Durant un exercici a alta intensitat es produeix una baixada de pH, que pot arribar a nivells per sota de 6,4 (Hermansen *i col.* 1972). Una disminució d'aquesta magnitud pot reduir l'activitat de la fosfofructoquinasa (Trivedi i Danforth, 1966), decreixent el flux glucolític. Però, la importància d'aquest mecanisme és qüestionable ja que els increments que es produeixen d'ADP, AMP, Pi, fructosa 6-P i les hexoses bisfosforilades junt amb la baixada de creatinafosfat, poden



eliminar la inhibició d'aquest enzim per l'efecte del pH (Vollestad i Sejersted, 1988; Hultman *i col.* 1990). Cooke i Pate (1985) descriuen una disminució de la força en un 60% i un 40% de disminució de l'activitat ATPàsica, per acúmuls de H^+ i de Pi. La disminució de la força es pot explicar segons Hermansen (1981) per una disminució de l'afinitat de la troponina al Ca^{2+} . La concentració de Pi es normalitza en pocs minuts mentre que la força segueix deprimida durant hores, indicant que la relació entre fatiga i acúmulo de Pi no està clara (Vollestad *i col.* 1985). Mesures de fibres aïllades en presència d'altres metabòlits intermediaris són descrites per Cooke i Pate (1990), en les quals observen que la força generada per les fibres es modifica en menys d'un 5% en presència d'AMP, IMP, adenosina, inosina, adenilsuccinat, amoni, creatina, piruvat i lactat, compostos que es troben augmentats a la fatiga. No exclouen les possibles interaccions d'aquests metabòlits amb els enzims de les diferents vies metabòliques.

Una disminució de la $Na^+ - K^+ - ATPasa$ pot afectar el balanç iònic de la membrana cel·lular, donant-se un increment en la concentració del K^+ extracel·lular i del Na^+ intracel·lular, canvis que s'han observat en un múscul fatigat (Sahlin, 1986). El resultat és una disminució del potencial de membrana, la qual cosa fa que la capacitat de generar força sigui menor.

El Ca^{2+} , també pot estar implicat en el procés de fatiga, si és captat per algun altre orgànel que no sigui el reticle sarcoplasmàtic, la disponibilitat de Ca^{2+} disminuirà, amb la qual cosa tots els mecanismes relacionats amb l'estimulació per Ca^{2+} estaran afectats (Vollestad i Sejersted, 1988). Sembla doncs, que no hi ha cap factor que per si sol pugui explicar el fenomen de la fatiga. Possiblement és un cúmul d'esdeveniments que provoquen la pèrdua progressiva de la força necessària per la contracció

muscular. Vollestad i Sejersted, (1988) resumeixen en la següent taula les principals conseqüències sobre el sistema contràctil que tenen els canvis bioquímics.

Taula 1.2: Possibles conseqüències dels canvis bioquímics

Paràmetres	Canvis Bioquímics	Canvis Mecànics
pH 6,5	↓ glucòlisi	↓ força màxima ↓ afinitat Ca^{2+} ↓ extracció Ca^{2+} ↓ vel. relaxació
25% ATP 75% PC	↓ captació de Ca^{2+} ↓ refosforilació ATP	↓ vel. relaxació
↑ ADP	↑ glucòlisi ↑ resp. mitocondrial	↓ vel. relaxació ↓ vel. prod. força
↑ Pi	↑ glucòlisi ↑ resp. mitocondrial ↑ Ca^{2+} en mitocondri	↓ força màxima ↓ afinitat Ca^{2+}
↑ Na^+ ↑ K^+	↑ Na^+, K^+ -ATPasa	↓ tensió
↑ Ca^{2+}	↑ resp. mitocondrial ↑ Ca^{2+} en mitocondri	↑ vel. contracció

1.4. ADAPTABILITAT DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC

El múscul esquelètic té una gran capacitat d'adaptació. És d'esperar que músculs que estan predominantment involucrats en el manteniment de la posició corporal siguin diferents dels que intervenen en moviments espontanis (Salmons i Vrbová, 1969).

Així, músculs que podem dir que estan tot el dia en contracció (músculs posturals), reben molta quantitat d'estímuls i són músculs de contracció lenta que es caracteritzen per l'alta capacitat oxidativa i estan formats principalment per fibres de tipus I. (Per exemple el múscul *Soleus*, en el conill).

En canvi els músculs que s'utilitzen de forma espontània, només reben impulsos de tant en tant. Són músculs de contracció ràpida i es caracteritzen per la gran capacitat glucolítica, formats majoritàriament per fibres de tipus II (Per exemple el múscul *Tibialis anterior* en el conill) (Pette i Vrbová, 1985).

Les fibres musculars estan en un estat dinàmic, la qual cosa explica l'habilitat que tenen de respondre específicament, amb canvis en l'expressió fenotípica, a una demanda funcional diferent (Pette i Staron, 1988).

Tant amb l'exercici com amb l'estimulació elèctrica es provoca un augment de l'activitat contràctil. Així, les característiques fenotípiques dels músculs que intervinguin a l'exercici o que siguin sotmesos a l'estimulació elèctrica es modificaran com a resposta adaptativa a la nova demanda funcional.

1.4.1. Efectes de l'exercici

Els efectes de l'exercici sobre el múscul esquelètic són complexos i variables, i dependents de diversos factors que inclouen el tipus d'exercici, la seva intensitat i durada, l'estat d'entrenament de l'individu, el múscul estudiat i possiblement també la determinació genètica.

Les modificacions que es donen es poden observar a tots nivells, des de modificacions estructurals fins a modificacions metabòliques.

1.4.1.1. Modificacions dels tipus de fibres

El teixit muscular, com s'ha vist, (apartat 1.1), és molt heterogeni, degut a que està format per diferents tipus de fibres, però aquest sistema és molt efectiu perquè així només s'utilitza l'energia indispensable per a cada tipus d'activitat. Per distingir els diferents tipus de fibres utilitzarem la nomenclatura que varen descriure Brooks i Kaiser (1970a).

Segons Prince *i col.* (1976), el percentatge de fibres ve determinat en els primers estadis de la vida i no pot ser variat amb l'exercici. En relació a l'edat sembla ser que no hi ha diferències en la proporció de fibres, (Essèn - Gustavsson i Borges, 1986), només durant el primer any de vida en què les de tipus I s'incrementen a expenses de les indiferenciades IIc, (Dubowitz, 1985). Altres autors, com Clarkson *i col.* (1982), no recolzen la idea de la transició de fibres que s'ha suggerit com a causa de la pràctica de l'exercici, ja que troben la mateixa distribució de fibres en atletes d'èlit que estan entrenats o que no ho estan.

Els atletes d'èlit de marató tenen un alt percentatge de fibres de tipus I, que són les més aeròbiques i més resistents a la fatiga. Mentre que els de

velocitat tenen un alt percentatge de fibres de tipus II. Segons Houston (1978), això és un efecte de la selecció natural i no de l'entrenament. Gollnick *i col.* (1982), amb biòpsies del vast extern examinades abans i després d'un període de sis mesos d'entrenament mitjançant exercici de llarga durada, no van observar modificacions en els dos grans tipus de fibres I i II, si ens referim a l'activitat ATPasa. Aquest període de sis mesos pot semblar curt si es compara amb els anys d'entrenament dels atletes especialitzats, però sis mesos és el temps de vida mitjana de les proteïnes que componen l'ATPasa miofibril·lar.

Komi *i col.* (1977) no va trobar diferències entre bessons univitelins, però Nimmo *i col.* (1985), utilitzant un model amb rosegadors va demostrar que els factors genètics només influïen en un 50% en la variació de la composició del tipus de fibres. Segons Bouchard *i col.* (1986), hi ha moltes condicions no genètiques que són responsables del fenotip que presenta el múscul esquelètic en humans i que l'efecte genètic és molt baix o fins i tot, inexistent.

Tant la inactivitat com la pràctica d'un exercici poden provocar transicions en el tipus de fibres. (Green *i col.* 1983, 1984; Haggmark *i col.* 1981; Howald *i col.* 1985, Schantz *i col.* 1982; Simoneau *i col.* 1985, Sjöström *i col.*, 1987).

Jansson *i col.* (1978) van observar una regressió de 81% a 57% del percentatge de fibres I en un esquiador de fons després d'una immobilització de sis setmanes. Baumann *i col.* (1987) descriuen que el múscul s'adapta a l'entrenament de resistència amb un augment de les fibres de tipus I, donant-se la següent transició I Ib - IIa - IIc - I. Jacobs *i col.* (1987) observen un augment de les fibres de tipus IIa a expenses de les de tipus I. Pette (1984) diu que la transició de fibres pot ser deguda a una resubstitució de les fibres de tipus II per les fibres de tipus I.

En alguns estudis s'ha observat que les modificacions es donen a nivell d'augment de diàmetre, ja sigui de les fibres I i IIa, (Costill *i col.* 1976a,b; Prince *i col.* 1976; Fournier *i col.* 1982), les més aeròbiques, o de les IIb. (Henriksson *i col.* 1977; Green *i col.* 1979). Costill *i col.* (1976a,b) no van demostrar canvis en el fenotip de base del múscul, però sí van demostrar un augment del diàmetre de les fibres de tipus I i IIa amb un entrenament de resistència, variant així la composició del múscul.

En exercicis anaeròbics hi ha una utilització preferent de les fibres de tipus II sobre les de tipus I, segons Gollnick *i col.* (1973), les fibres de tipus I no estan capacitades per a poder mantenir nivells alts de producció de força durant un curt període de temps. Diversos autors han trobat que l'àrea de les fibres de tipus II és més gran que la de les fibres de tipus I, en atletes que s'entrenen per velocitat. A més, en comparació amb les que es troben en persones sedentàries, el diàmetre de les fibres de tipus II també és més gran. El diàmetre de les fibres es correlaciona amb la força que poden produir, en el sentit de més diàmetre més força (Mero *i col.* 1981).

Cadefau *i col.* (1990) descriuen que després d'un període de 9 mesos d'entrenament per a millorar la velocitat, es produeix un augment de l'àrea de les fibres de tipus I i II, mentre que no s'observen canvis en el percentatge dels tipus de fibres i arriben a la conclusió que les modificacions histològiques són menys específiques que les metabòliques.

1.4.1.2. Modificacions metabòliques

Molts estudis han explicat els efectes d'exercicis de curta i llarga durada o d'alta i baixa intensitat, sobre el metabolisme.

Els enzims, degut a que tenen una vida mitjana curta, són molt sensibles als efectes d'un augment de l'activitat contràctil (Pette i Spamer, 1979). Segons el tipus d'entrenament s'aconsegueix estimular un tipus o altre de via metabòlica.

Les principals adaptacions que es donen com a resposta a un augment de l'activitat contràctil a llarg termini, consisteixen en una reducció del metabolisme anaeròbic i de la utilització de carbohidrats (Holloszy i Coyle, 1984; Saltin i Gollnick, 1983). Aquestes adaptacions han estat atribuïdes a un increment del metabolisme aeròbic i de la β -oxidació.

Tanmateix, un exercici anaeròbic es caracteritza per un esforç a alta intensitat i durant un curt període de temps, en el qual l'energia necessària s'obté a través de la depleció de la creatinafosfat i del glicogen, mitjançant l'activitat creatina quinasa, la glicogenòlisi i la glucòlisi.

1.4.1.3. Canvis deguts a l'exercici aeròbic

El principals substrats energètics que s'utilitzen en un exercici aeròbic són els hidrats de carboni (glicogen i glucosa) i els àcids grassos (Newsholme i Leech, 1983).

S'ha vist que l'entrenament de resistència fa disminuir les activitats dels enzims glucolítics.

La glicogen fosforilasa i la fosfofructoquinasa són dos enzims claus dins del metabolisme energètic, el primer regula la utilització del glicogen mentre que el segon està relacionat amb la velocitat del flux glucolític. Green *i col.* (1983), amb rates entrenades per millorar la resistència, van observar un augment considerable de l'activitat hexoquinasa, que estava

en relació amb la capacitat aeròbica, però no passava el mateix amb la glicogen fosforilasa, la lactat deshidrogenasa i la fructosa 1,6-bisfosfatasa, les quals disminuïen un 44%, 39% i 75% respectivament.

L'activitat glicogen fosforilasa segons Costill *i col.* (1976a,b), és igual en corredors d'èlit i en individus no entrenats, mentre que Urbano-Márquez *i col.* (1987) descriuen activitats més elevades de glicogen fosforilasa i glicogen sintasa en atletes entrenats per velocitat que en persones sedentàries.

L'efecte de l'entrenament de resistència sobre la fosfofructoquinasa en humans, sembla que depèn molt del protocol d'entrenament (Abernethy *i col.* 1990), ja que ocasionalment s'han descrit augments (Gollnick *i col.* 1973; Taylor *i col.* 1978), però altres vegades no s'ha vist cap mena de canvi (Fournier *i col.* 1982; Bylund *i col.* 1977; Taylor *i col.* 1981).

Pel que fa a la lactat deshidrogenasa, amb l'entrenament de resistència es produeix una disminució de l'activitat total (Sjodin *i col.* 1976).

Leberer i Pette, (1984) en múscul de conill van observar que les fibres de tipus II tenien predominantment l'isoenzim LDH₅ i menys quantitat de LDH₄ i LDH₃, mentre que les fibres de tipus I presenten els cinc isoenzims però els 1,2 i 3 en més quantitat.

Els isoenzims LDH₁ i LDH₂ es troben al mitocondri a favor de l'oxidació de lactat a piruvat durant el metabolisme aeròbic, mentre que l'isoenzim LDH₅ es troba en el reticle sarcoplasmàtic i redueix el piruvat en condicions anaeròbiques (Apple i Rogers, 1986).

L'activitat lactat deshidrogenasa total és més baixa en corredors de marató que en corredors de velocitat. (Apple i Rogers, 1986). Sjodin *i col.* (1976) van determinar que l'activitat total disminuïa i que el % d'isoenzims 1 i 2 en el múscul *Vastus lateralis* incrementava a causa d'un entrenament de tipus aeròbic. Així, es veu que el % d'isoenzims 1 i 2 és

més alt en corredors de marató que en corredors de velocitat o que en persones sedentàries.

Un altre enzim que presenta diferents formes isoenzimàtiques és la creatina quinasa, i sembla que aquestes es poden modificar amb la pràctica de l'esport. S'ha descrit (Apple i col, 1985, 1987) que la pràctica d'un entrenament dirigit a augmentar la resistència aeròbica fa que s'incrementi l'isoenzim creatina quinasa MB, mentre que l'activitat total no s'incrementa. L'explicació d'aquest fenomen es pot trobar en el fet que córrer llargues distàncies fa que es produeixi una necrosi muscular i que al regenerar-se es segueix el patró embrionari, és a dir primer apareix l'isoenzim BB i després els isoenzims MB i MM.

Com a resultat de la realització d'un exercici regular (Clausen, 1977), s'esperen canvis en la captació d'oxigen, VO_2 màx., que augmentaria, segons Saltin i Rowell (1980), per un increment en el transport d' O_2 i una major capil·larització. L'únic que no està clar és en quina magnitud es donen aquests canvis (Green i col. 1991b), que estarien en relació al protocol d'exercici que s'ha seguit.

L'augment de la capacitat respiratòria es correlaciona amb l'increment de les proteïnes mitocondrials (Schantz, 1986).

Tant el nombre com el tamany dels mitocondris augmenta amb la capacitat oxidativa del múscul esquelètic (Holloszy, 1967). Posteriorment s'han descrit, en humans i animals de laboratori, pujades de les activitats enzimàtiques responsables de l'activació, transport i β -oxidació dels àcids grassos de cadena llarga, dels enzims del cicle de Krebs, i dels components de la cadena respiratòria involucrats en l'oxidació del NADH i succinat (Holloszy i Coyle, 1984). Saltin i col. (1977) van observar que l'activitat succinat deshidrogenasa augmentava i que la utilització del glicogen disminuïa en atletes que realitzaven entrenaments de resistència.

L'enzim succinat deshidrogenasa està unit al mitocondri i la seva activitat es considera com a indicador de la concentració de mitocondris (Gollnick, 1982). Tot i que hi ha un ampli marge d'activitat succinat deshidrogenasa entre els diferents tipus de fibres (Pette i Spamer, 1986), les fibres de tipus I en humans tenen molta més activitat succinat deshidrogenasa que les fibres de tipus II (Essen *i col.* 1975).

L'augment de l'activitat succinat deshidrogenasa, no només es dóna a les fibres de tipus I sinó que també es dóna a les fibres de tipus II, tot i que s'ha vist que fins que no s'arriba a un 100% d'intensitat no es posen en funcionament les fibres de tipus IIb, mentre que per sota d'un 50% només estan funcionant les de tipus I (Kopke i Blom, 1985). Però aquesta idea no està del tot clara ja que Ball-Burnett *i col.* (1991) han descrit la desaparició de glicogen en un 50 i 20% de les fibres de tipus I i II respectivament, la qual cosa indicaria que els dos tipus de fibres intervenen durant un exercici a baixa intensitat.

Un entrenament continu de resistència provoca un augment de succinat deshidrogenasa a les fibres de tipus I, mentre que si és intermitent, la pujada de l'activitat enzimàtica es dóna principalment a les fibres de tipus II. Les adaptacions dels enzims oxidatius sembla que estiguin relacionades amb la quantitat d'exercici i no amb la composició de fibres (Abernethy *i col.* 1990). Les concentracions dels enzims oxidatius en persones no entrenades, són un 30-90% més altes a les fibres de tipus I que a les de tipus II, amb l'entrenament de resistència és possible que aquesta diferència entre fibres disminueixi (Chi *i col.* 1983).

