



Tesi doctoral:

**ESTUDI DEL PAPER DE LA
FRUCTOSA-2,6-BISFOSFAT I L'ENZIM
FOSFOFRUCTO-2-QUINASA/FRUCTOSA-2,6-
BISFOSFATASA EN MÚSCUL**

Jordi Rovira Juárez

Barcelona, 22 de desembre de 2005

Memòria presentada per
Jordi Rovira Juárez
per accedir al grau de
Doctor en Biologia

**Treball realitzat a la Unitat de Bioquímica de la Facultat de Medicina
(Departament de Ciències Fisiològiques I – Universitat de Barcelona)
sota la direcció de Dr. Roser Cussó Fresquet i Dr. Joan Aureli Cadefau
Surroca.**

Barcelona, 22 desembre de 2005.

**Directora de tesi:
Dr. Roser Cussó Fresquet**

**Co-Director de tesi:
Dr. Joan Aureli Cadefau Surroca**

**Autor:
Jordi Rovira Juárez**

Per als meus pares

AGRAÏMENTS

No sóc un home de grans discursos, però voldria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que d'una manera o altra han contribuït al desenvolupament d'aquesta tesi doctoral.

En primer lloc a la Dra. Roser Cussó i al Dr. Joan Aureli Cadefau per haver-me permès realitzar la tesi a la Unitat de Bioquímica del Departament de ciències fisiològiques I i dirigir-me en aquest llarg camí.

Al Dr. Joesp Carreras, al Dr. Ferran Climent i a la Dra. Nicole Mahy per permetrem treballar a la Unitat de Bioquímica i donar-me el seu recolzament quan ha estat necessari.

A la Universitat de Barcelona pel suport econòmic rebut durant l'execució de la tesi, a través de la Beca de Recerca i Docència així com l'ajuda per a la Finalització de tesi.

Al Dr. Claudio Adrián Bernal per permetre'm realitzar una estada al seu laboratori a la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe (Argentina) donant com a fruit l'article acceptat a la revista *British Journal of Nutrition* (Annex 1). Però sobretot per la seva amistat i suport.

Al Dr. Louis Hue i col·laboradors per donar-me l'opció de treballar amb ells a la Université Catholique du Louvain a Brussel·les (Bèlgica) durant 6 mesos.

A tots aquells que va ajudar-me en els primers passos en la vida científica amb els vostres consells i paciència, Dr. Joan A. Cadefau, Dr. Joan Parra, José Antonio Frías, Dra. Clara Prats, Mario Guerrero, Dr. Manuel Rodríguez, Dra. Rosa Adroer, Carmen Andrade, Dr. Pablo Pérez de la Ossa, Dr. José Humberto Maulén, Dra. Noemí Andrés, gràcies.

La docència no és fàcil, requereix temps, paciència i bons companys que t'ajudin a enfocar determinades problemàtiques o et donin un cop de mà en la preparació; Rosario Ruiz, Parra, Manolo, Marco, Pablo, Joan i Marc, gràcies.

Encara que a voltes sigui complicada, la vida social amb els companys de laboratori té més importància de la que un li dóna, però fent un repàs a la memòria o veient fotos (facilitant així la feina), t'adones de quants bons amics has fet; Josep Maria Irimia (Txurri), Ada Repiso, Elisenda Bañón, Maria José Ramírez (Mari), heu estat al meu costat en els molts bons moments que hem passat plegats però el que més valor-ho és la vostra presència en els moments més durs, aquells en què no surt res i penses en deixar-ho tot, però amb el vostre suport i/o consell he continuat i finalment acabat la tesi, moltíssimes gràcies!

No voldria oblidar aquest últim any i mig, perquè les noves incorporacions han aportat un altre aire al laboratori, les noves generacions (o no tan noves eh! Liu i Madu) donen aquesta frescor, alegria, que et dóna ganes de seguir, Marc Guiu, Feliu Roset (Liu), Monste Batlle (Madu), Lluís Pujadas, moltes gràcies!

Als amics i companys de tota la vida: Eva, Jaume, Enric, Mateu, Joan, Marc, X.Gibert, Maria, Mireia, Xavi, Marta, Dani, Anna, Martí, així com a les “noves” amistats: Esther, Lorella, Gloria, Iolanda a tots vosaltres gràcies per compartir els bons moments i ajudar-me a superar els difícils.

A la meua companya d'habitació durant els últims 4 anys, iaia Josefa, i als altres avis, que per desgràcia no poden veure com acaba aquesta història, gràcies!

I molt especialment als meus pares perquè sense el seu esforç i recolzament no hauria pogut fer aquesta tesi doctoral i al meu germà que ha estat font d'il·lusió, milions de gràcies!

Segurament hauré gastat la paraula *gràcies* però crec que era indispensable fer-vos saber a tots i totes que sense vosaltres això no hauria estat possible ... **GRÀCIES !!!**

ABREVIATURES

ADP	adenosina 5'-difosfat
AMP	adenosina 5'-monofosfat
AMPC	AMP cíclic o Adenosina 3',5'-monofosfat
AMPK	proteïna quinasa dependent d'AMP
ATP	adenosina 5'-trifosfat
ATPasa	ATP hidrolasa
BSA	albúmina de sèrum boví
CaM	calmodulina
CK	creatina quinasa
CrP	creatina fosfat
DAG	1,2-diacilglicerol
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DHAP	Dihidroxiacetona fosfat
DHPH	Receptors de dihidropiridina
DTT	Dithiothreitol
ECBF	Estimulació crònica de baixa freqüència
ECL	Enzimàtic quimioluminiscent
EDL	Extensor digitorum longus
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
FF	Ràpides i fatigables
FG	Ràpides i glicolítiques
FOG	Ràpides, oxidatives i glicolítiques
FR	Resistents a la fatiga
Fru-6-P	Fructosa-6-fosfat
Fru-1,6-P ₂	Fructosa-1,6-bifosfat
Fru-2,6-P ₂	Fructosa-2,6-bifosfat
FT	Contracció ràpida
g	Gravetats
GAP	Gliceraldehid-3-fosfat
GF	Glicogen fosforilasa
Glu-1-P	Glucosa-1-fosfat

Abrebiatures

Glu-6-P	Glucosa-6-fosfat
Glu-6-Pasa	Glucosa-6-fosfat fosfatasa
Glu-1,6-P ₂	Glucosa-1,6-bifosfat
Glu-6-PDH	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
GLUT	Transportador de glucosa
GS	Glicogen sintasa
HK	Hexoquinasa
IMP	Inosin-5'-monofosfat
InsP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfat
IRS-1	Substrat receptor de la insulina
kDa	Kilodalton
LDH	Lactat deshidrogenasa
MHC	Cadena pesada de la miosina
MLC	Cadena lleugera de la miosina
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
NAD	Dinucleòtid d'adenina i nicotinamida (oxidat)
NADH	Dinucleòtid d'adenina i nicotinamida (reduït)
PBS	Tampó fosfat salí
PBST	Tampó fosfat salí amb Tween-20
PCA	Àcid perclòric
PFK	Fosfofructoquinasa
PFK-2/FBPasa-2	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (PFK-2) mPFK-2 : Isoforma muscular lPFK-2 : Isoformes hepàtica hPFK-2 : Isoforma cardíaca uPFK-2 : Isoforma ubíqua
Pfkfb1-4/PFKFB1-4	Gen codificant de les diferents isoformes PFK-2 (rata/home) 1- Isoformes hepàtica, muscular i fetal 2- Isoforma cardíaca 3- Isoforma ubíqua i de cervell 4- Isoforma de testicle de PFK-2
PGI	Fosfogluoisomerasa
PGM	Fosfoglucomutasa
P _i	Fosfat inorgànic
PKA	Proteïna quinasa dependent d'AMPc
PKB	Proteïna quinasa B

PKC	Proteïna quinasa C
PM	Pes molecular
PMSF	Metosulfat de fenazina
PSA	Persulfat amonic
RS	Reticle sarcoplasmic
S	Lentes
SO	Lentes i oxidatives
ST	Contracció lenta
TA	Tibialis anterior
UA	unitats arbitràries

INDEX

CAPÍTOL 1.- Introducció

1.1.- El múscul	1
1.1.1.- Tipus de músculs	2
1.1.2.- Tipus de fibres	10
1.2.- Contracció muscular	15
1.2.1.- Font d'energia	15
1.2.1.1.- ATP i CP/Creatina	16
1.2.1.2.- Glucòlisi	19
1.2.1.3.- Cicle de Krebs	21
1.2.1.4.- Reserva energètica al múscul, el glucogen	22
1.2.2.- Fatiga muscular	23
1.3.- Regulació de la glucòlisi	26
1.3.1.- Captació de glucosa	26
1.3.2.- Hexoquinasa	31
1.3.3.- 6-fosfofructo-1-quinasa	32
1.4.- Fru-2,6-P ₂	34
1.4.1.- Implicació en el metabolisme	34
1.4.2.- Síntesi i degradació, l'enzim bifuncional PFK-2/FBPasa-2	36
1.4.2.1.- Isoenzims de l'enzim PFK-2/FBPasa-2	37
1.4.2.2.- Gens que codifiquen per PFK-2/FBPasa-2	41

CAPÍTOL 2. Material i Mètodes

2.1.- Reactius i productes utilitzats	47
2.2.- Procediments amb animals	49
2.2.1.- Condicionament dels animals	49
2.2.2.- Model d'electroestimulació en conills	50
2.2.2.1.- Protocol d'anestèsia	50
2.2.2.2.- Protocol d'implantació dels electrodes	52
2.2.2.2.1.- Característiques dels elèctrodes	52
2.2.2.2.2.- Intervenció quirúrgica	52
2.2.2.3.- Model d'electroestimulació	55
2.2.2.4.- Test d'exercici	56
2.2.2.5.- Registre de la contracció muscular	56
2.2.2.5.1.- Test de fatiga a 10 Hz	58
2.2.2.5.2.- Test de fatiga a 40 Hz	58
2.2.2.6.- Obtenció dels músculs	59
2.2.2.6.1.- Aïllament dels músculs	59
2.2.2.6.2.- Extracció dels músculs	59
2.2.3.- Model de desenvolupament en rates	60
2.2.3.1.- Protocol d'anestèsia	60
2.2.3.2.- Protocol quirúrgic	60
2.2.4.- Immunització de conills per l'obtenció d'anticossos	61
2.2.4.1.- Protocol d'immunitzacions	61
2.2.4.2.- Obtenció de sèrum	63
2.2.4.3.- Avaluació dels anticossos obtinguts	64
2.3.- Procediments bioquímics	66
2.3.1- Tractament dels teixits	66
2.3.1.1.- Extractes neutres	66
2.3.1.2.- Extractes àcids	68
2.3.1.3.- Extractes bàsics	68

2.3.2.- Valoracions metabòliques	69
2.3.2.1.- ATP i Creatina fosfat	70
2.3.2.2.- Creatina	71
2.3.2.3.- Glucosa-6-P, Fructosa- 6-P, Glucosa-1-P i Glucosa	73
2.3.2.4.- Gliceraldehid-3-P, Dihidroxiacetona-P i Fructosa-1,6-P ₂	74
2.3.2.5.- Lactat	76
2.3.2.6.- Piruvat	77
2.3.2.7.- Fructosa-2,6- P ₂	78
2.3.2.7.1.- Purificació de l'enzim P _i -PFK de patata	79
2.3.2.7.2.- Hidròlisi àcida, obtenció de Fru-6-P lliure de Fru-2,6-P ₂	80
2.3.2.7.3.- Dessalat d'enzims	80
2.3.2.8.- Glucosa-1,6-P ₂	81
2.3.2.8.1.- Purificació de Glu-1-P	83
2.3.3.- Activitats enzimàtiques	84
2.3.3.1.- 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK2)	84
2.3.3.1.1.- Semipurificació amb PEG	85
2.3.3.1.2.- Activitat PFK-2	86
2.3.3.1.3.- Km per Fru-6-P	87
2.3.3.1.4.- Km per ATP	87
2.3.4.- Quantificació de proteïna, Bradford	87
2.3.5.- Electroforesi	88
2.3.6.- Western blot	90
2.3.6.1.- Transferència	90
2.3.6.2.- Immunodetecció	92
2.3.6.2.1.- Protocol de revelat	95
2.3.7.- Extracció de IgG dels extractes de conill	96
2.3.7.1.- Incubació amb Proteïna A-Agarosa	96
2.3.7.2.- Regeneració de Proteïna A-Agarosa	97
2.4.- Procediments de biologia molecular	98
2.4.1.- Extracció de l'RNA	98

2.4.1.1.- Neteja del Polytron	98
2.4.1.2.- Quantificació de RNA	99
2.4.1.3.- Avaluació de la qualitat de RNA, gel d'agarosa per RNA	100
2.4.2.- Obtenció de cDNA, retrotranscripció	102
2.4.3.- Reacció en cadena de la polimerasa, PCR	103
2.4.3.1.- Electroforesi en gel d'agarosa per DNA	105
2.4.4.- Seqüenciació parcial del mRNA/cDNA dels gens Pfkfb1 (isoformes hepàtica i muscular), Pfkfb2 i Pfkfb4 de conill	107
2.4.4.1.- Disseny dels oligonucleòtids per la seqüenciació	107
2.4.4.2.- Producció dels fragments de DNA a seqüenciar	112
2.4.4.3.- Extracció d'un fragment de DNA d'un gel d'agarosa	112
2.4.4.4.- Seqüenciació dels fragments de DNA	114
2.4.5.- PCR a temps real	122
2.4.5.1.- Assaigs de PCR a temps real	122
2.4.5.1.1.- Assay-on-Demand	125
2.4.5.1.2.- Detecció de Pfkfb1 muscular en rata	125
2.4.5.1.3.- Detecció de Pfkfb1 hepàtica en rata	126
2.4.5.1.4.- Detecció de Pfkfb3 total (cervell-ubiqua) muscular en rata	126
2.4.5.1.5.- Detecció de Pfkfb1 muscular en conill	127
2.4.5.1.6.- Detecció de Pfkfb1 hepàtica en conill	127
2.4.5.1.7.- Detecció de Pfkfb2 en conill	128
2.4.5.1.8.- Detecció de Pfkfb4 en conill	128
2.4.5.2.- Optimització dels assaigs de PCR a temps real	129
2.4.5.2.1.- Optimització dels <i>forward</i> i <i>reverse primers</i>	129
2.4.5.2.2.- Optimització de la sonda	131
2.4.5.3.- Resultats de la PCR a temps real	131
2.4.5.3.1.- Què s'obté? i què indica?	131
2.4.5.3.2.- Normalització dels resultats	132
2.4.5.3.3.- Càlcul dels resultats, quantificació relativa	133

CAPÍTOL 3. Resultats**3.1.- Patró d'expressió dels diferents gens que codifiquen per PFK-2/FBPasa-2 en el transcurs del desenvolupament del teixit muscular esquelètic i cardíac.**

3.1.1.- Introducció	137
3.1.2.- Concentració de Fru-2,6-P ₂ en diferents teixits de rata	138
3.1.3.- Contingut dels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2	140
3.1.3.1.- Cor de rata	141
3.1.3.2.- Múscul de rata	141
3.1.4. Expressió dels gens que codifiquen pels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2	147
3.1.4.1.- Cor de rata	147
3.1.4.2.- Múscul de rata	151
3.1.5.- Discussió	155
3.1.6.- Conclusions	159

3.2.- Diferències entre un múscul de contracció ràpida (TA) i un múscul lent (Soleus).

3.2.1.- Introducció	160
3.2.2.- Concentració de Fru-2,6-P ₂ en diferents teixits de rata	161
3.2.3.- Activitat PFK-2	161
3.2.4.- Contingut dels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2	162
3.2.5. Expressió dels gens que codifiquen pels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2	165
3.2.6.- Discussió	168
3.2.7.- Conclusions	169

3.3.- Paper de la Fru-2,6-P₂ en la contracció del múscul esquelètic.

3.3.1.- Introducció	171
3.3.2.- Estudi de la força dels músculs <i>Tibialis anterior</i> en diferents situacions contràctils.	176

ÍNDIX

3.3.3.- Test de fatiga en músculs sotmesos en diferents situacions contràctils	176
3.3.4.- Concentració dels metabòlics energètics	179
3.3.5.- Consum d'ATP i pH	180
3.3.6.- Concentració dels metabòlits intermediaris de la via glucolítica	183
3.3.7.- Concentració dels sucres bisfosforilats; Fru-2,6-P ₂ i Glu-1,6-P ₂	185
3.3.8.- Paràmetres glucolítics i glucogenolítics	187
3.3.9.- Discussió	191
3.3.10.- Conclusions	195
3.4.- Estudi de la regulació de la isoforma muscular de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en temps llargs d'estimulació i durant el descans.	
3.4.1.- Introducció	196
3.4.2.- Concentració de la Fru-2,6-P ₂ en diferents situacions contràctils	199
3.4.3.- Activitat PFK-2	199
3.4.4.- Contingut dels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2	200
3.4.5.- Expressió dels gens que codifiquen pels isoenzims de PFK- 2/FBPasa-2	203
3.4.6.- Discussió	207
3.4.7.- Conclusions	209
CAPÍTOL 4 – Discussió general	211
CAPÍTOL 5 – Conclusions	219
CAPÍTOL 6 – Bibliografia	223
Annex 1.- Manuscrit de l'article	
“Effects of dietary <i>trans</i> fatty acids, saturated fatty acids and fat levels on glucose metabolism in experimental animals. ”	241

CAPÍTOL 1

INTRODUCCIÓ GENERAL

La fructosa-2,6-bisfosfat (Fru-2,6-P₂) és un sucre bisfosforilat que no intervé directament en cap via metabòlica, si ve ha estat reconegut com a element clau en la regulació de la glucolisi i gluconeogènesi hepàtica. S'ha demostrat el seu paper d'activador al·lostèric de l'enzim 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1), aquest enzim és el punt de regulació més important en la via glucolítica. Ha estat considerat clau en el metabolisme cardíac, tot i que cada cop hi ha més evidències del seu paper dins el metabolisme muscular, la seva implicació en el múscul esquelètic encara no s'ha aclarit. L'estudi d'aquest metabòlit i l'enzim que en regula la seva formació i degradació, 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa-2), en el múscul esquelètic sotmès a diferents situacions contràctils pot aportar nova informació que ens ajudi a entendre el paper de la Fru-2,6-P₂ en aquest teixit.

1.1.- El múscul

El múscul és un sistema molt eficient de reconversió energètica; promou la transformació de l'energia química, en forma d'ATP, en energia mecànica, la qual generarà la contracció muscular.

El teixit muscular és molt heterogeni, fruit d'aquesta heterogeneïtat no existeixen dos múscul idèntics, músculs homòlegs de diferents espècies i fins i tot dins del mateix animal presenten diferències en la composició fibril·lar. La plasticitat funcional permet al múscul adaptar-se a diferents situacions contràctils, aquesta propietat sembla ser essencial per les seves diverses funcions i es basa en la pròpia heterogeneïtat.

1.1.1.- Tipus de músculs

Els músculs poden classificar-se en **estriats** o **llisos**, aquesta nomenclatura s'obté a partir de l'observació de la secció longitudinal de cada tipus muscular a través del microscopi òptic. En la figura, que es presenta a continuació, s'aprecien les diferències entre els esmentats músculs.

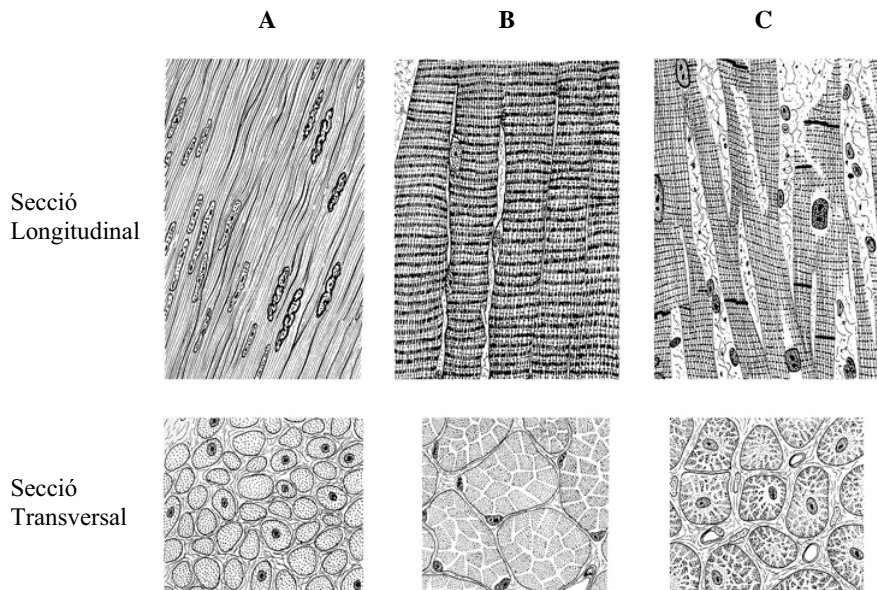


Figura 1.1.1: Seccions longitudinals i transversals de musculatura llisa (A), estriada B (esquelètica) i estriada C (cardíaca). Augment x400. (Segons H.Leonhard:Histologie,Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 8ª.ed. thieme,1990).

La major part dels **músculs estriats** estan sotmesos al control voluntari, és a dir, la contracció d'aquests es desencadena per impulsos nerviosos motors. Els músculs estriats són llargs feixos de fibres musculars, de 20 μ m a 100 μ m de diàmetre, que discorren paral·leles i poden ocupar tota la longitud del múscul. Aquestes fibres són cèl·lules multinucleades originades en el desenvolupament del múscul, a través de la fusió dels extrems de nombroses cèl·lules precursors. Alhora, les fibres musculars estan constituïdes per feixos paral·lels de miofibril·les, de 1 μ m a 2 μ m de diàmetre, les quals poden presentar tota la longitud de la fibra. La unitat de repetició de la miofibril·la és el sarcòmer, la longitud del qual, en un múscul en situació de repòs, és de 2,5 μ m a 3,0 μ m. La contracció del múscul provoca el progressiu escurçament dels sarcòmers.

Les estries que presenten les fibres musculars dels músculs estriats provenen d'una estructura en forma de bandes subjacents constituïdes per múltiples miofibril·les en fase.

Les bandes estan formades per regions alternades de densitat electrònica major i menor, anomenades banda A i banda I, respectivament.

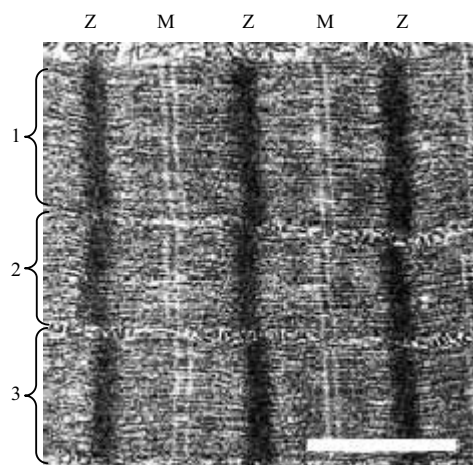


Figura 1.1.2: Micrografia electrònica d'un múscul control en secció longitudinal. Es distingeixen 3 miofibril·les (1-3), en el seu interior s'aprecien les línies M i Z, totes elles alineades i perpendiculars al sentit en què discorren les miofibril·les (el múscul està en fase). L'escala representa 1µm. (micrografia electrònica realitzada per J.A. Frias).

Els sarcòmers s'uneixen per les línies Z, els quals ocupen el centre de la banda I. A la regió central de la banda A s'hi localitza la zona H, la qual disposa en el seu centre la línia M (Fig. 1.1.2 i 1.1.3B). La secció transversal del sarcòmer ens proporciona l'explicació de l'origen de les estries observades en la figura 1.1.2. La zona H conté una sèrie de filaments gruixuts paral·lels empaquetats hexagonalment i de 150Å de diàmetre, mentre que la banda I consta del doble de filaments prims, de 70Å de diàmetre, ordenats hexagonalment i fixats a la línia Z. Les regions més fosques de cada banda A indiquen les regions on els dos grups de fibres es creuen o intercalen en orientacions paral·leles. Els filaments gruixuts i prims s'associen en aquesta regió a través de ponts transversals.

Els filaments gruixuts estan constituïts per miosina (Fig. 1.1.3C), aquesta heteroproteïna consta de 6 cadenes polipeptídiques, dues cadenes pesades (MHC) i dues parelles de cadenes lleugeres diferents, anomenades MLC1 i MLC2. Aquesta proteïna presenta propietats fibroses i globulars, la meitat N-terminal de les cadenes pesades es plega formant un cap globular, S1, mentre la meitat C-terminal forma una cua fibrosa α -helicoidal, les dues cues fibroses de la miosina s'associen per formar un enrotllament que acaba generant una estructura en forma de vareta. Els filaments gruixuts consten de centenars de molècules de miosina, on les cues en forma de vareta s'empaqueten cua amb cua formant una sèrie escalonada regular. Aquest filament doncs, presenta una

entitat bipolar, els caps globulars de la miosina es projecten des de cada extrem deixant una regió central al descobert. A part de presentar una funció estructural la cadena pesada de la miosina és una ATPasa, hidrolitza ATP a ADP i P_i , en una reacció que proporciona l'energia necessària per la contracció muscular.

En els filaments gruixuts apareixen altres proteïnes a part de la miosina, les quals poden unir-se a la miosina (myosin binding proteins o MBP). La *proteïna C* o *MBP-C* s'uneix a la miosina a intervals regulars. L'extrem C-terminal conté un lloc d'unió a la porció de miosina que constitueix la vareta, així com un lloc d'unió per la *titina* (Furst i col. 1992; Okagaki i col. 1993). Una altra proteïna capaç d'unir-se a la miosina és la *titina* (Fig. 1.1.3B). Aquesta proteïna és extremadament gran (3000 kDa) i presenta unes seqüències específiques d'unió a proteïnes de la línia Z (*actinina* i *teleonina*), actina, miosina i proteïnes de la línia M (Labeit i Kilmerer, 1995). La *titina* connecta la línia Z i el filament prim per un costat amb la línia M i el filament gruixut per l'altra. La regió de *titina* no associada en la banda I es considerada la responsable de la tensió passiva i dels estiraments en fibres musculars.

Existeixen dues proteïnes més que també poden unir-se a la miosina, concretament a la regió C-terminal, i a la *titina*, extrem C-terminal, es localitzen a la línia M: *miomesina* i la *proteïna M* (*MBP-M*). Aquestes dues proteïnes juntament amb la creatina quinasa MM (*CK_{MM}*), la miosina i la *titina* formen el complex estructural de la línia M.

La *proteïna H* (*MBP-H*) també pot unir-se a la miosina, concretament es localitza a ambdós costats de la línia M, en un lloc específic del filament gruixut.

El principal component dels filaments primers és l'actina (Fig. 1.1.3C), tot i que no és l'únic, també en formen part la *tropomiosina*, la *troponina* i la *nebulina*. L'actina en condicions fisiològiques es polimeritza constituint actina F (o fibrosa), filament de doble hèlix que constitueix el centre del filament prim. L'actina F s'uneix a banda i banda de la línia Z, associant-se als caps globulars S1 de la miosina (1 monòmer d'actina – 1 cap S1), a cada costat de la línia Z l'estructura formada per l'actina i els caps de miosina presenta orientació oposada.

La *tropomiosina* està formada per 2 subunitats que s'enrosquen entre elles orientades cap amb cua. L'heterodímer és capaç d'enrotllar-se al voltant del solc que forma l'hèlix

d'actina F, de tal manera que cada tropomiosina contacte amb 7 monòmers consecutius d'actina. Aquesta proteïna contribueix en la rigidesa dels filaments primers (Kojima i col. 1994), així com a regular les interaccions actina-miosina (Geeves i Lehrer, 1994).

La *troponina* (Tn) consta de 3 subunitats: TnC, TnI i TnT. La TnC pertany a la mateixa família que les MLC, calmodulina i parvalbumina, és doncs una proteïna capaç d'unir calci. La TnI presenta llocs d'unió a la TnC, la TnT i a l'actina, aquest llocs d'unió li permeten a la TnI interferir directament la interacció actina-miosina en relació amb la unió de calci a TnC. La TnT presenta llocs d'unió a la TnC, la TnI i 2 llocs per a la tropomiosina. El primer lloc d'unió a tropomiosina (TnT2) es localitza molt a prop dels llocs d'unió a TnC i TnI, conferint sensibilitat a calci, l'altre lloc d'unió a tropomiosina (TnT1) és insensible a calci (Perry, 1998; Solaro i Rarick, 1998).

La regió C-terminal de la proteïna *nebulina* forma part integral de l'estructura de la línia Z. Mentre la regió N-terminal es projecta cap a la banda I actuant com a guia pels filaments primers (Millevoi i col. 1998).

Existeixen algunes proteïnes musculars minoritàries que controlen la interacció de les miofibril·les. La línia Z és el punt d'enclavament de dos grups de filaments primers orientats en sentits oposats. L' α -actinina juntament amb el domini N-terminal de la titina, la nebulina i altres proteïnes (tensina, proteïna Z, teletonina) constitueixen l'estructura de la línia Z. L' α -actinina, permet unir els filaments primers a la línia Z.

Els ponts transversals entre els filaments gruixuts i els primers s'estableixen entre els caps globulars de les miosines i l'actina F dels filaments primers. El complex tropomiosina-troponina regula la contracció muscular, controlant l'accés dels ponts transversals de les S1 de la miosina al seus llocs d'unió en l'actina.

Les fibres musculars estriades presenten unes connexions neuromusculars (les plaques motores) que transmeten l'impuls nerviós directament al sarcòmer a través dels túbuls transversals o túbuls T, invaginacions de la membrana plasmàtica de les fibres musculars (sarcolema) que envolten cada miofibril·la en la línia Z (Fig. 1.1.3.A). El senyal elèctric es transmet al reticle sarcoplasmàtic (RS) a través d'una sèrie dels canals

i receptors; els canals de dihidropiridina dependents de voltatge (DHPR) es troben al sarcolema de les fibres musculars, més concretament en els túbuls-T, en rebre el senyal despolaritzant s'obren permetent l'entrada de calci extracel·lular a la fibra muscular. Alhora aquesta obertura dels canals DHPR provoca un canvi en l'estructura del receptor de rianodina (RyR), el qual està situat en el RS i promou la sortida de calci del RS a l'espai intracel·lular. Quan s'atura l'estímul nerviós, la membrana del RS torna a ser impermeable al calci i la Ca^{2+} -ATPasa comença a bombejar calci cap a l'interior del RS, produint-se el relaxament del múscul.

A nivell de la miofibril·la, la contracció muscular és regulada pel calci, aquest control es realitza a través de la troponina i tropomiosina. El complex contràctil; actina, miosina, troponina, tropomiosina requereix ATP i Ca^{2+} per poder generar la contracció del múscul. La subunitat TnC, tal i com s'ha comentat anteriorment, és el component que uneix calci, la seva interacció provoca un moviment de la tropomiosina que deixa al descobert, en l'actina, els llocs d'interacció amb la miosina. Els caps S1 de la miosina podran unir-se a l'actina, iniciant així el mecanisme de contracció muscular.