Pel que fa a altres enzims oxidatius, s'ha descrit un augment inicial de la malat deshidrogenasa que després s'estabilitza (Costill *i col.* 1979). Atletes poc i molt entrenats tenen nivells similars d'activitat malat deshidrogenasa.

Els enzims citrat sintasa i citocrom C oxidasa augmenten molt amb un entrenament de resistència (Svedenhag *i col.* 1983) a l'igual que el 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Jansson i Kaijser, 1977; Orlander *i col.* 1977), el qual estaria en relació amb l'oxidació d'àcids grassos.

Però mentre que alguns enzims incrementen la seva activitat, n'hi ha d'altres que no es modifiquen, entre aquests últims es troben la creatina quinasa mitocondrial, l'adenilat quinasa i la α -glicerolfosfat deshidrogenasa. Com a conseqüència de l'augment de proteïna, es produeix una disminució de l'activitat específica d'aquests enzims, el que fa que els mitocondris del múscul esquelètic siguin més semblants als mitocondris del múscul cardíac (Holloszy i Coyle, 1984).

Canvis relacionats amb el metabolisme aeròbic són les modificacions que es produeixen en l'activitat enzimàtica de les transaminases (ASAT i ALAT). Benzi *i col.* (1975) descriuen un increment de l'activitat d'aquest dos enzims en rates entrenades per a realitzar exercicis de resistència. També van observar un increment en els primers dies, de l'activitat fosfofructoquinasa i piruvat quinasa, les quals disminuïen al llarg del període d'entrenament. Però els valors d'activitat un cop acabat l'entrenament seguien sent més alts que els valors inicials abans de començar l'entrenament. Les activitats de les transaminases i de la succinat deshidrogenasa augmenten durant tot el període d'entrenament. Schantz *i col.* (1986) també observen un augment de l'activitat aspartat amino transferasa, com a resposta a un entrenament de resistència i en relació a la capacitat de reoxidació del NADH mitjançant la llançadora malat-aspartat.

1.4.1.4. Canvis deguts a l'exercici anaeròbic

Per què es produeixin modificacions a la via glucolítica sembla que és necessari realitzar exercicis a una intensitat molt elevada. Un augment en les activitats dels enzims claus de les vies glicogenolítica (glicogen fosforilasa) i glucolítica (fosfofructoquinasa), així com una major possibilitat de reoxidació del NADH (lactat deshidrogenasa), seria beneficiós per a la realització d'un exercici intens, de tipus anaeròbic.

Individus que varen seguir un entrenament que consistia en fer un exercici intens a intervals durant cinc setmanes, van incrementar l'activitat glicogen fosforilasa, fosfofructoquinasa i gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (Roberts *i col.* 1982). Taylor *i col.* (1981) també descriuen increments de l'activitat fosfofructoquinasa després de quatre sessions d'una hora durant 12 setmanes. Jacobs *i col.* (1987), amb un entrenament de sis setmanes de durada i amb exercicis d'intensitat màxima de 15 a 30 sg de durada, obtenen augments significatius de fosfofructoquinasa.

Després de nou mesos d'entrenament per a millorar la velocitat, Cadefau (1988) descriu que els enzims que estan més afectats per l'entrenament són aquells que tenen un paper regulador dins de les vies metabòliques. Així, descriu un augment de l'activitat glicogen fosforilasa, fosfofructoquinasa, piruvat quinasa i la modificació del perfil isoenzimàtic de la lactat deshidrogenasa, mentre que l'aldolasa, un enzim no regulador, no està modificat per l'entrenament.

L'últim enzim que actua a la via glucolítica és la lactat deshidrogenasa. Aquest enzim és d'esperar que amb un entrenament dirigit a augmentar la velocitat incrementi la seva activitat. Si l'entrenament estés dirigit a

millorar la resistència l'activitat lactat deshidrogenasa es mantindria o disminuiria molt poc, ja que en aquest tipus d'exercici el metabolisme aeròbic hi intervé en més mesura.

Thorstenson *i col.* (1976) descriuen un increment de l'activitat fosfofructoquinasa i creatina quinasa amb entrenaments de "sprint" però no observen un augment significatiu de l'activitat lactat deshidrogenasa. Tampoc s'observen canvis en el perfil isoenzimàtic de la lactat deshidrogenasa després de sis setmanes d'entrenament de velocitat (Staudte *i col.* 1973). Però segons altres autors (Apple *i col.* 1985, 1987), un entrenament de tipus aeròbic per millorar la resistència fa augmentar l'isoenzim LDH₁, i un entrenament de tipus anaeròbic per millorar la velocitat fa augmentar l'isoenzim LDH₅. Cadefau *i col.* (1990) observen modificacions en el mateix sentit que les que descriuen Apple *i col.* en el perfil isoenzimàtic de la lactat deshidrogenasa.

Junt amb l'augment del metabolisme anaeròbic també s'adverteix un increment en el metabolisme oxidatiu. Fournier *i col.* (1982) van descriure un increment de l'activitat succinat deshidrogenasa amb entrenaments de "sprint" i de resistència, però més accentuat en aquest últim, mentre que l'increment de la fosfofructoquinasa era més accentuat en el primer tipus d'entrenament. Encara que l'activitat succinat deshidrogenasa és més elevada en atletes que s'entrenen per velocitat que en persones sedentàries, aquesta és més baixa que les que es descriuen pels atletes de resistència (Costill *i col.* 1976a).

Roberts *i col.* (1982), amb un entrenament de "sprint" augmenten la VO₂ màx i la malat deshidrogenasa, però no la succinat deshidrogenasa. Sembla que l'entrenament per a millorar la velocitat provoca més adaptacions citoplasmàtiques que mitocondrials (Abernethy *i col.* 1990). Però, per exemple, la citrat sintasa també augmenta després de sis setmanes d'un entrenament de velocitat (Jacobs *i col.* 1987).

Com es pot observar pels resultats descrits a la literatura hi ha molta diversitat sobre els efectes que produeix l'activitat contràctil en el metabolisme muscular. Segurament les diferències que es donen entre els resultats descrits es deuen als diferents protocols experimentals utilitzats, la qual cosa ens indica la versatilitat d'adaptació del múscul esquelètic. Aquesta adaptació a l'exercici només es dóna en els músculs on es produeix l'activitat física (Saltin *i col.* 1976).

1.4.1.5. Modificacions dels substrats energètics

Les concentracions d'ATP són similars a tots els tipus de fibres, mentre que la creatinafosfat està present en més quantitat a les fibres de tipus II (Edström *i col.* 1982). Aquests metabòlits estan disponibles immediatament per la contracció muscular, però no representen una reserva important d'energia per a un exercici de llarga durada. Per tant no sembla que l'entrenament pugui variar les seves concentracions i les que s'han descrit són molt petites (Edström i Grimby, 1986). El que sí que es pot variar amb l'entrenament és la rapidesa d'utilització, Thorstensson *i col.* (1975) van descriure que les concentracions d'ATP i de creatinafosfat no augmentaven amb un entrenament de "sprint". Respecte l'activitat enzimàtica, van descriure uns increments del 30%, 20% i del 36% en els enzims ATPasa, mioquinasa i creatin quinasa respectivament.

Segons Green *i col.* (1991c), la hidròlisi de la creatinafosfat és menor després d'un període d'entrenament, fenomen anteriorment descrit per Constable *i col.* (1987) i Karlsson *i col.* (1972). La concentració d'ATP es manté constant al llarg de l'exercici encara que quan s'arriba a la fatiga pot disminuir. Hultman *i col.* (1967) i Green, (1978) suggereix que ha d'haver una baixada del 60% de la creatinafosfat abans que disminueixi

la concentració d'ATP.

Carbohidrats i àcids grassos són els principals substrats energètics.

El glicogen és un dels principals substrats energètics i la seva concentració es pot modificar per diferents factors. Tant l'entrenament de velocitat (Boobis *i col.* 1983; Cadefau *i col.* 1990), com el de resistència (Hermansen *i col.* 1967; Revisat en: Abernethy *i col.* 1990) fan augmentar la concentració intracel·lular d'aquest metabòlit. A més també s'han descrit nivells més alts de glicogen sintasa (Taylor *i col.* 1972; Urbano-Márquez *i col.* 1987; Cadefau *i col.* 1990) i de l'enzim ramificador (Taylor *i col.* 1974), en individus entrenats. No només la síntesi de glicogen està accentuada després de l'exercici sinó que també es produeix un estalvi d'aquest metabòlit durant l'exercici després de l'entrenament, aquest efecte s'ha vist tant en rates (Fitts *i col.* 1975; Baldwin *i col.* 1975) com en humans (Saltin i Karlsson, 1971). En individus entrenats es troben concentracions menors de lactat, tant en sang com en múscul. La disminució en la utilització del glicogen i una menor formació de lactat s'expliquen parcialment per l'augment en la metabolització dels triglicèrids i una capacitat més elevada d'eliminar el piruvat. (Edström i Grimby, 1986).

Green *i col.* (1989) diuen que aquest estalvi es pot donar sense que hi hagi un augment de les activitats enzimàtiques relacionades amb la β -oxidació. Aquest estalvi de glicogen també es produeix en un exercici anaeròbic, a intensitats del 100%, en individus als quals no s'ha observat cap increment de la lipoproteín lipasa (Nikkila *i col.* 1978) ni en rates a les quals tampoc s'ha observat una pujada de l'activitat 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Staudte *i col.* 1973). Green *i col.* (1991c), també observen aquest estalvi de glicogen i menor acumulació de lactat després d'un entrenament que consistia en realitzar un exercici al 66% d'intensitat

durant 12 dies, sense donar-se cap canvi en les activitats enzimàtiques del cicle de Krebs, β -oxidació, glicogenòlisi i glucòlisi.

La concentració de triglicèrids és més alta a les fibres de tipus I que a les fibres de tipus II (Essen 1977, Essen *i col.* 1975). S'han descrit estudis en els quals s'incrementen els acúmuls de triglicèrids en el múscul (Hoppeler *i col.* 1985; Howald *i col.* 1985).

L'entrenament de resistència provoca un augment de l'activitat proteín lipasa en tots els tipus de fibres però especialment a les fibres de tipus IIa. (Borensztajn *i col.* 1975). Això suggereix que la capacitat d'hidrolitzar triglicèrids a àcids grassos lliures està accentuada després d'un entrenament de resistència. Possiblement el pas limitant per l'oxidació d'àcids grassos és la disponibilitat d'aquests per al mitocondri (Holloszy i Booth, 1976). Però l'entrenament sembla que incrementa els dipòsits de triglicèrids al costat dels mitocondris (Hoppeler *i col.* 1973, 1985). La concentració d'àcids grassos lliures en sang és menor en individus entrenats, per tant aquesta reducció ha de ser compensada per una utilització més elevada dels dipòsits intramusculars de lípids (Hurley, 1986).

Quan el glicogen s'acaba s'arriba a la fatiga, no se sap perquè, ja que hi ha altres fonts energètiques disponibles com són els triglicèrids i els aminoàcids. La teoria més acceptada és la teoria anapleròtica, que no ha estat comprovada. Aquesta teoria afirma que el glicogen dóna el suficient oxalacetat per a mantenir el cicle de Krebs. Quan s'acaba el glicogen, els intermediaris del cicle de Krebs disminueixen i per tant s'atura la β -oxidació amb la qual cosa la producció aeròbica d'ATP ja no és possible. (Conlee, 1987).

La major part de les proteïnes tenen una funció específica, ja sigui estructural o enzimàtica, però no hi ha un magatzem de proteïnes comparable a les reserves de glicogen o de lípids. El metabolisme dels aminoàcids comporta l'eliminació del grup amino per transaminació o per desaminació oxidativa. La contribució dels aminoàcids com a font energètica va des d'1% (Lemon *i col.* 1983) fins a un 25% (Dohm *i col.* 1985). Possiblement el paper més important dels aminoàcids és el de servir com a font d'intermediaris del cicle de Krebs. Per tant, sembla que les proteïnes no tenen una funció directa en el metabolisme de l'exercici però són importants com a precursors de glucosa i metabòlits que són necessaris per l'oxidació dels hidrats de carboni i lípids (Dohm, 1986).

1.4.2. Estimulació elèctrica

L'activitat que imposa una motoneurona sobre el múscul determina les característiques fisiològiques i bioquímiques d'aquest. Estudis d'innervació creuada i de modificació de l'activitat elèctrica de les motoneurons varen demostrar que les propietats del múscul canviaven per efecte d'aquests dos fenòmens (per revisió: Pette i Vrbová, 1985). Si el tipus d'activitat de les neurones influeix en el temps de contracció, llavors deu ser possible convertir un múscul de contracció ràpida a lenta sotmetent-lo a un model d'activitat similar al que té normalment un múscul de contracció lenta. Inversament, si un múscul lent és sotmès a una activitat igual a la d'un múscul de contracció ràpida, el temps de contracció es reduirà (Salmons i Vrbová, 1969).

La importància de la freqüència en front de la quantitat d'estimulació necessària per transformar un tipus de múscul en un altre és motiu de

discussió. Si el paràmetre que determina la transformació d'un múscul en un altre només fos dependent de la quantitat d'activitat i no de la freqüència, llavors sempre que s'estimulés un múscul, fos quin fos, es produiria un canvi en la mateixa direcció, ja que sempre estaríem augmentant el nombre de contraccions.

Experiments realitzats amb el múscul *Soleus* de conill indicaven que era la freqüència i no la quantitat d'estímuls el que determinava la seves característiques (Salmons i Vrbová, 1969). A més, denervant el múscul *Soleus* i sotmetent-lo al mateix nombre d'impulsos però subministrats a diferents freqüències, s'observava que a baixa freqüència sí que s'aconseguia mantenir les característiques pròpies del múscul, mentre que amb l'alta no es podien mantenir (Lømo i col. 1980).

Però amb músculs de contracció ràpida no sembla succeir el mateix. Canvis similars es donen quan el múscul *Tibialis anterior* és sotmès a 10 Hz o a 40 Hz (Pette i Tyler, 1983; Hudlická i Tyler, 1984).

Aquest fenomen, segons Kaplove (1987), pot ser degut a que la transmissió sinàptica és incapaç de transmetre altes freqüències d'estimulació al múscul.

Henning i Lømo (1985) aconseguixen transformacions de músculs de contracció ràpida a lenta i de lenta a ràpida subministrant els impulsos elèctrics directament sobre el mateix múscul independentment de l'activitat nerviosa. Una gran quantitat d'estímuls a baixa freqüència (10 Hz) provoquen una contracció més lenta i una resistència a la fatiga molt alta. Contràriament, el *Soleus* es contrau més ràpidament quan és denervat i estimulat a alta freqüència, transformant-se en menys fatiga resistent quan es disminueixen el nombre d'estímuls. Canvis similars, però no tan accentuats també es donen si es manté la innervació del múscul (Henning i Lømo, 1987; Gorza i col. 1988).

Segons Salmons i Vrbová (1969), les neurones que innerven el múscul *Soleus* tenen una freqüència baixa d'estimulació, entre 10 - 20 Hz, mentre que les que innerven músculs de contracció ràpida ho fan a 30 - 60 Hz. Henning i Lømo (1985) descriuen tres tipus de models d'estimulació produïts per les motoneurones, a partir de registres electromiogràfics dels músculs *Soleus* i *Extensor digitorum longus*, de contracció lenta i ràpida respectivament, de rata. Els resultats que obtenen els correlacionen amb els diferents tipus d'unitats motrius: S, FR i FF.

Taula 1.3: Models d'estimulació produïts per les diferents unitats motrius. Adaptat de Henning i Lømo, (1985) i Eken i Gundersen (1988).

Unitat motriu	S	FR	FF
Freqüència	12 - 29	40 - 100	50 - 111
Impulsos/24h	309500 - 495800	89500 - 243100	2600 - 11200
Temps activitat/24h	5,3 - 8,4 h (22 - 35%)	23 - 72 min (1,6 - 5%)	0,5 - 3 min (0,04 - 0,22%)

Estudis posteriors, seguint els models anteriors, aconseguen mantenir les característiques dels músculs *Extensor digitorum longus* i *Soleus* denervats, però no poden transformar-los completament en un altre tipus de músculs (Eken i Gundersen, 1988).

Gundersen *i col.* (1988) demostren que tant la quantitat com la freqüència són factors importants a l'hora de determinar les característiques dels músculs. Utilitzant un model en el qual defineixen dos tipus

d'estimulació: 150 Hz amb molta quantitat i 150 Hz amb baixa quantitat, aconsegueixen mantenir les propietats metabòliques del múscul *Extensor digitorum longus*. 150 Hz amb baixa quantitat sembla que sigui més efectiu per mantenir les característiques del múscul de contracció ràpida, mentre que 150 Hz amb molta quantitat manté millor el metabolisme oxidatiu.

El múscul *Soleus* es transforma millor en un múscul de contracció ràpida si és sotmès al model de 150 Hz amb baixa quantitat, augmenta la calci ATPasa, la parvalbúmina i els enzims glucolítics.

El model d'estimulació més estudiat i determinat és el d'estimulació crònica a baixa freqüència (10 Hz) que s'aplica al múscul *Tibialis anterior* de conill. S'aconsegueix la quasi completa transformació d'un múscul de contracció ràpida i poc resistent a la fatiga en un múscul de contracció lenta i altament resistent a la fatiga.

La utilització de l'estimulació elèctrica crònica a baixa freqüència té l'avantatge que els canvis en el fenotip succeeixen de forma ordenada, incrementant-se amb la durada del període d'estimulació i depenent de la quantitat d'estímuls (Pette, 1990).

En els següents apartats, a menys que s'especifiqui el contrari, farem referència als canvis que es donen amb l'estimulació crònica a baixa freqüència.