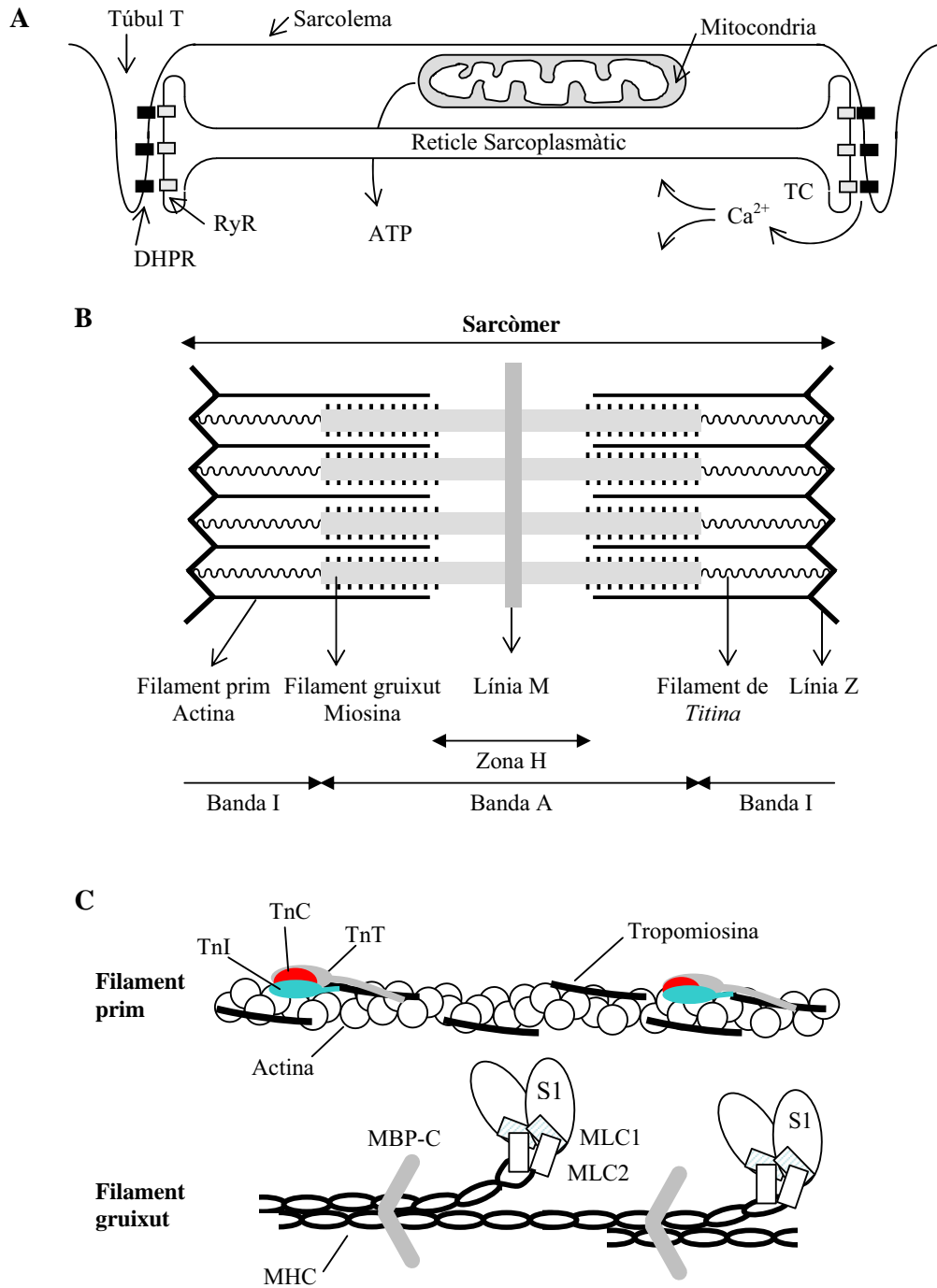


Figura 1.1.3.: Esquema de l'estructura involucrada en la resposta contràctil. A) Sarcolema amb els túbuls T, el reticle sarcoplasmàtic amb les cisternes terminals (TC) i els receptors de Rianodina (RyR) i dependents de voltatge (DHPR). B) El sarcòmer amb els filaments gruixuts i primers. C) Ampliació dels filaments gruixut i primers (modificació a partir de Bottinelli i Reggiani, 2000).

Fins ara s'han comentat les característiques i estructures presents en els músculs estriats però existeixen dos subgrups de músculs estriats; els músculs **cardíacs** i **esquelètics (de contracció lenta i de contracció ràpida)**.

Els músculs cardíacs i esquelètics (tan de contracció lenta com ràpida), presenten una organització molt semblant tot i presentar algunes divergències apreciables en la figura 1.1. Analitzant les proteïnes implicades en la contracció, s'observa la presència de les mateixes molècules però amb algunes modificacions, és a dir cada tipus muscular presenta les seves pròpies isoformes, les quals s'originen en isogens diferents o bé a través de maduracions post-transcripcionals tall-i-unió (*splicing*) alternatives a partir del mateix gen.

Les principals diferències entre els músculs estriats són metabòliques, el múscul cardíac ha de funcionar contínuament durant tota la vida, per tan dependrà més del metabolisme aeròbic del que en depèn el múscul esquelètic. Els cardiomiòcits poden contraure's espontàniament en vertebrats, però a través del sistema nerviós simpàtic s'aconsegueix que totes les cèl·lules del miocardi es contraguin alhora.

El múscul esquelètic és un teixit molt heterogeni, aquesta propietat sembla ser essencial per les seves diverses funcions. El múscul esquelètic ha de respondre a un determinat rang de demandes funcionals en cada espècie. En cada espècie les demandes són diferents i per tan les característiques d'aquest teixit dependran de l'espècie i de la funció a realitzar. La flexibilitat funcional permet que el teixit muscular sigui utilitzat en diferents tasques; manteniment de postura, contraccions repetides de força submàxima o contraccions ràpides i de força màxima. La funció de cada múscul bé determinada per 1) un potent control nerviós, la descàrrega aplicada per les motoneurons i el reclutament que genera 2) la presència d'un o altre tipus de fibres muscular, cada tipus de fibra presenta característiques funcional diferents, temps de contracció, pic de força, resistència e la fatiga, entre altres.

Els **músculs llisos** són responsables de les contraccions lentes, de llarga durada i involuntàries, de diversos teixits. Aquest tipus muscular és present en les parets intestinals, a l'úter, en grans vasos sanguinis, etc. La seva organització difereix de la presentada en els músculs estriats (Fig. 1.1.1), concretament, el múscul llis consta de cèl·lules mononucleades en forma de fus, els filaments gruixuts i prims estan alineats més o menys en l'eix longitudinal de la cèl·lula, sense formar miofibril·les.

L'aparell contràctil del múscul llis presenta algunes modificacions respecte al múscul estriat. D'entrada la miosina implicada en la contracció és originada a partir d'un gen diferent i alhora és funcionalment diferent. Aquesta miosina difereix de la miosina del múscul estriat en 1) l'activitat ATPasa molt inferior a la presentada pel múscul estriat, 2) només interacciona amb l'actina quan les cadenes lleugers (MLC) estan fosforilades i 3) els ponts transversals dels filaments gruixuts no són regulars i es troben distribuïts en tot el filament prim.

Els filaments prims del múscul llis no presenten troponina, tot i així la contracció d'aquest múscul es desencadena per calci, perquè la quinasa de les cadenes lleugeres de la miosina (MCL) només és actiu quan s'associa amb Ca^{2+} -Calmodulina. Aquesta quinasa fosforil·la les MCL permetent la interaccionar de la miosina del múscul llis amb l'actina (Hirano i col. 2004).

La contracció del múscul llis està subordinada al sistema nerviós autònom, el qual pot alterar la permeabilitat de la membrana plasmàtica del múscul llis, provocant un augment de la concentració de calci intracel·lular, aquest fet genera l'inici de la contracció. Quan la permeabilitat de la membrana es restableix, la Ca^{2+} -ATPasa expulsa a l'exterior el calci intracel·lular disminuint la seva concentració, arribant així la fase de relaxació muscular.

1.1.2.- Tipus de fibres musculars

El múscul esquelètic està compost per un gran nombre de fibres. L'existència de diferents tipus de fibres i la seva proporció definirà la funcionalitat del múscul. Els músculs posturals (tònics) presenten una major proporció de fibres de contracció lenta que els músculs adaptats a la mobilitat corporal (fàsics), els quals presenten majoritàriament fibres de contracció ràpida.

La classificació dels diferents tipus de fibres musculars es basa en criteris, morfològics, hitoquímics/bioquímics i funcionals. Els paràmetres emprats per a fer la classificació morfològica són; el color i el diàmetre de la fibra, la densitat de capil·lars i el volum mitocondrial. D'aquí se'n desprenen 3 tipus de fibres : FTa o FTb (Fast-Twitch), 2 tipus de fibra de contracció ràpida, ST (Slow-Twitch), de contracció lenta.

	FTb	FTa	ST
Color	blanc	Blanc/vermell	Vermell
Diàmetre de la fibra	↑	Intermedi	↓
Densitat de capil·lars	↓	Intermedi	↑
Volum mitocondrial	↓	intermedi	↑

Taula 1.1.1: Característiques morfològiques de les fibres musculars.

Per establir la classificació histoquímica/bioquímica s'utilitzen: l'activitat de la miosina-ATPasa, la capacitat de segrestar calci, la capacitat glucolítica i la capacitat oxidativa. Es poden diferenciar 3 tipus de fibres emprant el metabolisme glucolíci o oxidatiu; FG, ràpida-glucolítica, FOG, ràpida-glucolítica/oxidativa i SO, lenta-oxidativa. (Barnard i col.1971; Peter i col. 1972). A partir d'aquesta divisió s'associa la classificació histoquímica, que ens presenta els diferents grups en funció de la isoforma de cadena pesada de la miosina (MHC), les fibres de contracció ràpida presenten 3 isoformes de MHC; IIA, IIB i IID o IIX, mentre que les fibres lentes només presenten un tipus, MHC-I (Bar i Pette1988).

Bioquímica	FG	FOG		SO
Histoquímica	IIB	IIX o IID	IIA	I
Activ. Miosina-ATPasa	↑	↑	↑	↓
Cap. de segrestar Ca ²⁺	↑	intermedi/↑	intermedi/↓	↓
Cap. Glucolítica	↑	↑	↑	↓
Cap. Oxidativa	↓	intermedi/↑	intermedi/↓	↑

Taula 1.1.2: Característiques bioquímiques/histoquímiques de les fibres musculars.

La classificació segons la funció i contracció pren com a paràmetres la velocitat de contracció i relaxació, la resistència a la fatiga i la força a la contracció, donant com a resultat tres tipus de fibres; FF/FT, de contracció ràpida fatigable; FR/ST, de contracció ràpida resistent a la fatiga; S/ST de contracció lenta no fatigable. (Burke, 1971)

Funció Contracció	FF/FT	FR/FT	S/ST
Vel. contracció	↑	↑	↓
Vel. relaxació	↑	↑	↓
Resistència a la fatiga	↓	Moderada/↓	↑
Força de contracció	↑	Intermedi	↓

Taula 1.1.3: Característiques funcionals de les fibres musculars.

En l'anterior apartat, s'ha comentat la relació o implicació del sistema nerviós en la contracció del múscul. Però el sistema nerviós o més concretament les neurones implicades en la excitació del múscul (motoneurones) juguen també un altre paper important, determinen les propietats de les fibres musculars que s'hi associen, determinant així el seu fenotip (Buller i col. 1960). Totes les fibres musculars innervades per la mateixa unitat motora presenten el mateix fenotip (Kugelber i Edström, 1968).

Les neurones (motoneurones) que innerven les fibres de contracció lenta o tònic presenten un patró d'estimulació a baixes freqüències, entre 10Hz i 20Hz, en canvi les fibres musculars ràpides o fàsiques són innervades per neurones amb patrons de freqüències d'entre 30Hz i 60Hz (Salmons i Vrbová, 1969). A partir de registres electromiogràfics en diferents tipus musculars Henning i Lømo (1985) van descriure 3 models d'estimulació generat per les motoneurones, aquests reflecteixen en els tres tipus d'unitats motores existents: S, FR i FF (Taula 1.1.4). Les fibres de tipus lent (S), responen a activitats neuronals de baixa freqüència, amb un elevat nombre d'impulsos i de llarga durada. Per altre banda, les fibres de tipus ràpid, tan les FR com FF, responen a patrons neuronals d'alta freqüència, pocs impulsos i de poca durada.

Unitat motora	S	FR	FF
Tipus de fibra			
Freqüència (Hz.)	12-29	40-100	50-111
Impulsos/ 24 h	309500-495800	89500-243100	2600-11200
Temps activitat/ 24 h	5.3-8.4h (22-35%)	23-72 (1.6-5%)	0.5-3min (0.04-0.22%)

Taula 1.1.4: Patrons d'activitat neuromotora, els quals determinen els diferents tipus de fibres. Es diferencien tres fenotips: de contracció lenta (S), de contracció ràpida resistent a la fatiga (FR) i de contracció ràpida fatigable (FF) (Henning i Lømo (1985)).

Així doncs, les propietats de les fibres musculars es defineixen segons la motoneurona que les innerva, obtenint així els diferents fenotips. En determinades circumstàncies es modifica el patró d'estimulació de la fibra muscular, fet que provoca una sèrie d'adaptacions en la fibra encara que aquesta estigui totalment diferenciada. La capacitat d'adaptació de la fibra muscular a les noves demandes funcionals rep el nom de plasticitat muscular, aquest concepte fou introduït per Eccles i col. (1963). Aquesta resposta adaptativa es basa en la transició entre els diferents tipus de fibres.

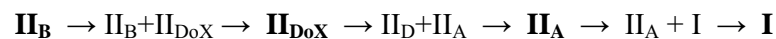
Experimentalment s'ha aconseguit modificar l'activitat elèctrica de les motoneurons així com la freqüència d'estimulació, establint que la plasticitat muscular és bidireccional, és a dir, es poden produir transicions de fibres lentes a ràpides i a la inversa (de lentes a ràpides).

L'estimulació crònica de fibres ràpides produeix canvis en les seves propietats fisiològiques, els quals acaben essent les pròpies de les fibres lentes (Salmons i Vrbová, 1969). Heilman i Pette (1979) són els primers en indicar que els canvis fenotípics induïts en les fibres ràpides a través de l'electroestimulació inclouen canvis en el mecanisme d'excitació-contracció, posteriorment altres autors (Eisenberg i Salmons, 1981; Briggs i col. 1990; Hicks i col. 1997) han recolzat aquesta idea.

El múscul és un teixit heterogeni constituït per diferents tipus de fibres, aquella que sigui majoritària definirà les propietats del múscul. Així quan es parla de plasticitat muscular, i hom considera el múscul, la transformació de múscul ràpid a lent és un

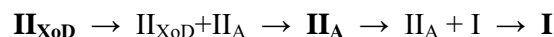
procés amb diferents estadis i consisteix en la transició seqüencial del tipus de fibra majoritari.

Els petits mamífers, com les rates i els conills, presenten la següent seqüència de transformació quan s'aplica una electroestimulació de baixa freqüència (10Hz) a músculs de contracció ràpida (Aigner i col. 1993; Leeuw i Pette 1993; Schuler i Pette, 1996; Pette i Staron, 1997).



Per completar la transformació, aquelles fibres de contracció ràpida que estan deteriorades es degraden i es substitueixen per noves fibres musculars originades a partir de les cèl·lules satèl·lit. Les noves fibres reben el nou patró d'estimulació neuromuscular, per tan acabaran essent fibres de contracció lenta. El moment màxim de regeneració arriba als 8-10 dies d'haver-se iniciat la transformació i posteriorment va disminuint (Maier i col 1986).

En els grans mamífers, com els cavalls (Serrano i col 2000) i els homes (Dubouchaud i col. 2000), la transició de fibres ràpides a lentes és lleugerament diferent, en aquests organismes no s'expressa la isoforma IIB de la miosina. A més a més, per aconseguir aquestes transformacions de músculs no s'aplica un protocol d'electroestimulació, cal realitzar entrenaments de resistència, on es potencien els músculs de contracció lenta.



L'estimulació crònica d'alta freqüència a músculs rics en fibres de contracció lenta, provoca la transformació del múscul i/o potencia l'aparició de fibres de contracció ràpida, les quals poden respondre a aquest tipus d'estímul (Salmons i Vrbová, 1969; Pette i Vrbová, 1985).

El desentrenament, quan s'ha atura el patró d'estimulació que potenciava la transició de fibres (entrenament de resistència), provoca la pèrdua de les capacitats adquirides, es produeix un lent retorn a la situació inicial. Les motoneurons en aquest procés reben els impulsos apropiats per les fibres de contracció ràpida, per tan l'estimularà la presència d'aquest tipus de fibres (Serrano i col. 2000).

En músculs denervats, s'observa una regressió en el procés de diferenciació, les fibres van perdent les característiques pròpies que permeten diferenciar-les en fibres ràpides o lentes, cal tenir present que algunes fibres d'aquests músculs s'atrofien. Lomo i col. (1985) van anar un pas més enllà aplicant un protocol d'estimulació contràctil a músculs *Soleus* previament denervats, els músculs estimulats amb un patró d'alta freqüència presentaven les característiques pròpies dels músculs ràpids, mentre els estimulats amb un patró de baixa freqüència acabaven recuperant les característiques dels músculs lents.

Daugaard i Richter (2004) han analitzat l'expressió de diferents gens (GLUT4, GS i GF) en fibres independents (I, II_A i II_X) de diferents músculs humans (*Vastus Lateralis*, *Soleus* i *Triceps Brachii*) arribant a la conclusió que l'expressió de proteïnes no només depèn del tipus de fibra, el múscul del qual provenen també defineix l'expressió final.

1.2.- Contracció muscular

L'arribada d'un estímul contràctil al múscul produeix un alliberament de calci per part del reticle sarcoplasmàtic. Aquest calci pot unir-se a la troponina, la qual permet que la tropomiosina es desplaci sobre l'actina, deixant lliure el lloc d'unió a miosina en l'actina. Els caps S1 de la miosina podran unir-se a l'actina alterant la relació angular amb l'eix del filament gruixut i provocant el lliscament d'un filament sobre l'altre, donant-se així l'escurçament del sarcòmer. La unió actina-miosina és molt estable i requereix ATP per tal de recuperar la conformació inicial, relaxament muscular. L'activitat ATPasa de la miosina és la responsable d'hidrolitzar l'ATP per obtenir l'energia necessari pel canvi de conformació.

1.2.1.- Font d'energia

Una molècula d'ATP proporciona l'energia necessària per provocar un cicle d'interacció entre els miofilaments, però cal també ATP en el procés de relaxació, aquest és emprat per la Ca^{2+} -ATPasa per traslladar el calci citoplasmàtic al reticle sarcoplasmàtic, a l'espera d'una nova estimulació.

La intensitat i la durada de la contracció determinen la despesa energètica que ha de suportar el múscul. En repòs el múscul utilitza 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, el primer és immediat, en el qual s'utilitzen d'enllaços fòsfor ja existents en el múscul, l'ATP així com la hidròlisi de la creatina-fosfat (CrP) en creatina i ATP. El segon mecanisme, menys ràpid, requereix la formació de nous enllaços fòsfor. Els quals s'obtenen amb la participació del potencial oxidatiu de la fibra muscular.

La quantitat d'ATP disponible pel múscul durant la contracció s'ha de mantenir constant per garantir la resposta del múscul, això implica una regeneració constant. El mecanisme que produeix aquesta regeneració depèn de l'exercici realitzat; en condicions anaeròbiques, s'utilitza la via glucolítica, mentre que en condicions aeròbiques és la β -oxidació la via que proporciona major ATP.

Segons Hultman i Sjöholm (1983) l'ATP intramuscular dona l'energia suficient per 5s en una contracció del 50%-70% de força màxima voluntària i la CrP pot donar l'energia suficient per 14 segons més, per tan és necessària la utilització d'altres fonts d'energia per poder mantenir exercicis de més llarga durada. Serresse i col (1988) diuen que la combinació ATP/CrP subministra energia entre els 0s i 10s. Un múscul sotmès a un exercici intens presenta el pic de força màxima entre els 5s i 10s, en experiments duts a terme per Beneke i col. (2002) s'ha demostrat que la glucòlisi permet la regeneració de l'ATP entre els 5s i 30s de l'exercici. El metabolisme aeròbic s'encarrega de subministrar l'energia necessària per mantenir la contracció a partir d'aquest moment.

En un exercici de màxima activitat, a un 130% de VO₂ màx. durant 192 segons, Bangsbo i col. (1990) van quantificar les contribucions dels metabolismes anaeròbics i aeròbics, durant els primers 30s d'exercici el metabolisme anaeròbic aportava el 80% de l'ATP mentre el metabolisme aeròbic només el 20%. En els últims 70s inverteixen les dades passant a ser del 30% i 70% respectivament.

1.2.1.1.- ATP i CrP/Creatina

En resposta a un estímul contràctil, el primer substrat que s'utilitza és el propi ATP que hi ha emmagatzemat al múscul. L'enzim responsable de produir la transformació d'energia química en mecànica és la miosina ATPasa que catalitza la hidròlisi de l'ATP en ADP i P_i.

L'adenilat quinasa regula les concentracions relatives dels nucleòtids d'adenina catalitzant la reacció reversible: $AMP + ATP \leftrightarrow 2ADP$, la qual es considera molt propera a l'equilibri, per tan un augment en la concentració d'ADP durant la contracció s'estimula la producció d'ATP.

La regeneració d'ATP a través d'aquesta reacció no és suficientment ràpida perquè durant la contracció la demanda d'ATP pot augmentar fins a 300 vegades en fraccions de segon (Sahlin i Katz,1988).

Per tal de minimitzar el desequilibri, la creatina quinasa (CK) catalitza la hidròlisi de la creatina fosfat: $CrP + ADP \leftrightarrow Creatina + ATP$. 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).

L'activitat persistent o extenuant produeix la caiguda de la força muscular, el contingut del citoplasma s'altera per la necessitat de compensar la demanda d'ATP, en aquest punt s'aprecia una disminució del contingut de CrP, ATP, glucogen i l'augment d'altres elements, com P_i , ADP, AMP, IMP i lactat.

Paper del cicle de nucleòtids de purina o cicle de Lowenstein

Per tal de desplaçar la reacció catalitzada per l'adenilat quinasa, i redirigir-la cap a la síntesi d'ATP, la cèl·lula pot disminuir la quantitat d'AMP. L'AMP pot ser desaminat per l'adenilat desaminasa de forma irreversible donant IMP i amoníac (NH_3), l'alternativa a aquest procés és la desfosforil·lació de l'AMP, donant adenosina i P_i , mitjançant l'enzim 5-nucleotidasa. A partir d'aquí, l'adenosina i l'IMP poden ser degradats fins a urats. L'IMP pot ser convertit en 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 activitats enzimàtiques del qual són molt baixes.

Quan es produeix una gran despesa d'ATP, la presència d'aquest cicle no garanteix el subministrament necessari d'energia per mantenir la contracció muscular. L'adenina i l'IMP que es troben en excés s'alliberen al torrent sanguini evitant així l'acumulació en el citoplasma, en aquest punt, es requereix de la síntesi de novo de nucleòtids d'adenina, per formar l'ATP, mecanisme que requereix més temps. En aquestes condicions el múscul presenta fatiga o incapacitat de respondre a estímuls contràctils.

Sahlin i Katz (1988) descriuen diverses funcions pel cicle de Lowenstein:

- 1.- La regulació de la glucòlisi a través de l'acumulació de NH_3 . L'ió amoni és un activador de la fosfofructoquinasa (Sugden i Newsholme, 1975). Tot i que NH_3 podria actuar com amortidor del pH durant la fatiga, Mutch i Banister (1983) demostren que només pot tamponar el 3% dels protons produïts.

2.- La regulació de la glucogenòlisi a través de l'IMP.

La concentració d'IMP augmenta considerablement durant la fatiga en les fibres musculars on ha disminuït el glucogen (Broberg i Sahlin, 1989). La desaminació de l'AMP està relacionada amb l'acidificació del medi, ja que un pH àcid activa l'adenilat desaminasa. En el múscul de contracció ràpida de rata estimulada elèctricament l'activitat de l'AMP desaminasa només augmenta quan el pH disminueix a 6,6, en canvi, en un múscul de contracció lenta no es forma lactat suficient per baixar el pH amb la qual cosa no s'acumula IMP (Dudley i Terjung, 1985; Whitlock i Terjung, 1987). Però aquesta desaminació no només està lligada a l'acidosi, sino que també està relacionada amb el desequilibri entre la utilització i resíntesi d'ATP, que genera una acumulació d'ADP i AMP (Sahlin i Katz, 1988).

L'IMP és un potent activador de la glucogen fosforilasa (Aragón i col. 1980). 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 l'acumulació d'IMP (Guha i Rose, 1982), però aquest efecte activador no ha estat descrit al múscul (Bassols i col. 1991). Una activació d'aquest enzim faria disminuir la concentració de Glu-1,6-P₂, la qual cosa provocaria una disminució de la inhibició que ocasiona aquest metabòlit a la hexoquinasa i la glucosa sanguínia que entrés podria ser fosforilada.

3.- El subministrament d'intermediaris al cicle de Krebs a través del fumarat.

Cada vegada que es forma AMP a partir d'IMP s'obté una molècula de fumarat, la qual cosa podria tenir una funció anapleròtica, generant intermediaris pel 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 tan la producció oxidativa d'energia (Aragón i col. 1981; Sahlin i Katz 1988).

4.- La desaminació d'aminoàcids, a través de l'aspartat.

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

5.- Manteniment d'una bona relació [ATP]/[ADP].

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. La importància de mantenir una relació [ATP]/[ADP] alta pot ser causada pel fet que l'energia produïda per la hidròlisi de l'ATP disminueix quan la concentració de productes (ADP i P_i) augmenta (Newsholme i Start, 1974)

1.2.1.2.- Glucòlisi i glucogenòlisi

El múscul esquelètic és el principal magatzem de glucogen, polímer de glucoses, sempre i quan es consideri la seva massa total, essent molt important en la regulació de la glucosa circulant. La glucosa sanguínia entra al múscul a través d'una sèrie de transportadors (GLUT), aquesta entrada es produeix tan en situacions d'alta demanda energètica, com de baixa demanda. Les diferents condicions determinaran el nombre de transportadors habilitats per fer el transport i per tan el flux de glucosa s'incrementarà o disminuirà en funció de les necessitats del teixit.

Així que la glucosa entra al citoplasma de la cèl·lula muscular és ràpidament fosforil·lada per l'hexoquinasa (HK) formant glucosa-6-fosfat (Glu-6-P). La qual en una situació de baixa demanda energètica seguirà la via glucogenogènica per tal de ser emmagatzemada en forma de glucogen. En canvi, quan la demanda energètica és alta, la Glu-6-P s'utilitza pel manteniment d'un bon flux glucolític.

La glucòlisi és la via metabòlica per la qual la glucosa es transforma, a través de l'intermediari Fru-1,6- P_2 , a piruvat amb la producció de 2 mols d'ATP per mol de glucosa utilitzada. Aquesta via metabòlica és present en tots els teixits i organismes, és doncs una via ubíqua. El paper catabòlic està molt ben analitzat i desglossat en les 10 reaccions que la constitueixen (Fig. 1.2.1) però cal dir que la glucòlisi subministra els precursors C_3 i C_2 a vies anabòliques que permeten la síntesi d'àcids grassos, colesterol i aminoàcids. Sota aquesta visió alguns autors consideren la glucòlisi com una via amfibòlica. La orientació de la via (catabolisme/anabolisme) és específica de cada teixit i depèn de l'estat nutricional i/o hormonal. Així doncs, en cada teixit l'orientació pot alternar-se si les condicions són les adequades (Hue i col. 1987).

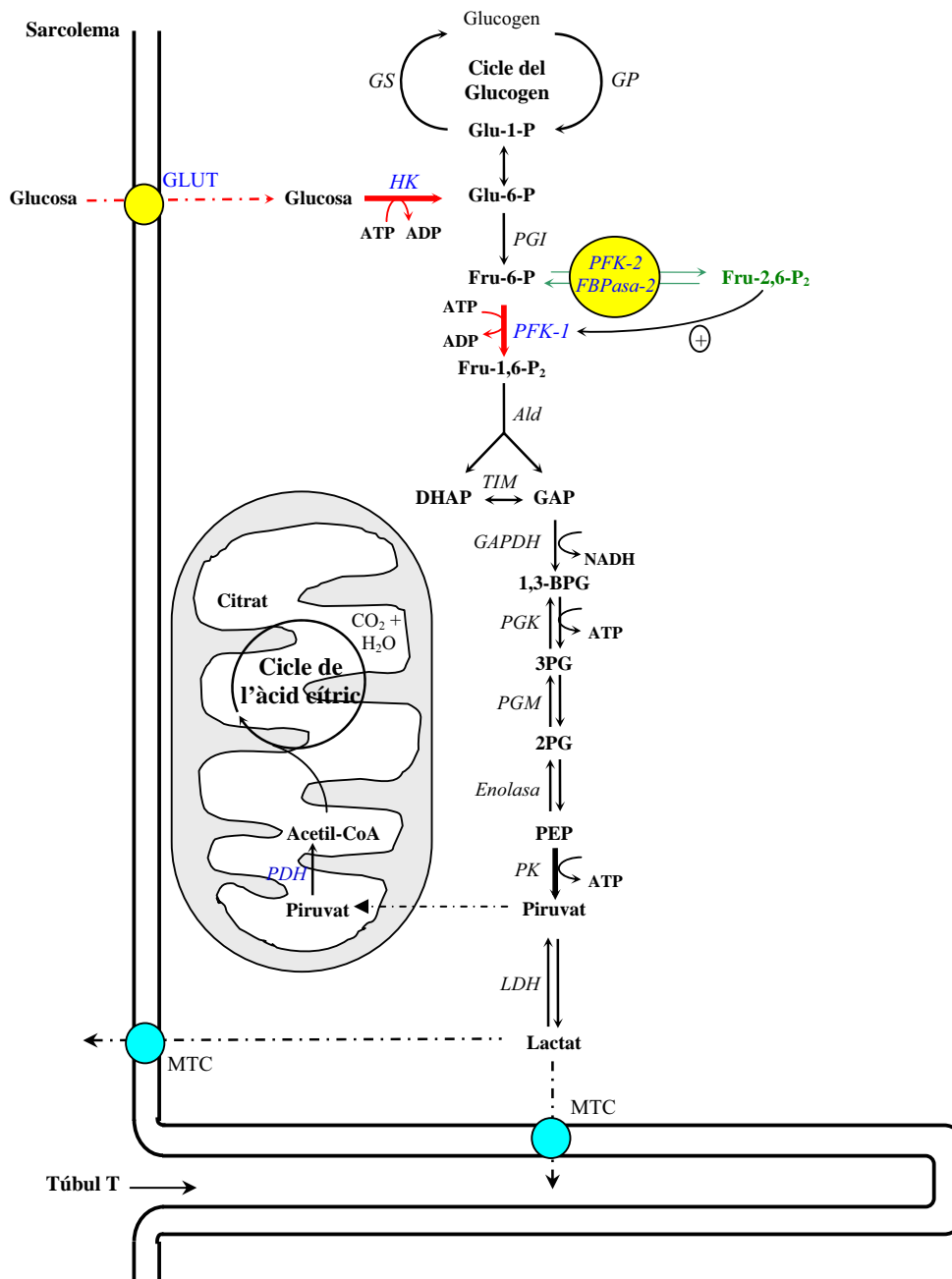


Figura 1.2.1: Esquema del metabolisme del glucogen, la glucólisi i el cicle de Krebs en el múscul esquelètic. En aquest esquema es presenten les 10 reaccions de la glucólisi, des de glucosa fins a piruvat. Les proteïnes implicades: els transportadors de Glucosa (GLUT) i d'àcids monocarboxílics (MCT), els enzims; hexoquinasa (HK), fosfoglucoisomerasa (PGI), 6-phosphofructo-1-quinasa (PFK-1), aldolasa (Ald), triosa fosfat isomerasa (TIM), Giceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH), fosfogliceratoquinasa (PGK) fosfogliceratomutasa (PGM), enolasa, piruvato quinasa (PK), lactato deshidrogenasa (LDH).

El piruvat, producte de la glucòlisi, pot transformar-se en lactat quan el teixit es troba en condicions anaeròbiques, d'aquesta manera es pot mantenir en funcionament la via catabòlica d'obtenció d'energia, gràcies a l'existència dels transportadors monocarboxílics (MCT) que s'encarreguen de treure el lactat del citoplasma i per tan eliminen la possible inhibició per producte.

En condicions aeròbiques el piruvat és transportat a l'interior de la mitocondria on seguirà la seva degradació en el cicle de Krebs.

En la contracció es produeix una despesa d'ATP, la qual és interpretada com a senyal estimulador de la glucòlisi. Petites disminucions en el contingut d'ATP intracel·lular provoquen grans augments en el flux glucolític. Aquesta resposta amplificada es produeix per la regulació que presenta aquesta via.

1.2.1.3.- El cicle de Krebs

El cicle de Krebs, o cicle de l'àcid cítric, és la via metabòlica emprada per degradar oxidativament la major part d'hidrats de carboni, àcids grassos i aminoàcids, alhora genera molts precursors per a altres vies metabòliques, és doncs una via amfibòlica.

Les reaccions que constitueixen aquest cicle es duen a terme a l'interior de la matriu mitocondrial. Així doncs, cal que els metabòlits que s'hagin d'oxidar siguin transportats des del citoplasma fins a l'interior de la mitocondria. El piruvat no forma part del cicle de Krebs, cal que sigui transformat a acetil-Coenzim A (acetil-CoA) per la piruvat deshidrogenasa (PDH).

El cicle de Krebs està constituïda un seguit de reaccions (Figura 1.2.1), les quals permeten oxidar el grup acetil de la molècula acetil-CoA a CO₂. El final del cicle per cada molècula d'acetil que es degrada s'obtenen 2 molècules de CO₂, generant alhora 3 molècules de NADH, una de FADH₂ i una de GTP.

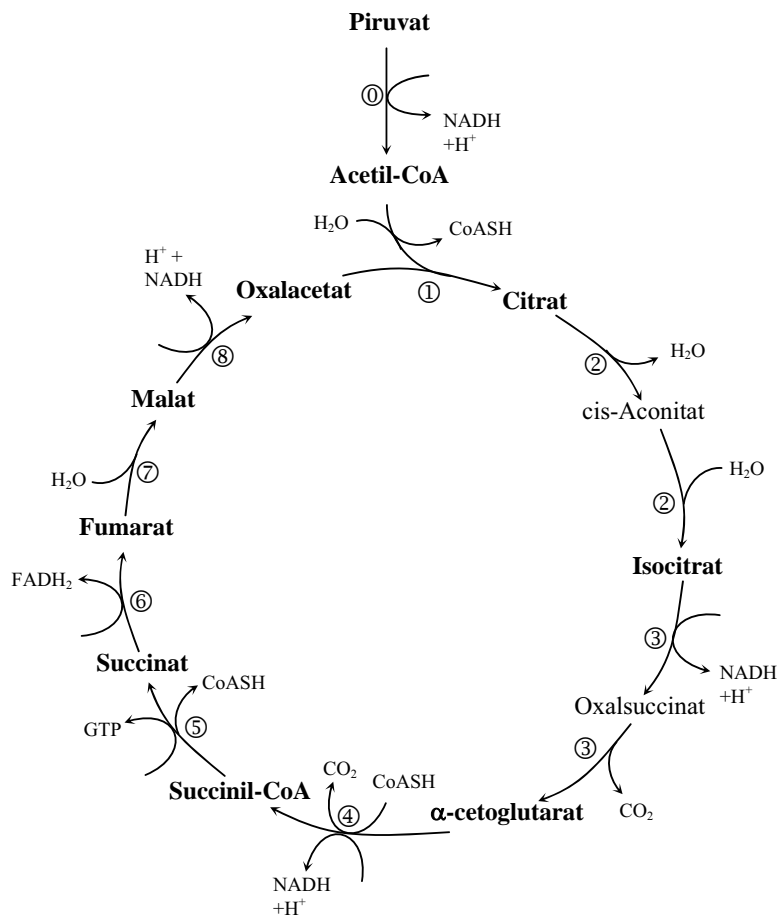


Figura 1.2.1: Esquema del cicle de Krebs. En aquest esquema es presenten les 8 reaccions del cicle de l'àcid cítric. Els enzims implicats són: la citrat sintasa (CS) ①, aconitasa ②, isocitrato deshidrogenasa ③, α -cetoglutarat deshidrogenasa ④, succinil-CoA sintasa ⑤, succinat deshidrogenasa (SDH) ⑥, fumarasa ⑦ i malat deshidrogenasa (MDH) ⑧. També hi apareix la piruvat deshidrogenasa (PDH) ① encarregada de la síntesi de l'acetil-CoA.

El NADH i el FADH₂ són reoxidats a través de la cadena de transport electrònic i la fosforilació oxidativa completant així el procés catabòlic generant una elevada quantitat d'energia en forma d'ATP. Per cada mol de NADH es generen 3 mols d'ATP i el FADH₂ produeix 2 mols d'ATP.

1.2.1.4.- Reserva energètica al múscul, el glucogen

En condicions d'hiperglucèmia, el múscul respon a la presència d'insulina incrementant la captació de glucosa (Baron i col. 1988) la qual serà emmagatzemada en forma de glucogen (Shulman i col. 1990) d'aquesta manera el múscul juga també un paper important en la homeostasi de la glucosa sanguínia.

La insulina provoca doncs un augment en la captació de glucosa i alhora activa la GS (Villar-Palasi i Laner, 1960), però encara queda clar quin d'aquests dos efectes determina la taxa de síntesi de glucogen. Existeixen dues hipòtesis; la hipòtesi del “pull”, en la qual l'activació de la GS induïda per la insulina seria suficient per provocar la síntesi del glucogen, essent el pas limitant. El mecanisme a través del qual la insulina activa la glucogen sintasa (GS) encara no s'ha acabat d'aclarir, però es realitza a través de la inactivació de la glucogen sintasa quinasa-3 β (GSK3 β). Aquesta inactivació és produïda per fosforilació per la via de la proteïna quinasa B (PKB o Akt) (Cross i col. 1995; Lawrence i Roach, 1997; Summers i col. 1999). La segona hipòtesi, el “push”, consideraria que el pas limitant és la captació de glucosa, i per tant l'increment en la taxa de síntesi de glucogen seria deguda a l'increment en la captació de glucosa.

Fins el moment, no hi ha evidències clares que puguin demostrar si l'increment de glucogen és produït per un augment en la captació de glucosa o bé per l'activació de la GS. Es creu però, que el transport de glucosa i la GS podrien contribuir de forma diferencial en el control del glucogen (revisat per Lawrence i Roach, 1997). Aquesta idea és corroborada per Fisher i col. (2002) els quals suggereixen que el transport de glucosa seria el pas limitant, en situacions en que la GS es troba activada, i en condicions en que l'estat d'activació de la GS és baix ambdós passos podrien ser limitants.

1.2.2.- Fatiga muscular

La fatiga muscular es defineix com una disminució en la capacitat de generar força a un determinat nivell (Edwards, 1981). Aquest fenomen és produït de forma gradual des de l'inici de l'exercici, tot i que els seus efectes no són visibles fins que s'arriba a l'esgotament, moment el qual la força o intensitat que es requereix en l'exercici ja no es pot mantenir (Bigland-Ritchie i col. 1986; Vollestad i Sejersted, 1988). L'esgotament depèn de la duració i intensitat de l'exercici.

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 un període de recuperació per tornar a les condicions inicials.

El fenomen de la fatiga no està totalment resolt, primer de tot cal examinar els possibles llocs on es pot donar la fatiga, segons Green (1990), alguns elements del sistema nerviós i del propi músculs intervindrien en aquest procés. Concretament en el múscul esquelètic, on es centra aquesta memòria, els elements que poden estar involucrats en la pèrdua de força durant l'exercici són:

1.- La propagació del potencial d'acció a través del sarcolema i dels túbuls-T.

L'activació muscular depèn de la propagació del potencial d'acció sobre el sarcolema, així qualsevol canvi de la composició iònica del citosol, del túbul-T o de l'espai intersticial pot afectar aquest procés i per tan evitar que es transmeti l'estímul que genera de contracció.

2.- Transmissió del senyal des del túbul-T fins al reticle sarcoplasmàtic.

En aquest pas estan involucrats els canals de dihidropiridina depenents de voltatge (DHPH) i els receptors de rianodina (RyR), qualsevol alteració en aquests elements provocaria la no transmissió del senyal i finalment no es podria donar la contracció.

3.- L'alliberament i captació de calci per part del reticle sarcoplasmàtic

La quantitat de Ca^{2+} emmagatzemada o alliberada pel reticle sarcoplasmàtic pot disminuir durant l'exercici, resultant una menor interacció entre l'actina i la miosina i per tan una disminució de la força.

4.- Les interaccions entre filaments primis i gruixuts

L'afinitat de la troponina pel Ca^{2+} també pot disminuir a causa de 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'acidosi intracel·lular que inhibeix l'activitat ATPasa de la miosina, o per exemple tots els productes intermediaris que s'acumulen durant l'exercici (lactat, Pi, H⁺, ADP, AMP, IMP, ...)

5.- La resíntesi d'ATP.

El subministrament d'energia també ha estat relacionat amb el procés de fatiga. En aquest cas es pot arribar a la fatiga a través de dos processos, el primer es caracteritza per la producció de lactat, mentre l'altre no en produeix. L'acumulació de lactat ve acompanyada per una disminució important de CrP, d'un 20% a 30% menys del contingut inicial d'ATP al finalitzar l'exercici, un augment de P_i i l'ADP i una disminució del pH. El segon tipus d'exercici es caracteritza per un descens molt acusat del glucogen muscular que impossibilita l'oxidació de lípids i de la glucosa sanguínia (Vollestad i Sejerted, 1988).

Cap dels factors presentats pot explicar el fenomen de la fatiga per si sol, és l'acumulació d'esdeveniments el que al final i en conjunt suposen la pèrdua de l'activitat contràctil.

Els entrenaments dels atletes pretenen endarrerir l'aparició de la fatiga, millorant alguns dels aspectes que podrien veure's involucrats en la fatiga. Tot i així la fatiga acaba donant-se si l'exercici persisteix i/o la intensitat és excessiva, en aquest cas l'aparició de la fatiga pot ser un sistema de protecció. La disminució persistent d'ATP produïda per l'excés d'activitat contràctil pot reduir l'activitat Ca^{2+} -ATPasa de manera que si aquesta situació es manté es produiria una acumulació de calci al citoplasma que ocasionaria la rigidesa muscular, una lesió o fins i tot una necrosi muscular depenents de calci (Westerblad i col. 1998; Lamb i col. 1995).

1.3.- REGULACIÓ DE LA GLUCÒLISI

La glucòlisi presenta tres colls d'ampolla, passos clau, que permeten un control molt acurat del flux glucolític: la captació de glucosa, l'activitat hexoquinasa (HK) i l'activitat 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1).

1.3.1.- Captació de la glucosa

En el múscul esquelètic el flux d'entrada de glucosa pot ser modulats en funció de les necessitats. Les proteïnes responsables de la captació d'aquest metabòlit són els transportadors de glucosa (GLUT); en el múscul s'expressen el GLUT1, principal responsable de l'entrada de glucosa en situacions de repòs, i el GLUT4, importantíssim per la modulació en l'entrada de glucosa com a resposta a determinades situacions (Zorzano i col. 1996). Existeix un tercer transportador, el GLUT5, en aquest cas és un transportador d'hexoses que majoritàriament s'encarrega de transportar fructosa (Hundal i col. 1992), aquest transportador es localitza al sarcolema permanentment, essent incapaç de respondre a estímuls contràctils (Hundal i col. 1998).

Ryder i col. (1999) no van observar increments en la captació de glucosa en resposta a l'exercici en ratolins transgènics que no expressaven GLUT4, aquest experiment junt amb d'altres de característiques similars van permetre argumentar la idea que en la potenciació del transport de glucosa durant l'exercici no hi participaven ni el GLUT1 ni el GLUT5.

L'increment de l'activitat contràctil (Nesher i col. 1985; Zorzano i col. 1986, Lund i col. 1995) provoca un augment en la captació de glucosa que es tradueix en un augment del flux glucolític, en múscul esquelètic. Per altre banda, la insulina provoca també un increment en la captació de glucosa per part del múscul, aquest efecte és additiu al induït per l'activitat contràctil (Whitehead i col. 2000). Això suggereix que la insulina i l'activitat contràctil estimulen la captació de glucosa per vies diferents (Fig. 1.3.1), en ambdós casos es produeix un augment de GLUT4 a la membrana plasmàtica (Revisat per Winder, 2001; Rose i Richter, 2005).

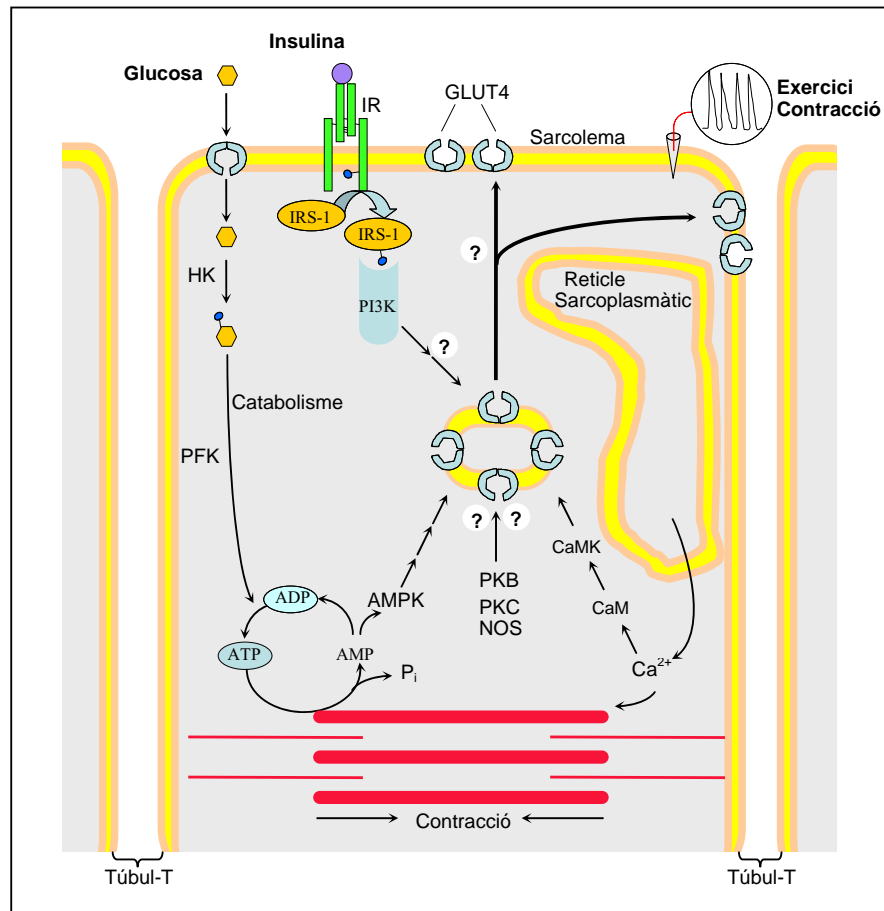


Figura 1.3.1: Regulació de la captació de glucosa en múscul esquelètic. Tan la insulina com la contracció muscular desencadenen la translocació de GLUT4 a les membranes del sarcolema i túbul-T, potenciant la captació de glucosa. En la via iniciada per la insulina, hi intervenen el receptor d'insulina (IR), els substrats del IR (IRS-1/-2), el fosfatidil inositol-3-kinasa (PI3K), entre d'altres elements. A través de la contracció muscular es produeixen diferents senyals; per exemple augment de calci i AMP intracel·lular. El calci estimula la Calmodulina (CaM) i la quinasa depenent de Ca²⁺/CaM (CaMK). Mentre l'AMP està involucrat en l'activació de la AMPK. Com es pot veure en l'esquema, encara hi ha moltes incognites. Adaptació que combina les figures presentades per Winder (2001) i Rose i Richter (2005).

L'increment en la captació de glucosa és generat principalment per la translocació del GLUT4 cap a la membrana plasmàtica (sarcolema) i als túbul-T (Ploug i col. 1998), així com l'increment en l'expressió de GLUT4 (Hofman i Pette, 1994). En la revisió de Zorzano i col. (2000) s'hipotetitzava sobre l'existència de dues vies de senyalització que promourien la translocació del GLUT4 cap a regions diferents de la membrana plasmàtica; al sarcolema o bé cap als túbul-T.

Douen i col. (1990) van proposar l'existència de diferents reserves de GLUT-4, de manera que, segons el tipus d'estímul rebut, es mobilitzaria una o altra reserva. L'efecte additiu de l'activitat contràctil i de la insulina, sobre la mobilització de GLUT4, només és detecta en músculs de rata vermells (de contracció lenta), i no es dona en músculs blancs (de contracció ràpida) (Ploug i col. 1987).

En *vastus lateralis*, múscul humà, s'ha observat un patró d'expressió diferencial de GLUT4 en funció del tipus de fibra (Daugaard i col. 2000), de manera que les fibres lentes expressen més transportador que les fibres ràpides. Altres autors coincideixen en dir que les fibres de tipus I (lentes) presenten una major captació de glucosa i/o sensibilitat a l'insulina, fet que es relaciona amb l'expressió de GLUT4 en aquestes fibres, (Klip i Paquet, 1990; Richter i col. 1982)

Les necessitats metabòliques del múscul en cada moment i l'arribada d'estímuls externs pot alterar el sistema de transport de glucosa, el qual està regulat per diverses vies de senyalització intracel·lulars (figura 1.5).

En la contracció es creu que com a mínim existeixen dos mecanismes que promouen la translocació de les vesícules de GLUT4 (revisat per Rose i Richter, 2005); un depenent de la intensitat i freqüència de l'estímul neuronal que augmenta la concentració de calci (Holloszy i col. 1986) i un segon relacionat amb l'estat energètic i metabòlic del múscul on juguen un paper important AMP, ATP, CrP, glucogen i/o oxigen, en aquest darrer mecanisme l'AMPK actuaria com a detector (Musi i col. 2001). La fosfolipasa D podria estar implicada en la part final de la translocació de les vesícules que contenen GLUT4 (Kristiansen i col. 2001), si bé no s'ha confirmat la seva participació en la via activada per la contracció.

Les isoformes convencionals de la proteïna quinasa C (PKC) s'activen en resposta a increments intracel·lulars de Ca^{2+} i diacilglicerol (DAG) (Nishizuka, 1995). L'activitat de la PKC de múscul esquelètic de rata està determinada per la seva translocació cap a la fracció membranosa, Richter al 1987 i Cleland al 1989 van observar un augment de l'activitat PKC amb l'exercici, si bé aquest descobriment no s'ha observat en múscul humà (Rose i col 2004).

Els exercici aguts (Chen i col. 2002; Perrini i col, 2004) així com els de resistència (Nielsen i col 2003) activen les isoformes atípiques de la PKC (αPKC: PKC-ζ/λ), les quals són independents de calci, en múscul humà i de ratolí. L'activació d'aquestes αPKC està implicada en l'estimulació del transport de glucosa amb l'exercici independentment de l'activitat del fosfatidil inositol-3-fosfat (PI3K).

Quan es realitzen experiments d'inhibició de la PKC, tan convencional com atípiques, s'observa una reducció en l'estimulació del transport de glucosa generat per la contracció (Ihlemann i col. 1999a).

La calmodulina (CaM) és una proteïna d'unió a calci, la qual modula molts processos cel·lulars, però Tang i col. (2002) també la vinculen al mecanisme d'excitació-contracció. En els músculs esquelètics s'ha detectat la presència de diferents isoformes de la proteïna quinasa depenent per calci unit a CaM (CaMK), concretament s'han detectat les CaMKI i CaMKII. L'exercici provoca un increment en l'activitat CaMKII, en músculs humans (Rose i Hargreaves, 2003). L'activitat CaMKII és inhibida per KN62/93, aquesta reducció provoca la disminució parcial, en el múscul epitroclearis (Wright i col. 2004), o total, en soleus (Wright i col. 2005), en la potenciació de la captació de glucosa quan el múscul de rata s'exercita.

L'AMPK s'activa durant la contracció muscular (Hutber i col. 1997), fet que també es produeix quan s'incrementa en la relació AMP/ATP i la relació Creatina/CrP (Hardie i col.1998) així com també s'aprecia quan hi ha un descens del contingut de glucogen (Derave i col 2000a), tots aquests elements fan de l'AMPK un bon candidat per a la monitorització de l'estrès metabòlic. En qualsevol cas l'AMPK no és essencial per l'activar la translocació de GLUT4 a membrana en la contracció del múscul soleus segons Derave i col. (2000b). Mu i col (2001) observen que la magnitud de l'activació de l'AMPK bé determinada pel grau d'intensitat de l'exercici, pel grau d'hipòxia, i pel grau l'estrès metabòlic (relacions AMP/ATP i Creatina/CrP), explicant així la baixa translocació de GLUT4 en determinats experiments. L'AMPK humana només s'activa quan es realitza un exercici d'alta intensitat (Chen i col. 2000).

El tractament amb 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleòsid (AICAR), droga que imita l'efecte de la contracció muscular en músculs en repòs, activa de manera

permanent l'AMPK incrementant la captació de glucosa (Hayashi i col. 1998) i la translocació de GLUT 4 (Kurth-Kraczek i col.1999), segons aquests resultats l'AMPK estaria implicada en la via de senyalització, activada per la contracció muscular, que indueix un increment en la captació de glucosa. Però, Ai i col (2002) van observar que existeix certa addició entre l'estimulació del transport de glucosa per contracció muscular i l'estimulació induïda per AICAR, segons sembla la contracció muscular i l'AICAR estimularien el transport de glucosa per mecanismes parcialment diferents, essent la contracció muscular més potent que la droga. L'AICAR estimula la captació de glucosa en músculs rics en fibres ràpides del tipus II_A i no té efectes sobre les fibres lentes majoritàries en el múscul soleus (Buhl i col. 2001).

Jorgensen i col (2004) treballant amb *knock-out* de les subunitats $\alpha 2$ de l'AMPK, van veure que tan en els músculs incubats amb AICAR com els sotmesos a hipòxia no s'induïa la captació de glucosa, en canvi si es provocava contracció, la inducció generada per aquesta no es modificava o disminuïa molt poc, tot i que aquests músculs no presentessin activitat AMPK. Al fer el mateix estudi però amb *knock-out* de les subunitats $\alpha 1$, no van apreciar diferències entre els tres tractaments, en cap cas s'observava augment de la captació de glucosa. Aquest resultats indiquen que l'AMPK podria estar parcialment involucrada en el sistema d'inducció de la captació de glucosa a través de l'exercici en múscul esquelètic, tot i que la presència d'altres vies independents també contribuirien a la resposta del múscul (Zorzano i col. 2005).

Durant l'exercici es produeix un augment l'activitat de la sintasa NO (NOS) (Roberts i col. 1999) així com d'òxid nítric (NO) (Balon, 1998) en múscul esquelètic de ratolí. Aquesta sintasa pot ser activada tan per l'AMPK (Fryer i col. 2000) com CaM-Ca²⁺ (Boule i col. 2005). Fryer i col. (2000) proposen que la translocació de GLUT4 cap a sarcolema i túbuls-T ha de passar per l'activació de NOS. Tot i això, el paper del NO en la potenciació del transport de glucosa, en resposta a l'exercici, és un debat encara obert i ple de resultats contradictoris, de fet Higaki i col. (2001) van postular que NO estimularia la captació de glucosa a través d'un mecanisme diferent al presentat per la contracció i al de la insulina.

1.3.2.- Hexoquinasa

El segon punt de regulació de la via glucolítica és la reacció catalitzada per l'hexoquinasa (HK), en la qual la glucosa és fosforil·lada per formar Glu-6-P. Existeixen 4 isoformes de HK, si bé en el múscul esquelètic només se n'expressen dues: HKI i HKII, essent aquesta última la que s'expressa en major quantitat (Katzen i Schimke, 1965). Ambdues isoformes de l'hexoquinasa es caracteritzen per tenir una K_m relativament baixa per la glucosa, de l'ordre d'entre 0,1 mM - 0,3mM, sent més baixa en el cas de la HKII. La Glu-6-P, producte de la reacció, actua com inhibidor a baixes concentracions (Grossbard i Schimke, 1966).

El contingut d'HKII en múscul esquelètic pot variar significativament en funció de l'activitat física i l'estat hormonal que presenti el teixit. En músculs electroestimulats s'ha observat increments de fins a 10 vegades en l'activitat HKII respecte a l'estat de repòs (Weber i Pette, 1990a). L'exercici, l'estrès per acció del fred, la presència de catecolamines i la insulina produeixen un augment en l'activitat HK, així com l'increment de la seva expressió en múscul (O'Doherty i col.1996; Koval i col. 1998; Young i col. 1984; Osawa i col. 1995; Weber i Pette, 1988).

La vida mitja (*turnover*) de HKII és de 2,5 dies (Frank i Fromm, 1982), aquesta característica permet al múscul recuperar l'activitat basal després d'un període d'activació en relativament poc temps. Un exemple seria l'estudi de Weber i Pette (1990a-b) amb l'electroestimulació contínua i el posterior descans.

Tan la contracció muscular (Weber i Pette, 1990b) com la insulina (Vogt i col. 1998) alteren la distribució subcel·lular de l'HKII, però no de l'HKI (Mandarino i col. 1995), en múscul esquelètic humà, concretament s'observa el pas de l'HKII present en la fracció soluble (citosol) a la fracció particulada, associada a mitocondria, dels extractes de múscul. Aquests efectes van molt lligats a la ràpida activació de la captació de glucosa en el múscul.

En múscul de rata s'ha detectat com l'hexoquinasa pot unir-se a les mitocondries quan les necessitats metabòliques ho requereixen, per tal d'obtenir l'ATP necessari per catalitzar la reacció de fosforilació de la glucosa, cedint alhora ADP a les mitocondries (Parra i Pette, 1995).

1.3.3.- 6-fosfofructo-1-quinasa

La 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1) realitza un paper central en el control de la glucòlisi perquè catalitza una de les reaccions que determina la velocitat de la via;



La PFK-1 pot presentar-se en diferents estats d'agregació, però no assoleix la seva activitat màxima fins que es constitueix en tetràmers. En el múscul en estat de repòs, on s'observen concentracions d'ATP i de Fru-6-P, 10mM i 0,1mM respectivament, la PFK-1 presenta només el 3% de la seva activitat màxima, en aquestes condicions el flux glucolític és molt baix. Quan el múscul realitza un exercici intens, es detecten concentracions d'ATP 7,5mM i de Fru-6-P 1mM, la PFK-1 arriba al 82% de la seva activitat màxima suficient per explicar l'augment del flux glucolític observat *in vivo* (Boscá i col. 1985).

Aquest enzim presenta molts afectors que modulen la seva activitat emprant diferents mecanismes, el conjunt esdevé un complex sistema de regulació. Sols (revisió de 1981) proposa que l'activitat PFK-1 es regula principalment per afectors al·lostèrics.

El control de PFK-1 es basa en la inhibició per substrat, ATP, el qual a concentracions fisiològiques disminueix l'afinitat de PFK-1 pel segon substrat (Fru-6-P), provocant que la Fru-6-P a concentracions fisiològiques no sigui suficient per activar PFK-1. La inhibició per ATP es veu reforçada per l'acció dels H^+ (la glucòlisi, via anaeròbica de producció d'ATP, provoca acidosi) i del citrat (substrat del cicle de Krebs, via de producció aeròbica ATP). La PFK-1 presenta afectors al·lostèrics activadors, els quals estan implicats directament en el recanvi d'ATP, i la seva concentració està augmentada en el múscul exercitat; fòsfor inorgànic (P_i), ADP i AMP (Krause i Wegener, 1996). L'ió amoni i el P_i activadors de la PFK-1 augmenten amb l'exercici, mentre la creatina fosfat (CrP), inhibidor de l'enzim, disminueix.

Durant la contracció muscular s'aprecia un augment de l'activitat PFK-1, 100 vegades superior a la presentada en l'estat de repòs. Aquest augment tan acusat, no pot explicar-se per les petites variacions que s'observen els inhibidors i activadors presentats fins ara (Ramaiah i col. 1976; Wilkie, 1983; Wegener i col. 1990), cal algun altre activador que expliqui aquest augment brutal del flux glucolític (revisat per Wegener i Krause, 2002).

Les variacions en la taxa glucolítica, induïdes per factors hormonals o per la contracció muscular (Minatogawa i Hue, 1984; Green i col. 1991; Winder i Duan, 1992; Cadeffau i col. 1993) i l'alcalinització del mioplasma, durant la contracció muscular, provoca l'activació de la PFK-1, observant-se un augment en la concentració de les hexoses bifosfats. Aquestes circumstàncies van suggerir que les hexoses bifosfats podrien jugar un paper important en l'activació de la PFK-1 i l'increment inicial del flux glucolític. La Fru-1,6-P₂, substrat de la reacció podria actuar a través de la retroalimentació positiva, però s'ha exclòs com a activador fisiològic perquè és necessària una concentració molt elevada per presentar algun efecte i alhora el citrat, a concentracions fisiològiques, eliminaria virtualment l'activació de PFK-1 (Krause i Wegener, 1996b).

La Fru-2,6-P₂ no és un intermediari de la via glucolítica però és un senyal metabòlic i l'activador més potent de la PFK de múscul de granota en condicions d'assaig molt properes a l'estat fisiològic (Krause i Wegener, 1996b). En presència de Fru-2,6-P₂, tan la Glu-1,6-P₂ com la Fru-1,6-P₂ poden activar addicionalment la PFK-1 i disminuir parcialment l'efecte inhibidor del citrat (Andres i col. 1990).

La Glu-1,6-P₂ es un cofactor de la reacció catalitzada per l'enzim fosfoglucomutasa i alhora un dels coproductes que genera la PFK-1 en múscul de mamífer (Eyer i col. 1971). S'ha suggerit com a activador de la PFK-1 de múscul, però la seva rellevància fisiològica es posa en dubte.

La PFK pot unir-se a l'actina i a la isoforma muscular de la creatina quinasa (MM-CK), detectant-se el complex en els filaments primers de la banda I, però en cap cas amb l'acto-

miosina. Aquest acoblament es produeix durant la glucòlisi (Kraft i col. 2000). Un augment en la concentració de Glu-1,6-P₂ associat a la unió de la PFK-1 amb proteïnes de l'aparell contràctil genera un gran activació de la glucòlisi, Andrés i col. (1996) declarant al conjunt com a paper important en la regulació de la glucòlisi a l'inici de la contracció.

1.4.- Fru-2,6-P₂

Durant la dècada dels 70, la recerca presentava una gran varietat de centres d'interès, concretament en l'estudi de la glucolisi i gluconeogenesis, molts esforços anaven dirigits a la recerca sobre l'estimulació que produïa el glucagó a la gluconeogenesis en el fetge. Fou en aquest context on es va descobrir l'existència d'un sucre bisfosforilat, la Fru-2,6-P₂, que no participava com intermediari en cap interconversió metabòlica i presentava una característica molt particular, era extremadament làbil en extractes àcids (extractes emprats sistemàticament per mantenir els ésters d'àcid fosfòric en les preparacions), aquests dos fets explicarien que no fos descoberta fins l'any 1980. (van Schaftingen i col. 1980a-d).

Només va caldre una any perquè aquesta molècula es convertís en un element clau en l'estudi de la glucòlisi i la gluconeogenesis, temps en qual es va demostrar que es tractava de l'afector al·lostèric més potent de l'enzim PFK-1, clau en la via glucolítica (van Schaftingen, 1981a; Pilkis, 1981a), així com un inhibidor de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1), clau per la via gluconeogènica (van Schaftingen, 1981b; Pilkis 1981b).

1.4.1.- Implicació en el metabolisme

La Fru-2,6-P₂ pot activar al·lostèricament l'enzim PFK-1, unint-se al lloc de regulació present en PFK-1, on participen activament els aminoàcids; Ser⁵³⁰, Arg²⁹² i His⁶⁶² (Chang i col. 2002). La interacció provoca un canvi conformacional en l'enzim que facilita la interacció de PFK-1 amb Fru-6-P i ATP, substrats de la reacció. Activant aquest enzim, la Fru-2,6-P₂, potencia la glucòlisi.

La gluconeogènesi només és possible en múscul per la constitució del complex aldolasa-FBPasa-1. L'aldolasa insensibilitza la FBPasa-1 muscular de la inhibició provocada per l'AMP, el qual a concentracions fisiològiques inhibiria per complet l'activitat FBPasa-1 (Skalecki i col. 1995). Rakus i col. (2003) postulen que el mecanisme d'inhibició de la Fru-2,6-P₂ sobre la via gluconeogènica és produït per la competència directa amb la Fru-1,6-P₂ pel centre actiu de l'enzim FBPasa-1, i alhora la desestabilització del complex aldolasa-FBPasa-1 observat en múscul.

En determinades ocasions el contingut de Fru-2,6-P₂ es veu alterat, s'observen augments d'aquest metabòlit com a resposta a situacions de demanda energètica, en altres paraules, els increments d'aquest metabòlit van associats a situacions en les quals la glucòlisi està augmentada.

En el fetge es descriuen dos estats metabòlics (revisat per Hue i Rider, 1987). En el primer, es produeix la gluconeogènesi mentre la glucòlisi està aturada evitant els cicles fútils. Aquesta situació es presenta en individus en dejú, en la diabetes i en els tractaments amb glucagó (Hue, 1981a; Hers i Hue, 1983). En aquestes condicions es detecten concentracions molt baixes de Fru-2,6-P₂. El segon estat metabòlic correspon a una situació anabòlica posterior a la ingesta d'aliments on la glucosa és abundant. El fetge disposa de glucosa i pot distribuir-la cap a la síntesi de glucogen i alhora emprar-la a través de la glucòlisi. L'estimulació de la glucòlisi a través de l'augment de glucosa podria explicar els increments de Fru-2,6-P₂ observats (van Schaftingen i col. 1980b; Hue i col. 1981b).

La insulina i l'adrenalina incrementen la glucòlisi i la Fru-2,6-P₂ en el múscul i el cor (Bosca i col. 1985; Hue i col. 1982 ; Rider i Hue, 1984 i 1986). L'increment de Fru-2,6-P₂ observat és part del complex mecanisme d'estimulació de la glucòlisi dut a terme per d'aquestes hormones, l'acció de les quals afecta a diversos punts de control de la glucòlisi; al transport de la glucosa, a la hexoquinasa, a la PFK-1, a la piruvat quinasa i a la piruvat deshidrogenasa.