1.4.2.1. Modificacions morfològiques

Sí l'estimulació crònica a baixa freqüència és subministrada de forma contínua (24 h/dia), la total transformació d'un múscul de contracció ràpida en lenta requereix aproximadament uns 30 dies.

Els primers canvis estructurals ja s'observen a les poques hores d'haver-se iniciat l'estimulació. El reticle sarcoplasmàtic comença a engrandir-se. En els següents 2 - 12 dies, el percentatge de volum mitocondrial augmenta a l'igual que els enzims oxidatius, el nombre de capil.lars per mm^2 , el flux sanguini i el consum total d'oxigen, canvis que reflecteixen l'increment de l'activitat metabòlica del múscul.

L'augment de la capacitat oxidativa del múscul va lligat a un increment de la densitat capil.lar (Hudlická i Tyler, 1984). La densitat del volum mitocondrial augmenta fins aproximadament un 20% del volum fibril.lar després de 28 dies d'estimulació. Entre aquestes dades morfològiques i les dades bioquímiques hi ha una total correlació. (Reichmann i col. 1985). Eisenberg i Salmons (1981) descriuen que el nombre de mitocondris augmenta més a la perifèria de la fibra que a l'interior. Els mitocondris després del període d'estimulació no varien de composició. La densitat de la membrana interna no es modifica, però sí que s'observa una lleugera disminució del tamany dels mitocondris (Reichmann i col. 1985).

Histoquímicament, els canvis anteriors es reflecteixen en una transició de fibres de tipus IIB a IIA.

En aquest punt l'amplada de la línia Z comença a augmentar per assolir els valors descrits com a normals en un múscul de contracció lenta (Eisenberg i Salmons, 1981).

Entre 4 i 6 dies d'haver-se iniciat l'estimulació es comencen a observar canvis en els enzims del metabolisme energètic i en proteïnes relacionades amb la captació de Ca^{2+} .

La parvalbúmina, proteïna segrestadora de calci i que està relacionada amb el temps de relaxació, es troba en gran quantitat en els músculs de contracció ràpida. Amb la influència de l'estimulació comença a disminuir als sis dies i cap als 12 ja és del 50% de la concentració inicial, fins que

als 20 dies ja ha disminuït a nivells que es troben en músculs de contracció lenta (Leberer i Pette, 1990).

Amb tècniques de criofragmentació es veu que la membrana del reticle sarcoplasmàtic del múscul que està sent estimulat, va perdent la asimetria que el caracteritza, així com la composició fosfolipídica. El reticle sarcoplasmàtic d'un múscul de contracció lenta té una activitat calci ATPasa molt baixa, una baixa capacitat de captació de Ca^{2+} i poca quantitat de bombes de calci, característiques que presenta un múscul de contracció ràpida després d'un llarg període d'estimulació. (Heilmann i Pette, 1979; Heilman i col. 1981)

Aquesta disminució de la utilització de Ca^{2+} es manifesta fisiològicament per un augment del temps de màxima tensió i del temps de relaxació muscular. L'increment d'enzims relacionats amb el metabolisme oxidatiu i la densitat capil·lar donen com a resultat una major resistència a la fatiga.

Aquests canvis són previs a les modificacions de les proteïnes contràctils, com són la miosina i la troponina. (Pette i Vrbová, 1985), i que es donen a les últimes fases del procés de transformació.

La miosina consisteix en una molècula asimètrica formada per sis subunitats, un parell de cadenes pesants (HC) i dos parells de cadenes lleugeres (LC). Les diferents combinacions d'aquestes cadenes donen les diferents isoformes. A més, les isoformes segons estiguin en un tipus de fibres o un altre també són diferents. La combinació de totes les possibilitats dóna més de 60 isoformes, la qual cosa no vol dir que totes siguin viables però sí que ens indica l'alt grau de variabilitat.

Les isoformes lentes i ràpides també existeixen per les subunitats de la

troponina (TnT, TnI, TnC), cosa que dóna una gran diversitat (per revisió: Pette i Staron, 1988).

D'acord amb el procés de transformació, el canvi de les diferents cadenes de miosina i de troponina es dóna de forma ordenada i coordinada. Sembla que la seqüència dels canvis de les cadenes lleugeres i pesants de miosina ve determinada per l'afinitat de les isoformes lentes i ràpides de les cadenes lleugeres a les diverses isoformes de les cadenes pesants. A més, els canvis dels filaments primis sembla que estan parcialment coordinats amb els canvis que es donen en els filaments gruixuts. L'acoblament entre la isoforma TnT ràpida i les cadenes pesants de miosina es manté al llarg del període de transformació, però no succeeix el mateix per les altres dues subunitats de la troponina. La subunitat TnC canvia de forma similar a la calci ATPasa sarcoplasmàtica. El grau de transició no és diferent per cadascuna de les subunitats, la qual cosa suggereix que poden coexistir en un mateix complex de troponina (Pette, 1990).

Finalment s'observa una disminució de la massa muscular i de l'àrea fibril·lar (Eisenberg i Salmons, 1981; Williams i col. 1987). Aquest fenomen no s'ha de veure com un resposta degenerativa del múscul sinó com una adaptació per facilitar la difusió de l'oxigen des dels capil·lars (Lieber, 1988). La disminució del diàmetre de les fibres pot donar-se com a resultat del compromís de dues necessitats: la producció de força i una bona difusió de la sang (Schantz, 1986).

Tots aquests canvis indiquen una transformació gradual de les fibres musculars, però també s'ha de tenir en compte la possible resubstitució de fibres que es moren, per fibres que es diferencien a partir de les cèl·lules satèl·lit (Maier i col. 1988).

Com a conclusió, podem dir que els enzims, capil·lars, reticle sarcoplasmàtic i sistema-T són molt més fàcilment modificats que les proteïnes contràctils (Lieber, 1988).

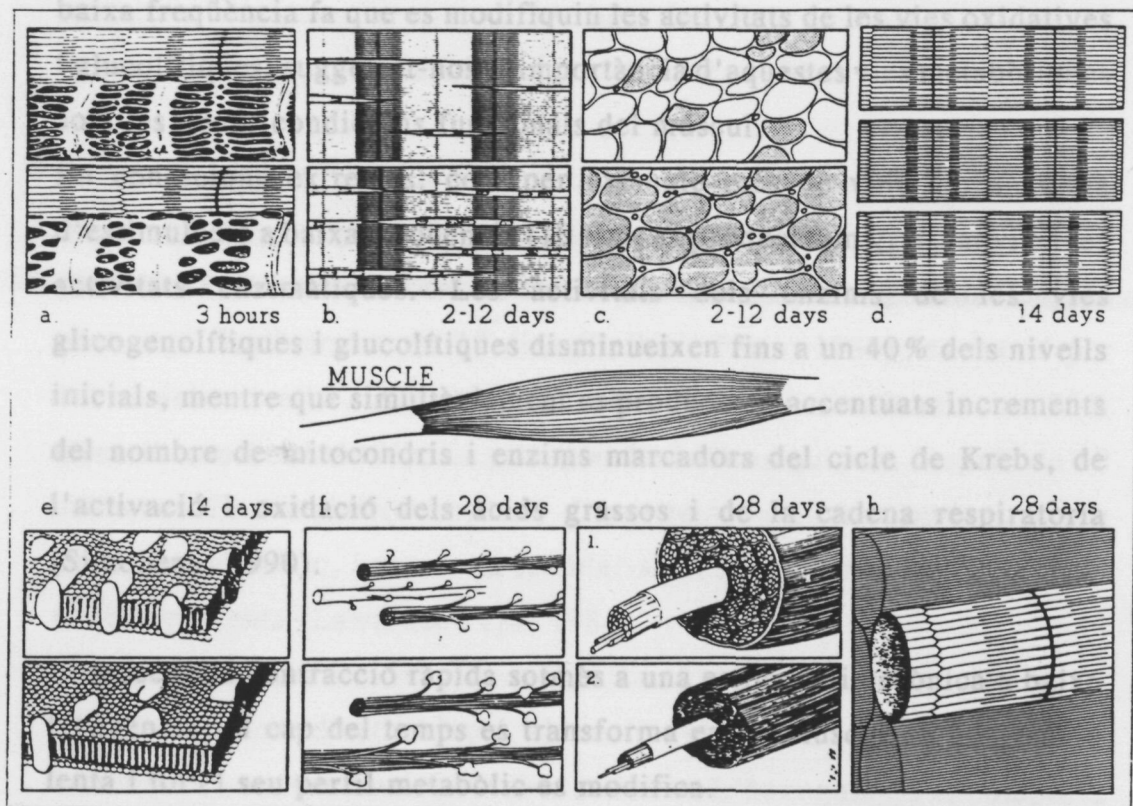


Figura 1.2: Representació esquemàtica de la transformació de les fibres musculars al llarg del temps. (Lieber, 1988) a) El reticle sarcoplasmàtic comença a engrandir-se al cap de 3 hores d'estimulació. b) Després de 2 a 12 dies d'estimulació crònica, s'observa un increment en el número de mitocondris. c) Després de 2 a 12 dies d'estimulació crònica també s'observa un augment de la densitat capil·lar així com de les fibres de tipus IIa. d) Després de 14 dies d'estimulació, la línia Z comença a augmentar en amplada. e) Als 14 dies també s'observa una disminució de la quantitat i activitat de la Calci ATPasa. f) Després de 28 dies, s'altera el perfil de la cadena lleugera de miosina. g) Després de 28 dies, la massa i les fibres musculars estan disminuïdes. h) Després de 28 dies, la línia Z té l'amplada total d'un múscul normal de contracció lenta i la densitat del sistema T ha augmentat. Arribat aquest punt, el múscul de contracció ràpida transformat és indistingible d'un múscul normal de contracció lenta.

1.4.2.2. Modificacions metabòliques

L'estimulació elèctrica crònica del múscul afecta profundament el perfil metabòlic de les fibres musculars. La resposta a l'estimulació crònica a baixa freqüència fa que es modifiquin les activitats de les vies oxidatives i glucolítiques, suggerint-nos la importància d'aquestes vies metabòliques sota les noves condicions funcionals del múscul.

En condicions extremes, com per exemple més de vuit hores al dia d'estimulació a baixa freqüència (10 Hz), es produeix un gran canvi en les activitats enzimàtiques. Les activitats dels enzims de les vies glicogenolítiques i glucolítiques disminueixen fins a un 40% dels nivells inicials, mentre que simultàniament es produeixen accentuats increments del nombre de mitocondris i enzims marcadors del cicle de Krebs, de l'activació i oxidació dels àcids grassos i de la cadena respiratòria (Simoneau, 1990).

El múscul de contracció ràpida sotmès a una estimulació crònica a baixa freqüència, al cap del temps es transforma en un múscul de contracció lenta i tot el seu perfil metabòlic es modifica.

Els enzims de les vies metabòliques són molt sensibles a l'activitat contràctil, les diferències enzimàtiques entre les fibres musculars reflecteixen el patró d'utilització del múscul.

L'activitat dels enzims relacionats amb la transferència de fosfats d'alta energia, disminueix fins assolir valors de l'ordre dels que es troben en el múscul *Soleus* (contracció lenta). La creatina quinasa i l'AMP deaminasa disminueixen un 50% i l'adenilat quinasa un 75% (Henriksson *i col.* 1986). La disminució de l'activitat creatina quinasa ja era coneguda (Pette *i col.* 1973), es dona de forma paral·lela a la disminució dels enzims

glucolítics. Aquesta disminució està compensada per l'augment de la forma isoenzimàtica mitocondrial, que supera els valors descrits en el *Soleus*. Aquesta pujada podria estar relacionada amb el potencial aeròbic-oxidatiu del múscul ja que es correlaciona amb els increments de les activitats d'alguns enzims oxidatius, la citrat sintasa i la malat deshidrogenasa mitocondrial (Schmitt i Pette, 1985).

Els enzims del metabolisme del glicogen tenen una resposta diferencial, mentre que la glicogen fosforilasa disminueix de forma similar als enzims glucolítics (Henriksson *i col.* 1986), la glicogen sintasa augmenta lleugera però significativament als 13 dies (Heilig i Pette, 1980), es manté per sobre dels nivells control i a les vuit setmanes disminueix un 20% (Henriksson *i col.* 1986). La glicogen fosforilasa quinasa després de 10 setmanes d'estimulació contínua, disminueix un 80%, canviant el seu perfil isoenzimàtic, i passant a semblar-se al que es troba en músculs de contracció lenta (Lawrence *i col.* 1986).

Durant el període d'estimulació, els enzims glucolítics amb l'excepció de l'hexoquinasa, disminueixen la seva activitat. L'hexoquinasa es comporta més com un enzim mitocondrial que no pas com un enzim glucolític. És un dels enzims que més ràpidament respon a l'increment de l'activitat contràctil, amb un sol dia d'estimulació (12 h/dia) es produeix una pujada del 50% (Heilig i Pette, 1980). Aquests mateixos autors diuen que la fosfofructoquinasa i la piruvat quinasa disminueixen lleugerament i que la fructosa 1,6-bisfosfatasa no es modifica, al cap de 13 dies tots tres enzims han disminuït entre un 40 - 50% i l'hexoquinasa ha augmentat unes 15 vegades, respecte al múscul control. Aquest tipus d'estimulació pot ser que no sigui la més òptima ja que s'ha observat que els canvis es poden donar més de pressa estimulant 24 h/dia. A més, el flux de recanvi

dels enzims glucolítics i del metabolisme del glicogen està valorat en un o dos dies (Pette i Spamer, 1979). Henriksson *i col.* (1986), estimulants 24 h/dia a 10 Hz, troben que l'activitat hexoquinasa ja és més del doble de la inicial als tres dies, per arribar a un màxim al cap de dues setmanes i després anar disminuint, aproximant-se als valors que es troben al múscul *Soleus*. Simoneau i Pette, (1988a) no troben aquesta resposta i la justifiquen dient que el seu patró d'estimulació (10 h/dia) possiblement no dóna la màxima resposta.

L'augment de l'activitat hexoquinasa es deu principalment a l'increment de la síntesi protèica de l'isoenzim HQ II, que és el que es troba majoritàriament al múscul (Weber i Pette, 1988). Aquesta pujada ràpida de l'activitat hexoquinasa fa pensar que el múscul obté l'energia necessària per la contracció muscular, de la glucosa que entra, i que la seva fosforilació pot ser un pas limitant (Weber i Pette, 1988).

Els enzims glucolítics mostren un progressiu i accentuat descens al llarg de tot el període d'estimulació. La lactat deshidrogenasa, la fosfofructoquinasa i la fosfoglucomutasa, arriben a nivells semblants als que es troben al múscul *Soleus* després de vuit setmanes d'estimulació contínua (Henriksson *i col.* 1986; Simoneau i Pette, 1988a).

Els canvis descrits anteriorment es refereixen a les observacions fetes amb el múscul *Tibialis anterior* de conill, estudis recents realitzats amb altres espècies mostren que la resposta adaptativa no sempre és la mateixa. Qualitativament, els canvis observats són iguals però la magnitud d'aquests varia entre les diferents espècies (Simoneau i Pette, 1988a, 1989).

La resposta de l'hexoquinasa en rata i conill perquè és diferent de la que s'obté en el conill, tot i que les tres espècies tenen valors basals similars. A les dues primeres s'observa un pic transitori, mentre que en el conill

es produeix una pujada progressiva de l'activitat. A més l'activitat màxima obtinguda és diferent en les tres espècies (Simoneau, 1990).

L'enzim fosfofructoquinasa després de quatre setmanes d'estimulació contínua (10 h/dia) a baixa freqüència, no es va modificar en el ratolí, mentre que a la rata, conill porquí i conill es va produir una forta disminució. Les diferències observades no es deuen als nivells basals de l'enzim, ja que aquests són iguals en totes aquestes espècies excepte en el conill (Simoneau, 1990). En totes les espècies estudiades, després del període d'estimulació, l'activitat fosfofructoquinasa tot i que ha disminuït considerablement, és superior a la que es troba al múscul *Soleus*. Canvis similars es donen amb la lactat deshidrogenasa, deguts a modificacions del perfil isoenzimàtic. L'estimulació crònica a baixa freqüència provoca un augment de la subunitat H (Pette *i col.* 1973; Seedefor *i col.* 1986). Aquest efecte s'observa a les diferents espècies (ratolí, rata, conill porquí i conill) estudiades per Simoneau i Pette, (1989), però la resposta és diferent per cadascuna de les espècies. L'augment més pronunciat es dona en músculs que tenen una baixa capacitat aeròbica-oxidativa basal, com és el cas del múscul *Tibialis anterior* de conill.

Les activitats dels enzims del cicle de Krebs i de l'oxidació dels àcids grassos incrementen paral·lelament a l'augment del nombre de mitocondris (Reichmann *i col.* 1985). Per aquests enzims també s'observa una adaptació diferencial entre espècies (Simoneau, 1990). Aquestes diferències poden ser degudes a l'estat inicial del múscul, la necessitat d'adaptació d'un múscul amb una alta capacitat aeròbica-oxidativa és menor que no pas la d'un múscul amb una baixa capacitat aeròbica-oxidativa. Reichman *i col.* (1985) descriuen que l'increment de l'activitat succinat deshidrogenasa és superior a la part superficial del múscul *Tibialis anterior*, la qual és més glucolítica que la part profunda. Segons

Hudlická i Tyler (1984), la capacitat adaptativa és inversament proporcional a l'estat basal del múscul. Per exemple, en el múscul *Soleus*, no s'observa cap increment en els enzims oxidatius com a resposta de l'estimulació elèctrica (Pette *i col.* 1975).