En el cor es pot produir una situació d'hipòxia, en la qual les condicions anaeròbiques promouen la producció d'aquest metabòlit per tal d'augmentar el flux glucolític i així compensar la incapacitat de realitzar la oxidació-aeròbica.

En cèl·lules cancerígenes, les quals presenten una sèrie d'alteracions en el seu metabolisme que li confereixen la capacitat de proliferar contínuament, algunes d'aquestes alteracions provoquen un augment del flux glucolític que subministrarà l'energia necessària a la cèl·lula cancerígena per seguir creixent, dins d'aquestes alteracions hi ha l'augment de Fru-2,6-P₂.

En tots els teixits, el control de la concentració de la Fru-2,6-P₂ depèn de l'activitat de l'enzim PFK-2/FBPasa-2.

1.4.2.- Síntesi i degradació, l'enzim bifuncional PFK-2/FBPasa-2

La síntesi de Fru-2,6-P₂ a partir de Fru-6-P i Mg-ATP és catalitzada per la 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK-2), mentre que la hidròlisi del metabòlit, en Fru-6-P i P_i, la catalitza la fructosa-2,6-bisfosfatasa (FBPasa-2). Les dues reaccions, PFK-2 i FBPasa-2, les duu a terme la mateixa proteïna, la PFK-2/FBPase-2. Aquest enzim bifuncional es presenta com un homodímer, on es produeixen moltes interaccions proteïna-proteïna entre els dominis quinasa de les dues subunitats (Hasemann i col. 1996, Fig. 1.4.1).

Dins de cada subunitat monomèrica la distribució de les activitats segueix el mateix patró, en la meitat N-terminal s'hi localitza l'activitat quinasa, mentre que l'activitat bisfosfatasa es catalitza en la meitat C-terminal (revisat en Okar i col. 2001; Rider i col. 2004).

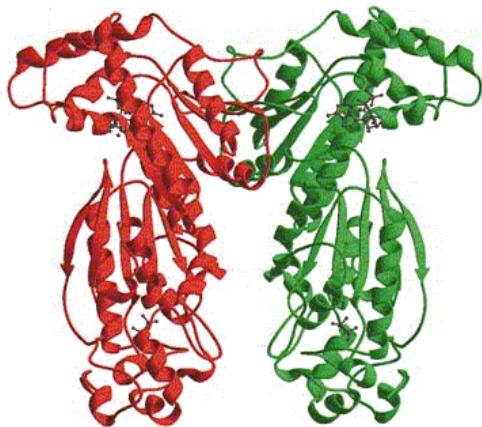


Figura 1.4.1: Estructura tridimensional de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 dimeritzat. Cadascun dels dímers presenta un color diferent. La interacció es produeix entre els dominis quinasa de les dues subunitats (Hasemann i col. 1996).

El balanç entre les activitats quinasa i bisfosfatasa de l'enzim, o sigui la relació d'activitat K:B, determina l'efecte net de l'enzim sobre el contingut cel·lular de Fru-2,6-P₂. Aquesta relació bé determinada per la isoforma que constitueix l'enzim, la concentració de determinats metabòlits de la via glucolítica i gluconeogènica, les modificacions post-transcripcionals que pateixi l'enzim (per exemple, fosforilacions) i la xilulosa-5-fosfat. A través d'un sistema de retroalimentació (*feedback*) negativa, el α -glicerol-3-fosfat, el fosfoenolpiruvat (PEP) i el citrat disminueixen l'activitat quinasa i afavoreixen la bisfosfatasa (revisat per van Schaftingen, 1987; Pilkis i col.1995).

1.4.2.1.- Isoenzims de l'enzim PFK-2/FBPasa-2

L'existència de diferents isoformes de l'enzim PFK-2/FBPase-2 fou descrita en diferents teixits de mamífer, cada nova isoforma que es descrivia s'anomenava en funció del teixit de procedència, fetge, cor, cervell (o placenta), testicle i múscul. Les isoformes de PFK-2/FBPasa-2 difereixen entre elles en la relació K:B, en les seves propietats immunològiques, en la seva resposta al ser fosforilades per proteïnes quinases i en el pes entre altres (Taula 1.4.1). Analitzant la seva seqüència s'aprecia un elevat grau d'homologia sobretot en la regió central de la molècula, corresponent als dominis catalítics quinasa i bisfosfatasa. En canvi, les regions perifèriques tan a l'extrem COOH com al NH₂ presenten moltes divergències, és precisament en els extrems de l'enzim on es localitzen les regions que permeten modular/regular les activitats quinasa i bisfosfatasa (Fig. 1.4.2).

		Fetge rata/boví	Múscul rata	Cor boví	Cervell / Placenta	Testis humà/rata		
Grandària	aa	470	450	570	ND	520	468	
	kDa	55	54	58	120	59	55	
Cinètiques PFK-2	V_{màx}(mU/mg)	113	42	66	61	90	142	75/90
	K_m Fru-6-P(μM)	35	150	56	74	55	32	58/85
Cinètiques FBPasa-2	V_{màx}(mU/mg)	45	35	154	33	29	0,2	80/22
	K_m Fru-2,6-P₂(μM)	<0,1	7	0,4	40	70	130	16/21
K:B		2,5	1,2	0,4	1,8	3,1	710	0,9/4,1

Taula 1.4.1: Característiques de les isoformes de l'enzim PFK-2/FBPasa-2. Revisat per Pilkis(1995) i Okar(2001) *Fetge*: Kountz, 1985; Rider,1985; El-Maghrabi,1986; Francois1986; Lin,1994. *Múscul*: Kitamura,1989; Rider, 1985. *Cor*: Kitamura, 1987;El-Maghrabi, 1982; Sakata, 1990; Kurland, 1992. *Cervell/Placenta*: Ventura 1992; Tsuchya 1994; Sakakibara 1997. *Testicle*: Sakata 1991.

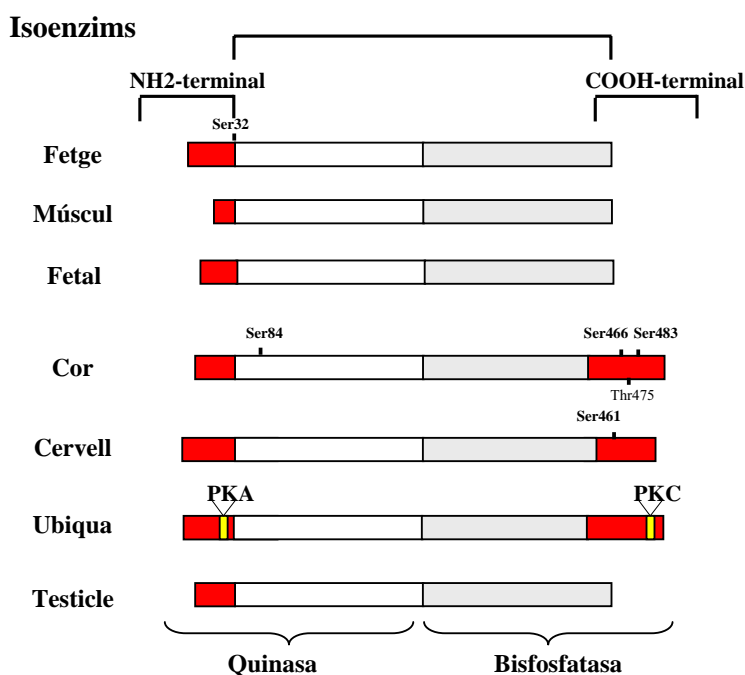


Figura 1.4.2: Esquema de les isoformes de PFK-2/FBPasa-2. En la porció central es mostren les regions més conservades entre isoformes, mentre en els extrems NH2- i COOH-terminal s'aprecien la major part de les divergències, en quan a longitud així com de seqüència d'aminoàcids. Els llocs de fosforilació apareixen indicats amb l'aminoàcid implicat. Revisat per Rider i col (2004), modificat.

Mecanismes de control dels isoenzims

La fosforilació de la Ser³² per PKA en la isoforma de fetge, provoca la inactivació de l'activitat quinasa a través d'un increment de la Km per Fru-6-P (van Schaftingen i col. 1981c; El-Maghrabi i col. 1982). El domini quinasa de la isoforma hepàtica és capaç reprimeix l'activitat bisfosfatasa de l'enzim, és per aquest motiu que la relació K:B en aquesta isoforma és favorable a la quinasa.

Les isoformes de múscul i de testicle no poden ser fosforilades per cap proteïna quinasa, no presenten regions susceptibles de ser fosforilades, aquest fet fa d'aquestes isoformes siguin les menys dinàmiques i que la seva regulació quinasa/bisfosfatasa només depengui de la concentracions del substrat i producte de la reacció així com dels inhibidors i activadors al·lostèrics.

L'isoenzim de cor presenta múltiples centres de fosforilació per diferents proteïna quinases. A diferència de la isoforma de fetge, les fosforilacions en aquesta isoforma suposen un augment en l'activitat quinasa. La insulina activa la glucòlisi en el cor, a través de la captació de glucosa i l'activació de PFK-2/FBPasa-2 (Depré i col.1998; Hue i col. 2002), en rata l'activació de la quinasa es produeix per un augment en la V_{\max} , entre la K_m es manté sense canvis (Rider i Hue, 1984). Tal i com es mostra en la figura 1.4.3, la insulina activa la PFK-2/FBPasa-2 de cor a través de la fosforilació de la Ser466, a través de WISK (wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase) (Deprez i col. 2000). L'enzim PFK-2/FBPasa-2 de cor boví també és substrat de la PKC, concretament són fosforilables les Ser84, Ser466 i la Thr475 (Rider i col. 1992a-b), tot i que les fosforilacions en Ser466 i Thr475 no canvien l'activitat de l'enzim (Rider i Hue,1986), però si permetrien la fosforilació de la Ser84. L'acció de la PKC sobre la PFK-2/FBPasa-2 de cor no és del tot clar perquè diferents isoformes atípiques de PKC poden fosforilar específicament la Ser466 activant l'activitat quinasa.

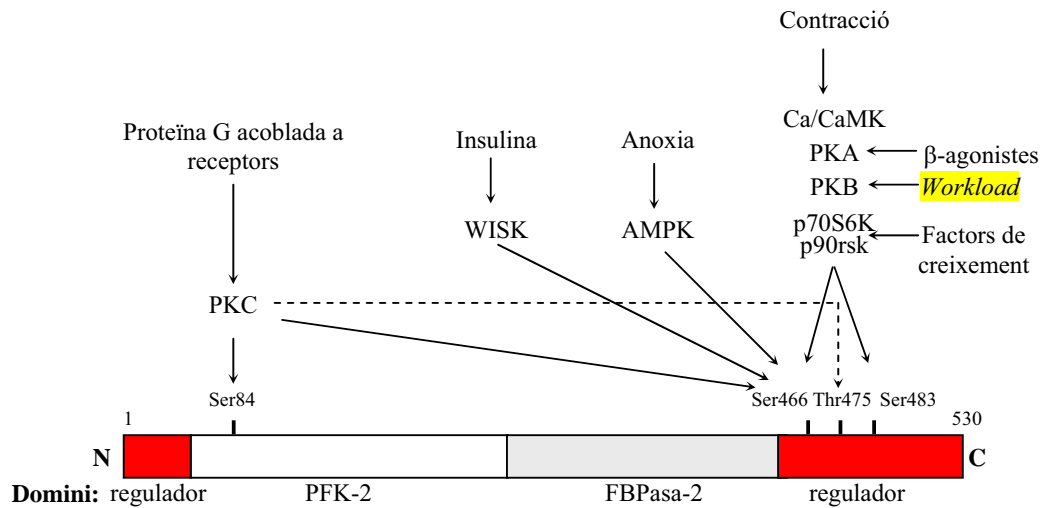


Figura 1.4.3: Fosforilacions potencials de l'isoenzim de cor de l'enzim PFK-2/FBPasa-2. Les proteïnes quinases que apareixen poden fosforilar aquesta isoforma "in vitro", en condicions fisiològiques no es pot assegurar. Els números que apareixen corresponen als residus de la isoforma de cor boví. La Ser466, podria ser la Ser461 de l'isoenzim cervell/placenta. Els equivalents a la Ser84 o Thr475, no existeixen en l'isoenzim de cervell/placenta perquè han estat substituïts per residus no fosforilables (Rider i col 2004).

Com ja s'ha comentat l'adrenalina augmenta la concentració de Fru-2,6-P₂ i estimula la glucòlisi en cor, en aquest cas s'activa la PFK-2 de cor, augmentant la V_{màx} i disminuint la K_m per Fru-6-P. L'activació es produeix per la fosforilació de la Ser466 i Ser483 per PKA (Rider i col. 1992b). Les mateixes serines poden ser fosforilades per PKB i altres proteïnes quinases estimulades a través de la insulina (Deprez i col 1997).

En el cor sotmès a situacions d'anoxia o d'isquèmia, on l'aportació d'oxigen està restringida, la glucòlisi es troba augmentada (es coneix com efecte Pasteur). Fruit de la fosforilació de la Ser466, en la PFK-2, per part de l'AMPK, aquesta activació augmenta el contingut de Fru-2,6-P₂ que estimula la glucòlisi.

L'isoenzim cervell/placenta presenta un motiu equivalent a la Ser466 de l'isoenzim de cor, aquest motiu és reconegut per l'AMPK tan en la isoforma ubiua com en la induïlbe (iPFK-2). L'isoenzim de cervell/placenta pot ser fosforilat per PKA, PKC (Okamura i Sakakibara, 1998) i AMPK (Marsin i col. 2002) tal i com ho feien en l'isoenzim de cor. En la iPFK-2, la Ser461 és fosforilada per l'AMPK activant així l'activitat quinasa (Marsin i col. 2002). iPFK-2 s'expressa constitutivament en algunes línies cel·lulars cancerígenes (Chesney i col. 1999), les quals presenten un elevat flux glucolític tot i la presència d'oxigen (efecte Warburg). Algunes regions de tumors són anòxiques, és precisament en aquestes regions on s'activa l'AMPK estimulant la glucòlisi a través de la fosforilació de iPFK-2. La insulina pot fosforilar la Ser461 de iPFK-2 de la mateixa manera que ho feia amb la Ser466 en l'isoenzim de cor, augmentant l'activitat quinasa.

En l'estadi fetal del fetge s'ha detectat la mateixa quantitat de M i L mRNA (Bosca i col. 1988) i en fetge en regeneració s'ha detectat F mRNA (Casado i col. 1996). Tot i aquestes troballes, l'enzim PFK-2/FBPasa-2 present en cèl·lules proliferants, ja siguin línies cel·lulars incloses les cancerígenes, fetge en estadi fetal, fetge en regeneració o limfòcits, té propietats similars a les presentades per els isoenzims de cor i de cervell/placenta. Aquest darrer aspecte fa suposar que l'isoenzim de cor o cervell/placenta s'expressen en aquests teixits.

1.4.2.2.- Gens que codifiquen per PFK-2/FBPasa-2

L'enzim PFK-2/FBPasa-2 és codificat per 4 gens (Taula 1.6). La nomenclatura inclou part del nom de l'enzim que genera (PFKFB) però depèn de l'espècie (en l'home el gen s'escriu en majúscules mentre que en rata i altres espècies "inferiors" es presenta en minúscula) i per diferenciar-los cada gen e numera en funció de l'ordre en què s'ha caracteritzat. Tots els gens segueixen la mateixa organització i cadascun d'ells codifica per un isoenzim, l'aparició d'algunes isoformes es produeix per diferències en les modificacions del procés de tall i unió (*splicing*) així com per la presència d'alguns promotors en les regions 5' no codificants.

Gen	Locus en Cromosoma	Isoenzim	mRNA	mRNA (Kb)	Isoforma
PFKFB1(A)	Human Xp11.21	FETGE	L	2,1	Fetge
Pfkfb1	Rat Xq22-q31		M	1,9	Múscul
			F	2,2	Múscul
PFKFB2(B)	Human 1q31	COR	H1, H2, H3	6,8	Long (58kDa)
Pfkfb2	Rat 13 q24-q25		H4	4	Short (54kDa)
PFKFB3	Human 10p14-p15	CERVELL/ PLACENTA	U	4,8	Ubiqua
Pfkfb3	Rat 17q12.3		I		Induïble
PFKFB4	Human 3p21-p22	TESTICLE	T	2,4	Testicle
Pfkfb4	Rat 8q32				

Taula 1.6: Gens codificants de PFK-2/FBPasa-2 en mamífers, productes generats. Compendi de les revisions d'Okar (2001) i Rider (2004) modificades.

Gen PFKFB1

El gen PFKFB1 conté 17 exons que codifiquen per diversos mRNA; L, M, i F, els quals deriven de diferents promotors (Darville i col. 1989 i 1992; Dupriez i col. 1993). Els 3 mRNA obtinguts difereixen en el primer exó, situat a l'extrem 5', la resta és igual per a les 3 isoformes, concretament coincideixen en 12 exons consecutius. L'extrem 5' del mRNA, codifica per la regió N-terminal de la proteïna resultant, l'exó 1_L (isoforma L) genera una seqüència de 32 aminoàcids amb una serina susceptible de ser fosforilada per proteïna quinasa dependent de AMP cíclic (PKA). La isoforma M presenta l'exó 1_M codificant d'una seqüència de 9 aminoàcids que no presenta llocs fosforilables. La

isoforma F presenta els exons 1_{Fa} i 1_{Fb} (exons que no codifiquen per proteïna) juntament amb una porció de l'exó 1_M, aquest mRNA també acaba generant la isoforma M (Figura 1.10).

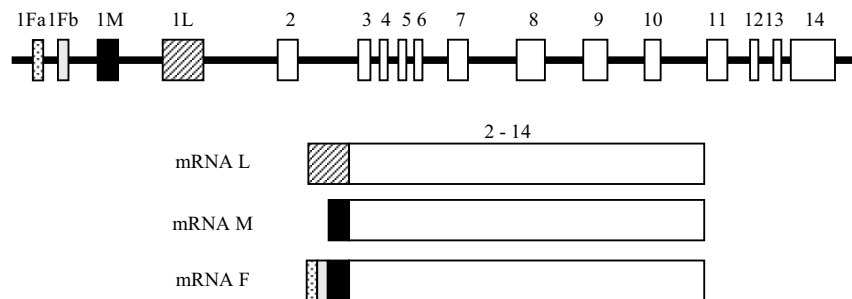


Figura 1.10: mRNA generats pel gen PFKFB1.

La isoforma M s'expressa en múscul esquelètic i teixit adipós blanc a través del promotor M, mentre que el promotor F genera aquesta isoforma en fibroblasts i teixits fetals i proliferants (Joaquin i col. 1997a-b). La isoforma L s'expressa a través del promotor L en fetge, també s'ha trobat en teixit adipós (Bruni i col 1999) i en múscul esquelètic (Taniyama i col. 1988).

L'expressió del gen PFKFB1 pot ser estimulada per glucocorticoides a través de l'element de resposta a glucocorticoides (GRE), localitzat en el primer intró del gen (Lange i col. 1992), aquesta localització no és habitual però ja ha estat descrit en altres gens, com per exemple; el gen de l'hormona del creixement humana (Slater i col. 1985) o el gen del collagen II de rata (Horton i col 1987). La insulina inhibeix l'estimulació produïda pels glucocorticoides en l'expressió del gen PFKFB1 a través de la via JNK-SAPK (De Los Pinos i col. 2001) i a través de la via PI3K en els gens PEPCCK i glucosa-6-fosfatasa (Dickens i col. 1998)

L'activitat del promotor F és estimulada per la unió de *ets*, productes de protooncogens (Dupriez i col. 1993), aquesta activitat es veu inhibida en cèl·lules diferenciades, allora es produeix el canvi d'utilització de promotors, passant a utilitzar el promotor M, enlloc del F. En aquesta transició i juguen in paper important el retinoblastoma (Rb) i el factor de transcripció E2F. L'activitat del promotor M s'estimula a través del factor de transcripció C/EBP al unir-se a la caixa TATA (Vandoolaeghe i Rousseau, 1997).

Ens cèl·lules proliferants el flux glucolític es troba augmentat, fruit de l'activació de la transcripció de la isoforma F de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 (Darville i col. 1995), els resultats de Fernández i col. (2000) demostren que PI3-K i PKB estan involucrats en la transcripció de la isoforma específica de proliferació. La via MAPK també està involucrada en aquest fenomen.

L'activitat basal del promotor L és controlada pel GRE, al qual poden unir-s'hi factors de transcripció generals com el factor nuclear -1 (NF-1) i Oct-1, així com factors específics del fetge, factor nuclear de l'hepatòcit-3 (HNF-3), C/EBP i OC-1 (també conegut com HNF-6).

El factor de transcripció HNF-6 estimula la transcripció dels gens que codifiquen per enzims del metabolisme de la glucosa, entre els quals hi ha PFK-2/FBPasa-2 i el fosfoenolpiruvat creatina quinasa (PEPCK) (Pierreux i col. 1999) glucosa-6-fosfatasa i glucoquinasa. HNF-6 pot contrarestar l'acció estimuladora dels glucocorticoides en la transcripció de PFKFB1 i PEPCK quan interacciona amb el receptor de glucocorticoides (GR) sobre aquests gens. Els enzims que controla HNF-6 pertanyen a dues vies oposades, glucolisi i gluconeogenesi, Rider i col (2004) suggereixen que la funció de HNF-6 és mantenir un nivell d'enzims adequat perquè les vies funcionin regularment i la definició de l'orientació cap a l'anabolisme o bé catabolisme serà regulat per altres senyals.

Gen PFKFB2

El gen PFKFB2 codifica per l'isoenzim de cor. En rata, el gen presenta 20 exons (Darville i col 1991; Chikri i Rousseau, 1995), de l'exó 3 al 14 es codifica pels centres catalítics quinasa i bisfosfatasa. L'exó 15 codifica per una seqüència d'aminoàcids que presenta múltiples llocs de fosforilació, un *splicing* alternatiu amb la delecció d'aquest exó permet l'existència de dues isoformes (54kDa i 58kDa) d'aquest isoenzim en el cor boví (Tsuchiya i Uyeda, 1994)

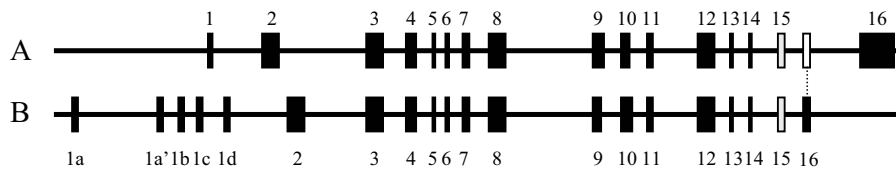


Figura 1.11: Estructura del gen PFKFB2. A) Genera l'isoenzim de cor boví, mentre B) l'isoenzim de cor de rata. En el procés de maduració de mRNA, l'exó 15 serà suprimit en la isoforma de 54kDa mentre que la 58kDa presentarà els aminoàcids codificats per aquest exó.

La transcripció d'aquest gen es motivada per diferents promotors que com a mínim generen 4 mRNA diferents en l'extrem 5' no codificant (Heine-Suñer i col. 1998), aquests mRNA obtinguts es traduiran en les dues isoformes possibles.

La seqüència flanquejant 5' presenta regions conservades entre els gens PFKFB2 de diferents espècies, una d'aquestes regions presenta un lloc d'unió potencial per als factors de transcripció; Sp1, factor nuclear d'hepatocit-1 (HNF-1) i hèlix-gir-hèlix (β HDLH, també anomenades caixes E) i pel receptor de glucocorticoides (GR).

Gen PFKFB3

El gen PFKFB3 conté almenys 16 exons que codifiquen per l'isoenzim descrit en cervell boví (Ventura i col. 1995) i en placenta humana (Sakai i col 1996). A través d'un *splicing* alternatiu de l'exó 15 s'obtenen dues isoformes que difereixen en una curta seqüència de l'extrem C-terminal (Navarro-Savaté i col. 2001). La isoforma ubiqua present en pràcticament tots els teixits (Hamilton i col. 1997) i la isoforma induïble (Watanabe i Furuya, 1999). Existeixen variants del procés de *splicing*, en cervell de rata s'han descrit fins a 6 isoformes mentre en l'humà n'hi ha 4 (Kessler i Eschrich, 2001).

L'expressió de la isoforma ubiqua és induïda per de progestina (Hamilton i col. 1997) i insulina (Riera i col. 2002), per tal de comprendre aquesta inducció cal veure la seqüència flanquejant 5' del gen, on es localitzen regions que potencialment permetrien la unió del receptor de progesterona així com de l'element regulador d'esterols (SREBP-1c) implicats en la senyalització de la progestina i insulina respectivament.

Altres factors de transcripció que podrien activar l'expressió serien; Sp-1, AP-2 i factor nuclear-1 (NF-1)) (Navarro-Sabaté i col. 2001).

També s'han trobat elements que permeten explicar l'increment d'expressió del gen en condicions d'hipòxia (HIF-1) (Obach i col. 2004) així com a través d'un estímul de PKC i PKA (Navarro-sabaté i col. 2001).

De l'estudi dut a terme per Riera i col (2003) s'extreu que el gen PFKFB3 resulta ser important per mantenir un flux glucolític elevat en cèl·lules proliferants i en el procés de diferenciació, en el cas de les cèl·lules C2C12, l'expressió del gen es veu disminuïda i coincidint amb un augment de la degradació de la proteïna resultant per acció de la via proteolítica ubiquitina-proteasoma.

Gen PFKFB4

L'isoenzima de testicle és codificat pel gen PFKFB4 i ha estat caracteritzat en rata (Sakata i col 1991) i en l'home (Manzano i col. 1999), essent l'expressió d'aquest gen teixit específic originant la presència de 2 mRNA.

En la seqüència del gen s'ha localitzat una regió homologa a un element de resposta a andrògens, la presència d'aquest element permetria que l'expressió del gen fos regulada i induïda com a resposta a aquestes hormones.

CAPÍTOL 2

MATERIAL I MÈTODES

2.1.- REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS

Acetat de magnèsic, de Merck.	Bicarbonat potàssic, de Sigma.
Àcid acètic, de Merck.	Bis-acrilamida, de Sigma.
Àcid Clorhídric, de Merck.	Blau de bromofenol, de Sigma.
Àcid fosfòric, de Merck.	Bradford reagent, de Bio Rad.
Àcid Perclòric, de Merck.	Clorhidrat de ketamina (Ketolar), de Parke-Davis.
Àcid tricloracètic, de Sigma.	Clorur càlcic, de Merck.
Acrilamida, de Sigma.	Clorur de benzalconi (Arnil), de S.I.F.S.A.
Adenosina monofosfat (AMP), de Sigma.	Clorur magnèsic, de Merck.
Adenosina trifosfat (ATP), de Sigma.	Clorur Sòdic, de Merck.
Adjuvant de Freund Complet	Dithiothreitol (DTT), de Sigma.
Adjuvant de Freund Incomplet	E.C.L., d'Amersham Pharmacia Biotech.
Albúmina bovina (BSA), de Sigma.	E.D.T.A., de Sigma.
Alcohol etílic de Merck.	E.G.T.A., de Sigma.
Aprotinina, de Sigma.	Fluorur potàssic, de Sigma.
Assay-on-Demand -Applied Biosystems	
Benzamidina, de Sigma.	

Fosfoglucomutasa, de Roche Molecular
Biochemicals.
Glicerol, de Merck.
Glicina, de Sigma.
Glu-1-fosfat, de Sigma.
Glu6PDH, de Boehringer Mannheim
Glu-6-P, de Sigma.
Glucosa, de Sigma.
HEPES, de Sigma.
Hidròxid sòdic, de Sigma.
Hyperfilm, d'Amersham Pharmacia
Biotech.
Imidazol, de Sigma.
Leupeptina, de Sigma.
Llet en pols desnatada, de Nestlé.
Maleat d'acepromacina (Calmoneosan),
de Smithkline Beecham.
Maleat sòdic, de Merck.
Marcadors de pes molecular, de Bio
Rad.
Membrana de nitrocel·lulosa,
d'Inmobilon-P.

Metanol, de Merck.
NADP, de Roche
Oligonucleotids, de Izasa
Paper Whatman 31ET, de Whatman.
Persulfat amònic (PSA), de Sigma.
Phenazine methosulphate (PMSF), de
Sigma
Pirofosfat sòdic, de Merck.
S.D.S., de Roche Molecular
Biochemicals
Sephadex G-25 fine, de Sigma.
Sulfat amònic, de Merck.
Sulfat atropina, de Merck.
T.E.M.E.D., de Sigma.
Taq polimerasa, de Ecogen.
Tripsina, de Sigma.
Tris (Trizma Base), de Sigma.
Tween-20, de Sigma.
 β -mercaptoetanol, de Sigma

2.2.- PROCEDIMENTS AMB ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Els estudis realitzats en aquesta tesi es basen en la utilització de models experimentals en animals de laboratori per tal de resoldre els objectius plantejats.

2.2.1.- Condicionament dels animals

Els animals emprats en els diferents estudis realitzats han estat conills de la raça *New Zealand (Orictolagus cuniculus)* subministrats per la Granja San Bernardo i rates *Sprague Dawley* dels laboratoris Harlan.

Els conills arriben a l'estabulari pesant 2.3 - 2.7 kg. Els animals han estat sotmesos a un període d'estabulació abans d'iniciar els protocols d'electroestimulació, la durada d'aquest període ha estat com a mínim d'una setmana. Durant tot el temps que han estat a l'estabulari de la Facultat de Medicina del Campus del Clínic han estat sotmesos a períodes de llum i foscor de 12 hores, amb una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ i una humitat del 55% amb oscil·lacions no superiors al 10%, on la renovació de l'aire es dona 20 vegades per hora, segons la normativa de les instal·lacions. Els animals han disposat de menjar i beguda "*ad libitum*".

En l'estudi realitzat amb rates en diferents estadis de desenvolupament, es segueixen el protocols d'anestèsia i quirúrgic així que arriben a l'estabulari. Els estadis de desenvolupament analitzats en aquest estudi han estat: fetus de 19 dies post-concepció, rates neonates de 2, 5 i 10 dies, així com rates adultes individus d'un pes superior als 250g. Ambdós models d'experimentació van estar aprovats per el CEA de la Universitat de Barcelona.

2.2.2.- Model d'electroestimulació en conills

L'estimulació elèctrica es basa en el model d'estimulador descrit per Schwarz i col. (1983), a partir del qual s'ha dissenyat un estimulador autònom que presenta una freqüència de 10Hz i la intensitat de l'estímul es modulable amb un potenciòmetre. L'estimulador autònom és de dimensions reduïdes i com s'aprecia en la figura 2.2.1 es col·loca a l'esquena del conill, fixat al damunt d'una cinta adhesiva que envolta el cos de l'animal per darrera de les potes davanteres. A l'estimulador s'hi connecten els cables dels elèctrodes que estan implantats a banda i banda del nervi peroneal (derivació del nervi ciàtic) responsable de transmetre l'estímul fins als músculs *Tibialis Anterior* (TA) i *Extensor digitorum longus* (EDL).

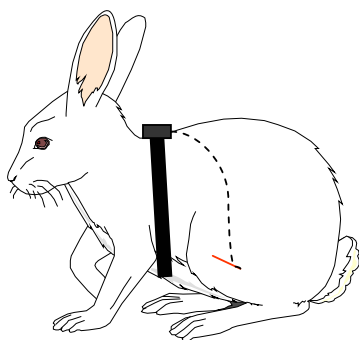


Figura 2.2.1: Esquema del model d'electroestimulació. Localització de l'electroestimulador en un conill, La ratlla discontinua permet veure el recorregut que fa el cable subcutani amb els elèctrodes, situats a una de les potes posteriors fins a l'estimulador, situat al lloc del conill.

Per tal de dur a terme aquest estudi s'ha seguit el Procediment de Recerca, que porta per títol: "Causes de la fatiga de curta i llarga durada en múscul esquelètic emprant un model experimental amb conill", el qual ha estat avaluat i autoritzat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la UB, i el CEA de la Generalitat de Catalunya.

2.2.2.1.- Protocol d'anestèsia

Per tal de seguir aquest procediment es va prendre com a base el protocol descrit per Flecknell (1987). Primerament cal administrar els següents pre-anestèsics:

- El *Sulfat d'atropina* (0,2 mg/kg de pes de l'animal) permet contrarestar l'augment de secrecions bronquials i salivals produït per l'acció de l'anestèsic, les quals podrien obstruir les vies respiratòries durant la intervenció quirúrgica. Com a anticolinèrgic és capaç de protegir el cor d'una inhibició vagal.
- El *Maleat d'acepromacina* (*CalmoNeosan®*) (1 mg/kg de pes de l'animal) és un sedant que tranquil·litza l'animal. La tranquil·lització o relaxació muscular afavoreix la inducció al son, reduint i fins i tot eliminant l'ansietat i la por de l'animal davant de procediments als quals no està acostumat, permet una millor manipulació de l'animal i alhora potència l'acció de l'anestèsic podent disminuir en un 30% - 50% la dosi necessària.