El diferent comportament entre espècies pot ser degut a que en els animals petits l'expressió dels enzims oxidatius és màxima i per això no s'observen canvis, (Simoneau i Pette, 1988a) o a que la freqüència de 10 Hz no sigui l'adequada. En rates s'ha observat que les motoneurons emeten senyals a una freqüència de 20 Hz (Navarrete i Vrbová, 1983; Henning i Lømo, 1985).

Els enzims citrat sintasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa i citocrom *a* presenten canvis similars al llarg del període d'estimulació. Després d'un dia d'estimulació (12h/dia, 10 Hz) s'observa un lleuger increment, sent de 3,3 vegades al cap de 13 dies (Heilig i Pette, 1980). Reichman *i col.* (1985) també descriuen canvis en els enzims mitocondrials (citrat sintasa, cetoglutarat deshidrogenasa, lipoamida deshidrogenasa, succinat deshidrogenasa, fumarasa i malat deshidrogenasa), en els enzims encarregats de l'oxidació dels àcids grassos (3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa), i de la utilització dels cossos cetònics (β -hidroxibutirat deshidrogenasa, 3-cetoàcid-CoA transferasa), canvis que són dependents de la durada del període d'estimulació. La glicerolfosfat deshidrogenasa és l'únic enzim mitocondrial que no varia.

Pette i Tyler (1983) examinen el comportament de la succinat deshidrogenasa sota diferents models d'estimulació i sobre els diferents tipus de fibres. La quantitat d'impulsos al llarg del dia és la mateixa en els dos models d'estimulació, sent les freqüències utilitzades 10 Hz i 40 Hz respectivament. En el primer model d'estimulació (10 Hz) es produeix un augment més ràpid de l'activitat succinat deshidrogenasa, però

l'activitat final com a resultat de 14 dies d'estimulació és la mateixa en ambdós casos.

Henriksson *i col.* (1986), estimulant el múscul *Tibialis anterior* durant 24 hores al dia a 10 Hz, descriuen els mateixos canvis que els altres autors, però aquests es donen més ràpidament i s'observen dues fases, una inicial en què es produeix un augment dels enzims mitocondrials i una altra fase en la qual disminueixen fins assolir els nivells descrits al múscul *Soleus*. Els enzims glucolítics amb l'excepció de l'hexoquinasa, van disminuint progressivament. L'adaptació metabòlica es dona a totes les fibres i no només a algunes (Chi *i col.* 1986). Aquesta fase posterior de disminució no s'observa en els resultats de Simoneau i Pette, (1986), però pot ser degut a que aquests només estimulen fins a 28 dies, mentre que Henriksson *i col.* (1986) i Chi *i col.* (1986) ho fan fins a 10 setmanes. La major part d'enzims que incrementen ràpidament la seva activitat durant la primera setmana com a resposta adaptativa al patró d'estimulació, després es mantenen estables per seguidament disminuir (Henriksson *i col.* 1986).

Henriksson *i col.* (1986) han estudiat com es modifiquen 21 enzims de les diverses vies metabòliques i descriuen que hi ha una baixada del 70-90% en enzims que són característics dels músculs de contracció ràpida i un fort increment dels enzims característics dels músculs de contracció lenta. Entre sis dels nou enzims que disminueixen hi ha una correlació del 0,94, la qual cosa suggereix que hi ha una regulació coordinada d'aquests enzims, que pertanyen a les vies glicogenolítica, glucolítica, síntesi de glicogen i la transferència de fosfats d'alta energia. Amb els enzims mitocondrials no s'observa aquesta correlació amb altres vies metabòliques, però sí entre ells mateixos. A més, cinc dels enzims mitocondrials o relacionats amb el mitocondri tenen un alt coeficient de

correlació (0,93). Aquests enzims són la citrat sintasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, carnitina acetiltransferasa i l'aspartat amino transferasa (Henriksson *i col.* 1990). Reichmann *i col.* (1991) troben que després de 28 dies d'estimulació, l'increment que es dona en els principals enzims de l'oxidació d'àcids grassos i de la cadena respiratòria indica que aquests canvis es donen de forma coordinada. La troballa que la carnitina:palmitoil-CoA transferasa augmenti just abans dels enzims 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa i 3-cetoacil-CoA tiolasa fa pensar que el pas limitant per l'oxidació en una fase prèvia d'adaptació a l'increment de l'activitat contràctil, pot ser el transport d'àcids grassos.

Aquests resultats recolzen la idea de les proporcions constants de grups d'enzims, proposada per Bas *i col.* (1969).

La disminució que s'observa dels enzims mitocondrials després d'haver arribat a un màxim s'explica segons Henriksson *i col.* (1986), perquè les fibres de contracció lenta necessiten menys ATP per unitat de força que les de contracció ràpida. Així la disminució del nombre de mitocondris i de la capacitat respiratòria apareix com una conseqüència lògica a l'inici de la síntesi de la cadena de miosina lenta.

1.4.2.3. Modificacions dels substrats energètics

Per entendre els canvis enzimàtics descrits anteriorment és necessari saber en quin estat energètic es troba el múscul. La informació que hi ha respecte la concentració de metabòlits al llarg d'una estimulació perllongada a baixa freqüència és molt minsa.

A més, és necessari examinar la concentració de substrats i productes als diferents passos del metabolisme energètic, ja que les alteracions en aquest

nivell poden actuar com a senyals moleculars per la inicialització d'alguns dels canvis en l'expressió de proteïnes que tenen una resposta adaptativa a l'augment de l'activitat contràctil (Henriksson *i col.* 1989).

Podem distingir entre els diferents models d'estimulació que s'utilitzen. Així, un dels models més utilitzats és el de 12 h/dia a 10 Hz de forma alternada. En aquest tipus d'activitat s'ha de tenir en compte que el múscul està en repòs després d'una hora d'activitat, i que durant aquest temps es pot recuperar. Hood i Parent (1991) estudien els canvis metabòlics que succeeixen durant un període de tres hores (1 h estimulació, 1 h repòs, 1 h estimulació). Als tres minuts d'estimulació el glicogen disminueix un 75% i es recupera un 50% amb l'hora de repòs. També observen als tres minuts un fort augment de lactat, creatina, IMP, i d'ADP i AMP lliures. Tots aquests metabòlits, amb l'excepció de l'ADP lliure, tornen a les concentracions basals abans d'haver finalitzat la primera hora del període d'estimulació. A la segona hora d'estimulació es produeixen els mateixos canvis però no tan accentuats, es gasta menys glicogen i s'acumula menys lactat i IMP. Els canvis descrits en les concentracions de glicogen també són descrits per Maier i Pette (1987), però de forma qualitativa. A més observen l'existència de fibres que estan plenes de glicogen mentre que n'hi ha d'altres que estan buides. A mesura que el període d'estimulació s'allarga fins a 12 dies, el percentatge de fibres plenes de glicogen augmenta fins un 50%.

Henriksson *i col.* (1988), amb el model d'estimulació contínua (24 h/dia), descriuen dues fases, la primera fins a les 30 hores i la segona d'una a vuit setmanes. L'únic canvi que observen a les trenta hores és una concentració més baixa de glicogen, el qual ha disminuït entre un 25 i un 80% a la meitat de les fibres. Mentre que a la segona fase troben que les concentracions de malat, citrat, glucosa 6-fosfat i glucosa són molt més

altes que les basals, la de lactat està una mica per sobre i l'ATP i creatinafosfat estan lleugerament per sota. El fet que no trobin cap canvi en la concentració dels metabòlits energètics a les 30 hores, és degut, segons Green *i col.* (1990), a que les primeres modificacions es donen abans de les 24 hores.

Els resultats descrits per Green *i col.* (1990) coincideixen amb els observats per Hood i Parent (1991), en els quals el múscul es recupera sense deixar d'estimular-lo. Les concentracions d'IMP, Pi, creatina i lactat a les 24 hores són les mateixes que les que es troben abans de començar les contraccions, l'ATP i la creatinafosfat estan lleugerament per sota dels nivells basals. El glicogen és d'un 50% i la glucosa està molt per sobre dels valors normals. Als dos dies d'haver-se començat l'estimulació es produeix una supercompensació de glicogen junt amb la tornada dels valors de glucosa a la normalitat. A partir d'aquest moment comença una altra etapa a la qual les concentracions dels diferents metabòlits tendeixen a aproximar-se als valors que estan descrits en el múscul *Soleus*. (el període d'estimulació acaba als 50 dies).

La recuperació metabòlica del múscul sense deixar-lo d'estimular es pot explicar fent el supòsit que les fibres que estan fatigades, continuen amb una baixa taxa de contracció i amb un baix recanvi d'ATP o que algunes fibres deixen de contraure's, començant així la recuperació (Henriksson *i col.*, 1988, 1989, 1990; Green *i col.* 1990).

Green *i col.* (1990), descriuen que la tensió generada pel múscul disminueix un 40% després de dues hores d'estimulació. Aquest mateix fenomen és descrit per Hood i Parent (1991), tot i que en el seu model hi ha una hora de repòs.

L'augment d'alguns metabòlits intermediaris, com per exemple la glucosa 6-fosfat, al final del període d'estimulació és degut a que el flux glucolític

CAPÍTOL 2

MATERIALS I MÈTODES

2.1 REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS

Els reactius i productes que van ser utilitzats en aquest treball i la firma comercial de procedència són els següents:

REACTIUS GENERALS

Bio Rad

Bradford Reagent.

Boehringer Manheim

N-Acetilcisteïna. ADP. AMP. L-Alanina. L-Aspartat. ATP. α -Cetoglutarat. Creatina fosfat. Fosfoenolpiruvat. Fructosa 6-fosfat. Fructosa 1,6-bisfosfat. Glucosa. Glucosa 1,6-bisfosfat. NAD. NADH. NADPH. Oxoglutarat. Piruvat.

Merck

Acid clorhídric. Acid perclòric. Alcohol etílic. Acetat magnèsic. Acetat sòdic. Acetona. Antrona. Clorur càlcic. Clorur magnèsic. Clorur potàssic. Clorur sòdic. DTT. Hidrogen arseniat disòdic. Fluorur potàssic. Fosfat monosòdic. Fosfat disòdic. Glicerol fosfat. Glicina. Hidracina. Hidròxid potàssic. Imidazol. Maleat sòdic. β -Mercaptoetanol. Pirofosfat sòdic. Sulfat amònic. Sulfat d'atropina. Sulfat sòdic. Trietanolamina.

Panreac

Toluè.

Parke-Davis

Clorhidrat de ketamina (Ketolar 100 mg).

S.I.F.S.A.

Clorur de benzalconi (Armil).

Sigma Chemical Co.

Albúmina bovina (BSA). AMP. ATP. EDTA. Fructosa 2,6- bisfosfat.
Glicogen (lliure d'AMP). Glucosa. Glucosa 1-fosfat. Glucosa 1-fosfat
(lliure de Glucosa 1,6- bisfosfat). Glucosa 6-fosfat. Imidazol. Malonat.
Tris (Trizma Base).

Smithklina Beecham

Maleat d'acepromacina (Calmoneosan).

PREPARACIONS ENZIMÀTIQUES**Boehringer Manheim**

Aldolasa. Creatina quinasa. Fosfoglucomutasa. Fosfoglucosa isomerasa.
Glicerol 3-fosfat deshidrogenasa. Glucosa 6-fosfat deshidrogenasa. Lactat
deshidrogenasa. Hexoquinasa. Malat deshidrogenasa. Mioquinasa. Piruvat
quinasa. Triosa fosfat isomerasa.

Sigma

Glicogen fosforilasa a.

PRODUCTES PER CROMATOGRÀFIA**Pharmacia**

Sephadex G-25.

Whatman

Paper Whatman ET-31.

PRODUCTES RADIOACTIUS**Amersham**[¹⁴C]-glucosa 1-fosfat, sal dipotàssica. [¹⁴C]- UDP Glucosa.

2.2 METODOLOGIA EMPRADA AMB ANIMALS DE LABORATORI

Els animals emprats als diferents estudis són conills (*Oryctolagus cuniculus* "New Zeland").

Com a precaució, tots els animals utilitzats van estar en observació durant una setmana, com a mínim, des de que arribaren fins que s'inicià l'estudi. Això es fa perquè s'habituin al menjar i a les condicions de l'estabulari.

2.2.1. Protocol anestèsia

El protocol seguit és el descrit per Flecknell (1987).

Primer es realitzà un tractament preanestèsic en el qual vàrem utilitzar:

Atropina: És un anticolinèrgic, que protegeix el cor d'una inhibició vagal. També provoca una reducció de les secrecions bronquials i salivars, les quals podrien obturar parcialment les vies respiratòries durant la intervenció quirúrgica.

Acepromazina: Produeix la sedació de l'animal i fa que es redueixi la quantitat d'anestèsic necessari per a dormir-lo. Com efectes no desitjables provoca una baixada de temperatura i una lleugera hipotensió.

El tractament preanestèsic, es pot administrar al mateix lloc on es troba normalment l'animal i això ajuda a que no estigui tan nerviós. A més, el poder reduir la quantitat d'anestèsic necessari per dormir l'animal evita, en part, els efectes secundaris d'aquest.

Totes aquestes drogues es van subministrar de forma intramuscular, al múscul *quadriceps* de qualsevol pota posterior o a la zona lumbar.

La pauta seguida és la següent:

<u>temps 0 min:</u> sulfat d'atropina	0,200	mg/Kg
<u>temps 15 min:</u> maleat d'acepromacina	1	mg/Kg
<u>temps 30 min:</u> ketamina	20	mg/kg

Amb aquestes dosis els conills romanien dormits durant 15 minuts aproximadament. Per continuar-los mantenint en aquest estat, calia administrar-los una altre dosi de ketamina de la meitat de la inicial (10 mg/kg) als 15 minuts. A partir d'aquest moment s'administraren successives dosis de la meitat d'aquesta última (5 mg/kg) cada 15 minuts, depenent de la durada de la intervenció.

Les injeccions es donaren de forma indistinta a qualsevol de les dues potes posteriors.

2.2.2 Estimulació elèctrica

El model d'estimulador es basa en el descrit per Schwarz *i col.* (1983). Consta d'un estimulador en el qual podem variar la freqüència i la intensitat de l'estímul. Aquest està connectat a una bobina que crea un camp magnètic dins del qual es troba el conill amb el receptor. Aquest rep les ones, que són emeses des de la bobina i les transforma en impulsos elèctrics. El receptor, de dimensions petites, està col.locat sobre el conill sense produir-li molèsties (Figura 2.1). El receptor, mitjançant uns cables, està connectat als elèctrodes, que estan implantats a banda i banda del nervi peroneal (una derivació del ciàtic), podent-se així estimular els músculs *Tibialis anterior* i *Extensor digitorium longus*.

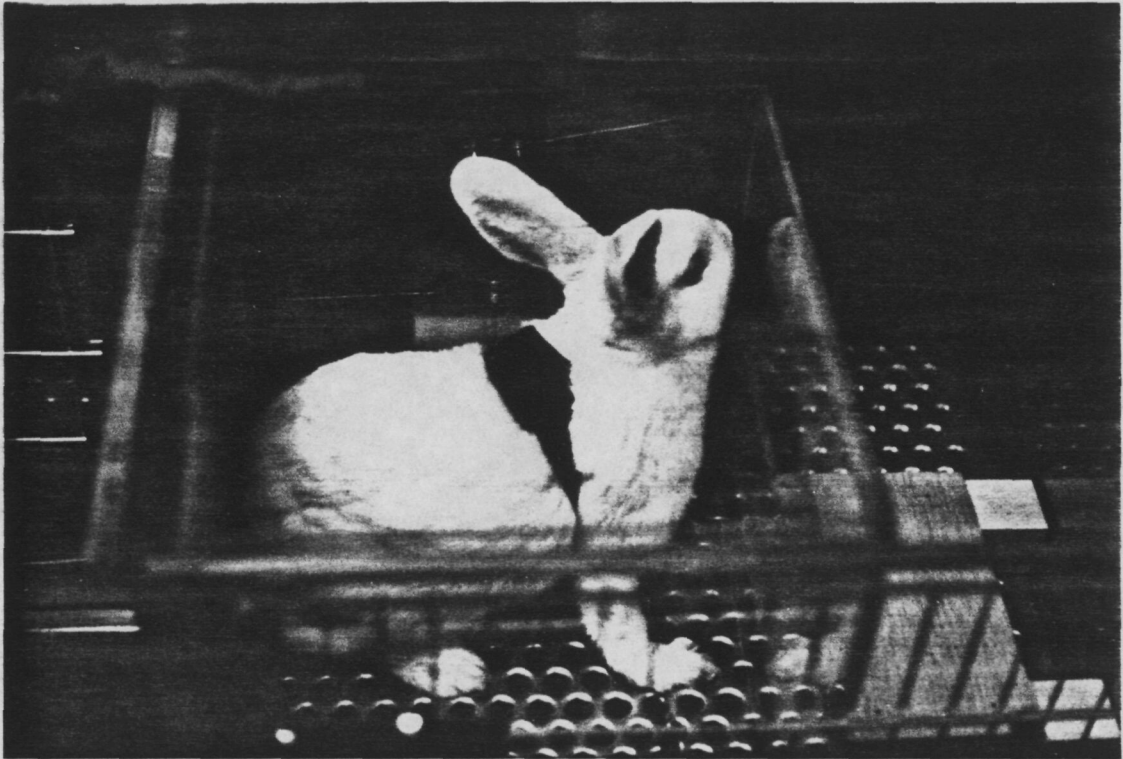


Figura 2.1: Sistema d'estimulació emprat.

2.2.2.1 Característiques dels elèctrodes

Els elèctrodes estan fets d'un cable d'acer inoxidable (secció 0.2 mm) al qual prèviament li hem donat forma de molla. Les dimensions aproximades són d'1 cm de llargada i 3 mm d'amplada. La llargada pot variar segons l'espai disponible per implantar-lo.

Aquests elèctrodes estan soldats a un cable de coure recobert de silicona. La soldadura està protegida amb un plàstic termoretràctil, per evitar problemes de rebuig.

2.2.2.2 Implantació dels elèctrodes

Els conills emprats tenien aproximadament 3 mesos i pesaven entre 2,7 - 3,2 kg, que és quan es considera que són adults.

Un cop adormit el conill, es procedia a l'eliminació del pèl de la zona on es feia el tall, per a la implantació dels elèctrodes. Tota l'àrea adjacent s'havia de desinfectar, amb una solució de clorur de benzalconi (Nom comercial: Armil).

Per a localitzar el lloc on efectuar el tall, situàvem la pota de manera que el genoll formés un angle recte. Llavors, aproximadament 0,5 cm per sobre de la tibia fèiem un tall paral·lel a aquesta, de 1,5 - 2 cm.

Un cop fet el tall, separàvem la pell dels músculs que hi ha a sota, mitjançant unes tisores, però intentant no tallar cap altre teixit. Havíem de netejar tota aquesta zona de teixit conjuntiu i adipós.

Un cop net el múscul, l'agafàvem amb unes pinces aixecant-lo. Fèiem un tall d'un cm aproximadament amb les tisores. S'ha d'anar en compte de no posar les tisores completament verticals a l'hora de fer el tall, per no tallar el nervi que està sota d'aquest múscul.

Netejàvem tota la zona pròxima al nervi i procedíem a la implantació dels elèctrodes. Primer, en posàvem un, el més proper al nervi possible però sense tocar-lo. Ens havíem d'assegurar que quedés ben fixat. Per fer-ho, cosíem l'elèctrode al múscul que queda just a sota del nervi. Fet això,

passàvem a posar l'altre elèctrode, a l'altre costat del nervi. El col·locàvem al lloc que ens donés més senyal amb el voltatge més baix possible, (el voltatge sol estar entre 0,6 - 1 V). Això és important, ja que en el període d'estimulació, al voltant dels elèctrodes creix teixit conjuntiu que fa augmentar la resistència i per això s'ha d'augmentar el voltatge. S'ha de tenir en compte que el màxim voltatge que dona l'estimulador és de 5 V. Els dos elèctrodes han de quedar ben fixats (Figura 2.2).



Figura 2.2: Detall de la implantació dels elèctrodes al costat del nervi peroneal.

El pas següent era tancar el tall del múscul, deixant sortir els cables dels elèctrodes a través d'ell. Aquests cables els passàvem per sota la pell fins fer-los sortir a l'exterior per l'esquena a nivell del coll. Aquí és on connectàvem el receptor, adherint-lo a l'animal amb cinta aïllant.

Finalment, deixàvem aproximadament uns 10 cm de cable a sota la pell a nivell de la pota i tancàvem la ferida. Aquest cable ens servia en cas que el conill mossegués o trenqués els cables que estaven a l'exterior.

Després d'una setmana de postoperatori, ja es podia començar l'electroestimulació.

2.2.2.3 Obtenció dels músculs Tibialis anterior i Extensor digitorium longus

Amb l'animal anestesiats procedíem a l'extracció dels diferents músculs. El *Tibialis anterior* (TA) i l'*Extensor digitorium longus* (EDL) són els primers que obteníem degut al seu fàcil accés i la rapidesa amb què els podem congelar.

El *Tibialis anterior* és el primer múscul que s'observa. És un múscul superficial, cobrint la cara lateral de la tibia i el múscul *Extensor digitorium longus*. Per la part proximal s'uneix a la fíbula i per la part distal acaba en un fort tendó que passa per sota del lligament transversal. La seva funció és flexionar el peu.

L'*Extensor digitorium longus* es troba entre el TA i el peroné. Comença amb un llarg i prim tendó que està unit a la superfície lateral de

l'epicòndil del fèmur, passa a través de la càpsula de l'articulació del genoll i per sobre la fíbula. El múscul s'extén al llarg de la tíbia i passa per sota del lligament transversal acabant en quatre tendons que van cap als quatre dits. La seva funció és estirar les falanges.

Per l'extracció d'aquests músculs, prèviament netejàvem les dues potes i eliminàvem tot el pèl existent. Es feia un tall al davant, al llarg de la part distal de la pota, des del peu fins al genoll, de manera que quedés tot sense pell.

Es pot observar a la part distal una lleugera línia blanca que ens serveix de referència per tallar la fàscia. Quan la tenim tallada el TA queda lliure i l'EDL es pot veure fàcilment.

Cadascun dels músculs eren congelats simultàniament amb el seu homòleg de l'altre pota. La congelació la fèiem amb unes tenalles d'acer inoxidable submergides en nitrogen líquid. Primer tallàvem el tendó distal aixecant el múscul i abans de tallar l'altre tendó ja prensàvem el múscul amb les tenalles quedant així immediatament congelat.

2.3. METODOLOGIA EMPRADA AMB HUMANS

Totes les persones que van participar en aquest estudi, ho van fer de forma voluntària. A tots ells se'ls va informar dels procediments experimentals i dels possibles riscos i se'ls va demanar l'acceptació per escrit.

Tot aquest treball va ser aprovat pel Office Human Research, University of Waterloo, Ontario, Canadà.

2.3.1 Tipus d'exercici i entrenament

Tant l'exercici com l'entrenament es van realitzar en una bicicleta ergòmetre. Té l'avantatge que l'energia que es necessita per fer un exercici es pot predir fàcilment. A més, amb algunes limitacions, l'eficiència mecànica és independent del pes corporal.

Es van fer dos tipus d'exercici que es diferenciaven per la intensitat de l'esforç. Els entrenaments van ser bàsicament iguals però un durava 3 dies mentre que l'altre en durava 6.

Els protocols seguits foren els següents:

Primer, en tots els casos, es valorà la VO_2 màxima i després tingueren dos dies de repós, abans de començar l'experiment.

A.- La intensitat de l'esforç es mantingué constant al llarg de tot l'exercici.

1^{er} Dia: Realització de l'exercici al 60 - 65% de VO_2 màxima fins l'esgotament

2^{on} Dia: Repós

3^{er} Dia: Repós

4^{rt} Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO_2 màxima (1 h, descans 5 min, 30 min, descans 5 min, 15 min, descans 5 min, 15 min, descans 15 min)

5^e Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO_2 màxima

6^e Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO_2 màxima

7^e Dia: Repós

8^e Dia: Realització de l'exercici al 60 - 65% de VO_2 màxima fins l'esgotament

Les biòpsies musculars varen ser obtingudes el 1^{er} i 8^e dies durant la realització de l'exercici. El primer dia, abans de l'entrenament, s'obtingueren quatre biòpsies a diferents temps: abans de començar, als 3 min, als 15 min i al temps de fatiga. El vuitè dia, després de l'entrenament, es van obtenir cinc biòpsies, les quatre primeres als mateixos temps que les anteriors i la cinquena al nou temps de fatiga, que en tots els casos va superar el temps inicial de fatiga, degut a l'adaptació a l'exercici.

B.- La intensitat de l'esforç augmentà durant l'exercici

L'exercici consistia a augmentar la intensitat d'aquest cada vint minuts, primer al 60%, després al 79% i finalment al 94% de la VO₂ màxima, fins arribar a la fatiga.

1^{er} Dia: Realització de l'exercici

2^{on} Dia: Repós

3^{er} Dia: Repós

4^{rt} Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO₂ màxima (1 h, descans 5 min, 30 min, descans 5 min, 15 min, descans 5 min, 15 min, descans 15 min)

5^e Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO₂ màxima

6^e Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO₂ màxima

7^e Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO₂ màxima

8^e Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO₂ màxima

9^e Dia: Entrenar 2 hores al 65% de VO₂ màxima

10^e Dia: Repós

11^e Dia: Realització de l'exercici

Tant abans com després de l'entrenament es van obtenir quatre biòpsies musculars i totes al mateix temps. Aquests temps van ser els següents: abans de començar, als 20 minuts, als 40 minuts i als 60 minuts, quan finalitzava l'exercici.

2.3.2. Obtenció de les biòpsies musculars d'humans

Per a l'obtenció de la mostra vam utilitzar la tècnica descrita per Bergström (1962).

Les biòpsies es van dur a terme mitjançant l'agulla de Bergström en el *Vast extern* del múscul *quàdriceps crural* de les dues extremitats.

La incisió es realitzà prèvia anestèsia local, aproximadament en el punt mig d'una línia teòrica que uneix el trocànter major amb el centre de la patella. La tècnica consisteix a fer diferents talls (3 a cadascuna de les cames) d'uns 5 mm que permeten l'entrada de l'agulla. Aquesta entra perpendicularment fins tocar la fàscia, moment en que s'adopta un angle de 30° respecte a la pell, i amb la punta dirigida cap el còndil femoral intern, es pressiona per travessar la fàscia i profunditzar 2 cm. En aquest punt s'agafa una mostra muscular.

Abans d'iniciar l'exercici es preparà l'atleta. Es realitzaren dos o tres incisions a cada cama, depenent del número de biòpsies que es volien fer. Les biòpsies s'obtingueren de forma alterna, d'una cama a l'altre.

Un factor important era la rapidesa amb què s'obtenien les biòpsies. Sense que l'atleta baixés de la bicicleta, immediatament després de que parés s'estirava enrera, on hi havia una persona que l'aguantava, mentre que una altra li aixecava la cama on es feia la biòpsia i una tercera persona li

extreia la mostra amb l'agulla de Bergström, posant-la directament al nitrogen líquid. Des de que parava fins que es congelava la mostra passaven uns 7 - 8 segons.

Totes les mostres de múscul es varen congelar en nitrogen líquid immediatament i es guardaren a -80°C fins que foren processades pels posteriors estudis bioquímics.

2.4. PREPARACIÓ DEL TEIXIT PER ANÀLISI

Per a la determinació de metabòlits, la preparació del teixit és important. La fase més crítica és el període entre la pèrdua de subministrament sanguini i el moment en què s'atura l'activitat de l'enzim de degradació. Una ràpida congelació és per tant, essencial. Per aquest motiu totes les anàlisis de metabòlits, es van fer a partir d'extractes preparats amb teixit congelat.

Sembla que el millor mètode per congelar teixits ràpidament, és la utilització de tenalles de metall, refredades a la temperatura del nitrogen líquid. El teixit és pressionat entre plaques d'alumini unides a les tenalles que han estat refredades a -190°C . Això incrementa l'àrea superficial del teixit i promou una molt ràpida congelació.

Per a la determinació d'activitats enzimàtiques, la rapidesa de congelació del teixit no és tan crítica, a menys que es vulguin valorar enzims que tenen formes interconvertibles, com és el cas de la glicogen sintasa o glicogen fosforilasa.

Un cop congelat, el teixit pot ser emmagatzemat amb seguretat durant setmanes (probablement mesos) a -80°C . A temperatures superiors, canvis

deguts a l'acció enzimàtica es poden donar de forma sorprenentment ràpida. Per tant, és essencial que la temperatura no superi els -35°C , excepte durant curts períodes en el procés de preparació del teixit.

Totes les mostres abans de ser analitzades van ser netejades de sang i teixit conjuntiu.

Quan ja teníem les mostres netes, les polvoritzàvem amb un morter d'acer inoxidable submergit en nitrogen líquid i evitant amb molta cura que no es descongelessin. Aquest pas és molt important ja que facilita l'homogeneïtzació del teixit i a més permet treballar amb quantitats mínimes, de l'ordre de 10 -20 mg.

En el cas de les biòpsies humanes el que férem fou assecar-les mitjançant un liofilitzador, per eliminar tota l'aigua del múscul, així els enzims no són actius i els metabòlits es mantenen estables. També facilita el seu processament ja que no cal, un cop seques, que es mantinguin congelades.

Per fer les diferents anàlisis el tipus d'homogeneïtzació varia segons siguin enzims o metabòlits.

2.4.1 Extractes neutres

Consisteix a fer l'homogenat en condicions adequades per la major part d'enzims. Els tampons d'homogeneïtzació poden variar segons quin enzim es vulgui valorar, encara que s'empraren tampons a pH pròxim a 7.

En aquest treball s'ha intentat utilitzar tampons que vagin bé per la major part dels enzims que s'han valorat.

Els medis i les condicions d'homogeneïtzació utilitzades han estat les següents:

Per valorar la GF i GS:

homogenat 1:15 (pes mg : volum μ l)

Tris-HCl 50 mM, EDTA 4 mM, FK 50 mM β -mercaptoetanol 30 mM, pH 7,0.

Per valorar PFK, PK, HK:

homogenat 1:10 (pes mg : volum μ l)

Tris-HCl 50 mM, EDTA 4 mM, FK 50 mM β -mercaptoetanol 30 mM, pH 7,0.

Per valorar Fru 1,6 bisfosfatasa:

homogenat 1:5 (pes mg : volum μ l)

Tris-HCl 100 mM, EDTA 1 mM, ClMg_2 5 mM β -mercaptoetanol 30mM, pH 7,5.

Per valorar CK, LDH, ASAT, ALAT:

dilucions dels extractes anteriors amb Tris-HCl 50 mM, EDTA 4 mM, FK 50 mM β -mercaptoetanol 30 mM, pH 7,0.

PROTOCOL

L'homogeneïtzació en tots els casos es va fer amb el Polytron, posició 5 durant 10 sg + 50 sg de repós, això es repetia 3 vegades.

Es recuperà l'extracte i es centrifugà a 38000 g durant 20 minuts. Per fer les valoracions s'utilitzà el sobrenedant.

2.4.2. Extractes àcids

Tots els metabòlits foren assajats en extractes lliures de proteïna preparats amb àcid perclòric (HClO_4) amb l'excepció de la Fru 2,6-P₂ que es féu en un medi alcalí. L'àcid perclòric pot ser fàcilment eliminat per precipitació com una sal de potassi.

L'eliminació de tota la proteïna és important ja que alguns enzims poden suportar el tractament àcid. Per exemple, l'ATPasa pot persistir, donant baixos valors d'ATP, també l'adenilat quinasa és bastant resistent a baixos nivells de pH. Normalment els extractes de HClO_4 són parcialment o completament neutralitzats, especialment si estem assajant metabòlits àcid-làbils. La majoria de metabòlits, inclosos ATP, CP i la major part dels intermediaris del cicle dels àcids tricarbòxílics són estables en aquest extracte i poden ser emmagatzemats indefinidament a temperatures inferiors als -50°C . Sempre hi ha el perill que traces d'enzims puguin romandre, i per tant, els extractes no haurien d'estar descongelats durant llargs períodes fins i tot a 0°C .

PROTOCOL

El mètode que vàrem utilitzar per l'extracció en medi àcid va ser descrit per Harris i col. (1974).

- 1) Pesar entre 3 i 5 mg de teixit en el cas de que sigui sec. Si és teixit fresc entre 15 i 25 mg, evitant que es descongeli.
- 2) Afegir 600 μl d'àcid perclòric (HClO_4) 0,5 M.
Si és teixit sec agitar el tub diverses vegades durant 10 minuts.
Si és teixit fresc homogeneïtzar amb el Polytron, posició 5, durant 10 sg + 50 sg de repós, repetint això tres vegades.

- 3) Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm, amb una centrífuga Eppendorf.
- 4) Recuperar 540 µl de sobrenedant, afegir-hi 135 µl de KHCO_3 2,3 M, agitar i esperar fins que no hi hagi bombolles.
- 5) Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm, amb una centrífuga Eppendorf i recuperar el sobrenedant, que ja està llest per fer les diferents valoracions.

El precipitat que s'obté de la primera centrifugació es pot utilitzar per fer la valoració de glicogen.

Tot el procés es fa en fred (4°C).

2.4.3. Extractes bàsics

Consisteix a fer una homogeneïtzació en condicions alcalines, ja que la fructosa 2,6-bisfosfat només és estable a un pH bàsic.

PROTOCOL

- 1) Pesar entre 3 i 5 mg de teixit sec i posar-los en 200 µl de NaOH 50 mM. Si és teixit fresc es fa un homogenat 1:10 (pes:volum).
- 2) Homogeneïtzar utilitzant les mateixes condicions que als extractes àcids.
- 3) Posar l'extracte durant 10 minuts a 90°C.
- 4) Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm amb una centrífuga Eppendorf i recuperar el sobrenedant.
- 5) Neutralitzar-lo.

2.5. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

Totes les determinacions d'activitat enzimàtica van ser fetes a partir dels extractes neutres convenientment diluïts i amb el tampó més adient per cadascun dels enzims, tal i com s'explica a l'apartat 2.4.1.

Per fer la major part de les determinacions espectrofotomètriques hem utilitzat un espectrofotòmetre Kontron Uvikon 380 i les lectures s'han fet a 340 nm. Per les altres tècniques ja especificuem en cada cas les condicions de l'assaig.

2.5.1 Determinació de l'activitat glicogen sintasa I i D

FONAMENT

El mètode utilitzat és el descrit per Thomas i col. (1968) que es basa en la incorporació de U-[¹⁴C]-glucosa a glicogen a partir de [¹⁴C]-UDPGlucosa i posterior precipitació del glicogen radioactiu.



REACTIUS

- a) tampó (Tris-ClH 500 mM, pH 7,8; EDTA 50 mM)
- b) [¹⁴C]-UDPGlucosa 10 mM
- c) glicogen 8%
- d) Glu 6-P 100 mM

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció que conté a concentracions finals: Tris-ClH 50 mM EDTA 5mM a pH 7,8, [¹⁴C]-UDPG 6,6 mM (155.000

cpm/ μ mol), glicogen 10 mg/ml i glucosa-6-P 10mM.