Ambdós s'administren combinats a través d'una injecció intramuscular a nivell de la musculatura lumbar o dels músculs quadríceps de qualsevol de les dues potes. Per tal d'afavorir l'acció del pre-anestèsic es deixa els animals durant 15 - 30 minuts aïllats de tot soroll i llum.

Per tal d'acabar el procediment d'anestèsia cal administrar el *Clorhidrat de Ketamina* (*Ketolar®*) (20 mg/kg de pes de l'animal). L'administració d'aquest fàrmac produeix un estat de depressió a l'escorça cerebral que evita l'arribada o reconeixement de qualsevol estímul sensitiu. Aquest estat reversible es caracteritza per l'absència de qualsevol tipus de percepció sensitiva, ja sigui dolorosa o no.

L'efecte de l'anestèsia permet treballar durant 30 - 45 minuts aproximadament. Cal mantenir l'animal en aquest estat durant tot el procediment quirúrgic. Si es preveu que s'excedirà el temps descrit anteriorment, cal realitzar recordatoris de ketamina, administrant la meitat de la dosi inicial (10 mg/kg), la qual proporciona 15 minuts addicionals. A partir del segon recordatori s'administra una quarta part de la dosi inicial (5 mg/kg). L'anestèsia s'injecta intramuscularment en les potes posteriors.

2.2.2.2.- Protocol d'implantació dels elèctrodes

2.2.2.2.1.- Característiques dels elèctrodes

Els elèctrodes estan fets d'un cable d'acer inoxidable (secció 0.2 mm) al qual prèviament se li ha donat forma de molla. Les dimensions aproximades són d'1cm de llargada per 3 mm d'amplada. La llargada pot variar segons l'espai disponible per implantar-lo. Aquesta molla es solda amb estany a un cable de coure recobert de silicona. La soldadura està protegida amb un plàstic termoretràctil, per evitar problemes de rebuig (Fig. 2.2.2). Abans de la intervenció cal realitzar proves amb els elèctrodes per tal d'apreciar la conductivitat d'aquests.



Fig. 2.2.2.- Esquema d'un elèctrode.

2.2.2.2.2.- Intervenció quirúrgica

Quan el conill està completament adormit per l'acció del protocol d'anestèsia (apartat 2.2.2.1), es procedeix a rasurar el pèl de les zones on es faran talls cutanis: en la primera s'implantaran els elèctrodes (pota esquerra) i en la segona, situada a l'alçada dels omòplats es connectaran els elèctrodes a través dels cables amb l'electroestimulador. Totes les regions adjacents es desinfecten amb Armil (clorur de benzalconi).

La localització del punt d'incisió amb el bisturí s'obté, mantenint la pota de manera que formi un angle recte entre el fèmur i la tibia. A continuació, deixant 2 cm des de l'exterior de la cuixa i 2 cm per sobre del límit inferior, es practica una incisió a la pell paral·lela a la tibia d'1,5 a 2 cm.

Emprant unes tisores es separa la pell del múscul en la regió propera a la intervenció, creant un espai on ubicar el cable dels elèctrodes. Cal passar els cables dels elèctrodes fins a la zona on es col·locarà el dispositiu d'electroestimulació. Per fer-ho s'utilitza una vara d'acer inoxidable que recorrerà a través de l'espai entre la pell i els teixits musculars fins arribar al

solc que s'aprecia entre els 2 omòplats. Amb el bisturí es practica una incisió per on surten els cables.

Es torna a localitzar el punt per on passa el nervi peroneal (a 2 cm x 2 cm), es pinça el múscul *bíceps femoral* (Fig. 2.2.3A), que està situat per sobre del nervi, s'aixeca per tal de separar-lo de la zona per on passa el nervi, es practica un tall pràcticament en perpendicular al múscul, es localitza realment per on passa el nervi peroneal (Fig. 2.2.3B) i tot seguit s'amplia el tall fins 1,5 cm, aquest espai és suficient per poder implantar els elèctrodes (Fig. 2.2.3C). Es neteja la zona pròxima al nervi i tot seguit es procedeix a la implantació dels elèctrodes. El primer es situa paral·lel al recorregut del nervi de manera que quedi el més a prop possible d'aquest i evitant el contacte directe. Per tal de fixar l'elèctrode, aquest es cus al múscul *Semimembranós*, situat per sota del nervi. Un cop el primer elèctrode està fixat, el segon es col·loca paral·lel a l'altre costat del nervi (Fig. 2.2.3D), localitzant abans de procedir a la fixació la zona on s'obté millor senyal (contracció dels músculs TA i EDL) amb el voltatge més baix (entre 0.6 V – 1 V). Aquesta precaució afavoreix la durada dels períodes d'estimulació, perquè cal tenir en consideració que durant el postoperatori la regió que ha estat intervinguda es recobreix de teixit conjuntiu, el qual provoca un augment de la resistència als pas de corrent elèctric entre els elèctrodes, per tal de superar aquesta resistència cal augmentar el voltatge, el qual està limitat a 5V en els equips d'electroestimulació autònoms que utilitzem en aquest estudi.

Quan els dos elèctrodes ja estan fixats a cada costat del nervi peroneal es procedeix a cosir el tall realitzat al múscul *Bíceps femoral* deixant que els cables dels elèctrodes passin a través emprant punts de sutura senzills (Fig. 2.2.3E). Per evitar que els elèctrodes siguin arrancats pel moviment de l'animal, un cop aquest s'hagi recuperat de l'operació, es col·locaran 10 cm de cada cable d'elèctrode en l'espai que prèviament s'ha fet entre la pell i el múscul *Bíceps femoral*. El tall a la pell de la pota es cus amb punts de sutura una mica més complexes que impedeixen l'entrada d'agents patògens externs a l'interior de l'animal (Fig. 2.2.3F). També es cus el tall per on surten els elèctrodes a nivell dels omòplats.

Tot seguit es col·loca una banda de cinta aïllant que envolti el cos de l'animal just per sota de les potes davanteres, aquesta banda ocultarà els cables dels elèctrodes fins al moment d'iniciar l'electroestimulació, alhora permetrà fixar l'electroestimulador autònom a l'esquena de l'animal impedint que aquest pugui arrencar-se'l o aturar l'estimulació.

Durant una setmana l'animal es recupera de la cirurgia i es manté amb les condicions habituals de l'estabulari, descrites anteriorment (apartat 2.2.1). Durant aquest postoperatori, es vigila diàriament les possibles variacions de pes, de consum d'aliments i l'estat general de l'animal, a més de controlar que no hi hagi cap infecció en les ferides realitzades durant la implantació dels elèctrodes. A partir d'aquí es pot iniciar el protocol d'electroestimulació.

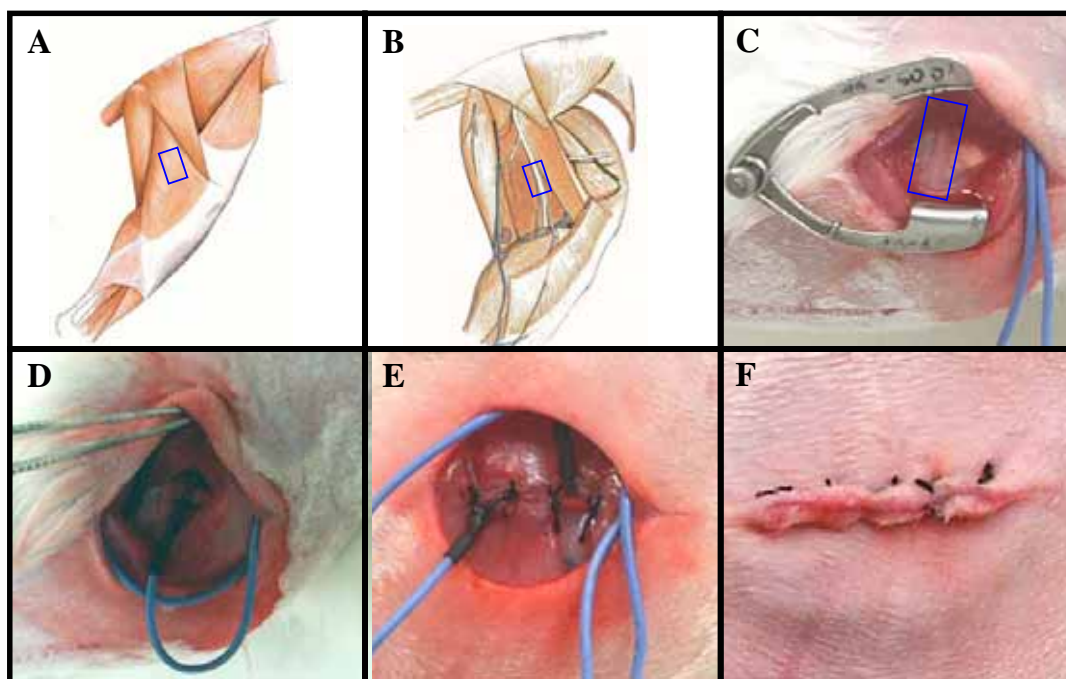


Figura 2.2.3: Protocol d'implantació d'electrodes. Els dibuixos A i B corresponen a esquemes extrets de l'atlas d'anatomia del conill. El requadre en blau de les imatges A, B i C indica la posició del nervi peroneal, en les 2 primeres marquen la zona de treball i el recorregut teòric mentre en C localitza el nervi un cop realitzat el tall a nivell cutani i del múscul *biceps femoral*. En la fotografia D apareixen els elèctrodes implantats a ambdós costats del nervi peroneal. En les fotografies E i F s'aprecien les sutures realitzades al múscul bíceps femoral i a la pell de la pota respectivament.

2.2.2.3.- Model d'electroestimulació

El model emprat en aquest estudi consta de diferents punts d'anàlisi tal i com s'aprecia en la figura que es presenta a continuació.

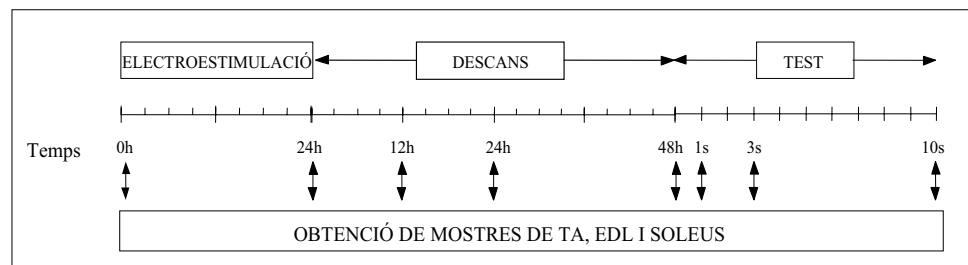


Figura 2.2.4: Esquema del protocol seguit per obtenir mostres del model d'experimentació emprat en l'estudi

Un cop l'animal està recuperat de l'operació d'implantació d'elèctrodes a la pota esquerra (pota entrenada) es col·loca l'estimulador autònom amb la bateria adequada al damunt de la cinta adhesiva, es connecten els cables dels elèctrodes a l'estimulador i es comprova el senyal (la contracció muscular) que genera. Es fixa l'estimulador mirant que els cables quedin ocults i fora de l'abast de l'animal, evitant així que arranqui o talli els cables, malmetent l'estudi.

En l'estudi es manté una estimulació contínua durant 24 hores a 10Hz a la pota entrenada, mentre que la pota contralateral es manté en repòs (pota control). Després del període d'estimulació es deixa que l'animal es recuperi durant 48 hores, l'animal està estabulat, aliment i aigua a l'abast durant tot el procés. En finalitzar aquest descans s'aïllen els músculs TA, EDL i Soleus d'ambdues potes. I es practica un test d'exercici a diferents temps 0, 1, 3 o 10 segons. Per a cada punt d'estudi s'utilitzen de 3 a 6 animals. Els TA, EDL i Soleus es congelen immediatament amb l'ajuda de 2 persones (veure el protocol d'obtenció de mostres apartat 2.2.2.6). El temps que es tarda a tallar i congelar el múscul és de 0.5 segons.

2.2.2.4.- Test d'exercici

El test d'exercici és una estimulació a 10Hz que es realitza durant 1, 3 o 10 segons. Per tal d'assegurar que el temps d'estimulació és el correcte, aquest ha estat controlat per un temporitzador que es pot ajustar als temps requerits. El fet d'analitzar diferents paràmetres a temps tan curts respecte la situació de repòs ens permet estudiar el flux glucolític i glucogenolític durant els primers instants de la contracció muscular.

2.2.2.5.- Registre de la contracció muscular

En determinats animals es monitoritza la contracció muscular emprant el sistema que tot seguit es comentarà. Els músculs emprats per aquest estudi no s'utilitzen per a determinacions de paràmetres bioquímics, com per exemple: la concentració de metabòlits o activitats enzimàtiques.

Als animals sotmesos a aquest protocol se'ls implanta elèctrodes a la pota esquerra. Un cop superat el post-operatori, s'anestesia l'animal i es segueixen els següents passos:

Aïllament del tendó distal del múscul TA

Amb el bisturí es tallen 3 cm de pell just per la zona mitja des de la porció terminal del múscul TA fins al lligament "*retinaculum extensorum crurale*". Llavors, amb tisores es talla la fàscia que recobreix el múscul i la beina del tendó del múscul TA. Es talla el lligament amb el bisturí alliberant així els tendons que passen per sota d'aquest. Arribats a aquest punt podem veure 2.5 cm de tendó i 0.5 cm de múscul TA (Fig. 2.2.5). Per evitar canvis en la temperatura del teixit, així com la pèrdua de líquid i electròlits que podrien modificar la funcionalitat del múscul, en concret la capacitat i magnitud de la contracció (Tesi de J.Maulen 2005); el múscul TA es manté envoltat dels teixits adjacents i de la pell que el recobreix fins a última hora.



Figura 2.2.5: Esquema de la pota posterior del conill. S'observa el lligament "*retinaculum extensorum crurale*" (1), el múscul TA (2), el múscul EDL (3) i el nervi peroneal (4).

Tall i lligadura del tendó del múscul *Tibialis anterior*

Amb unes tisores es talla el tendó del múscul TA, el tall es produeix tan lluny com sigui possible de l'inici del múscul. El tendó es lliga a l'anella del destorcedor (Fig. 2.2.6); es passa el tendó a través de l'anella i es lliga amb un fil de sutura gruixut amb un nus doble i un altre de simple, es diposita l'extrem del tendó damunt dels nusos previs i es fan tres nusos simples.

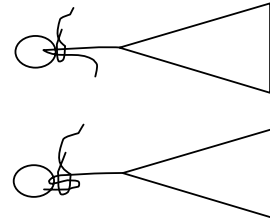


Figura 2.2.6: Lligadura del tendó del múscul *Tibialis anterior*.

Fixació de l'extremitat a la taula de registre

Per aconseguir el registre de la contracció d'un múscul "in vivo" i "in situ", en aquest cas del múscul TA, cal impedir que l'extremitat es mogui. En aquest estudi l'estimulació del múscul es realitza a través del nervi peroneal fet que implica tan la contracció dels músculs que inerva com del moviment de la pota.

La metodologia de fixació de l'extremitat a la taula de registre consisteix en traspasar broques d'acer inoxidable per les parts distals del fèmur i de la tibia. Perquè això sigui més efectiu i relativament senzill en la seva execució es recomanable realitzar una dissecció prèvia per identificar el millor lloc on col·locar les broques, sense provocar danys a vasos sanguinis o nervis. En la part distal de l'extremitat s'hi troben l'artèria i vena safenes, la ruptura de les quals provocaria una hemorràgia que invalidaria el registre.

S'asseguren les dues broques a les peces verticals de la taula. La peça mòbil es desplaça fins a deixar la pota completament estirada.

Lligadura del tendó al transductor de tensió o dinamòmetre

El múscul TA presenta insercions en el seus extrems i les fibres musculars extrafusals s'orienten d'inserció a inserció (tendó a tendó). La contracció del múscul implica un escurçament de l'eix longitudinal d'aquest. Per tan, si es pretén obtenir un bon registre isomètric es condició prèvia alinear el múscul amb el dinamòmetre. Això s'aconsegueix fent una sèrie d'ajustos en la posició del portabroques i pujant o baixant el dinamòmetre en el seu suport. Es realitzen 3 fixacions amb cordill per tal d'assegurar que la pota està

completament immòbil: a) es fixa el peu per sota la taula de registre, b) es pot fixar la broca amb la peça vertical per damunt de la zona anterior del peu, c) es pot fixar la broca amb la peça vertical passant per damunt de l'articulació del genoll.

Llargada ideal del múscul

La tensió o força màxima generada per una fibra muscular o un múscul total depèn de la llargada a que està la fibra o el múscul abans de ser estimulat a través del nervi. Cal doncs aplicar un protocol per establir la llargada ideal.

- 1.- Assegurar que l'orientació dels elèctrodes ens proporcionin una millor resposta.
- 2.- Assegurar que l'estimulació elèctrica del nervi recluta tots els axons motors.
- 3.- Estirar el múscul amb 50g, 100g, 150g, 175g, 200g i 225g. obtenim així diferents longituds del múscul, la llargada ideal serà aquella que proporcionin la màxima força de tracció en aplicar un estímul elèctric d'1 Hz, 1 pols/s amb una durada de 10ms/pols.

2.2.2.5.1.- Test de fatiga a 10 Hz

Emprant el protocol descrit per Cadefau i col. (1993), en el qual s'estimula a 10Hz durant 100ms per cada segon durant 8 minuts. Analitzant gràficament la contracció inicial i la disminució de la força al llarg del temps es pot determinar si el múscul està fatigat i en quin grau.

2.2.2.5.2.- Test de fatiga a 40 Hz

Emprant el protocol proposat per Burke i col. (1973), en el qual s'estimula a 40Hz durant 330ms per cada segon durant 2 minuts. De la gràfica resultant es pot saber la tensió inicial i la final, en grams. La relació tensió final / inicial x 100 ens indica l'índex de fatiga. Per poder establir comparacions, les tensions s'ajusten a gram de múscul, per aquesta raó un cop finalitzat el registre cal extreure tot el múscul per pesar-lo.

2.2.2.6.- Obtenció dels músculs

Si l'animal segueix un protocol d'electroestimulació contínua fins al sacrifici, s'anestesia i s'aïllen els músculs mentre encara es produeix l'electroestimulació. Si es practica un test d'exercici a l'animal cal aïllar els músculs abans d'iniciar el test, perquè quan s'acabi aquest s'han d'extreure i congelar els músculs immediatament. Per últim en els animals que presenten un descans després de l'electroestimulació, es calcula el moment en el qual cal iniciar el protocol d'anestèsia perquè el temps de descans designat es compleixi just en el moment d'extreure les mostres.

2.2.2.6.1.- Aïllament dels músculs

Cal rasurar el pèl d'ambdues potes, sobretot entre el genoll i el turmell, emprant un bisturí es fa un tall a la zona davantera d'ambdues potes concretament en la regió designada abans. Amb unes tisores s'amplia el tall realitzat fins a deixar completament a la vista el múscul *Tibialis anterior*. Tot seguit es separen els diferents tals o fàscies que envolten el múscul i l'uneixen als músculs adjacents, com per exemple EDL. Es separa el tendó del TA de la resta de tendons els quals corresponen a cadascun dels músculs que componen l'EDL. Separant la pell de la cara externa de la pota emprant unes tisores de punta roma i el múscul *Gastrocneiums*, s'aconsegueix localitzar el múscul *Soleus*, el qual cal alliberar-lo dels tals que l'uneixen als músculs adjacents.

2.2.2.6.2.- Extracció dels músculs

Arribats a aquest punt és necessària la presència d'un col·laborador per tal de dur a terme l'extracció dels músculs el més ràpidament possible, essent crucial per la preservació de les mostres. Un dels investigadors pinça el tendó del múscul TA i el talla per la part més distal, deixant el múscul exposat perquè l'altre congeli el múscul TA, mitjançant les tenalles d'acer inoxidable prèviament submergides en nitrogen líquid, i amb una estrebada arrenqui el TA de la regió del genoll on està soldat, tot seguit submergeix les tenalles amb el múscul extret en nitrogen líquid. Sense perdre temps, es pincen els tendons que provenen del múscul l'EDL i els talla per la part distal, amb les tenalles d'acer es congela l'EDL per la regió central, en aquest cas la unió de l'EDL amb el genoll és a través de tendons els quals

cal tallar. Es submergeix el múscul en nitrogen líquid. Per extreure el múscul *Soleus* cal tallar el tendó de la part distal i disseccionar el tendó proximal que es fusiona amb el múscul *Gastrocnemius*, immediatament es congela amb les tenalles d'acer i es submergeix en nitrogen líquid.

2.2.3.- Model de desenvolupament en rates

Per tal de dur a terme aquest estudi s'ha ideat un nou Procediment de Recerca, que porta per títol: "Determinació d'isoenzims de la PFK-2 en diferents estadis de desenvolupament muscular", el qual ha estat avaluat i autoritzat pel Departament de Medi Ambient, DMA: 2574, d'acord amb l'article 32 del decret 214/1997.

2.2.3.1.- Protocol d'anestèsia

Concretament per tal d'induir aquest estat s'administra halotà per via inhalatòria entre 4% i 5%, per mantenir l'animal anestesià durant la intervenció s'administra entre 1% - 2% d'halotà.

2.2.3.2.- Protocol quirúrgic

En el cas dels fetus s'anestesia la mare i s'obre la cavitat abdominal per tal de localitzar la placenta, tot seguit s'alliberen un a un tots els fetus. Un cop s'ha sacrificat la mare amb una sobredosi d'anestèsia, es procedeix a la dissecció de cadascun dels fetus per tal d'aïllar: múscul esquelètic de les potes posteriors, cor, fetge, ronyó, melsa i cervell.

En la resta d'estadis de desenvolupament calia anestesiar un a un els individus de la camada, per tal de realitzar el protocol d'extracció dels diferents teixits analitzats: múscul esquelètic de les potes posteriors (diferenciant en el cas que sigui possible els diferents tipus musculars, TA, EDL i *Soleus*), fetge, cor, cervell, ronyó i melsa.

No cal practicar un protocol d'eutanàsia en cap dels animals mencionats en aquest procediment perquè moren per l'extracció dels diferents òrgans vitals. Tots els teixits es van congelar immediatament després de ser extrets emprant unes pinces d'acer inoxidable prèviament submergides en nitrogen líquid.

2.2.4.- Immunització de conills per l'obtenció d'anticossos

Els anticossos policlonals de la isoforma de múscul de la PFK-2 en conill s'han obtingut en base a una seqüència d'aminoàcids exclusivament d'aquesta isoforma (Fig. 2.2.7), concretament NH₂-E-E-K-A-S-K-R-T-A-C-COOH (Glu-Glu-Lys-Ala-Ser-Lys-Arg-Thr-Ala-Cys), la seqüència ja ha estat emprada per altres autors per tal de generar aquest tipus d'anticòs (Crepin et al., 1989). La síntesi d'aquesta seqüència s'ha encarregat al Servei de Síntesi de Pèptids de la UB, Departament de Química Orgànica de la Facultat de Química de la UB.

	10	20	
1	MSREMGE	LQTQLQKIWI	PFK-2 (Fetge)
1	MEERASKR	TA-----	PFK-2 (Múscul)
1	MSENSTF	STEDSSSSSYKPH	PFK-2 (Cor)
1	MPL---	ELTQSRVQKIWVPV	PFK-2 (Ubiqua)
1	MASPR-	ELTQNPLKKIWMPY	PFK-2 (Testicle)

Figura 2.2.7: Seqüències d'aminoàcids corresponents a les diferents isoformes de l'enzim PFK2/FBPasa2 en rata.

2.2.4.1.- Protocol d'immunitzacions

El protocol d'immunitzacions es realitza en paral·lel sobre 2 conills de la raça *New Zealand (Orictolagus cuniculus)*, aquests animals han estat estabulats durant tot el procés d'immunització i seguits amb totes les atencions possibles i controls rutinaris del seu estat de salut, doncs ha estat la primera vegada que s'ha implementat aquest protocol en el nostre

laboratori. Per dur a terme el procediment s'ha establert un calendari consens entre la bibliografia consultada, recollida en el manual "*ANTIBODIES -A Laboratory Manual*" i l'experiència de laboratoris propers com el del Dr. Oriol Bach.

Dia 0

1.- Extracció d'una mostra de sang entre 5 ml i 10 ml, de la qual es n'obté el "pre-sèrum", o sigui el sèrum on encara no ha aparegut l'anticòs que es vol obtenir, servirà com un "control negatiu".

2.- Preparació de la solució a injectar: es barreja l'antigen conjugat i l'Adjuvant de Freund Complet (CFA) per tal d'homogeneïtzar la solució que s'ha d'injectar, calen dues xeringues de vidre (una amb CFA i l'altra amb l'antigen conjugat) es connecten mitjançant una tub de goma, i es va transferint el líquid d'una xeringa a l'altra successives vegades fins a comprovar que s'han homogeneïtzat els 2 líquids (aquest mètode de barreja de volum mitjà s'ha extret del manual citat anteriorment). Concretament els volums utilitzats són els següents:

1.3 ml conjugat (486,6 µg d'antigen conjugat -180 µg de pèptid) + 1,3 ml CFA

3.- Injecció primària de la barreja antigen – CFA, s'inocula els 2,6 ml en dues injeccions intramusculars de 1,3 ml en llocs diferents.

Dia 14-21 (Recordatori 1) aprox. 15 dies després de la primera inoculació

En aquest cas s'inocula l'antigen (486.6 µg d'antigen conjugat) barrejat amb l'Adjuvant de Freund Incomplet (IFA) en proporció 1:1. La injecció torna a ser intramuscular i repartint la dosi en dues inoculacions de 1,3 ml en zones diferents.

Dia 24-31 (10 dies després de la segona inoculació)

Extracció de sang n°1 entre 5 ml i 10 ml, de la qual s'obtindrà sèrum per avaluar-ne la producció d'anticossos.

Dia 42-49 (Recordatori 2)

Després de 4 a 6 setmanes de la segona inoculació cal repetir l'administració de la barreja Antigen-IFA 1:1. En aquest cas s'injecten els 2,6 ml de mescla a través de 6 injeccions subcutànies (cadascuna d'elles amb 433.3 µl) a l'esquena de l'animal.

Dia 40-59 (8-16 dies després de la tercera inoculació)

Per tal de trobar en sèrum el nombre màxim d'anticossos (Fig. 2.2.8) caldrà fer una sèrie d'extraccions de sang els dies 8 – 10 – 12 – 14 – 16 després de la tercera inoculació. Cadascuna d'aquestes extraccions serà d'un màxim de 50 ml de sang i posteriorment analitzada per separat i no es barrejarà amb les altres, d'aquesta manera les fraccions amb un títol superior no es veuran alterades.

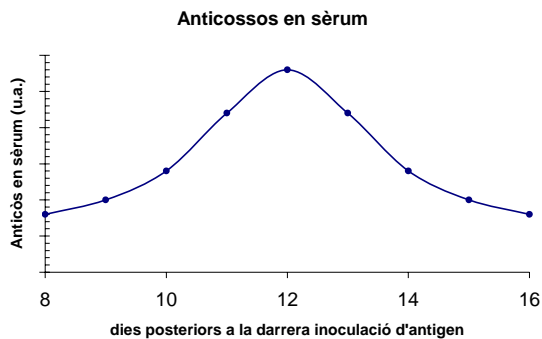


Figura 2.2.8: Gràfica tipus on es presenta la titulació d'anticossos en cadascun dels dies en que s'ha fet l'extracció de sang després de la tercera inoculació.

2.2.4.2.- Obtenció del sèrum

1.- Immobilitzar el conill i localitzar la vena perifèrica de l'orella del conill, de fàcil accés i amb molt poques terminacions nervioses. Sinó és possible visualitzar-la, aplicarem calor per tal de provocar la seva dilatació.

2.- L'extracció de sang de la vena de l'orella es realitza amb una agulla *palometa* connectada amb un tub de goma amb una agulla de xeringa a l'altre extrem. Amb la *palometa* es punxa la vena biaix, per no travessar la vena, quan comença a aparèixer sang pel tub amb l'altra agulla es punxa la tapa de goma del tub *vacutainer* (tub de vidre que en el seu interior s'hi ha fet el buit), la sang és aspirada cap al tub, quan s'ha recollit la sang necessària es treu l'agulla del *vacutainer* i la *palometa* de la vena si ja no s'ha de treure més

sang. Si no es disposa de tubs *vacutainer* o bé el volum d'extracció és superior a la capacitat del tub, es pot treure la segona agulla del tub i connectar una xeringa al tub, en aquest cas cal anar amb molt de compte al realitzar l'aspiració de la sang, en el cas que es produeixi una aspiració massa ràpida i/o intensa, es pot col·lapsar la vena, mentre que si no és prou ràpida la sang pot coagular-se a l'interior del tub de goma.

El volum màxim de sang que es pot extreure és de 50 ml/extracció, si el volum és superior es causarà una anèmia al conill. Per aturar l'extracció cal aplicar pressió sobre el punt d'inserció de l'agulla *palometa*, durant 10-20 segons i comprovar que la fuga s'ha aturat.

3.- Després de recollir la sang cal deixar que coaguli, per facilitar el procés deixarem el tub a 37 °C durant 30 – 60 minuts. Es separa el coàgul format de les parets del tub amb molt de compte amb una pipeta Pasteur.

4.- Per obtenir el sèrum cal precipitar el coàgul i la matèria insoluble emprant una centrifugació a 3000 rpm durant 10 minuts a 4 °C. El sèrum es pot guardar a – 20 °C o temperatures inferiors durant anys.

2.2.4.3.- Avaluació dels anticossos obtinguts

Els anticossos es troben en el sèrum, però és possible que calgui algun pas per tal de concentrar-los o bé per eliminar partícules que podrien interferir en posteriors anàlisis. Les tècniques més utilitzades per la purificació i/o concentració dels anticossos són el protocol amb sulfat d'amoni i la diàlisi. En aquest cas no es realitzà cap dels dos protocols perquè en els primers assaigs es va veure que l'especificitat de l'anticòs era prou elevada. Així doncs, el següent pas es *titular* els anticossos, saber quina quantitat d'anticossos hi ha en cadascuna de les fraccions recollides durant el procés d'extracció de sèrum després de les immunitzacions, per saber quina dilució cal aplicar a cada fracció escollida per detectar millor la proteïna a estudi.

1.- Preparar la mostra, en aquest cas es tracta de múscul esquelètic de rata homogeneïtzat en 10 volums de tampó d'homogeneïtzació amb un còctel d'inhibidors suplementari seguint el protocol d'extractes neutres (ap. 2.3.2) on els inhibidors emprats són: leupeptina, aprotinina, PMSF, benzamidina i β -mercaptoetanol.

2.- S'afegeix el 20% de tampó de càrrega i es desnatura a 95°C durant 4 minuts.

3.- Es fa una electroforesi (ap. 2.3.5) amb un gel separador a l'11% i concentrador al 5% d'acrilamida. On es carreguen de 30 µg a 100 µg de proteïna (de la mostra) per pou. Es corre a 65 V fins que el front arriba al gel separador, llavors s'augmenta el voltatge fins a 110 V i es manté fins que surt el front.

4.- El gel d'acrilamida sortint de l'electroforesi és transferit i utilitzat per immunodetectar la presència de mPFK2 amb l'ajut dels anticossos obtinguts, en conjunt es dur a terme la tècnica de western-blot (apartat 2.3.6)

Com anticossos primaris s'utilitzaran els sèrums obtinguts els diferents dies: pre-sèrum (control negatiu), sèrum de la primera extracció, sèrum de la segona extracció, sèrums extrets els dies 8-10-12-14 després de la tercera inoculació. Pels assaigs s'utilitzaran diverses dilucions 1/10 - 1/100 - 1/500 - 1/1000 - 1/5000 - 1/10000, dilucions aplicades en altres laboratoris on l'obtenció d'anticossos és habitual.

Els anticossos secundaris emprats en aquest estudi són anticossos que reconeixen els anticossos generats en conill que presenten la peroxidasa de *Horseradish* (HRP) conjugada.

2.3.- PROCEDIMENTS BIOQUÍMICS

2.3.1.- Tractament dels teixits

Un cop es disposa dels músculs TA, EDL i *Soleus* congelats cal seguir un rigorós procés per tal de treballar amb porcions homogènies de teixit muscular i alhora evitar que aquest es malmeti. Així doncs, primer s'extrauran les porcions de teixit connectiu i sang que hagi quedat congelada damunt del teixit muscular, per fer-ho, es mantindrà el múscul en contacte amb nitrogen líquid mentre amb l'ajuda d'un bisturí s'anirà eliminant per fricció tan la sang com les fibres de teixit connectiu que envolten el múscul. Quan es disposa del múscul "net" es procedeix a la pulverització del mateix, emprant un morter d'acer inoxidable, prèviament submergit en nitrogen líquid, es converteix en pols petites porcions de múscul, d'aquesta manera s'aconsegueix que un teixit heterogeni com el múscul sigui homogeni, es manté el teixit congelat durant tot el procés evitant la seva degradació i el fet de treballar amb pols de múscul facilita l'homogeneïtzació durant l'obtenció dels extractes.