60 μ l d'aquesta mescla s'incuben amb 30 μ l de l'extracte muscular, a 30°C i durant un temps de 15 minuts. Passat aquest temps, es treuen 75 μ l de la mescla d'incubació i es dipositen sobre un paper Whatman 31 ET (2x2 cm). Després es submergeixen en etanol al 66% fred. El glicogen precipitat per l'etanol queda així retengut per la trama del paper, mentre que els restants components de la mescla s'eliminen mitjançant successius rentats amb etanol 66%. Un cop secs, els papers s'introdueixen en vials utilitzant com a líquid d'escintil.lació toluè i PPO al 0,5%.

Seguidament es procedeix a la lectura de la radioactivitat continguda en els papers en un espectròmetre d'escintil.lació líquida.

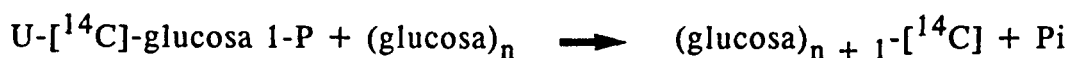
Al mateix temps es realitza un blanc, que consisteix a posar 30 μ l d'aigua en lloc de mostra.

Per valorar la glicogen sintasa I, es segueix el mateix protocol però amb absència de Glu 6-P i substituint el volum d'aquesta per aigua o tampó.

2.5.2. Determinació de l'activitat glicogen fosforilasa a i b

FONAMENT

L'activitat glicogen fosforilasa es mesura per la incorporació de U-[¹⁴C]-glucosa a glicogen a partir de U-[¹⁴C]-glucosa 1-P, segons el mètode descrit per Gilboe i col. (1972).



REACTIUS

a) tampó (maleat sòdic 0,5 M a pH 6,5)

- b) U-[¹⁴C]-glucosa 1-P 300 mM
- c) glicogen 8% mg/ml (lliure d'AMP)
- d) AMP 40 mM

PROTOCOL

30 µl de l'extracte muscular s'incuben amb 60 µl de la mescla de reacció, que conté a concentracions finals:

maleat sòdic 0,1 M a pH 6,5, U-[¹⁴C]-glucosa 1-P 150 mM (15000 cpm/µmol), glicogen 20 mg/ml i AMP 2 mM durant 15 minuts a 30°C.

A partir d'aquí la determinació de l'activitat segueix els mateixos passos que la tècnica anterior.

Per valorar la glicogen fosforilasa a, s'utilitza la mateixa mescla de reacció però sense AMP i substituint el volum d'aquest per aigua o tampó.

2.5.3. Determinació de l'activitat hexoquinasa

FONAMENT

El mètode seguit és el descrit per Bass i col. (1969) modificat per Davidson i col. (1987)

- 1) Glucosa + ATP \longrightarrow Glu 6-P + ADP (HK)
- 2) Glu 6-P + NAD⁺ \longrightarrow 6,P-Gluconat + NADH+H⁺ (G6PDH)

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Trietanolamina 200mM pH 7,6; EDTA 20 mM; MgSO₄ 32 mM.
- b) glucosa 8 mM
- c) NAD 3 mM

d) G6PDH 2750 U/ml

e) ATP 15 mM

PROTOCOL

Posar 20 μ l d'homogenat en 880 μ l de la mescla de reacció, a les concentracions finals següents:

Trietanolamina 50 mM pH 7,6; EDTA 5 mM; $MgSO_4$ 8 mM; glucosa 2 mM; NAD 0,3 mM i G6PDH 0,69 U/ml

Incubar aquesta barreja durant 10 minuts a 30°C. Afegir 100 μ l d'ATP 15 mM per començar la reacció. L'aparició de NADH es segueix a 340 nm durant 10 minuts a la fase linial, la qual és proporcional a l'activitat hexoquinasa.

2.5.4. Determinació de l'activitat fosfofructoquinasa

FONAMENT

El mètode utilitzat va ser el descrit per Beutler i col. (1975a)

- 1) Fru 6-P + ATP- Mg^{2+} \longrightarrow Fru 1,6-p₂ + ADP (PFK)
- 2) Fru 1,6-P₂ \longrightarrow Gliceraldehid 3-P+DHAP (Ald)
- 3) Gliceraldehid 3-P \longrightarrow DHAP-P (TPI)
- 4) DHAP-P + NAD+ H^+ \longrightarrow α -Glicerol-P + NAD (G3PDH)

REACTIUS I ENZIMS

a) tampó (Tris-HCl 200 mM, ph 8; EDTA 1 mM; $MgCl_2$ 24 mM i Sulfat amònic 16 mM)

b) Fru 6-P 10 mM

- c) NADH 2 mM
- d) G3PDH/TPI (8000 U/ml; 50000 U/ml)
- e) Aldolasa 9 U/ml
- f) ATP - MgCl₂ 10 mM

PROTOCOL

Per mesurar l'activitat fosfofructoquinasa de l'homogenat es posen 25 µl d'aquest amb 875 µl de la mescla de reacció a les concentracions finals següents:

Tris-HCl 50 mM EDTA 0,25 mM pH 8, MgCl₂ 6 mM, fructosa 6-P 1 mM, NADH 0,2 mM, G3PDH 8 U/ml, TPI 50 U/ml i Aldolasa 0,4 U/ml.

Tot això es posa a incubar durant 10 minuts a 30°C, i després s'hi afegeixen 100 µl d'ATP 10 mM neutralitzat a pH 7, per començar així la reacció, donant-se una disminució de l'absorbància que llegim durant 10 minuts a la fase linial.

Al mateix temps es fa un blanc, en el lloc de posar ATP es posa aigua. L'oxidació del NADH es llegeix a 340 nm.

2.5.5. Determinació de l'activitat fructosa 1,6- bisfosfatasa

FONAMENT

El mètode utilitzat és el descrit per Tonder i col. (1985)

- 1) Fru 1,6-P₂ → Fru 6-P (Fru 1,6-bisfosfatasa)
- 2) Fru 6-P → Glu 6-P (PGI)
- 3) Glu 6-P + NADP⁺ → 6,P Gluconat + NADPH⁺ + H⁺
(G6PDH)

L'AMP és un fort inhibidor de la Fru 1,6-bifosfatasa per la qual cosa s'ha d'eliminar del medi d'incubació. Això es fa amb les següents reaccions:

- 4) $\text{ATP} + \text{AMP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{ADP (MK)}$
- 5) $\text{PEP} + \text{ADP} \longrightarrow \text{Piruvat} + \text{ATP (PK)}$

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Tris-HCl 500 mM pH 7,5; EDTA 20 mM; MgSO_4 60 mM; β -mercaptoetanol 200 mM)
- b) NADP 20 mM
- c) PEP 50 mM
- d) ATP 0,5 mM
- e) Mioquinasa 2 mg/ml; PK 10 mg/ml
- f) PGI 10 mg/ml; G6PDH 5 mg/ml
- g) Fru 1,6- P_2 10 mM

PROTOCOL

Per mesurar l'activitat fructosa 1,6- bifosfatasa de l'homogenat es posen 20 μl d'aquest en 880 μl de la mescla de reacció a les concentracions finals següents:

Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 2 mM; MgSO_4 6 mM; β -mercaptoetanol 20 mM; NADP 2 mM; PEP 5 mM; ATP 0,05 mM; Mioquinasa 5 $\mu\text{g/ml}$; PK 10 $\mu\text{g/ml}$; PGI 2 $\mu\text{g/ml}$ i G6PDH 2 $\mu\text{g/ml}$

Tota aquesta barreja es posa a incubar a 30°C durant uns 10 minuts aproximadament. S'hi afageix fructosa 1,6- P_2 (concentració final 1 mM), per començar així la reacció, donant-se un augment de l'absorbància que llegim durant 10 minuts a la fase linial.

La reducció del NADP es llegeix a 340 nm.

2.5.6. Determinació de l'activitat piruvat quinasa

FONAMENT

L'activitat piruvat quinasa es mesura segons el mètode de Beutler i col. (1975b)

- 1) $\text{PEP} + \text{ADP} \longrightarrow \text{Piruvat} + \text{ATP (PK)}$
- 2) $\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Lactat} + \text{NAD}^+ \text{ (LDH)}$

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Tris-HCl 400 mM, pH 8,0; EDTA 2 mM; MgCl_2 40 mM i KCl 200 mM)
- b) NADH 2 mM
- c) LDH 5500 U/ml
- d) ADP 30 mM
- e) PEP 50 mM

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció a les concentracions finals següents:

tampó Tris-HCl 100 mM, EDTA 0,5 mM pH 8, KCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, NADH 0,2 mM i LDH 11 U/l i aigua.

Per mesurar l'activitat es posen 825 μl d'aquesta mescla en una cubeta d'espectrofotòmetre, junt amb 25 μl de l'homogenat i 50 μl d'ADP 1,5 mM. En el cas del blanc l'ADP és substituït per aigua. S'incuba aquesta barreja durant 10 minuts a 30°C. Després hi afegim PEP 7,5 mM,

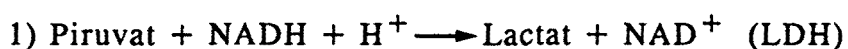
començant així la reacció.

Es mesura l'oxidació del NADH a l'espectrofotòmetre a 340 nm.

2.5.7. Determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa

FONAMENT

El mètode utilitzat va ser descrit per Bass i col (1969).



La velocitat de disminució de la concentració de NADH en el medi, determinada fotomètricament, és proporcional a la concentració catalítica de la lactat deshidrogenasa a la mostra.

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Tris-HCl 80 mM a pH 7,2; EDTA 2,0 mM i ClNa 200 mM)
- b) Piruvat 1,6 mM
- c) NADH 0,18 mM

PROTOCOL

La mescla d'assaig a concentracions finals està constituïda per:

tampó Tris-ClH 80 mM a pH 7,2, piruvat 1,6 mM, NADH 0,18 mM, EDTA 2 mM i ClNa 200 mM.

S'incuba aquesta mescla a la cubeta dins la cambra de l'espectrofotòmetre a 30°C, i llavors s'hi afageix la mostra, començant així la reacció, durant la qual seguim l'extinció del NADH a 340 nm uns 10 minuts aproximadament.

2.5.8. Determinació de l'activitat creatina quinasa

FONAMENT

El mètode utilitzat és el descrit per Oliver, (1955).

- 1) CP + ADP \longrightarrow Creatina + ATP (CK)
- 2) ATP + Glucosa \longrightarrow ADP + Glucosa 6-P (HK)
- 3) Glu 6,P + NADP⁺ \longrightarrow 6,P Gluconat + NADPH + H⁺
(G6PDH)

La velocitat de formació del NADPH és determinada fotomètricament a 340 nm i és directament proporcional a l'activitat creatina quinasa existent a la mostra.

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Imidazol 200mM pH 6,7; acetat magnesi 20 mM i EDTA 4 mM)
- b) Glucosa 200 mM
- c) N-acetilcisteïna 200 mM
- d) ADP 40 mM
- e) NADPH 40 mM
- f) AMP 100 mM
- g) G6PDH 350 U/ml
- h) HK 280 U/ml
- i) Creatina-P

PROTOCOL

Incubar 25 μ l de la mostra convenientment diluïda amb 925 μ l de la mescla de reacció, a les concentracions finals següents:

Imidazol 100mM, D-Glucosa 20mM, acetat magnesi 10 mM, EDTA 2 mM

ajustada a pH 6.7, N-acetilcisteïna 20 mM, ADP 2 mM, NADPH 2 mM, AMP 5 mM, els enzims auxiliars G6PDH 1,5 U/ml, HK 2,5 U/ml.

Incubar aquesta mescla durant 10 minuts a 30°C i després afegir 50 µl de creatina-P que queda a una concentració a la cubeta de 30 mM, començant així l'aparició de NADPH, que es mesura durant 10 minuts aproximadament.

2.5.9. Determinació de l'activitat aspartat amino transferasa

FONAMENT

El mètode utilitzat és el descrit per Bergmeyer i col. (1976).

- 1) L-Asp + 2-Oxoglutarat \longrightarrow Oxalacetat + L-Glutamat (ASAT)
- 2) Oxalacetat + NADH+H⁺ \longrightarrow L-Malat + NAD (MDH)

La mesura fotomètrica a 340 nm de l'extinció del NADH és el que ens dóna l'activitat L-aspartat amino transferasa.

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó fosfats 320 mM a pH 7,4
- b) L-aspartat 800 mM
- c) MDH 600 U/ml
- d) LDH 1250 U/ml
- e) NADH 2 mM
- f) Oxoglutarat 150 mM

PROTOCOL

Es prepara una mescla de reacció a les concentracions finals següents:

tampó fosfat 80 mM a pH 7,4, L-aspartat 200 mM, MDH 0.6 U/ml, LDH 1,2 mU/ml i NADH 0.2 mM.

A 840 μ l del test afegim 80 μ l de la mostra i ho atemperem durant 10 minuts a 30° C. Després hi posem 80 μ l d'oxoglutarat, que a la cubeta queda a una concentració de 12 mM, començant així la reacció, la qual enregistrem durant 10 minuts.

Al mateix temps es fa un blanc en el qual en lloc de posar oxoglutarat es posa aigua.

2.5.10. Determinació de l'activitat alanino amino transferasa

FONAMENT

La determinació de l'activitat alanina amino transferasa es fa mitjançant el mètode de Wroblewski modificat per Henry i col. (1960).

- 1) α -Cetoglutarat + L-Ala \longrightarrow L-Glutamat + Pir (ALAT)
- 2) Pir + NADH + H⁺ \longrightarrow NAD⁺ + L-Lactat (LDH)

A la primera reacció l'alanina amino transferasa catalitza la transferència d'un grup amino. A la segona reacció acoblada, la lactat deshidrogenasa produeix l'oxidació del NADH, que és proporcional a l'activitat alanina amino transferasa existent a la mostra.

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó fosfats 320 mM a pH 7,4
- b) L-alanina 800 mM
- c) NADH 2 mM
- d) LDH 1200 U/ml

e) α -cetoglutarat 225 mM

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció a les concentracions finals següents: tampó fosfat 80 mM a pH 7,4, L-alanina 80 mM, LDH 1,2 U/ml i NADH 2 mM.

Incubar 840 μ l d'aquesta mescla a 30°C durant 10 minuts junt amb 80 μ l de mostra. Després, afegir 80 μ l d' α -cetoglutarat, que ens queda a una concentració final, de 18 mM, començant així la reacció, a la qual mesurem la disminució d'absorbància durant 10 minuts.

El blanc és igual però en lloc d' α -cetoglutarat hi posem aigua.

2.6. DETERMINACIÓ DE NIVELLS DE METABÒLITS

Totes les determinacions de metabòlits, a menys que s'indiqui el contrari, s'han fet utilitzant el fluorímetre. La longitud d'ona d'excitació és de 340 nm i la d'emissió de 465 nm.

2.6.1. Determinació del glicogen

Els nivells de glicogen muscular s'han determinat per dos mètodes diferents, segons el tipus de mostra.

2.6.1.1. Mètode de l'antrona

FONAMENT

El mètode utilitzat és el descrit per Carroll, (1956), que es basa en la

digestió del teixit en medi alcalí, seguida de la hidròlisi àcida i en calent del polisacàrid. La glucosa produïda es determina aleshores per reducció química del reactiu d'antrona.

PROTOCOL

Per a l'extracció del glicogen, un fragment del teixit, congelat amb nitrogen líquid (aproximadament 4 mg), es digereix amb hidròxid potàssic al 30% amb una relació pes/volum de 1/10 a una temperatura de 100°C durant 20 minuts, fins a la digestió total del teixit. S'hi afegeix etanol fins a una concentració final del 66% i sulfat sòdic saturat (100 µl/ml de mostra), i es deixa que precipiti el glicogen. Després de 24 h es centrifuguen les mostres a 3500 rpm durant 15 minuts. El precipitat de glicogen obtingut es resuspèn en 500 µl d'aigua i es determina segons s'explica a continuació.

El reactiu de l'antrona es compon d'antrona al 0,05% en àcid sulfúric al 72%. Per a la determinació s'agafen 0,2 ml de les mostres preparades i se'ls afegeix 0,8 ml del reactiu de l'antrona. L'addició del reactiu es fa submergint els tubs en un bany de gel per compensar la reacció fortament exotèrmica que té lloc. Seguidament els tubs s'agiten vigorosament per tal de facilitar l'homogeneïtzació del líquid i es col.loquen en un bany maria a 100°C durant 10 minuts per provocar l'aparició del color. La reacció s'atura submergint els tubs novament en gel. Tot seguit es llegeix l'absorbància que presenten a 620 nm.

Simultàniament es prepara un patró amb glucosa a concentracions entre 0 i 100 µg/ml.

2.6.1.2. Determinació enzimàtica

FONAMENT

Es basa en la digestió del teixit en medi àcid amb HCl a 100°C (Harris i col. 1974). Quan ja no queda teixit sòlid, l'extracte és neutralitzat amb NaOH, per després fer la valoració de la glucosa de forma enzimàtica (Lowry i Passoneau, 1972).

PROTOCOL

Per fer la hidròlisi, s'utilitzen entre 3 i 5 mg de teixit sec. Es posa en un volum de 650 µl de HCl 2 M i a 100°C durant 2 hores, agitant-lo de tant en tant. Quan està fred s'hi afageixen 650 µl de NaOH 2 M, per així neutralitzar l'extracte. El teixit queda totalment digerit.

També es pot utilitzar el precipitat que s'obté de fer l'extracció de metabòlits amb perclòric. S'utilitza la mateixa quantitat de teixit i també s'ha de fer la hidròlisi àcida, tal com s'explica en el paràgraf anterior.