Per tal de dur a terme cadascuna de les determinacions que s'han realitzat en aquesta tesi s'ha tractat el teixit muscular seguint diferents protocols d'extracció per tal de preservar de la degradació cadascun dels elements a valorar.

2.3.1.1.- Extractes neutres

L'obtenció d'extractes neutres permet treballar amb proteïnes en perfecte estat en les quals es preserva el grau de fosforil·lació que presenten en el moment precís en que s'ha congelat el teixit, així com també preserven la seva estructura i activitat. Aquests extractes seran útils per determinar la presència de determinades proteïnes en el teixit a estudi (emprant tècniques bioquímiques, electroforesi i western-blot) i avaluar la seva activitat (ap. 2.4.2).

REACTIUS

Tampó d'homogeneïtzació: El tampó d'homogeneïtzació consta d'una fracció que pot estar emmagatzemada a 4°C, Tris-HCl (pH 7) amb EDTA i KF i els inhibidors de proteases i

fosfatases que cal tenir-los preparats, cadascun per separat i congelats a -20°C. (Aprotinina 5mg/mL, Leupeptina 5mg/mL, PMSF 0.1M i Benzamidina 0.1M).

En el moment d'utilitzar les concentracions finals són: Tris-HCl 50 mM (pH 7), EDTA 4 mM, KF 50 mM, β-mercaptoetanol 30 mM, Aprotinina 0.1mg/ml, Leupeptina 0.1mg/ml PMSF 1mM i Benzamidina 1mM.

PROTOCOL

El procediment que s'ha seguit per a l'extracció en medi neutre

- 1.- Es pesen aproximadament 20mg de múscul pulverizat congelat en N₂ líquid.
- 2.- Afegir tampó d'homogeneïtzació sencer
 - 1/5 (p/v) (mg/μl) en el cas d'avaluar activitat PFK-2
 - 1/15 (p/v) per treballar amb electroforesi/*western-blot*.

La mostra es manté en gel mentre es durant tot el procés d'homogeneïtzació, que es dur a terme amb el Polytron, en posició 5, durant 10s. Aquest protocol es repeteix tres vegades, deixant 50s en repòs entre cadascuna. És molt important que no es formi espuma en aquest procés perquè seria un indicador de desnaturalització de proteïnes, fet que no ens interessa perquè són precisament els elements a estudiar. Abans de començar el procés i entre les mostres cal netejar les fulles del Polytron amb aigua destil·lada i posteriorment assecant les fulles amb paper absorbent mentre es posa en funcionament.

- 4.- Es centrifuga l'homogenat a 12000g a 4°C durant 20 minuts. Per tal d'eliminar el material més groller, membranes i orgànuls que no s'hagin destruït en el procés d'homogenització.
- 5.- Es recull el sobrenadant i es comencen les determinacions enzimàtiques mantenint la mostra sempre a 4°C.

2.3.1.2.- Extractes àcids

Aquest tipus d'extracte permet avaluar l'ATP, Creatina fosfat (CP), creatina i la major part dels intermediaris del cicle dels àcids tricarboxílics, Glucosa, Glucosa-6-fosfat (Glu-6-P), Glucosa-1-fosfat (Glu-1-P), Fructosa-6-fosfat (Fru-6-P), Fructosa-1,6- bisfosfat (Fru-1,6-P₂), Dihidroxiacetona fosfat (DHAP) i Gliceraldehid-3-fosfat (Gly-3-P), es poden emmagatzemar durant llargs períodes a temperatures inferiors als -50 °C. El procediment que s'ha seguit per a l'extracció en medi àcid fou descrit per Harris i col. (1974).

REACTIUS

HClO₄ 0.5 mM i KHCO₃ 2.3 M

PROTOCOL

- 1.- Pesar entre 15 i 25 mg de teixit fresc (múscul en pols), evitant que es descongeli.
 - 2.- Afegir 600 µl d'àcid perclòric (HClO₄) 0.5 M.
Homogeneïtzar amb el Polytron, posició 5, durant 10s seguidament es deixa en repòs durant 50s, aquest procediment es repeteix tres vegades. La mostra es manté en un vas de precipitats amb gel mentre es dur a terme tot el procés d'homogeneïtzació.
 - 3.- Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm en una centrífuga Eppendorf de la cambra freda.
 - 4.- Recuperar 540 µl de sobrenadant i neutralitzar afegint 135 µl KHCO₃ (2.3 M) agitar amb el vòrtex fins que no es produeixin més bombolles.
 - 5.- Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm a la cambra freda, recuperar el sobrenadant que ja es podrà utilitzar per a les diferents valoracions.
- El precipitat que s'obté després de la primera centrifugació pot emprar-se per fer la valoració del glicogen, tot el procés es fa en fred (4 °C).

2.3.1.3.- Extractes bàsics

Aquest tipus d'extracte es dur a terme per poder determinar les concentracions de Fru-2,6-P₂ i de Glu-1,6-P₂, seguint el procediment descrit per Van Schaftingen i col. (1982).

Aquests metabòlits són molt làbils quan es realitzen extractes àcids o neutres i per tan s'han de valorar preparant un altre tipus d'extracte.

REACTIUS

NaOH 50 mM i HCl 1M

PROTOCOL

- 1.- Pesar entre 15 i 25 mg de teixit fresc i s'addiciona NaOH 50 mM, per tal d'obtenir un homogenat 1:10 (pes:volum).
- 2.- Homogeneïtzar el teixit seguint les mateixes condicions que als extractes àcids
- 3.- Col·locar l'extracte durant 10 minuts a 90°C en el bloc tèrmic.
- 4.- Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm en la centrífuga Eppendorf.
- 5.- Recuperar el sobrenadant.
- 6.- Neutralitzar el sobrenadant obtingut amb HCl 1M.

2.3.2.- Valoracions metabòliques

Les valoracions dels diferents metabòlits analitzats es duen a terme emprant tècniques enzimàtiques que utilitzen substrats o bé generen productes amb la capacitat d'emetre fluorescència, concretament en tots els assaigs que es duen a terme en aquesta tesi es valora la desaparició o producció de NADH, NADPH associats a una reacció enzimàtica.

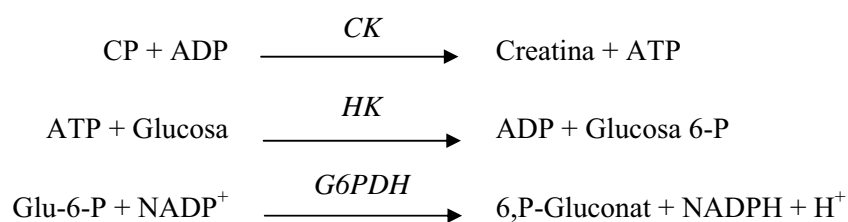
Aquestes tècniques enzimàtiques es realitzen a punt final, o sigui, es determina tot el producte format o bé tot el substrat degradat. Per poder-les monitoritzar cal realitzar lectures de fluorescència, aquestes es realitzen amb un fluorímetre (Kontron Type SFM 25) el qual emet una llum d'excitació a 340 nm, que en irradiar les partícules de NADH o NADPH aquestes emeten una llum (fluorescència) a 465 nm detectada per l'aparell. Els valors que aporta l'aparell s'utilitzen per fer els càlculs pertinents per conèixer la concentració de cadascun dels metabòlits analitzats.

Per la determinació de la Fru-2,6-P₂ i Glu-1,6-P₂ s'utilitzen tècniques espectrofotomètriques on ambdós metabòlits actuen com a cofactors de les reaccions catalitzades per PFK-1 i PGM respectivament. S'han utilitzat dos espectrofotòmetres, UVIKON 930 (Kontron) i DU 640 (Beckman Coulter).

2.3.2.1.- ATP i CP

FONAMENT

Aquesta determinació es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid. L'element analitzat en aquesta determinació és NADPH, el qual es genera en l'última reacció. Si es realitza el protocol establert es pot valorar ATP i després CP sense que hi hagi interferència de resultats.



CK: Creatina quinasa / **HK:** Hexoquinasa / **G6PDH:** Glu-6-P Deshidrogenasa

REACTIUS

Tampó **Tris-HCl** 1 M, pH 8.1,

MgCl₂ 1 M, **DTT** 0.5 M, **Glucosa** 100 mM, **NADP** 50 mM

G6PDH 350 U/ml

HK 280U/mL (diluïda: 25µl en 1ml de tampó)

ADP + CK 25U/mg (2 mg d'ambdós en 1ml de tampó amb BSA 0.1%)

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades:

Tris 50 mM pH 8.1; MgCl₂ 1 mM; DTT 0.5 mM; Glucosa 100 µM; NADP 50 µM i G6PDH 0.02 U/ml.

2. En un tub es col·loca 1ml de mescla de reacció i s'afegeixen 10 µl de mostra, aigua (blancs) o de la solució estàndard (ATP 200 µM). Barrejar i llegir la fluorescència (R₀).

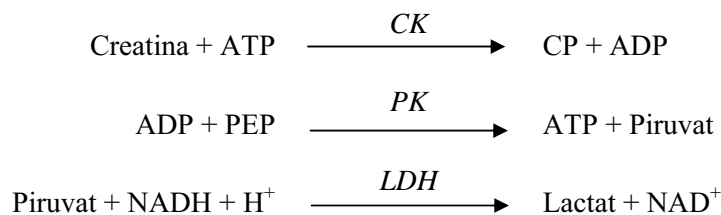
3. Afegir 25 µl d'hexoquinasa diluïda (concentració final 0.16 U/ml). Barrejar i deixar els tubs en foscor durant 30 minuts i detectar la fluorescència (R_1), l'increment de fluorescència (R_1-R_0) indica la formació de NADPH és degut a la presència d'ATP en la mostra avaluada.
4. Afegir 20µL de la solució Creatina quinasa amb ADP (concentració final 1 U/ml i 0.1 mM respectivament), s'incuba durant 1 hora i es llegeix la fluorescència (R_2), l'increment observat (R_2-R_1) també indica la formació de NADPH, però en aquest cas és degut a la fosfocreatina de la mostra.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons uns blancs en els quals enlloc de mostra hi ha aigua. Emprant la relació de concentració de la solució estàndard i la fluorescència originada es pot determinar finalment la concentració de cadascun dels metabòlits avaluats; ATP i CP.

2.3.2.2.- Creatina

FONAMENT

Aquesta determinació es basa en el mètode descrit per Lowry i Passoneau (1972), a partir d'un extracte àcid. En aquesta determinació es valora el contingut de NADH, per tal de poder conèixer el contingut de creatina de les mostres analitzades.



CK: Creatina quinasa / **PK:** Piruvat quinasa / **LDH:** Lactat Deshidrogenasa

REATIUS

Tampó **Imidazol** 1 M, pH 7,5

MgCl₂ 1 M, **KCl** 1 M, **PEP** 10mM, **ATP** (0.2 mg per ml de mescla de reacció), **NADH** 15 mM

LDH 12500 U/ml (0.2 µl per cada ml de mescla de reacció)

PK 2000 U/ml (0.4 µl per cada ml de mescla de reacció)

CK 25 U/ml (5 mg de CK en 1 ml de tampó amb BSA 0.1%)

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades:

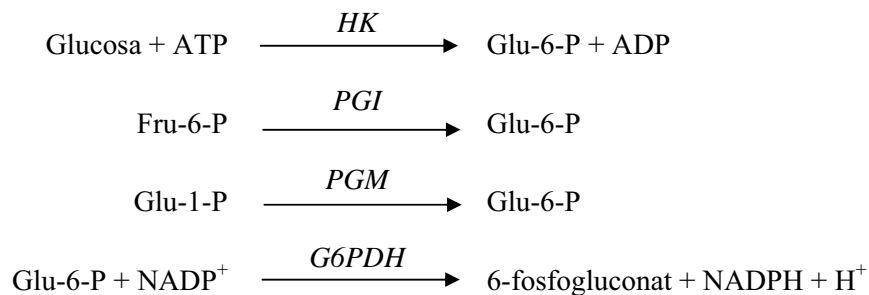
Imidazol 50 mM; MgCl₂ 2.5 mM; KCl 30 mM; PEP 25 µM; ATP 200 µM; NADH 75 µM; LDH 0.24 U/ml i PK 0.75 U/ml.

2. En un tub es col·loca 1ml de mescla de reacció i s'afegeixen 10 µl de mostra, aigua (blancs) o de la solució estàndard de creatina 500 µM. Es barreja la solució i després de 15 minuts es llegeix la fluorescència (R₀).
3. Afegir 25 ml de CK diluïda (concentració final 3.6 U/ml), s'incuba durant 30 minuts i a continuació es llegeix la fluorescència (R₁), en aquest cas la disminució de fluorescència observada és deguda a la creatina present en la mostra analitzada.

Les variacions de les lectures es corregeixen segons els blancs. Emprant la relació de concentració de la solució estàndard i la fluorescència originada es pot determinar finalment la concentració de la creatina.

2.3.2.3.- Glucosa-6-P, Fructosa-6-P, Glucosa-1-P i GlucosaFONAMENT

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



HK: Hexoquinasa / **PGI:** FosfoGlucosomerasa / **PGM:** FosfoGlucosomerasa / **G6PDH:** Glucosa-6-P Deshidrogenasa

REACTIUS

Tampó **Tris-HCl** 1 M pH 8.1

MgCl₂ 1 M, **DTT** 0.5 M, **EDTA** 200 mM

ATP+MgCl₂ 0.3 M, MgCl₂ és quelat per l'ATP si no es prepara en la mateixa proporció ATP i MgCl₂, l'ATP segregaria MgCl₂ de la solució i alteraria les condicions de treball.

NADP 50 mM

G6PDH 350 U/ml (preparació de la dilució, 10 µl en 1.5 ml de tampó)

PGM 400 U/ml (preparació de la dilució, 20 µl en 1 ml de tampó)

PGI 3500 U/ml (preparació de la dilució, 10µl en 1ml de tampó)

HK 280 U/ml (preparació de la dilució, 25µl en 1ml de tampó)

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades:

Tris 50 mM pH 8.1; MgCl₂ 1 mM; DTT 0.5 mM; ATP+MgCl₂ 300 µM; NADP 50 µM
EDTA 100 µM.

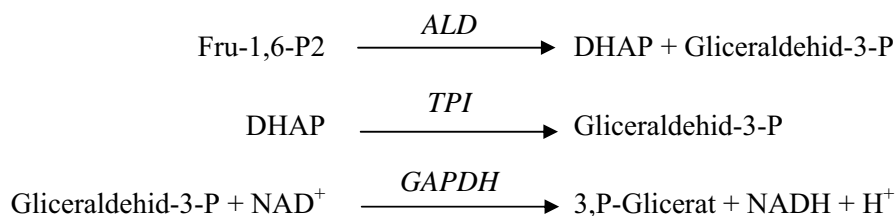
2. En un tub es col·loca 1ml de mescla de reacció i s'afegeixen 100 µl de mostra, aigua (blancs) o de la solució estàndard (Glu 6-P 5 µM i Glucosa 10 µM). Barrejar i llegir la fluorescència (R₀).
3. Afegir 10 µl de G6-PDH diluïda (0.02 U/ml). Deixar 15 minuts en un lloc fosc i a continuació llegir la fluorescència (R₁).
4. Afegir 10 µl de PGM diluït (concentració final 65 mU/ml), barrejar i deixar 15 minuts en lloc fosc, llegir la fluorescència (R₂) en finalitzar el període d'incubació.
5. Afegir 10 µl de PGI diluït (concentració final 0.35 U/ml), barrejar i deixar 15 minuts en un lloc fosc. Després de la incubació, es llegeix la fluorescència (R₃).
6. Afegir 25 µl de HK diluïda (concentració final 0.14 U/ml), barrejar i deixar 15 minuts en lloc fosc, llegir la fluorescència (R₄).

Les variacions de fluorescència detectades, sempre corregides amb les lectures obtingudes pels blancs i contrastant les dades obtingudes amb les determinacions de la solució estàndard es determinen les concentracions de Glu 6-P, com R₁-R₀, la Glu 1-P (R₂-R₁), Fru 6-P (R₃-R₂) i Glucosa (R₄-R₃).

2.3.2.4.- Gliceraldehid-3-P, Dihidroxiacetona-P i Fructosa-1,6-P₂

FONAMENT

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



ALD: Aldolasa / **TPI:** Triosafosfat Isomerasa / **GAPDH:** Gliceraldehid 3-P Deshidrogenasa.

REACTIUS

Tampó **Imidazol** 1 M pH 7.5

β -mercaptoetanol 14.3 M, **EDTA** 200 mM, **Na₂HAsO₄** 1 M, **NAD** 100 mM

GAPDH 800 U/ml (preparació de la dilució, 100 μ l en 1 ml de tampó)

TPI 350 U/ml (preparació de la dilució, 5 μ l en 1 ml de tampó)

Aldolasa 90 U/ml (preparació de la dilució, 5 μ l en 1 ml de tampó)

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades:

Imidazol 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, NAD 100 μ M i Na₂HAsO₄ 1 mM.

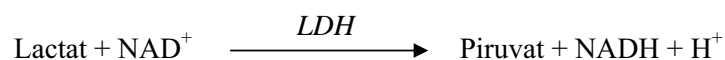
2. En un tub es col·loca 1ml de mescla de reacció i s'afegeixen 75 μ l de mostra, aigua (blancs) o la solució estàndard (Fru-1,6-P₂ 2 μ M). Barrejar i llegir la fluorescència (R₀).
3. Afegir 10 μ l de GAPDH diluïda (concentració final 0.8 U/ml). Es deixa 15 minuts en un lloc fosc i es llegeix la fluorescència (R₁). L'increment de fluorescència observat (R₁-R₀) permet calcular la concentració de Gliceraldehid 3-P
4. Afegir 10 μ l de TPI diluïda (concentració final 2.4 U/ml), es deixa 15 minuts en un lloc fosc i es llegeix la fluorescència (R₂). El nou increment de la fluorescència permet calcular la concentració de DHAP.
5. Afegir 10 μ l de Aldolasa diluïda (concentració final 0.02 U/ml), després de 15 minuts d'incubació, es llegeix la fluorescència (R₃). El darrer increment de la fluorescència permet determinar la concentració de Fru-1,6-P₂.

Per determinar correctament les concentracions dels diferents metabòlits, cal sempre corregir les lectures obtingudes amb els resultats dels *blancs* i contrastar amb les dades obtingudes amb les determinacions de la solució estàndard.

2.3.2.5.- Lactat

FONAMENT

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



LDH: Lactat Deshidrogenasa.

REATIUS

Tampó **Hidrazina** 1 M pH 10

Glicina 1 M, **NAD** 100 mM

LDH 550 U/ml (preparació de la dilució, 250 µl en 1 ml de tampó)

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades:

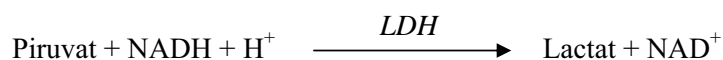
Hidrazina 100 mM, Glicina 100 mM i NAD 0.5 mM a pH 10

2. En un tub es col·loca 1ml de mescla de reacció i s'afegeixen 10 µl de mostra, aigua (blancs) o de la solució estàndard de Lactat (444 µM). Es barreja i llegeix la fluorescència (R_0).
3. Afegir 25 µl de LDH diluïda (concentració final 8 U/ml). Es deixa 60 minuts en un lloc fosc, a continuació es llegeix la fluorescència (R_1).
4. L'increment de fluorescència observat ($R_1 - R_0$) en les mostres és degut al contingut de lactat, cal però corregir les lectures obtingudes considerant els blancs i finalment contrastant les dades amb les lectures de la solució estàndard.

2.3.2.6.- Piruvat

FONAMENT

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



LDH: Lactat Deshidrogenasa.

REACTIUS

Tampó **Fosfat** 50 mM pH 7 (per preparar el tampó fosfat s'utilitza; K_2HPO_4 30,6 mM + KH_2PO_4 19,4 mM)

NADH 15 mM

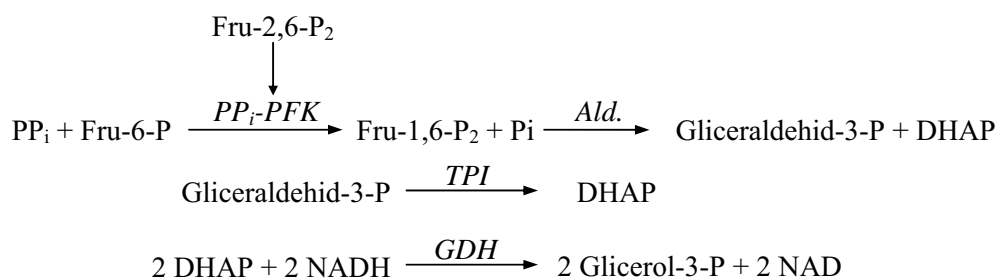
LDH 550 U/ml (preparació de la dilució, 10 μl en 2 mlde tampó)

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades: Tampó fosfat 50 mM pH 7, NADH 750 μM .
2. En un tub es col·loca 1 ml de mescla de reacció i s'afegeixen 50 μl de mostra, aigua (blancs) o de la solució estàndard de Piruvat 10 μM . Es barreja i s'legeix la fluorescència (R_0).
3. Afegir 10 μl de LDH diluïda (concentració final 0.6 U/ml). Es deixa 20 minuts en un lloc fosc, a continuació es llegeix la fluorescència (R_1).
4. La disminució de fluorescència observada ($R_1 - R_0$) en les mostres és deguda al contingut de piruvat, cal però corregir les lectures obtingudes considerant els blancs i finalment contrastant les dades amb les lectures de la solució estàndard.

2.3.2.7.- Fructosa-2,6- P₂FONAMENT

Aquesta determinació es basa en el mètode descrit per Van Schaftingen i col. (1982) a partir d'un extracte bàsic. La disminució de l'absorbància a 340nm durant almenys 5 minuts és producte de la progressiva transformació del NADH en NAD.



PP_i-PFK: 6-fosfofructo-1-quinasa dependent de PP_i / **ALD:** Aldolasa / **TPI:** Triosafosfat Isomerasa / **GDH:** Glicerol Deshidrogenasa.

MATERIAL I REACTIUS

Tampó **Tris-acetat** 50 mM pH 7.8, **Acetat-Mg** 5 mM

PP_i-PFK de patata (veure purificació de l'apartat 2.3.2.7.1.)

Fru-6-P acidificada (apartat 2.3.2.7.2.) 300 mM, **Glu-6-P** 100 mM

NADH 2 mM

Enzims auxiliars (cal dessalar-los, apartat 2.3.2.7.3.):

- **Aldolasa** 9 U/ml

- **GDH/TPI** 8000 U/ml, 50000 U/ml.

PP_i-Na 10 mM

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades: Tris-Acetata 50 mM pH 7.8, acetat de magnesi 5 mM, NADH 0.2 mM, Fru-6-P 1.4 mM, Glu-6-P 0.5 mM, Aldolasa 0.4 U/ml, GDH 8 U/ml, TPI 50 U/ml, PP_i-PFK (l'activitat depèn de la purificació), mostra i aigua fins arribar a 950 µl.

2. Es deixa atemperar a 30 °C mentre s'enregistra l'absorbància a 340 nm. S'inicia la reacció afegint a cada cubeta 50 µl de PP_iNa 10 mM i s'enregistra la disminució de l'absorbància durant un mínim de 5 minuts en que la velocitat de reacció sigui lineal.
3. Per calcular la concentració existent en les mostres, es construeix una recta patró per concentracions de Fru-2,6-P₂ entre 0 i 5 nM.

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

2.3.2.7.1.- Purificació de l'enzim PP_i-PFK de patata

REACTIUS

Tampó d'homogenització: Tris-acetat 20 mM pH 8.2, Acetat-Mg 1 mM, DTT 2 mM

Polietilenglicol(PEG)₆₀₀₀, Glicerol, Patata

HCl 1 M, KOH 1 M, PP_i-Na 10 mM

PROTOCOL

1. Homogeneïzar de 400 g a 500 g de patates acabades de pelar, rentades i tallades en una batedora *Waring-Blendor* amb 2 volums de tampó d'homogeneïtzació
2. Filtrar l'homogenat a través de gases i mesurar el volum resultant (**volum 1**).
3. Afegir PP_i i MgCl₂ fins que la concentració final sigui 2 mM, a continuació ajustar el pH a 8.2 amb KOH 1 M.
4. Introduir la solució en un bany d'aigua a 70 °C – 80 °C i escalfar-la fins a 59 °C. Mantenir a aquesta temperatura durant 5 minuts agitant suaument.
5. Refredar ràpidament en un bany amb gel i sal, ajustar el pH a 7.1 en fred amb HCl 1M. A continuació mesurar el volum (**volum 2**)
6. La solució es manté entre 0 °C i 4 °C, s'agita manualment mentre s'afegeix lentament PEG₆₀₀₀ de manera que la proporció final sigui 5-6 % (p:v). Un cop dissolt el PEG₆₀₀₀ s'agita lentament durant 15 minuts a la cambra freda.
7. Repartir el volum en els tubs de centrífuga i deixar reposar durant 10 minuts a la cambra freda. Centrifugar durant 10 minuts a 6000 rpm (rotor d'angle fix GS-3).

8. Mesura el volum del sobrenadant resultant (**volum 3**), i afegir PEG₆₀₀₀ fins arribar al 10% agitant lentament. Un cop dissolt tot el PEG₆₀₀₀ s'agita lentament durant 15 minuts en la cambra freda.
9. Repartir el volum en els tubs de centrífuga i deixar reposar durant 10 minuts a la cambra freda. Centrifugar durant 10 minuts a 6000rpm (rotor d'angle fixe GS-3).
10. Redissoldre el sediment amb el tampó d'homogeneïtzació (aproximadament 20mL).
11. Centrifugar a 15000 rpm durant 15 minuts, mesurar el volum del sobrenadant (**volum 4**), enzim útil.
12. Afegir glicerol en un 20 % (v/v).
13. Fraccionar la solució final en alíquotes i guardar a - 40 °C.

2.3.2.7.2.- Hidròlisi àcida, obtenció de Fru-6-P lliure de Fru-2,6-P₂

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

2.3.2.7.3.- Dessalat d'enzims

En la valoració de fructosa 2,6-bisfosfat és necessari un dessalat previ dels enzims utilitzats per tal d'evitar interferències degudes a l'elevat contingut en sulfat amònic que tenen les suspensions comercials. Per tal de dur a terme el dessalat es realitza una cromatografia de gel filtració en Sephadex G-25 fine.

REACTIUS

Preparació de les columnes: les columnes són xeringues de plàstic de 5 ml, a les quals es tapa l'extrem amb llana de vidre. Al damunt es col·loca el gel prèviament hidratat amb aigua com a mínim 24 hores abans. Una vegada els tubs estan plens de gel fins els 5 ml, es col·loquen en tubs de vidre per poder centrifugar-los sense tacar tot amb l'aigua del gel. Les

xeringues es van centrifugar aleshores a 3000 rpm durant 2 minuts en la 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.

Preparació dels enzims;

volum de suspensió comercial es centrifuga a 15000 rpm durant 2 minuts en centrífuga de Eppendorf, el sediment es resuspèn en el mateix volum d'una solució amortidora. 1^a eliminació de sals.

Les solucions d'enzims s'apliquen a les columnes (50 µl de mostra/columna), centrifugació de les columnes durant 2 minuts a 3000 rpm en la centrífuga JOUAN CR 1000, el sobrenadant ja és la preparació enzimàtica dessalada.

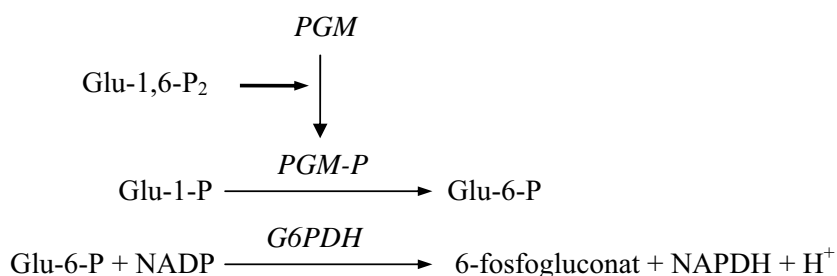
PROTOCOL

1. Es barreja un volum de solució G3PDH/TPI amb 4 volums de la solució d'aldolasa.
2. Es centrifuga a 15000 rpm durant 5 minuts en fred (0 °C - 4 °C).
3. El sediment es resuspèn amb tampó Tris-acetat emprat en la valoració de la Fru-2,6-P₂ amb un volum final idèntic a l'inicial.
4. 250 µl de solució enzimàtica en cada columna; es col·loca cada xeringa en un tub de vidre nou, on es recolliran els eluïts de la columna després de la centrifugació a 3000 rpm durant 5 minuts en fred.
5. S'ajunten els eluïts per homogeneïtzar les diferències.
6. Es fan alíquotes petites de l'enzim concentrat i es congelen a - 20 °C.
7. Per a l'assaig de la Fru-2,6-P₂ diluïrem els enzims 1:10.

2.3.2.8.- Glucosa-1,6- P₂

FONAMENT

Aquesta determinació es basa en el mètode descrit per Van Schaftingen i col. (1982) a partir d'un extracte bàsic.



PGM: FosfoGlucoMutasa / **PGM-P:** FosfoGlucoMutasa activada per Glu-1,6-P₂

G6PDH: Glu-6-P Deshidrogenasa.

La Glu-1,6-P₂ actua com a cofactor de PGM, catalitzant la transformació de Glu-1-P a Glu-6-P. Posteriorment es transforma en 6-fosfogluconat per acció de G6PDH perdent un hidrogen que és capturat pel NADP passant a ser NADPH. L'espectrofotòmetre registre un increment d'absorbància a 340 nm en el transcurs dels 5 minuts, aquest fet és produït per l'augment en la concentració de NADPH.

REACTIUS

Tris-HCl 80 mM pH 7.4, **MgCl₂** 10 mM, **Histidina** 64 mM, **Glu-1-P** (lliure de Glu-1,6-P₂) 2 mM

NADP 0.2 mM

G6PDH 350 U/ml, **PGM** 100 U/ml

PROTOCOL

1. Preparar la mescla de reacció, amb els següents reactius a les concentracions finals indicades: Tris-HCl 40 mM pH 7.4 , MgCl₂ 10 mM, Histidina 32 mM, Glu-1-P (lliure de Glu-1,6-P₂) 2 mM, NADP 0.1 mM, G6PDH (0,35 U/ml mescla)
2. En una cubeta d'espectrofotometria es col·loquen 350 µl de mescla de reacció + 7µl de PGM 1/200 diluïda amb BSA 10 mg/ml (0,5 U/ml mescla) i aigua destil·lada (a determinar en funció de la quantitat d'estàndard o mostra que s'analitzi. Es deixa temperar a 30 °C durant 3 minuts mentre s'enregistra l'absorbància a 340 nm. Així s'estableix una línia base.

3. S'inicia la reacció afegint una quantitat de Glu-1,6-P₂ coneguda (estàndard) o bé desconeguda, la mostra. El volum total de l'assaig és de 0,7 ml. Es determina l'absorbància a 340 nm durant 5 minuts.
4. Per calcular la concentració existent en les mostres, es construeix una recta patró per concentracions de Glu-1,6-P₂ entre 0 nM i 80 nM.

2.3.2.8.1.- Purificació de Glucosa-1-fosfat

FONAMENT

La purificació de la Glu-1-P es necessària perquè en el flascó comercial hi ha Glu-1,6-P₂ (contaminant), unida amb Mg, un cofactor de la reacció de síntesi de Glu-1,6-P₂.

La purificació es realitza a través de l'aplicació de cromatografia de bescanvi iònic en una columna de DOWEX-1x8 en forma clorur.

REACTIUS

NaOH 0.5 M. La resina utilitzada és DOWEX-1x8 en forma clorur. HCl 0.5 M

Columna de vidre de 32x3 ml de VidraFoc.

Bomba peristàltica Isco, col·lector de fraccions Isco.

Espectrofotòmetre termostatitzat (KONTRON)

A) REGENERAR LA RESINA I PREPARAR LA COLUMNA CROMATOGRÀFICA

1. Preparar solució de NaOH 0.5 M necessària per fer els rentats de la resina.
2. Per obtenir 20cm de columna cal preparar 200 ml de resina.
3. Barrejar durant 30'.
4. Decantar NaOH.
5. Rentar 2 vegades amb H₂O Milli-Q.
6. Si la resina no s'ha utilitzat mai es repetirà el rentat amb NaOH una segona vegada.
7. Buidar la resina en un Buchner amb paper Whatman 3.
8. Fer passar H₂O Milli-Q fins que el pH de l'aigua del quitasato sigui < 9.
9. Preparar HCl 0.5 M per uns 20 volums.
10. Agitar la solució durant 1 hora.
11. Rentar en Buchner amb H₂O Milli-Q fins aconseguir pH = 6.

12. Omplir la columna amb la resina i equilibrar durant 24 hores amb H₂O Milli-Q a un flux de 10 ml/h.

B) PROCÉS DE PURIFICACIÓ DE LA GLU-1-P

1. Preparar 30 ml d'una solució 0.1 M de Glu-1-P i ajustar el pH a 6.0 amb HCl.
2. Aplicar la solució a la columna de DOWEX una vegada equilibrada a un flux de 10 ml/h.
3. Una vegada ha entrat tota la mostra a la columna aturar el flux i deixar 2 hores en aquestes condicions (per tal d'augmentar la unió dels soluts a la resina)
4. Eluïr amb HCl 0.1 M a una velocitat de 10 ml/h i recollir fraccions de 4 ml (recol·lector automàtic de mostres a un temps de 24 minuts per mostra i amb un temps suficient per 65 tubs aproximadament 26 hores).
5. Neutralitzar a pH = 7 amb Tris sòlid.
6. Quantificar la Glu-1-P obtinguda a cadascuna de les fraccions obtingudes.

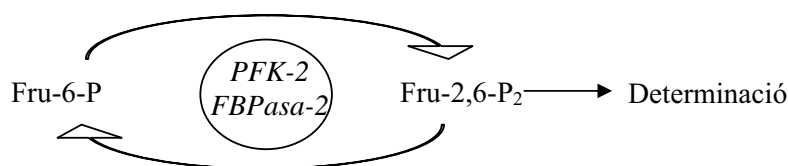
2.3.3.- Activitats enzimàtiques

Conjunt de tècniques bioquímiques per tal d'avaluar la concentració dels enzims. Per dur a terme aquestes tècniques cal mantenir l'enzim en les condicions òptimes de funcionament, en les quals hi intervenen bàsicament 3 factors: el substrat, cofactors (si s'escau), la temperatura i el pH del medi on es realitzarà la valoració.

2.3.3.1.- 6-fosfofructo-2-quinasa (PFK-2)

FONAMENT

Mètode utilitzat és de El-Maghrabi i col. (1982) on es descriu l'extracció i semipurificació de PFK-2/FBPasa-2 a partir de teixit emprant polietilenglicol (PEG) i la determinació de l'activitat específica de l'isoforma muscular seguint el mètode de Bertrand i col (1999).



PFK-2: 6-fosfofructo-2-quinasa / **FBPasa-2:** Fructosa-2,6-bisfosfatasa

REACTIUS

Tampó 10X: TES 200 mM pH a 7.6 amb KOH, DTT 100 mM, EDTA 1 mM.

Tampó d'homogeneïtzació: Tampó 10X pH a 7.8 amb KOH, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM. Abans d'aplicar-lo cal afegir PMSF 1,2 mM i Leupeptina 2,5 mg/ml.

Tampó B: Tampó 10X pH a 7.6 amb KOH, KCl 100 mM. Abans d'aplicar-lo cal afegir PMSF 0,5 mM i Leupeptina 2,5 mg/ml.

PEG₈₀₀₀, 20 % (p:v).

Tampó 4X: HEPES 200 mM a pH 8.5 amb KOH, KCl 400 mM, DTT 4 mM, BSA 4 mg/ml, KPi (K₂PO₄+ KH₂PO₄ pH7.0) 20 mM, KF 80 mM.

Fru-6-P acidificada: 100 mM, **Mg-ATP:** 100 mM, **DTT:** 100 mM.

Tampó per valorar la Fru-2,6-P₂ produïda: apartat 2.3.2.7

2.3.3.1.1.- Semipurificació amb PEG

PROTOCOL

1. Homogeneïtzar aproximadament 1 g de teixit muscular de conill amb 5 volums de tampó d'homogeneïtzació, seguint el protocol dels extractes neutres amb el Polytron.
2. Centrifugar la solució resultant a 15000 rpm durant 10 minuts, recullint el sobrenadant (**volum 1**).
3. S'afegeix PEG₈₀₀₀ al 20 %, fins a representar un 6 % en la solució final (0,428 ml/ml de volum 1). Homogeneïtzar i deixar reposar durant 30 minuts a 4 °C.
4. Centrifugar la solució al 6 % amb PEG durant 30 minuts a 12000 rpm. Recuperar el sobrenadant (**volum 2**).

5. S'afegeix PEG₈₀₀₀ al 20 %, fins a representar un 12 % en la solució final considerant el PEG afegit anteriorment (1 ml PEG 20%/ml de volum 2). Homogeneïtzar i deixar reposar durant 30 minuts a 4°C.
6. Centrifugar la solució al 12 % amb PEG durant 30 minuts a 12000 rpm. Descartar el sobrenadant i resuspendre el pellet amb tampó B (amb un volum aproximadament la meitat del pes inicial de la mostra).
7. La solució resultant es pot utilitzar pels assaigs d'activitat.

2.3.3.1.2.- Activitat PFK-2

PROTOCOL

1. Es prepara la mescla de reacció amb els següents reactius a les concentracions finals, 50 µl tampó 4X (¼ part del volum final de la reacció), Mg-ATP 10 mM, Fru-6-P 5 mM i DTT 1 mM.
2. En un tub *Eppendorf* es col·loca aigua destil·lada (108 µl/assaig) i la mostra a analitzar (10 µl/per assaig). S'incuba a 30 °C durant 2 minuts.
3. S'inicia la reacció en el moment en què es s'afegeixen 82 µl de mescla/assaig. Incubar durant 0-2-5-10-15-20 minuts a 30 °C.
4. Per aturar la reacció s'afegeixen 200 µl de NaOH 100 mM i es posa la mostra en el bloc sec a 90 °C durant 10 minuts.
5. Centrifugar durant 5 minuts a 15000 rpm i descartar el pellet.
6. Determinar la quantitat de Fru-2,6-P₂ produïda mitjançant la tècnica descrita a l'apartat 2.3.2.7
7. La Fru-2,6-P₂ produïda en funció del temps i de la quantitat de proteïna total present a l'assaig proporciona l'activitat de l'enzim PFK-2. La determinació de la quantitat de proteïna es realitza amb el mètode Bradford.

2.3.3.1.3.- Km per Fru-6-P

La determinació de la Km per Fru 6-P, segueix el mateix protocol que l'activitat PFK-2 però en aquest cas la concentració de Fru-6-P varia. Les diferents concentracions emprades són: 0 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM i 5 mM. La darrera concentració serà saturant.

2.3.3.1.4.- Km per ATP

La determinació de la Km per ATP, segueix el mateix protocol que l'activitat PFK-2 però en aquest cas la concentració d'ATP varia. Les diferents concentracions emprades són: 0 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 500 mM, 1 mM, 5 mM i 10 mM.

2.3.4.- Quantificació de proteïna, Bradford

FONAMENT

La quantificació de proteïnes es dur a terme seguint la metodologia proposada per Bradford (1976) emprant el reactiu *Bio-Rad Protein Assay*, la base de la qual és el reactiu "Coomassie Brilliant Blue G-250". Aquest presenta un màxim d'absorció a una longitud d'ona de 465nm, però en unir-se a una proteïna es produeix un canvi en la seva estructura que provoca una modificació del patró d'absorció, passant a ser el màxim d'absorció a 595nm. És una tècnica espectrofotomètrica, concretament s'han utilitzat els espectrofotòmetres UVICON 930 i DU640.

REACTIUS

BSA: 2 mg/ml.

Reactiu de Bradford: BioRad Protein Assay®

PROTOCOL

1. Preparar la dilució de BSA 30 µg/ml a partir de la 2 mg/ml. Es construeix una recta patró amb BSA de 0 µg/ml – 24 µg/ml en tubs de polipropilè. Afegir les mostres a determinar en altres tubs.
2. Afegir aigua destil·lada fins a 800 µl i barrejar correctament.
3. Afegir 200mL del reactiu de Bradford (1/5 part del volum total), barrejar amb el vòrtex.
4. Incubar durant 10 minuts a les fosques.
5. Determinar l'absorbància amb l'espectrofotòmetre a 595 nm.
6. Interpol·lar les absorbàncies de les mostres respecte la recta patró, i considerant la dilució aplicada a cada mostra i el volum emprat en l'assaig es pot calcular la concentració de proteïna.

2.3.5.- Electroforesi

El mètode SDS-PAGE fou descrit per Laemmli i col (1970). La separació de les proteïnes per pes molecular es base en sotmetre les proteïnes (carregades negativament) a un camp elèctric i fer-les correr a través del gel d'acrilamida. Les proteïnes es desplaçaran a través del gel cap l'ànode (pol positiu), i la seva mobilitat electroforètica serà inversament proporcional al seu pes per molecular. Un cop separades, les proteïnes seran transferides a una membrana PVDF, per tal de immunodetectar la proteïna que centra el nostre interès.

REACTIUS

Solució A: acrilamida 30 % (p/v), bis-acrilamida 0,8 % (p/v) en aigua Milli-Q, un cop preparada la solució es filtre, es desgasificada i es manté a 4 °C.

Solució B: Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8) i SDS 0.4 % (p/v), es manté a 4 °C.

Solució C: Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) i SDS 0.4 % (p/v), es manté a 4 °C

Persulfat Amònic (PSA): 10 % (p/v). S'ha de preparar diàriament.

TEMED. n-Butanol: saturat amb aigua.

Tampó de Càrrega "Loading Buffer" LB 5X: Tris-HCl 62.5 mM, glicerol 40 %, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 5 %, blau de bromofenol 0.025 %. Es col·loca 1 volum de tampó 5X per cada 4 volums de mostra.

Tampó electrolític 10X: Tris 250 mM, Glicina 1,92 mM i SDS 1 % diluïts en aigua Milli-Q. No cal ajustar el pH que quedarà entre 8.1 i 8.4. Quan s'hagi d'utilitzar el tampó caldrà diluir-lo fins a 1X, llavors les concentracions finals seran; Tris 25 mM, pH 8.1-8.4, Glicina 192 mM, SDS 0.1 %.

PROTOCOL

- 1.- Cal preparar els vidres amb l'ajuda del suport i comprovar que no perd, per tal de fer-ho s'utilitza aigua, que posteriorment caldrà eliminar.
- 2.- En un vas de precipitats es barregen les solucions A, B i aigua per aconseguir un gel separador amb l'acrilamida al 10 %. Un cop ben barrejat es col·loca el TEMED i PSA, es barreja i ràpidament s'evoca entre els vidres. Tot seguit s'evoca n-butanol prèviament saturat d'aigua per tal d'aconseguir un front recte i alhora facilitar la polimerització.
- 3.- Un cop polimeritzat el gel separador, s'elimina el butanol i es repeteix el procés anteriorment citat per tal de preparar el gel concentrador, enlloc d'afegir butanol, s'omple fins a la part superior dels vidres i tot seguit es col·loca la pinta per tal de formar els pous. Cal anar amb compte per tal d'evitar la formació de bombolles en els pous, aquest fet podria alterar el desenvolupament correcte de l'electroforesi.
- 4.- Les mostres que s'utilitzen en aquesta tècnica, provenen d'extractes neutres de teixit pulveritzats. Un cop determinada la concentració de proteïnes que presenta l'extracte, emprant el mètode Bradford, es prepara la mostra per a l'electroforesi. Per cada 4 volums de mostra és necessari un volum de tampó de càrrega, es col·loca la mostra en el bloc sec i es manté durant 5 minuts a 95 °C, en acabar es deixa refredar la solució i es centrifuga durant 3 minuts a 12000 rpm. Arribats a aquest punt ja tenim la mostra a punt per carregar la quantitat necessària.
- 5.- Un cop els gels estan completament polimeritzats, ja es pot procedir a la càrrega de les mostres. Primer cal treure la pinta i netejar els pous per eliminar les restes d'acrilamida, es col·loquen els gels en la cubeta d'electroforesi amb el seu suport i s'omple la cubeta amb tampó electrolític 1X, fins a cobrir els pous. El volum màxim de càrrega en els pous és de 40 µl, si es considera la quantitat de proteïna en aquest estudi es carreguen de 20 µg a 100 µg.

6.- S'inicia l'electroforesi quan es connecta la font d'electroforesi a 100 V fins que el front hagi arribat al gel separador (aprox. 20 minuts), a partir d'aquest punt s'augmenta el voltatge fins a 150 V (aprox. 1h).

7.- Quan es considera que ha corregut suficient es para la font i es treuen els gels.

2.3.6.- Western Blot

Aquesta tècnica permet en la primera etapa fixar les proteïnes contingudes en un gel d'acrilamida al damunt d'un paper de nitrocel·lulosa i en la segona etapa visualitzar una proteïna en particular emprant reaccions d'immunodetecció, és a dir utilitzant anticossos específics.

2.3.6.1.- Transferència

La transferència és el primer pas del western blot, en aquesta etapa es produeix la translocació de les proteïnes d'un gel (electroforesi) a una membrana de transferència. Aquesta membrana és una superfície porosa sobre la qual es poden fixar proteïnes,

REACTIUS

Tampó de transferència 10X: Tris 250 mM, Glicina 1,92 M en aigua Milli-Q

Si es prepara el tampó amb les concentracions mencionades la solució presenta el pH adequat, entre 8.1-8.4.

Quan s'ha d'utilitzar cal diluir-lo seguint aquestes proporcions:

100 ml tampó de transferència 10X + 200 ml Metanol 100% + 700 ml aigua Milli-Q.

Així doncs, la solució final serà de Tris 25 mM, glicina 192 mM i metanol al 20%.

Gel d'acrilamida: un cop acabada l'electroforesi es separen els vidres i es talla el concentrador, marcant en la cantonada el marge superior on es troba el carril nº1, fent un petit tall en diagonal. Cal tractar el gel abans de fer el western-blot, és necessari eliminar el SDS del gel, només cal submergir el gel en tampó de transferència durant un minut.

Paper "Whatman": es retallen 8 trossos de paper GB002 (Gel-Blotting-paper) de *Schleicher & Schuell* de la mida del gel d'acrilamida, 8.5 cm x 5.5 cm. Submergir-los en tampó de transferència.

Membrana Immobilon-P: La Immobilon-P de MILLIPORE és de *polyvinylidene fluoride* (PVDF) amb microporus de 0.45 μm , adequada quan es treballa amb proteïnes amb un pes molecular superior a 10 kDa.

Es retalla la membrana de transferència Immobilon-P de la mida del gel d'acrilamida, 8.5 cm x 5.5 cm.

Abans d'utilitzar la membrana de PVDF cal "activar-la", tractament previ per garantir que la transferència sigui homogènia en tota la membrana:

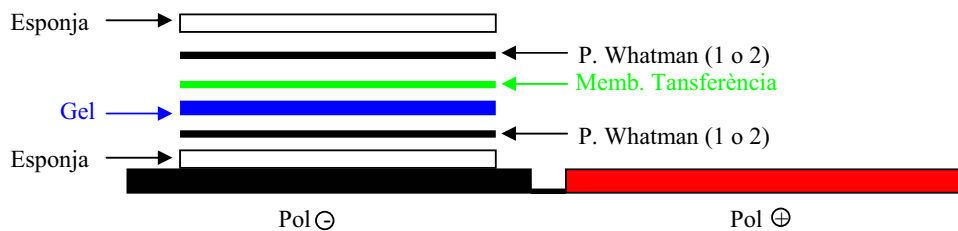
- 1.- Submergir la membrana de PVDF en metanol al 100% durant 15 segons.
- 2.- Transferir la membrana a un recipient amb aigua Milli-Q durant 2 minuts.
- 3.- Equilibrat la membrana durant almenys 5 minuts amb el tampó de transferència.

Equip de transferència

Consta d'una cubeta, el suport pel "sandwitch" amb pol +/- , dos cassettes on es prepararan els "sandwitch", esponges de transferència i una font elèctrica (generador del camp elèctric).

PROTOCOL

- 1.- El material i reactius estan preparats i submergits en tampó de transferència 1X.
- 2.- Preparar el "sandwitch" de transferència:



Tal i com s'observa en l'esquema es prepara el "sandwitch" al damunt del suport que estarà en contacte amb el pol negatiu (càtode). A mesura que es van col·locant els diferents elements cal anar amb molt de compte per evitar que es formin bombolles entre les diferents capes.

Precaució al col·locar el gel i la membrana! La disposició dels carrils a la membrana un cop s'hagi fet la transferència hauria de coincidir amb la del gel (per aconseguir-ho disposarem el gel invertit de manera que quan traiem la membrana del damunt del gel, mantingui la disposició dels carrils)

Un cop preparats els “sandwitch”, es col·loquen a la cubeta de transferència i s'omple de tampó de transferència i s'hi posa un nucli magnètic (per poder agitar el tampó de transferència). Si el protocol de transferència es realitza a un elevat voltatge (60 V-100 V) és recomanable afegir algun element refrigerant (recipent amb líquid congelat, aigua o gel especial).

3.- La transferència es realitza a la cambra freda (4 °C) i amb agitació contínua, es pot seguir qualsevol dels 3 protocols de transferència: a 20 V durant tota la nit, a 60 V durant 3 hores o a 100 V durant 1 hora, en funció del moment en el qual es prepara la transferència.

4.- Al finalitzar la transferència es treu la membrana del “sandwitch” i es poden fer dues coses amb ella: començar immediatament el protocol de immunodetecció o bé assecar la membrana i guardar-la per fer en un altre moment la immunodetecció.

2.3.6.2.- Immunodetecció

La immunodetecció és la segona etapa del western-blot, en aquest pas es pretén detectar la presència d'una proteïna en concret al damunt de la membrana de transferència. Per poder dur a terme aquesta tasca cal emprar anticossos específics que reconeguin la proteïna a estudi i utilitzar un sistema de detecció d'aquests anticossos. En aquesta tesi tots els sistemes de detecció es basen en la quimiolumiscència.

REACTIUS

Tampó PBS 10X: tampó fosfat

Tampó T-PBS: correspon al tampó PBS diluït fins a 1X amb un 0.1 % de Tween 20.

Llet en pols o BSA: els dos elements permeten bloquejar la membrana de PVDF, o sigui recobrir la membrana amb proteïna en aquells llocs on no s'hi havia transferit res.

Anticossos Primaris

mPFK2: generat en conill per la detecció de PFK-2/FBPasa2 de múscul: obtenció pròpia apartat 2.2.4.

IPFK2: generat en cabra per la detecció de PFK-2/FBPasa2 de fetge: PFK-2 liv (N-13) sc-10094 de *Santa Cruz*.

m/l/t PFK2: generat en cabra per la detecció de PFK-2/FBPasa2 de múscul, fetge i testicle: PFK-2 liv (E-16) sc-10096 de *Santa Cruz*.

hPFK2: generat en conill per a la detecció de PFK-2/FBPasa2 de cor. Cedit pel Dr. Louis Hue de la unitat d'estudis hormonals del Christian de Duve Institute of Cellular Pathology, Université Catholique de Louvain a Brussel·les.

uPFK2: generat en conill per la detecció de PFK-2/FBPasa2 ubíqua de la qual reconeix l'epítop **MKGSRSSADSSRKH**. Cedit pel Dr. Ramon Bartrons, Unitat de Bioquímica del Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona.

Na⁺/K⁺-ATPasa α 1: generat en cabra per la detecció de la subunitat α 1 de la Na⁺/K⁺-ATPasa sc-16041 de *Santa Cruz*. Amb aquest anticòs es pot normalitzar les dades obtingudes amb la resta d'anticossos perquè la presència d'aquesta proteïna és constitutiva i constant al llarg de tot el desenvolupament i en les diferents etapes de l'exercici.

Anticossos Secundaris

Anti-Rabbit+HRP: anticòs generat en cabra (170-6515) de *Bio-Rad*.

Anti-Goat+HRP: anticòs generat en burro, sc-2020 de *Santa Cruz*.

Prot A +HRP: la Proteïna A té una elevada afinitat pels anticossos això fa que pugui utilitzar-se com a secundari, tot i no ser-ho. 10-1023 de *ZYMED Laboratories Inc*.

E.C.L.[®] western blotting System - Ref. RPN 2109 – *Amersham Pharmacia Biotech*.

Hyperfilm[®] E.C.L.[®] - Ref. RPN 2103K (18 cm x 24 cm) – *Amersham Pharmacia Biotech*.

Revelador - Ref. G150 – *AGFA*.

Fixador - Ref. G350 – *AGFA*.

2.3.6.2.1.- Protocol de revelat

1.- Preparar una mescla de les solucions de detecció 1 i 2 a volums iguals (1:1), per tal de proporcionar un volum suficient que cobreixi la membrana (el volum requerit 0,125 mL/cm² de membrana).

2.- Treure l'excés de tampó PBS de la membrana

3.- Cobrir tota la membrana amb la mescla de detecció, deixar la solució durant 1 minut a temperatura ambient i sense agitació.

4.- Treure l'excés de mescla de detecció i col·locar en una bossa de plàstic "saran wrap" de manera que les proteïnes quedin a la part superior. Un cop la membrana està en la bossa la resta del protocol es durà a terme en la cambra fosca.

5.- Col·locar una pel·lícula d'autoradiografia (Hyperfilm ECL) damunt la membrana, tancar el cassette i exposar durant 30 segons

6.- Es treu la pel·lícula del cassette i es col·loca en la primera cubeta de la seqüència de revelat durant 3-5 minuts amb agitació contínua. En la primera cubeta hi ha el revelador, en la segona hi ha aigua (bloquejar o aturar el revelat) i en l'última cubeta hi ha el fixador. Quan s'ha acabat el temps incubació amb el revelador, es treu l'excés de revelador de la pel·lícula i es col·loca a la segona cubeta on es mantindrà durant 30 segons amb agitació contínua. Finalment es col·loca la pel·lícula en la tercera cubeta durant 5 minuts amb agitació contínua. Es treu la pel·lícula del tercer bany, es passa per un bany d'aigua destil·lada per treure l'excés de fixador i es deixa assecar.

7.- Un cop s'ha tret el film i aquest segueix la seqüència de banys per tal de fer el revelat, es col·loca una nova pel·lícula al damunt de la membrana, deixant-lo el temps necessari perquè l'exposició sigui òptima per la quantificació, és a dir, les bandes que apareguin puguin ser detectades pel software que s'utilitza (Quantity one) i alhora no quedin cremades, es considera que una banda està cremada quan la irradiació rebuda supera el màxim permès per la pel·lícula i per tan no es poden detectar diferències.

8.- Es digitalitza la pel·lícula emprant un *scanner* i es treballa amb els *Software Quantity One* per avaluar les densitats de les bandes aparegudes. Cada banda correspon a una proteïna en concret, si l'anticòs és suficientment específic, només apareixerà la banda

deguda a la proteïna que s'estudia, sinó és així, caldrà algun sistema per detectar la banda que correspongui a la proteïna d'estudi, per pes molecular i/o a través d'un estàndard (solució amb la proteïna purificada) col·locat en algun carril de l'electroforesi.

2.3.7.- Extracció de IgG dels extractes de conill

Aquesta tècnica surt per tal de solucionar un conflicte. S'ha dissenyat i obtingut un anticòs específic per identificar la isoforma muscular de PFK-2, l'hoste ha estat el conill i per tan s'hauria d'utilitzar un anticòs secundari que reconegués les IgG de conill. Però el problema apareix quan s'intenta detectar mPFK-2 en mostres de conill, l'anticòs secundari reconeix les fraccions pesades i lleugeres de les IgG pròpies de la mostra que s'estudia creant un soroll de fons molt important que emmascara el possible resultat. Així doncs, es va decantar per eliminar les IgG de les mostres de conill a valorar.

2.3.7.1.- Incubació amb Proteïna A-Agarosa

REACTIUS

Tampó dilució i conservació de proteïna A-Agarosa: Tris 50 mM pH 7.0, Azida sòdica 0.01 %

Proteïna A-Agarosa:

PROTOCOL

1. Realitzar un extracte neutre 1:10 amb múscul de conill seguint les indicacions de l'apartat 2.3.1.1. Quantificar la proteïna total present en l'extracte.
2. Col·locar en un tub eppendorf; 250µg de proteïna de l'extracte, 200µL de tampó i 25mg de proteïna A-agarosa. Mantenir en un *roller* a temperatura ambient durant 1 hora.
3. Centrifugar a 5000 rpm durant 5 minuts, descartar el pellet per la posterior regeneració de la proteïna A-agarosa que en el pas anterior haurà quelat les immunoglobulines presents a l'extracte.
4. Es quantifica la proteïna total del sobrenadant i s'utilitza la mostra per la detecció de totes aquelles proteïnes per les quals tenim anticossos primaris generats en conill, d'aquesta manera el secundari només reconeixerà l'anticòs primari. Si la concentració

de proteïna és molt baixa, es pot concentrar la mostra emprant el liofilitzador o altres sistemes de concentració.

2.3.7.2.- Regeneració de la Proteïna A-Agarosa

REACTIUS

Tampó A: NaCl 3M, Borat sòdic(Borax) 50 mM, Glicina 1,5 M a pH 8.9

Tampó A: Glicina 100 mM a pH 3.0

PROTOCOL

El tampó A provoca un salt salí molt fort, permetent desenganxar les proteïnes unides inespecíficament a l'agarosa. Però aquest gradient salí tan fort no és suficient per desenganxar els anticossos, així només es neteja la proteïna A-agarosa de les proteïnes foranies.

1. Barrejar 1ml de tampó A per cada 100 µl de proteïna A
2. Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm, descartar el sobrenadant.
3. Repetir l'operació 2 o 3 cops. A mesura que es fan rentats s'analitza l'absorbància del sobrenadant descartat a 280 nm, el sobrenadant descartat a cada rentat presentarà menys proteïnes i per tan una menor absorbància.

El tampó B presenta un pH de 3, el qual permet desenganxar les immunoglobulines que estan unides a la proteïna A, quedant així totalment neta la solució proteïna A-agarosa:

1. Barrejar 1ml de tampó B per cada 100µl de proteïna A
2. Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm, descarta el sobrenadant.
3. Repetir l'operació 2 o 3 cops. A mesura que es fan rentats s'analitza l'absorbància del sobrenadant descartat a 280 nm, el sobrenadant descartat a cada rentat presentarà menys proteïnes i per tan una menor absorbància.
4. Un cop finalitzat el protocol de purificació de la proteïna A-Agarosa, cal deixar-la en un medi que eviti la seva degradació, concretament una solució amb Tris 50 mM pH 7.0 i azida sòdica al 0.01 %.

2.4.- PROCEDIMENTS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Per tal d'analitzar els nivells d'expressió de determinats gens en els teixits i òrgans a estudi, cal emprar tot un seguit de tècniques que permeten extreure RNA missatger, analitzar l'estat d'aquest RNA, obtenir cDNA i quantificar la presència d'aquest missatger al llarg del desenvolupament d'un teixit o si es modifica la seva proporció en un protocol d'electroestimulació.

2.4.1.- Extracció de RNA

Aquesta tècnica permet obtenir RNA a partir de diferents teixits i òrgans dels animals d'experimentació emprats pels diferents estudis.

REACTIUS

TriPure, Cloroform, Isopropanol 99 %, Etanol 75 % i aigua estèril.

PROTOCOL

Per tal d'obtenir RNA de les mostres d'estudi s'ha dut a terme el protocol que inclou el reactiu TriPure Isolation de Roche, seguint els següents passos;

- 1.- Pesar la mostra de la qual es vol extreure el RNA, concretament serà teixit pulveritzat que es troba en N₂ líquid. Deixar en gel uns segons i afegir 1mL del reactiu TriPure per cada 100 mg de teixit. Barrejar amb vòrtex.
- 2.- Homogeneïtzar la mostra amb el Polytron durant 30s començant a mínima velocitat i incrementar-la fins al màxim. Netejar el polytron (veure el protocol)
- 3.- Eliminar les membranes i teixit connectiu que no s'hagi disgregat amb una centrifugació a 12000 rpm durant 10 minuts.
- 4.- Deixar l'homogenat durant 5 minuts a temperatura ambient.
- 5.- Afegir 0,2 ml de cloroform per cada mil·lilitre de TriPure. Tapar, barrejar vigorosament i deixar a temperatura ambient durant 5 minuts.
- 6.- Centrifugar la mostra a 12000 rpm durant 15 minuts a 4 °C

- 7.- Recuperar la fase superior en un tub nou (fase aquosa) sense tocar la interfase (on es troben les proteïnes i el DNA) ni agafar líquid de la part inferior (fase orgànica, fenol/cloroform). Afegir a la fase aquosa recuperada el mateix volum de cloroform i repetir des del pas 4. Repetir el punt 6 per augmentar la puresa de la mostra de RNA.
- 8.- Amb la fase superior neta es precipita el RNA, afegint 0,5 volums inicials d'isopropanol al 99 %. Barrejar correctament.
- 9.- Deixar reposar durant 5-10 minuts la mescla a temperatura ambient. Aquest pas és opcional (permet augmentar el rendiment de RNA, però disminueix la puresa final).
- 10.- Centrifugar a 12000 g durant 8 minuts a 4°C.
- 11.- S'obté un precipitat o pellet al fons del tub. S'elimina el sobrenadant i es barreja el pellet amb etanol 75 % (1 ml d'etanol per cada 1 ml de TriPure emprat al principi). Transferir a tubs de microcentrífuga.
- 12.- Centrifugar la mescla a 7500 g durant 5 minuts a 4 °C. Si el pellet no queda suficient compacte o sura en el líquid, augmentar la velocitat de centrifugació a 12000 g.
- 13.- Eliminar el sobrenadant i assecar el pellet a l'aire. (no assecar al buit perquè es podria assecar massa fet que dificultaria molt la resuspensió.
- 14.- Redissoldre el pellet de RNA en 50 µl d'aigua estèril.
- 15.- Valorar la concentració de RNA i la qualitat.
- 16.- Guardar a -80 °C per un posterior anàlisi.

2.4.1.1.- Neteja del Polytron

REACTIUS

Etanol 99 %, NaOH 1 M, Tiocianat de Guanidina 4 M

A.- Neteja del Polytron abans de la primera utilització i entre cadascuna de les mostres

Cada pas es realitzarà seguint les següents indicacions: el Polytron es connectarà a la velocitat màxima durant 10 segons mentre es manté submergit en 5 ml de cadascuna de les següents solucions (preparades diàriament).

- 1.- Aigua (netejar les fulles del Polytron de les restes de teixit)
- 2.- Etanol al 99 %
- 3.- Aigua

- 4.- NaOH 1 M, que permetrà eliminar totes les traces de RNA que poguessin haver.
- 5.- 3 rentats amb aigua per eliminar NaOH.
- 6.- Tiocianat de Guanidina 4 M, desnaturalitza les proteïnes, sobretot per eliminar les RNases (responsables de la degradació de RNA)

B.- Neteja del Polytron després de l'última mostra del dia

Cada pas es realitzarà seguint les següents indicacions: el Polytron es connectarà a la velocitat màxima durant 10 segons mentre es manté submergit en 5 ml de cadascuna de les següents solucions (preparades diàriament).

- 1.- Aigua (netejar les fulles del Polytron de les restes de teixit)
- 2.- Etanol al 99 %
- 3.- Aigua

2.4.1.2.- Quantificació de RNA

La valoració de la concentració de RNA es fa a través de la determinació de l'absorbància de la solució obtinguda a 260 nm. Concretament es prepara en una cubeta de quars 1 ml d'aigua estèril i una quantitat de mostra de RNA (5 µl). Finalment sabent que cada unitat de densitat òptica (UDO) equival a 40 µg RNA/ml es pot calcular la concentració de RNA.

2.4.1.3.- Avaluació de la qualitat de RNA

La comprovació de la qualitat de RNA es fa seguint dos tècniques diferents.

A) Puresa de l'RNA segons l'absorbància

1. En una cubeta de quars es col·loca 1 ml d'aigua estèril amb 5 µl solució de RNA.
2. S'analitzen dues longituds d'ona, 260 nm (RNA) i 280 nm (proteïna), i a continuació es fa el quocient entre ambdues, A_{260}/A_{280} .

Es considera que el RNA és de bona qualitat o pur quan presenta un quocient entre 1,6 i 2,0. Treballar amb RNA de qualitat o puresa inferior pot presentar problemes en les tècniques posteriors.