Una vegada hem digerit el teixit, el glicogen s'ha trencat en residus de glucosa, que és el metabòlit que mesurem.

2.6.2. Determinació de la glucosa

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid.

- 1) Glucosa + ATP \longrightarrow Glu 6,P + ADP (HK)
- 2) Glu 6,P + NADP⁺ \longrightarrow 6,P Gluconat + NADPH + H⁺
(G6PDH)

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Tris-HCl 1 M, pH 8,1; MgCl₂ 1 M; DTT 0,5 M)
- b) ATP 300 mM
- c) NADP 50 mM
- d) G6PDH 350 U/ml
- e) HK 280 U/ml (25 µl en un mil.lilitre de mescla de reacció)

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció que conté els següents reactius i enzims, a les concentracions finals indicades:

Tris pH 8,1 50 mM; MgCl₂ 1 mM; DTT 0,5 mM; ATP 300 µM; NADP 50 µM i G6PDH 0,02 U/ml.

A un mil.lilitre de la mescla de reacció s'hi afegeixen 10 µl de mostra i es llegeix la fluorescència. Hi afegim 25 µl de HK diluïda (concentració final 0,14 U/ml), esperem 60 minuts i tornem a llegir la fluorescència. El canvi produït és proporcional a la quantitat de glucosa present al tub.

Simultàniament a les mostres també es llegeix una solució patró de glucosa 500 µM.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs, en els quals en lloc de mostra es posa aigua.

2.6.3. Determinació d'ATP i creatinafosfat

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid.

- 1) $CP + ADP \longrightarrow Cre + ATP$ (CK)
- 2) $ATP + Glucosa \longrightarrow ADP + Glu\ 6,P$ (HK)
- 3) $Glu\ 6,P + NADP^+ \longrightarrow 6,P\ Gluconat + NADPH + H^+$
(G6PDH)

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Tris - HCl 1 M, pH 8,1; Cl_2Mg 1 M; DTT 0,50 M)
- b) glucosa 100 mM
- c) NADP 50 mM
- d) G6PDH 350 U/ml
- e) HK 280 U/ml (diluïda, 25 μ l en 1 ml de tampó)
- f) ADP i CK 25 U/mg (2 mg d'ambdós en 1 ml de tampó amb BSA 0,1 %)

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció que conté els següents reactius i enzims, a les concentracions finals indicades:

Tris 50 mM pH 8,1; $MgCl_2$ 1 mM; DTT 0,5 mM; Glucosa 100 μ M; NADP 50 μ M i G6PDH 0,02 U/ml.

A un mil.lilitre d'aquesta mescla s'afegeixen 10 μ l de la mostra i es llegeix la fluorescència que presenta. S'hi afegeixen llavors 25 μ l d'hexoquinasa diluïda, (concentració final 0,16 U/ml). Esperem durant 30 minuts, i es torna a llegir. L'increment de fluorescència produït ens dóna la concentració d'ATP. Afegim ara 20 μ l de la solució de creatina quinasa i ADP (concentració final de 1 U/ml i 0,1 mM respectivament), esperem 60 minuts, i llegim novament la fluorescència. L'increment de fluorescència ens dóna la concentració de fosfocreatina.

Simultàniament a les mostres també es llegeix una solució patró d'ATP

200 μ M.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs, en els quals en lloc de mostra es posa aigua.

2.6.4. Determinació de creatina

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid.

- 1) $\text{Cre} + \text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{PC (CK)}$
- 2) $\text{ADP} + \text{PEP} \longrightarrow \text{ATP} + \text{Piruvat (HK)}$
- 3) $\text{Piruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Lactat} + \text{NAD}^+ \text{ (LDH)}$

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Imidazol 1 M, pH 7,5; MgCl_2 1 M; KCl 1 M)
- b) PEP 10 mM
- c) ATP (0,2 mg per mil.lilitre de mescla de reacció)
- d) NADH 15 mM
- e) LDH 12500 U/ml (0,2 μ l per mil.lilitre de mescla de reacció)
- f) PK 2000 U/ml (0,4 μ l per mil.lilitre de mescla de reacció)
- g) CK 25 U/mg (5 mg de CK en un mil.lilitre de tampó amb BSA 0,1%)

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció que conté els següents reactius i enzims, a les concentracions finals indicades:

Imidazol 50 mM; MgCl_2 5 mM; KCl 30 mM; PEP 25 μ M; ATP 200 μ M; NADH 75 μ M; LDH 0,24 U/ml i PK 0,75 U/ml.

h) GFa 12 U/mg (5 mg de GFa en un mil.litre de aigua)

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció que conté els següents reactius i enzims, a les concentracions finals indicades:

Imidazol 50 mM; acetat de Mg 500 μ M; EDTA 1 mM; NADP 50 μ M; DTT 500 μ M; BSA 0,02 %; AMP 10 μ M; glicogen 0,8 gr/l; PGM 1,2 U/ml i G6PDH 0,12 U/ml.

A un mil.lilitre d'aquesta mescla s'afageixen 10 μ l de mostra i es llegeix la fluorescència. Afagim 20 μ l de GFa diluïda (concentració final 1 U/ml), agitem el tub i esperem 45 minuts. Tornem a llegir la fluorescència i l'increment que s'observa ens dóna la quantitat de Pi que hi ha a la mostra.

Simultàniament a les mostres també es llegeix una solució patró de fosfat inorgànic 500 μ M.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs, en els quals en lloc de mostra es posa aigua.

2.6.6. Determinació de Lactat

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid.

- 1) Lactat + NAD⁺ \longrightarrow Piruvat + NADH + H⁺ (LDH)
- 2) Piruvat + Hidrazina \longrightarrow Hidrazona

La reacció es realitza en medi alcalí i en presència d'hidrazina. D'aquesta manera la reacció està desplaçada cap a la formació de piruvat, el qual es combina amb l'hidrazina, evitant-se que reverteixi la reacció.

REACTIUS I ENZIMS

- a) Hidrazina 1 M
- b) Glicina 1 M
- c) NAD 100 mM
- d) LDH 1250 U/ml (afegir 250 μ l a un mil.lilitre d'aigua)

PROTOCOL

Es prepara la barreja de reacció que conté els següents reactius i enzims, a les concentracions finals indicades:

Hidrazina 100 mM; glicina 100 mM i NAD 0,5 mM; pH 10.

A un mil.lilitre d'aquesta mescla s'afageixen 10 μ l de mostra i es llegeix la fluorescència. Afegim 25 μ l de LDH diluïda (concentració final 8 U/ml), agitem i esperem 60 minuts. L'augment de fluorescència ens dóna la quantitat de lactat existent a la mostra.

Simultàniament a les mostres també es llegeix una solució patró de lactat 500 μ M.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs, en els quals en lloc de mostra es posa aigua.

2.6.7. Determinació de glucosa, glucosa 6-P, glucosa 1-P i fructosa 6-P

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid.

- 1) Glucosa + ATP \longrightarrow Glu 6,P + ADP (HK)
- 2) Fru 6,P + ATP \longrightarrow Glu 6,P + ADP (PGI)
- 3) Glu 1,P + ATP \longrightarrow Glu 6,P + ADP (PGM)
- 4) Glu 6,P + NADP⁺ \longrightarrow 6,P Gluconat + NADPH + H⁺
(G6PDH)

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Tris-HCl 1M, pH 8,1, MgCl₂ 1M, DTT 0,5M, EDTA 200 mM)
- b) ATP 300 mM
- c) NADP 50 mM
- d) G6PDH 350 U/ml (10 µl en 1,5 mil.litres de tampó)
- e) PGM 400 U/ml (20 µl en un mil.lilitre de tampó)
- f) PGI 3500 U/ml (10 µl en un mil.lilitre de tampó)
- g) HK 280 U/ml (25 µl en un mil.lilitre de tampó)

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció que conté els següents reactius i enzims, a les concentracions finals indicades:

Tris 1,50 mM, pH 8; MgCl₂ 1 mM; DTT 0,5 mM; ATP 300 µM; NADP 50 µM i EDTA 100 µM.

A un mil.lilitre de mescla de reacció afegim 100 µl de mostra i es llegeix la fluorescència. Llavors afegim successivament els següents enzims: 10 µl de G6PDH diluïda (concentració final 0,02 U/ml), 10 µl de PGM diluïda (concentració final 0,065 U/ml), 10 µl de PGI diluïda (concentració final 0,35 U/ml) i finalment 25 µl de HK diluïda (concentració final 0,14 U/ml). Entre cadascun dels enzims esperem 15 minuts i llegim la pujada de fluorescència, donant-nos aquesta de forma successiva, les concentracions de Glu 6,P, Glu 1,P, Fru 6,P i glucosa. Simultàniament llegim una solució patró que conté Glu 6-P 5 µM i glucosa 10 µM.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs, en els quals en lloc de mostra es posa aigua.

2.6.8. Determinació de fructosa-1,6-P₂, dihidroxiacetona fosfat i gliceraldehid 3- fosfat

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid.

- 1) Fru 1,6-P₂ → DHAP + Gliceraldehid 3,P
(Ald)
- 2) DHAP → Gliceraldehid 3-P
- 3) Gliceraldehid 3,P + NAD⁺ → 3,P Glicerat + NADH + H⁺
(G3PDH)

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Imidazol 1M pH 7,5; EDTA 200mM; β-mercaptoetanol 14,3 M)
- b) NAD 100 mM
- c) Na₂HAsO₄ 1 M

- d) G3PDH 800 U/ml (100 μ l en un mil.lilitre de tampó)
- e) TPI 61350 U/ml (5 μ l en un mil.lilitre de tampó)
- f) ALD 90 U/ml (5 μ l en dos mil.litres de tampó)

PROTOCOL

Es prepara la mescla de reacció que conté els següents reactius i enzims, a les concentracions finals indicades:

Imidazol 50,0 mM; NAD 100 μ M; Na₂HAsO₄ 1 mM; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 2 mM.

A un mil.lilitre d'aquesta mescla s'afegeixen 75 μ l de mostra i es llegeix la fluorescència que presenta.

Afegim 10 μ l de GAPDH diluïda (concentració final 0,8 U/ml) i esperem 15 minuts, la diferència de fluorescència ens dóna la concentració de Gliceraldehid 3-P.

Tornem a afegir 10 μ l de TPI diluïda (concentració final 2,4 U/ml) i esperem 15 minuts. El nou increment de fluorescència ens dóna la concentració de DHAP.

Finalment, afegim 10 μ l de Ald diluïda (concentració final 0,02 U/ml) i esperem 15 minuts. Llegim la fluorescència i la diferència amb l'anterior lectura ens dóna la concentració de fru 1,6-P₂.

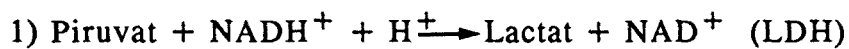
Simultàniament a les mostres també es llegeix una solució patró de fru 1,6-P₂.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs, en els quals en lloc de mostra es posa aigua.

2.6.9. Determinació de Piruvat

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid.



REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó fosfats 50 mM pH 7,0 (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4)
- b) NADH 15 mM
- c) LDH 1250 U/ml

PROTOCOL

Es prepara la barreja de reacció que conté els reactius i enzims següents, a les concentracions finals indicades:

Tampó fosfat 50,0 mM i NADH 0,75 μM .

A un mil.lilitre de mescla de reacció afegim 50 μl de mostra i llegim la fluorescència que presenta. S'hi afageixen 10 μl de LDH diluïda (concentració final 0,06 U/ml), i esperem 20 minuts. La disminució de fluorescència ens dóna la concentració de piruvat.

Simultàniament a les mostres també es llegeix una solució patró de piruvat 10 μM .

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs, en els quals en lloc de mostra es posa aigua.

2.6.10. Determinació d'IMP, ATP, ADP, hipoxantina, AMP, NADP, NAD i inosina

FONAMENT

Es basa en el mètode descrit per Ingebretson i col. (1982), a partir d'un extracte àcid. S'utilitza una columna de par-ionic fase reversa HPLC.

REACTIUS

- a) Tampó fosfats 100 mM pH 6,3 (KH_2PO_4 , K_2HPO_4)
- b) 900 ml del tampó anterior més 100 ml de metanol pur

PROTOCOL

S'injecten 25 μl de mostra a la columna de SUPELCOSIL LC18 4,6 * 25 cm 5 μM , amb les condicions següents:

30 - 35°C, pressió 1050 a un flux de 1ml/min, detecció a 254 nm, atenuació 16 i el gradient de:

TEMPS (m)	SOLUCIO A %	SOLUCIO B %	FLUX
0,0	100	0	1,0
9,0	100	0	1,0
15,0	75	25	1,3
17,5	10	90	1,3
19,5	0	100	1,3
25,5	100	0	2,0
35,0	100	0	2,0

L'ordre d'aparició i el temps de retenció dels diferents metabòlits és el següent: IMP (7,3m), ATP (9,64m), ADP (10,68m), Hipoxantina (12,44m), AMP (14,56m), NADP (17,3m), NAD (24,2m) i Inosina (25,2m).

PGM 0,05 U/ml.

Aquesta solució es deixa preincubar a 30°C uns 3 minuts i s'hi afegeix la mostra i s'enregistra l'increment d'absorbància a 340 nm com a mínim durant 5 minuts, en els quals la reacció és linial.

La concentració de glu 1,6-P₂ es calcula a partir d'una recta patró construïda amb glu 1,6-P₂ a concentracions 0 i 80 nM en cubeta, marges entre els quals la reacció de la fosfoglucomutasa és linial respecte a la concentració de l'activador.

En la determinació de la concentració de glu 1,6-P₂ en extractes àcids procedents de teixits, cal assegurar-se que la velocitat de reacció sigui proporcional al volum d'extracte utilitzat. Aquest aspecte pot ser problemàtic a causa de la presència de metabòlits inhibidors de l'activitat fosfoglucomutasa en els extractes. En aquest sentit és necessari utilitzar volums de mostra petits i fins i tot diluir-les i construir aleshores una recta patró amb concentracions de glucosa 1,6-P₂ entre 0 i 40 nM, augmentant la sensibilitat de l'espectrofotòmetre.

2.6.12. Determinació de Fructosa 2,6-bisfosfat

FONAMENT

La fructosa 2,6-P₂ es va determinar segons el mètode de Van Schaftingen (1984), que es basa en el fet que aquest metabòlit actua com a cofactor de la P_{Pi}-fructosa 6-P fosfotransferasa (P_{Pi}-PFK). S'utilitza l'enzim aïllat de patata donat que aquest és pràcticament dependent de la presència del metabòlit ja que té una K_a molt baixa, de l'ordre de 1 nM.

- 1) Fru 6,P + P_{Pi} → Fru 1,6-P₂ + Pi (P_{Pi}-PFK)
- 2) Fru 1,6-P₂ → Gliceraldehid 3,P + DHAP (Ald)
- 3) Gliceraldehid 3-P → DHAP-P (TPI)
- 4) DHAP + NADH + H⁺ → α-Glicerol-P + NAD⁺ (G3PDH)

REACTIUS I ENZIMS

- a) tampó (Tris-acetat 50 mM, pH 7,8; Acetat-Mg 5 mM)
- b) Fru 6,P 70 mM + Glu 6,P 20 mM (lliure de fru 2,6-P₂)
- c) NADH 2 mM
- d) G3PDH/TPI (8000 U/ml, 50000 U/ml)
- e) Aldolasa 9 U/ml
- f) P_{Pi}-PFK
- f) P_{Pi} sòdic 10 mM

PROTOCOL

La mescla de reacció a volum final conté:

Tris-acetat 50 mM pH 7,8, acetat-Mg 5 mM, fru 6,P 1,4 mM, Glu 6,P 0,5 mM, NADH 0,2 mM, G3PDH 8 U/ml, TPI 50 U/ml, Aldolasa 0,4 U/ml, P_{Pi}-PFK (l'activitat depèn de la preparació enzimàtica), mostra i aigua fins arribar a 950 µl.

Es deixa atemperar aquesta barreja a 30°C mentre s'enregistra l'absorbància a 340 nm. S'inicia la reacció afegint a cada cubeta 50 µl de P_{Pi} 10 mM i s'enregistra la disminució de l'absorbància durant un mínim de 5 minuts en què la velocitat de reacció sigui linial.

Per a calcular la concentració existent en les mostres, es construeix una recta patró per concentracions de fru 2,6-P₂ entre 0 i 1 nM.

La utilització d'una mescla de Fru 6-P i Glu 6-P com a substrat de la reacció és degut al fet que la preparació de PPI-PFK utilitzada té activitat fosfoglucoisomerasa.

2.7. DESSALAT D'ENZIMS

En la valoració de fructosa 2,6-bisfosfat és necessari dessalar prèviament els enzims utilitzats per tal d'evitar interferències degudes a l'elevat contingut en sulfat amònic que tenen les suspensions comercials.

El dessalat es va fer per cromatografia del gel filtració en Sephadex G-25 fine.

En primer lloc es preparen les columnes utilitzant xeringues d'insulina, que s'omplen amb el gel prèviament inflat. Les xeringues es centrifuguen aleshores a 3000 rpm. durant 2 minuts en una centrífuga Jouan CR 1000 proveïda de rotor basculant. D'aquesta manera, s'elimina l'aigua i queda el gel en estat pràcticament sec per tal de no diluir posteriorment els enzims.

Aquests es preparen de la següent manera: un volum determinat de la suspensió comercial es centrifuga a 15000 rpm. durant 2 minuts en una centrífuga Eppendorf i el sediment obtingut es resuspèn en el mateix volum d'una solució amortidora adient.

D'aquesta forma s'elimina part de les sals presents a la preparació. La mostra s'aplica aleshores a les columnes de Sephadex G-25 (50µl mostra/columna), les quals es tornen a centrifugar a 3000 rpm. durant 2 minuts en una centrífuga Jouan CR 1000 i es recull la preparació enzimàtica ja dessalada en els tubs de centrífuga.

2.8. PREPARACIÓ DE FRUCTOSA 6-P LLIURE DE FRUCTOSA 2,6-P₂

La Fru 6-P utilitzada en l'assaig de la fructosa 2,6-P₂ ha de ser prèviament tractada per eliminar la contaminació pròpia de les preparacions comercials. S'aprofita la gran labilitat d'aquest compost en medi àcid.

Es prepara una solució de Fru 6-P (o Glu 6-P) de la concentració desitjada, sense ajustar el volum final. Aquesta solució es porta a pH 1,5 - 2 mitjançant l'addició de HCl 1 N i s'escalfa a 30°C durant 30 minuts. Seguidament es neutralitza amb NaOH 1 M i s'ajusta el volum final.

2.9. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNES

Per a la determinació de proteïnes en els sobrenedants obtinguts de centrifugar els homogenats musculars (12000 rpm), hem emprat el mètode de Bradford (1981), modificat.

A 0.8 ml de la mostra convenientment diluïda s'afegeixen 0.2 ml de "Bradford reagent", les mostres s'agiten i es llegeix l'absorbància que presenten a 540 nm.

La concentració es determina en comparació amb una recta patró d'albúmina de 0-22.4 µg/0.8 ml.

A la vista de la depleció inicial de glicogen, de la formació de lactat i de la posterior recuperació de les reserves de glicogen i la desaparició de lactat al llarg del període d'estimulació, la qüestió se centrà en la font d'energia i el control del metabolisme energètic durant aquest període de temps.

L'important increment de la concentració de glucosa (Green *i col.* 1990) feia suposar que la glucosa exògena es converteix en la principal font d'energia del múscul en contracció a la fase inicial d'aquest període d'estimulació.

L'enzim clau de la glucòlisi, la fosfofructoquinasa, està descrit que disminueix per efecte de períodes llargs d'estimulació. A més els enzims relacionats amb el metabolisme oxidatiu i dels àcids grassos no es modifiquen fins després d'una setmana d'estimulació (Simoneau, 1990).

Davant d'aquests fets calia preguntar-se si la via glucolítica estava activada o no.

Per aquesta raó, i sabent que la glucosa-1,6-bisfosfat és un fort regulador del metabolisme dels carbohidrats en múscul (Beitner, 1990), al igual que la fructosa-2,6-bisfosfat (Wegener *i col.* 1990), ens vàrem plantejar la investigació dels canvis en les concentracions d'aquests dos activadors alostèrics de la fosfofructoquinasa en el múscul *Tibialis anterior* de conill amb l'estimulació crònica al llarg del temps.

3.2. MODEL EXPERIMENTAL

El model experimental consistí en sotmetre el múscul *Tibialis anterior* (TA) de conill a una estimulació crònica a baixa freqüència (10 Hz) durant un període aproximat de dos mesos.

A tots els animals la pota contralateral va ser utilitzada com a control, implantant-hi els elèctrodes però sense estimular-la.

Es van obtenir mostres als temps d'estimulació: 15 minuts, 1,3,12 i 24 hores, 2,4,10 i 50 dies. Per cada punt es van utilitzar entre 3 i 4 animals.

3.3. RESULTATS

A mesura que avançava el temps de contracció es van observar pronunciats increments tant en la Glu 1,6-P₂ com en la Fru 2,6-P₂ (Figures 3.1 i 3.2).

En el cas de la Glu 1,6-P₂, els augments ($P < 0,05$) no es van produir fins a les dotze hores d'estimulació, temps en què hi havia un augment d'unes tres vegades aproximadament. Aquesta elevació va persistir al llarg de quatre dies, a excepció del punt corresponent al temps de dos dies. Cap al desè dia la Glu 1,6-P₂ va disminuir fins els nivells control i va romandre inalterable durant la resta del període d'estimulació.

El model de canvi de les concentracions de la Fru 2,6-P₂ va ser qualitativament similar als canvis en la Glu 1,6-P₂ (Figura 3.2). El màxim trobat als quatre dies fou aproximadament de cinc a sis vegades més gran que els valors control. A l'igual que la Glu 1,6-P₂, la Fru 2,6-P₂ als cinquanta dies no estava elevada respecte els controls i els períodes curts d'estimulació.

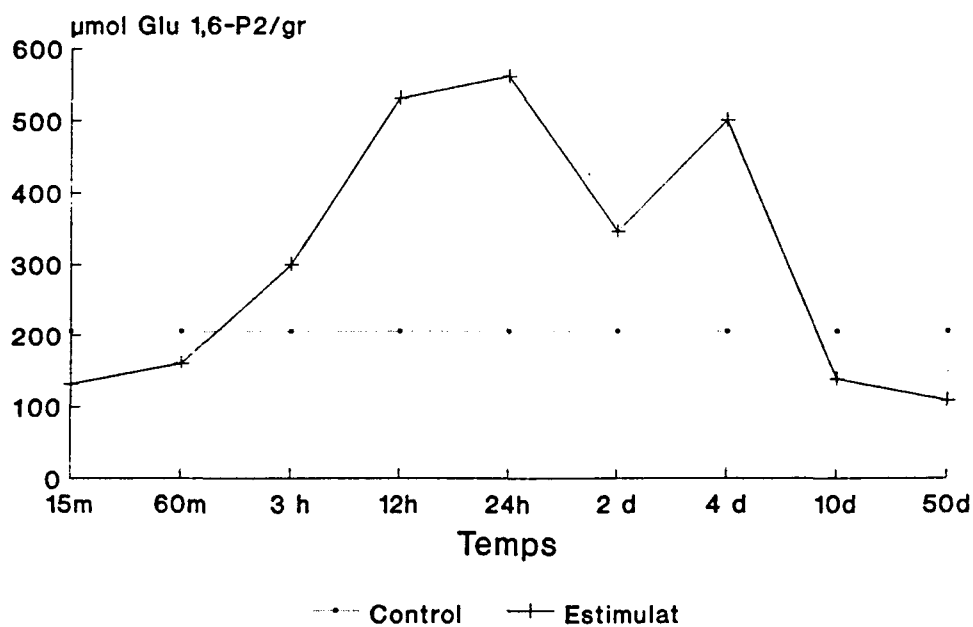


Figura 3.1: Canvis de la concentració de glucosa 1,6-P₂ deguts a una estimulació crònica a baixa freqüència (10 Hz, 24h/dia).

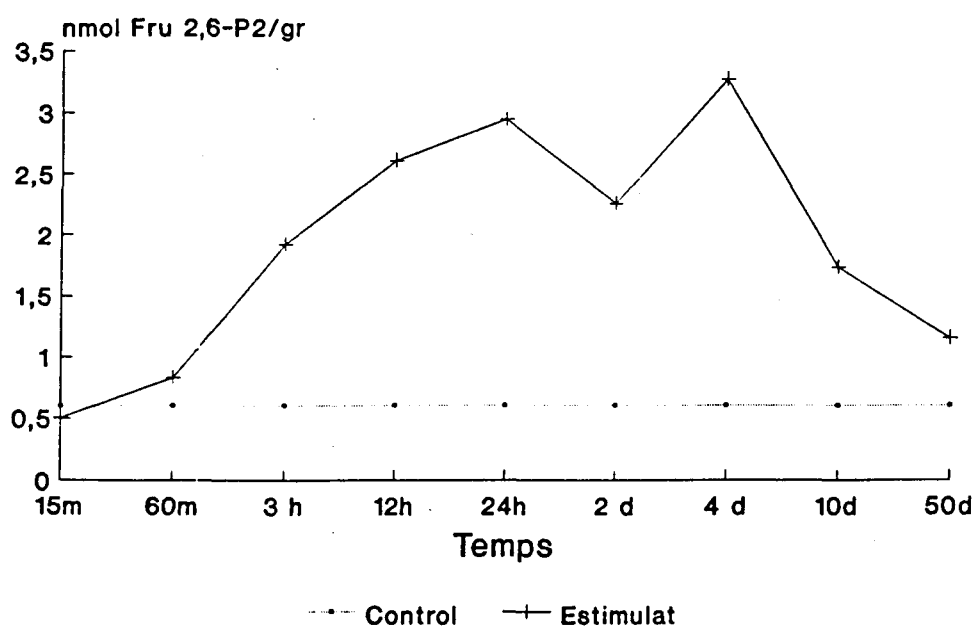


Figura 3.2: Canvis de la concentració de fructosa 2,6-P₂ deguts a una estimulació crònica a baixa freqüència (10 Hz, 24h/dia).

També es van realitzar anàlisis per a seguir els canvis induïts per l'estimulació en les concentracions de la Glu 6,P, Fru 6,P (Taula 3.1) i glicogen (Figura 3.3).

Taula 3.1: Canvis a la concentració de glucosa 6-fosfat i fructosa 6-fosfat durant estimulació crònica a baixa freqüència (10 Hz).

	Glu 6-P	Fru 6-P
TA control	0,110 ± 0,02	0,039 ± 0,004
TA estimulat		
15 min	0,573 ± 0,22 ^a	0,089 ± 0,003
60 min	0,089 ± 0,03 ^b	0,027 ± 0,010
3 h	0,143 ± 0,02 ^b	0,042 ± 0,004
12 h	0,127 ± 0,03 ^b	0,037 ± 0,004
24 h	0,078 ± 0,01 ^b	0,048 ± 0,020
2 d	0,070 ± 0,01 ^b	0,039 ± 0,020
4 d	0,092 ± 0,03 ^b	0,027 ± 0,002
10 d	0,085 ± 0,04 ^b	0,084 ± 0,060
50 d	0,387 ± 0,11 ^{ac}	0,130 ± 0,020 ^{ac}

Els valors són la mitjana ± SEM. Fru 6,P i la Glu 6,P expressats en µmol/gr de teixit fresc. ^aDiferència significativa respecte al TA control (p < 0,05); ^bDiferència significativa respecte als 15 min estimulat (p < 0,05); ^cDiferència significativa respecte als 60 min estimulat (p < 0,05).

Els primers quinze minuts d'estimulació varen resultar en un augment d'aproximadament cinc vegades en les concentracions de la Glu 6-P ($P < 0,05$), (Taula 3.1). A mesura que continuava l'estimulació, la concentració declinà i s'estabilitzà en els nivells de repòs cap el desè dia. Als cinquanta dies, la Glu 6-P era més alta ($P < 0,05$) que a tots els altres punts, excepte als quinze minuts. No es trobà cap diferència entre els valors als quinze minuts i als cinquanta dies.

En el cas de la Fru 6-P, l'únic canvi significatiu fou un augment en el múscul estimulat cinquanta dies, però es podia observar que la concentració d'aquest metabòlit als quinze dies era més alta que al múscul control. Mentre que en els temps successius els valors eren aproximadament els mateixos (Taula 3.1).

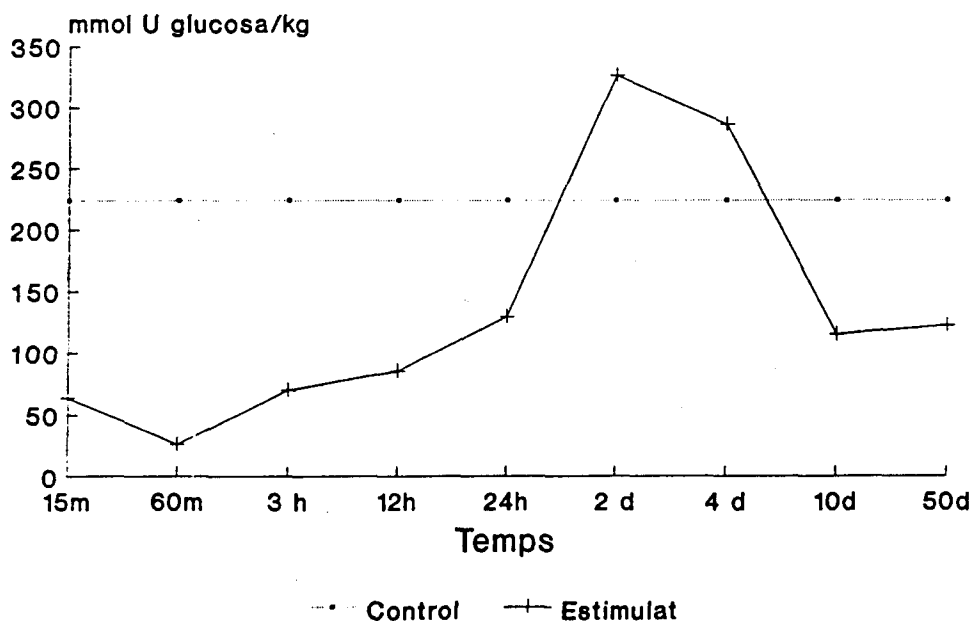


Figura 3.3: Canvis de la concentració de glicogen deguts a una estimulació crònica a baixa freqüència (10 Hz, 24h/dia).

L'estimulació a baixa freqüència tingué efectes pronunciats en el glicogen muscular (Figura 3.3). Cap als quinze i seixanta minuts, el glicogen s'havia reduït aproximadament en un 76% i en un 90% respectivament. Tanmateix, amb una estimulació persistent les reserves de glicogen no únicament van ser recuperades, sinó que es va superar el valor inicial. Als dos dies, la concentració de glicogen del múscul estimulat excedia a la del TA control en aproximadament un 25% ($P < 0,05$). Després el glicogen declinà, assolint un valor als deu dies que era menor del 50% de les concentracions inicials. No es van trobar més alteracions amb estimulació més enllà dels cinquanta dies.

3.4. DISCUSSIÓ

En músculs de contracció ràpida, sotmesos a una estimulació crònica, no havia estat mai descrit el canvi en les concentracions de Fru 2,6-P₂ i de Glu 1,6-P₂ que s'han donat.

Les concentracions d'aquest dos efectors de la fosfofructoquinasa, presenten els mateixos tipus de canvis al llarg del temps, consistents en una pujada a partir de les tres hores i que és present durant els primers quatre dies.

L'augment en la concentració de Glu 1,6-P₂ com a resposta a una major activitat contràctil ja havia estat descrit en músculs de contracció ràpida de rata (Bassols *i col.* 1986) i també en músculs humans de composició fibril·lar mixta (Katz *i col.* 1988; Lee *i col.* 1989). Però els increments descrits eren transitoris i es donaven únicament als primers segons de l'exercici. Això pot explicar el perquè nosaltres no detectem cap pic inicial de Glu 1,6-P₂ ja que el primer punt estudiat és el de quinze

minuts. Aquesta mateixa explicació pot servir per la Fru 2,6-P₂, ja que ha estat descrit un augment transitori d'aquest metabòlit en múscul de granota en els primers segons d'haver-se iniciat la contracció (Wegener *i col.* 1990). Les variacions que es donen en aquests dos metabòlits bisfosforilats han estat relacionades amb el flux glucolític. Bassols *i col.* (1986), descriuen que a mesura que augmenta la concentració de glu 1,6-P₂, augmenta la glucòlisi anaeròbica i que es pot observar un cert paral·lelisme amb el lactat, mentre que amb la Fru 2,6-P₂ només observen un pic transitori i que no es relaciona amb la concentració de lactat. Wegener *i col.* (1990), sí que correlacionen l'acumulació de lactat a l'inici de les contraccions amb un increment de la concentració de Fru 2,6-P₂.

La troballa d'aquest estudi és l'increment persistent de dos reguladors del metabolisme de carbohidrats, durant alguns dies. Les concentracions més altes d'ambdós metabòlits coincideixen amb un període de temps en què la glucòlisi anaeròbica sembla que estigui inhibida, com es pot deduir pels baixos nivells de lactat en el múscul en contracció (Green *i col.* 1990). Per tant la pujada de Glu 1,6-P₂ i de Fru 2,6-P₂ no està en relació amb l'estimulació de la glucòlisi anaeròbica.

Però sí que pot estar en relació amb l'activació de la fosfofructoquinasa en conjunt amb l'elevat flux aeròbic, com es pot deduir a partir de les baixes concentracions de Glu 6,P i Fru 6,P (Henriksson *i col.* 1989) i les altes concentracions de citrat i malat des del primer dia d'estimulació (Henriksson *i col.* 1986), tot i que els enzims del cicle de Krebs no varien fins al cap d'una setmana aproximadament (Simoneau i Pette, 1988; Chi *i col.* 1986).

L'augment als 50 dies d'estimulació d'ambdós metabòlits estaria relacionat segons Henriksson *i col.* (1986), amb la disminució de

l'activitat fosfofructoquinasa que es produeix com a resultat de la transformació de les fibres musculars.

Anàlisis fetes de les mateixes mostres varen demostrar que els nivells de glucosa intramuscular eren diverses vegades més alts i que es produïa síntesi de glicogen al mateix temps (Green *i col.* 1989). A més la concentració de l'enzim hexoquinasa després del primer dia d'estimulació ha augmentat significativament (Chi *i col.* 1986) i va augmentant al llarg de tot el període d'estimulació assolint valors molt més alts que els que correspondrien a un múscul de contracció lenta (Simoneau i Pette, 1988, Simoneau, 1990).

La glucosa podria actuar com el substrat per la síntesi de glicogen i com a major font energètica a través del cicle de Krebs després de l'esgotament inicial de glicogen.

La conclusió més important d'aquest estudi és que tant la Glu 1,6-P₂ com la Fru 2,6-P₂ augmenten significativament al llarg del temps a causa d'un increment de l'activitat contràctil. Aquesta pujada podria suggerir una activació de la via glucolítica aeròbica a través de l'enzim fosfofructoquinasa.