B) Gel d'agarosa per RNA

En l'apartat 2.3.5 s'ha explicat el funcionament de l'electroforesi, en aquest cas enlloc d'acrilamida, els suport o matriu per on han de passar les partícules que volem diferenciar (fragments de DNA) és agarosa. Tal i com passava amb l'acrilamida, el percentatge d'agarosa determina el tipus de seqüències que es poden identificar i diferenciar. Totes les seqüències de nucleòtids presenten càrrega negativa i en aplicar un corrent elèctric a través del gel les seqüències de DNA es desplaçaran cap a l'ànode (pol positiu), quan major sigui la seqüència més dificultat presentarà al pas a través de la matriu d'agarosa i per tan el seu desplaçament serà menor.

REACTIUS

MOPS 10X, 41,8 g MOPS en 800 ml d'aigua s'ajusta el pH a 7 amb NaOH, s'afegeixen 16.3 ml d'acetat sòdic 3 M i 20 ml EDTA 0,5 M. Completar amb aigua fins a un litre.

Tampó de càrrega (Loading buffer) per RNA, 5 ml MOPS 10X, 8.75 ml formaldehid 37 %, 25 ml formamida, 25 µl EDTA, 25 mg blau de bromofenol, 25 mg cian de xilè, 5 ml glicerol i 5 ml d'aigua, 100 µl de bromur d'etidi 10 mg/ml.

Gel 1,2% d'agarosa; 40 ml d'aigua i 0,6 g d'agarosa es col·loquen en un erlenmeyer en un microones fins que l'agarosa es dissolgui completament, refredar lleugerament i afegir 5mL de MOPS 10X i 5 ml de formaldehid 37 %.

PROTOCOL

1. Preparar les mostres amb el tampó de càrrega, 1µl mostra : 5µl tampó de càrrega, es col·loca al bloc sec durant 5 minuts a 70 °C.
2. Carregar les mostres al gel d'agarosa.
3. Connectar la cubeta d'electroforesi a la font elèctrica durant 45 minuts a 75V.
4. Mirar el gel amb un transil·luminador que emet llum ultravioleta (UV). El bromur d'etidi del tampó de càrrega s'haurà intercalat a l'RNA i al ser irradiat amb llum UV emet llum. Donant com a resultat el que s'aprecia a la figura 2.4.1.

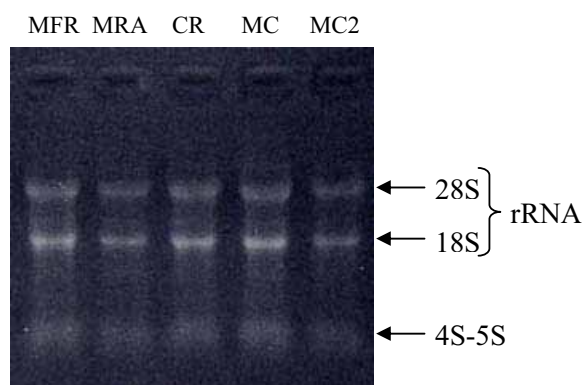


Figura 2.4.1: Gel d'agarosa per detectar RNA. S'aprecia l'extracció de RNA realitzat a diferents mostres: Múscul de fetus de rata (MFR), Múscul de rata adulta (MAR), Cor de rata adulta (CRA), Múscul de conill control (MC), Múscul de conill electroestimulat (MC2). Apareixen diverses bandes corresponents a RNA ribosòmic, 28S (4.7 kb), 18S (1.9 kb), així com una que comprèn 4S-5S (0.10 a 0.15 kb) que conté una mescla de RNA de transferència i RNA ribosòmic 5S.

2.4.2.- Obtenció de cDNA, retrotranscripció

Per poder seguir treballant cal transformar l'RNA present a les mostres en cDNA, aquest procés s'anomena retrotranscripció, dut a terme per una transcriptasa inversa, enzim produït per alguns virus, els altrament dits "retrovirus", aquest enzim realitza la mateixa acció que la DNA polimerasa I però utilitzant com a motlle RNA.

REACTIUS

RNA

Random primers 3 mg/ml, Tampó 5X, DTT 0.1 M, dNTP 10 mM

PROTOCOL

El volum final de l'assaig és de 20 µl, on hi ha d'haver entre 50 ng i 250 ng de Random Primers, 2 µg de RNA, tampó 1X, DTT 10 mM, mix de dNTP 0,5 mM.

- 1.- Preparar una mescla amb; Random Primers (50 ng -250 ng), solució de RNA (2 µg) i aigua estèril fins arribar a un volum final de 12 µl.
- 2.- Incubar a 70 °C durant 10 minuts. Col·locar immediatament en gel mentre s'afegeixen els següents elements.
- 3.- Afegir Tampó 5X, DTT (0,1 M) i mix de dNTP (10 mM).
- 4.- Incubar a 25 °C durant 10 minuts i a continuació a 42 °C durant 2 minuts.
- 5.- Afegir 1 µl de transcriptasa inversa (SuperscripII RT, Invitrogen).
- 6.- Incubar a 42 °C durant 50 minuts.

7.- Incubar a 70 °C durant 15 minuts.

8.- Mantenir a 4 °C. Determinar la puresa i la concentració del cDNA obtingut.

Un cop finalitzat el protocol de retrotranscripció, cal verificar el bon estat del producte resultant. Utilitzarem la reacció en cadena de la polimerasa o PCR, obtenint d'aquesta tècnica un fragment de DNA amplificat que podrà ser visualitzat en un gel d'agarosa.

2.4.3.- Reacció en cadena de la polimerasa, PCR

Aquesta tècnica permet augmentar el nombre de còpies d'una seqüència de DNA. Per dur-la a terme cal la presència de DNA motlle (cDNA obtingut en l'etapa anterior), 2 oligonucleòtids encebadors (*primers*) i DNA polimerasa. Com el nom de la tècnica indica, es tracta d'un seguit de reaccions de la polimerasa encadenades, per aconseguir-ho s'ha dissenyat un aparell que permet que es produeixi la reacció de la polimerasa de manera seqüencial i contínua, el termociclador. Per emprar sempre el mateix enzim s'utilitza una polimerasa estable a la calor, Taq-polimerasa (polimerasa del bacteri *Thermus aquaticus*, *arquibacteri que viu en condicions extremes, temperatures molt elevades*)

REACTIUS

cDNA motlle, obtingut després de l'extracció de RNA i la retrotranscripció.

Tampó 10X, MgCl₂ 50 mM, dNTP 10 µM.

EcoTaq, TaqPolimerasa de la casa comercial Ecogen.

Oligonucleòtids encebadors, tan el *Forward* com el *Reverse Primers* a 20 µM, els oligonucleòtids emprats apareixen a la taula 2.4.1.

Gen	Primer	Seqüència	Tm	Amplicó
beta-Actina NM_031144 Rattus Novergicus	ACTFOR	CCGTGAAAAGATGACCCAGATC	62,67	701 pb
	ACTREV	GTGAGGCCAGGATAGAGCCA	64,5	
Glucogen Sintasa muscular (mGS) AF017114 Oryctolagus cuniculus	GSFOR	GCCCACGTCTTCACTACCGT	64,5	302 pb
	GSREV	AGGTAGTTGAGCCGAGCCAAG	64,52	

Taula 2.4.1: Oligonucleòtids encebadors per la PCR de comprovació. Apareix el gen constituït que s'amplificarà, en el cas de les mostres de rata b-atina, mentre que en conill s'utilitza un altre gen, Glucogen sintasa muscular (mGS). El nom dels primers emprats on FOR indica *forward primer* i REV *reverse primer*. Tm, temperatura de melting, l'amplicó és la longitud de la seqüència amplificada en parells de bases (pb).

PROTOCOL

- Preparar en microtubs Eppendorf la següent reacció amb volum final de 100 µl i concentracions, 750 ng/ml cDNA motlle, tampó 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 µM dNTP, 0.4 µM oligonucleòtid - *Forward Primer*, 0.4 µM oligonucleòtid - *Reverse Primer*, aigua estèril fins a 99 µl. Finalment 1 µl de EcoTaq. Si el termociclador no presenta placa calefactora a la part superior, cal afegir oli mineral per evitar l'evaporació de la mescla de reacció.
- Iniciar el protocol de PCR amb el termociclador,
 - PAS 1 – 94 °C durant 1 minut (desnaturalització del cDNA).
 - PAS 2 – 94 °C durant 1 minut (desnaturalització del cDNA).
 - PAS 3 – 58 °C durant 1 minut, etapa d'*annealing* (moment en el qual els oligonucleòtids encebadors reconeixen les regions complementàries) i extensió.
 - PAS 4 – 72 °C durant 1 minut, reacció de la polimerasa o elongació.
 - PAS 5 - Repetir 29 vegades a partir del segon pas (PAS 2).
 - PAS 6 – 72 °C durant 10 minuts, elongació final.
 - PAS 7- Finalitzar la reacció de PCR.

La temperatura d'*annealing* (PAS 3) depèn de la seqüència dels oligonucleòtids encebadors. Ha de ser lleugerament inferior a la temperatura de *Melting* (Tm) temperatura a partir de la qual els *primers* es desenganxen del motlle.

- Un cop finalitzada la PCR les mostres es guarden a 4 °C.

2.4.3.1.- Electroforesi en gel d'agarosa per DNA

En l'apartat 2.3.5 s'ha explicat el funcionament de l'electroforesi, en aquest cas enlloc d'acrilamida, els suport o matriu per on han de passar les partícules que volem diferenciar (fragments de DNA) és agarosa. Tal i com passava amb l'acrilamida, el percentatge d'agarosa determina el tipus de seqüències que es poden identificar i diferenciar. Totes les seqüències de nucleòtids presenten càrrega negativa i en aplicar un corrent elèctric a través d'aquest gel les seqüències de DNA es desplaçaran cap a l'ànode (pol positiu), quan major sigui la seqüència més dificultat presentarà al pas a través de la matriu d'agarosa i per tan el seu desplaçament serà menor.

REACTIUS

TAE 50X

Aquest reactiu es prepara amb Tris a una concentració 2 M, àcid acètic glacial per ajustar el pH a 8.5 i EDTA a 100 mM. Quan s'ha d'utilitzar el tampó TAE, es dilueix 50 vegades el que s'ha preparat per treballar amb TAE 1X: Tris-acetat 40 mM i EDTA 2 mM.

Gel d'agarosa

El gel d'agarosa es prepara amb TAE1X i agarosa al 1 %-2 %, el percentatge d'agarosa determina el tipus de fragments de DNA que es poden diferenciar més clarament, a major percentatge, es dificulta el pas de les seqüències més grans i les menors es desplacen més a poc a poc, per tan les podem diferenciar clarament. Mentre que amb percentatges baixos es visualitzen les seqüències grans i les petites pràcticament desapareixen del gel amb molt poc temps.

S'escalfa el tampó TAE 1X amb l'agarosa en el microones per facilitar la seva dissolució, quan està completament dissolta, es refreda la solució fins a 50°C aproximadament, moment en el qual s'afegirà el bromur d'etidi. A continuació es col·loca la mescla en el recipient o cubeta on hi ha una "pinta" estructura que permet la formació dels pous. Un cop s'ha refredat i per tan solidificat el gel, es treu la pinta i ja es poden carregar les mostres.

Loading Buffer 6X

PROTOCOL

- 1.- Preparació de les mostres: 10 µl de mostra + 2 µl de Loading Buffer 6X
- 2.- Carregar les mostres als pous del gel d'agarosa.
- 3.- Connectar l'electroforesi a 75 V durant 30-45 minuts.
- 4.- Observar amb el transil·luminador. Fotografiar.

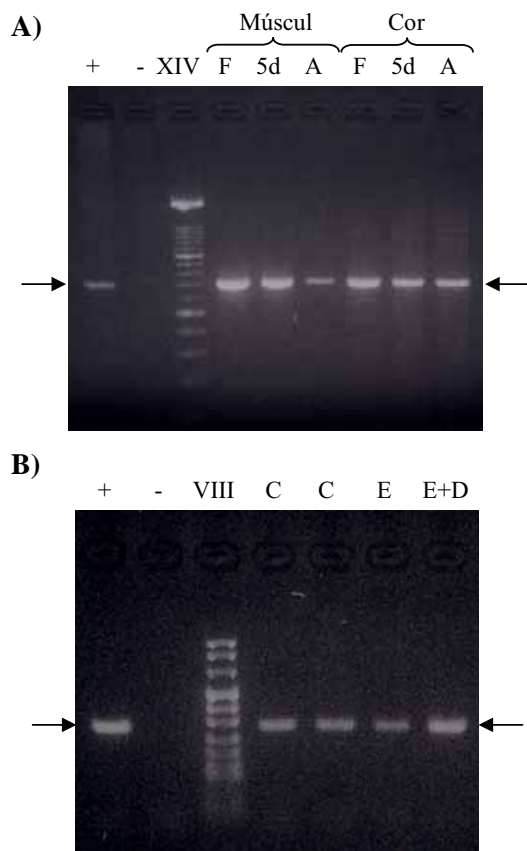


Figura 2.4.2: Gel d'agarosa per DNA. A) Detecció del fragment de 701pb de β -actina en mostres de cor i múscul de rata en diferents estadis de desenvolupament (F; fetus de 19 dies, 5d; neonat de 5 dies, A; adult).

B) Detecció del fragment de 302pb de Glucogen Sintasa muscular en mostres de múscul de conill, on C; múscul en repós, E; múscul electroestimulat, E+D; múscul estimulat i descansat.

+: Control de PCR amb una mostra ja contrastada.

-: Control per verificar que no hi ha contaminacions, la mostra ha estat substituïda per aigua. estèril.

2.4.4.- Seqüenciació parcial del mRNA/cDNA del gens Pfkfb1 (isoformes hepàtica i muscular), Pfkfb2 i Pfkfb4 de conill

Després de consultar les bases de dades que contenen les seqüències dels mRNA i el genoma dels diferents gens i espècies, es va arribar a la conclusió que caldria obtenir almenys alguna porció dels gens Pfkfb1 i Pfkfb2 de conill per tal de poder analitzar el patró d'expressió d'aquests gens. Concretament cal conèixer una regió del mRNA que contingui la unió entre 2 exons (s'elimina la possibilitat que l'assaig detecti DNA genòmic el qual no proporcionaria informació sobre l'expressió), aquesta regió ha de ser suficientment específica per no cometre errors a l'hora de dur a terme les quantificacions dels assaig d'expressió.

2.4.4.1.- Disseny dels oligonucleòtids per la seqüenciació

Al conèixer les seqüències dels gens en altres espècies, rata, ratolí i humana, s'ha determinat alguna regió que es conservi entre les 3 espècies, per cadascun dels gens. Tot i no tenir la certesa de què s'obtinguin resultats, s'han dissenyat diversos oligonucleòtids encebadors per tal veure si s'aconseguia amplificar la regió desitjada.

Les isoformes muscular i hepàtica es generen per un *splicing* alternatiu del gen Pfkfb1. La diferència es dona en el primer exó, mentre la isoforma muscular presenta 1M, l'hepàtica presenta 1L, els exons posteriors del 2 fins al 14 són comuns. En l'esquema (Fig. 2.4.3) es mostra la disposició dels oligonucleòtids encebadors sobre les seqüències de mRNA/cDNA de les isoformes muscular i hepàtica mentre que en la taula 2.4.2 es mostren els oligonucleòtids emprats.

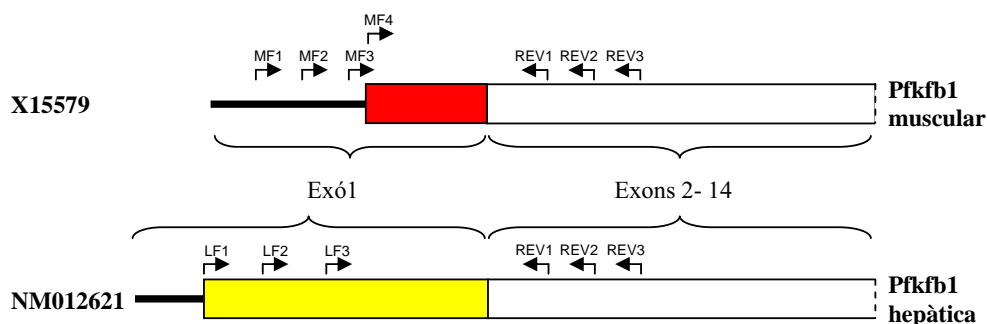


Figura 2.4.3: Esquema de la disposició dels oligonucleòtids encebadors sobre les seqüències de cDNA de les isoformes muscular i hepàtica del gen *Pfkfb1*. En color la regió codificant de l'exó 1 d'ambdues isoformes.

Primer	X15579		NM012621		%GC	Tm	Seqüència oligonucleòtid
	Inici	Final	Inici	Final			
MF1	41	58	-	-	61,1	62,2	ACCCACCGGACCTGCTTT
MF2	82	103	-	-	40,9	58,9	CCATTGGAAAATTAGCGATGGA
MF3	96	118	-	-	43,5	61,0	GCGATGGAAGAAAAAGCCTCTAA
MF4	99	116	-	-	38,9	53,1	ATGGAAGAAAAAGCCTCT
LF1	-	-	203	223	50,0	60,9	ATGTCTC V AGAGATGGGAGAR
LF2	-	-	221	237	52,9	57,2	GARCTCAC Y CAAACCAG
LF3	-	-	243	263	45,0	58,4	AGAAGATCTGGATTCCACAC
REV1	189	166	362	339	54,2	66,3	CTCGAGCTGGTAAACCCACCATGA
REV2	250	230	423	403	42,9	58,7	TTAGTTGGTGTTCCTATCCAG
REV3	289	268	462	441	54,5	64,5	CTCACTGCCTCTCGTCGATACT

Taula 2.4.2: Relació dels primers emprats en la seqüenciació de les isoformes muscular i hepàtica del gen *Pfkfb1*. Per les divergències entre espècie i evitar així que els primers no servissin, s'ha optat per construir combinacions de seqüències que presentin les modificacions identificades entre les espècies analitzades (rata, ratolí i humana) essent **V**:A/C/G, **R**:A/G i **Y**:C/T.

Els assaigs amb els parells d'oligonucleòtids encebadors sobre les seqüències conegudes de rata, ratolí i humana proporcionen seqüències amplificades de les longituds en parells de bases (pb) que apareixen en la taula 2.4.3, per tan quan es realitzi l'assaig amb cDNA de conill caldrà esperar fragments de la mateixa grandària.

	Pfkfb1 de múscul				Pfkfb1 de fetge		
	MF1	MF2	MF3	MF4	LF1	LF2	LF3
REV1	149 pb	108 pb	94 pb	91 pb	160 pb	142 pb	120 pb
REV2	210 pb	169 pb	155 pb	152 pb	221 pb	203 pb	181 pb
REV3	249 pb	208 pb	194 pb	191 pb	260 pb	242 pb	220 pb

Taula 2.4.3: Combinació de *forward* i *reverse primers* per cadascuna de les isoformes del gen *Pfkfb1* que cal seqüenciar.

Després de realitzar les proves pertinents, s'ha arribat a la conclusió que els millors parells de *primers* per dur a terme la seqüenciació són:

- Per la regió del gen *Pfkfb1* que codifica per l'exó 1 de la isoforma muscular: MF1-REV2.
- Mentre que per la porció del gen *Pfkfb1* que genera la isoforma hepàtica: LF1-REV2.

Per seqüenciar el cDNA que codifica per la isoforma cardíaca de l'enzim PFK-2, s'ha seguit una estratègia semblant, a l'anteriorment descrita. Utilitzant les seqüències que codifiquen per aquesta isoforma en rata, ratolí i humà, s'han determinat algunes regions altament conservades, precisament en aquestes s'han dissenyat els *forward* i *reverse primers*, tal i com es mostra en la figura 2.4.4. En la taula 2.4.4 hi ha les ubicacions i les seqüències de tots els *primers* utilitzats.



Figura 2.4.4: Esquema de la disposició dels oligonucleòtids encebadors sobre les seqüències de cDNA del gen *Pfkfb2*. El requadre indica la porció de cDNA que es tradueix generat la isoforma cardíaca de l'enzim PFK-2/FBPasa-2

Primer	NM080477		%GC	Tm	Seqüència oligonucleòtid
	Inici	Final			
F491	491	511	47,6		CYATGAAGATCCGCAAACAGT
F600	600	621	50,0		GGAGAGGAGGGACATGATTTTG
F685	685	706	50,0		GTCATTGCTGCCAATATTCTGG
F1370	1370	1387	58,3		ACCAGGCTGTCATGCRCT
R1387	1387	1370	58,3		AGYGCATGACAGCCTGGT
R1604	1604	1583	50,0		GGCGTAAAGCTGTTTCCTTCTCA
R1635	1635	1616	47,5		TGGACGCCTTATTGTRTTTCG
R1662	1662	1645	69,4		GGGYCGGCTCCCAACACT

Taula 2.4.4: Relació dels primers emprats en la seqüenciació del gen Pfkfb2 de conill. S'ha emprat com a seqüència base la NM080477 que correspon al cDNA de la isoforma cardíaca de rata. Per les divergències entre espècie i evitar així que els primers no servissin, s'ha optat per construir combinacions de seqüències que presentin les modificacions identificades entre les espècies analitzades (rata, ratolí i humà) essent, R:A/G i Y:C/T.

Els assaigs amb els parells d'oligonucleòtids encebadors sobre les seqüències conegudes de rata, ratolí i humà proporcionen seqüències amplificades amb les longituds que apareixen a la taula 2.4.5.

	Pfkfb2_Rata/Ratolí/Home			
	F491	F600	F685	F1370
R 1387	897 pb	788 pb	703 pb	---
R1604	1114 pb	1005 pb	920 pb	235 pb
R1635	1145 pb	1036 pb	951 pb	266 pb
R1662	1172 pb	1063 pb	978 pb	293 pb

Taula 2.4.5: Combinació de *forward* i *reverse primers* pel gen Pfkfb2 a seqüenciar.

Després de realitzar les proves pertinents, s'ha arribat a la conclusió que els millors parells de *primers* per dur a terme la seqüenciació són: F491 i R1387.

Per seqüenciar el cDNA que codifica per la isoforma de testicle de l'enzim PFK-2, s'ha seguit l'estratègia anteriorment descrita. Un cop determinades les regions conservades en rata, ratolí i humà s'han dissenyat els *forward i reverse primers*, tal i com es mostra en la figura 2.4.5. En la taula 2.4.6 hi ha les ubicacions i les seqüències de tots els *primers* utilitzats.



Figura 2.4.5: Esquema de la disposició dels oligonucleòtids encebadors sobre les seqüències de cDNA del gen **Pfkfb4**. El requadre indica la porció de cDNA que es tradueix generat la isoforma de testicle de l'enzim PFK-2/FBPasa-2.

Primer	NM019333		%GC	Tm	Seqüència oligonucleòtid
	Inici	Final			
F531	531	550	55	60	CTGCCAACATCGTGCAAGTG
F602	602	621	50	58	GACTTCATGAGGCGCATTGA
F992	992	1012	57	58	CAGTGGAAGGTCCTCAACGAG
R1012	1012	992	57	58	CTCGTTGAGGACCTTCCACTG
R1344	1344	1319	42	59	AGGAATATGGACTCCACTTTACAACC

Taula 2.4.6: Relació dels *primers* emprats en la seqüenciació del gen **Pfkfb4** de conill. S'ha emprat com a seqüència base la NM019333 que correspon al cDNA de la isoforma de testicle de rata. Per les divergències entre espècie i evitar així que els primers no servissin, s'ha optat per construir combinacions de seqüències que presentin les modificacions identificades entre les espècies analitzades (rata, ratolí i humà) essent.

Els assaigs amb els parells d'oligonucleòtids encebadors sobre les seqüències conegudes de rata, ratolí i humà proporcionen seqüències amb les longituds que apareixen a la següent taula.

	Pfkfb4_Rata/Ratolí/Home		
	F531	F602	F992
R 1012	482 pb	411 pb	---
R1344	814 pb	743 pb	353 pb

Taula 2.4.7: Combinació de *forward i reverse primers* pel gen **Pfkfb4** a seqüenciar.

Després de realitzar les proves pertinents, s'ha arribat a la conclusió que els millors parells de *primers* per dur a terme la seqüenciació són: F602 i R1344.

2.4.4.2.- Producció del fragment de DNA a seqüenciar

Quan ja s'han concretat tots els parells de primers adequats per a la seqüenciació es realitza un assaig de PCR (apartat 2.4.3) amb una temperatura d'*annealing* suficientment restringent com per generar només 1 únic fragment amplificat. Un cop acabada la PCR es preparen 2 gels d'agarosa al 2%; en el primer es verifica que només hi ha un fragment amplificat de DNA de la grandària desitjada, carregant 2 µl de producte de PCR producte s'aplicarà corrent elèctric durant 45 minuts a 90 V per aconseguir aïllar correctament el fragment amplificat (Fig. 2.4.6). Si el resultat del primer gel és satisfactori, farem la segona electroforesi en gel d'agarosa amb 50 µl del producte de PCR. El següent pas serà extreure el fragment de DNA del gel d'agarosa, pas indispensable per realitzar el protocol de seqüenciació de DNA.

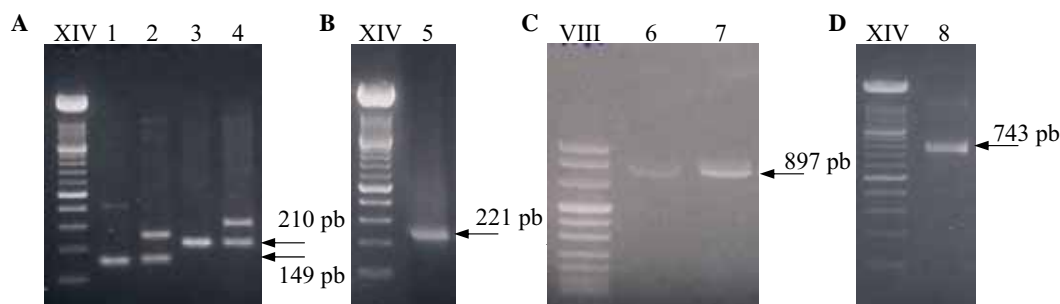


Figura 2.4.6: Gels d'agarosa per comprovar la PCR prèvia a la seqüenciació. En els gels A, B i D s'ha carregat el marcador de pes molecular XIV de Roche mentre que en el gel C hi ha el marcador VIII. En el gel A s'hi observen els fragments amplificats pels *primers* MF1-REV1 amb cDNA de múscul de rata (1) i de múscul de conill (2). Pels *primers* MF1-REV2 amb cDNA de rata (3) i de conill (4). Al gel B els *primers* LF1-REV2 (3) sobre un motlle de cDNA de fetge de conill. En el gel C s'utilitza el parell de *primers* F491-R1387 sobre diferents motlles de cDNA, cor i múscul de conill als carrils 6 i 7 respectivament. En el gel D s'hi observa el producte de PCR generat pels *primers* F602-R1344 amb el cDNA de testicle de conill com a motlle (8).

2.4.3.3.- Extracció d'un fragment de DNA d'un gel d'agarosa

REACTIUS

Sistema d'extracció de Quiagen, *QIAquick Gel Extraction Kit*. Isopropanol al 99 %.

PROTOCOL

1. Retallar amb un bisturí la porció de gel d'agarosa que conté el fragment de DNA que es pretén purificar. Col·locar en un tub Eppendorf i pesar el fragment d'agarosa.
2. Afegir 3 volums (p:v) del tampó QG. Incubar a 50 °C durant un mínim de 10 minuts o fins que es dissolgui l'agarosa, agitant la solució cada 2-3 minuts.
3. Afegir un volum d'isopropanol a la mostra i barrejar.
4. Passar la solució a través de la columna QIAquick aplicant el sistema de buit QIA, així s'uneix el DNA a la membrana de la columna.
5. Afegir a la columna 0.5 ml de tampó QG i aplicar novament el sistema de buit.
6. Afegir 0.75 ml de tampó PE, deixar el tampó en contacte amb la membrana de la columna durant 5 minuts i a continuació aplicar el buit.
7. Col·locar la columna en un tub Eppendorf net i centrifugar durant 1 minuts a 13000 rpm. Eliminar l'etanol residual que dificultaria la resuspensió del DNA.
8. Col·locar la columna en un nou tub Eppendorf, afegir a la columna el tampó d'elució EB, incubar durant 1 minut.
9. Eluir el DNA a través d'una centrifugació d'1 minut a 13000 g.
10. Per verificar la puresa i quantificar el producte, es prepara un gel d'agarosa al 2 %, s'hi col·loquen les mostres i un marcador de pes molecular (Figura).
11. Finalment guardar la solució de DNA a -20 °C.

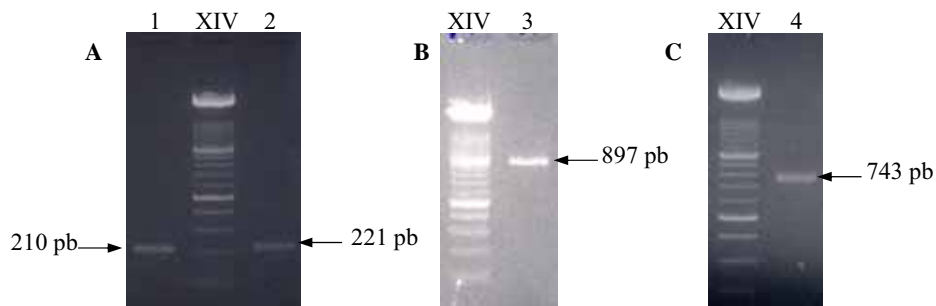


Figura 2.4.7: Gels d'agarosa on es mostra el producte de PCR un cop ha estat purificat del gel d'agarosa. El marcador de pes molecular dels 3 gels és el *MWM XIV* de Roche. Al gel A s'hi observen els fragment amplificat pel parell de primers MF1-REV2 (1) i LF1-REV2 (2). El parell de primers F491 - R1387 generen el fragment del gel B. En el gel C s'hi observa el producte amplificat pels primers F602 i R1344.

2.4.4.4.- Seqüenciació dels fragments de DNAREACTIUS

Sistema de seqüenciació de Applied Biosystems, *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

Oligonucleòtids encebadors: MF1, LF1, REV2, F491, R1387, F602 i R1344 2 µM

PROTOCOL

A) PCR de seqüenciació:

A cada microtub eppendorf s'hi col·loquen 2 µl de Terminator Ready Reaction Mix, els ng de DNA que es consideri segons la taula 2.4.8, 3.2 pmol de primer i aigua estèril fins a volum final de 10 µl. Es col·loca en el termociclador i s'inicia la PCR de seqüenciació seguin els següents passos:

1. 96 °C durant 1 minut.
2. 96 °C durant 10 segons.
3. 50 °C durant 5 segons.
4. 60 °C durant 4 minuts.
5. Repetir el procés durant 24 cicles des de 2-4.
6. Finalitza la PCR disminuint la temperatura fins a 4 °C.
7. Purificació del producte de PCR.

La transició entre les diferents etapes de la PCR es produeix 1 °C/segon.

Producte de PCR	Quantitat de mostra
100-200 pb	1-3 ng
200-500 pb	3-10 ng
500-1000 pb	5-20 ng
1000-2000 pb	10-40 ng
>2000 pb	20-50 ng

Taula 2.4.8: Relació de grandària dels fragments de DNA produïts en la PCR i la quantitat de mostra necessària per un assaig de seqüenciació.

B) Purificació del producte de PCR de seqüenciació:

1. Eliminar oli mineral
2. Afegir a tubs Eppendorf 1.5 ml els 10 μ L de la reacció de seqüenciació.
3. Augmentar el volum de la reacció fins a 20 μ L amb aigua abans d'iniciar el procés de purificació.
4. Afegir 16 μ L d'aigua i 64 μ L d'etanol al 95 %. Barrejar amb vòrtex i deixar a temperatura ambient un mínim de 15 minuts.
5. Centrifugar durant 20 minuts a 14000 g a temperatura ambient.
6. Eliminar el sobrenadant i afegir 200 μ l d'etanol al 70 % a temperatura ambient.
7. Centrifugar durant 2 minuts a 14000 g a temperatura ambient.
8. Repetir el pas e-f 2 o 3 vegades.
9. Eliminar la solució d'etanol al màxim si cal es pot centrifugar novament per eliminar el que quedi.
10. Asecar el pellet, el qual pot guardar-se a -20 °C (com a molt durant un any).

El pellet s'ha dut als Serveis Científico-tècnics del Parc Científic de Barcelona, on amb l'ajuda d'un seqüenciador s'ha llegit les seqüències generades.

- Seqüència del gen *Pfkfb1* que codifica per la isoforma muscular de l'enzim PFK-2

A continuació es presenta l'alineament de les seqüències del gen *Pfkfb1* de rata (X15579, cDNA que genera la isoforma muscular) i de conill (obtinguda experimentalment) corresponent a l'amplificació produïda pel parell de *primers* MF1 i REV2.

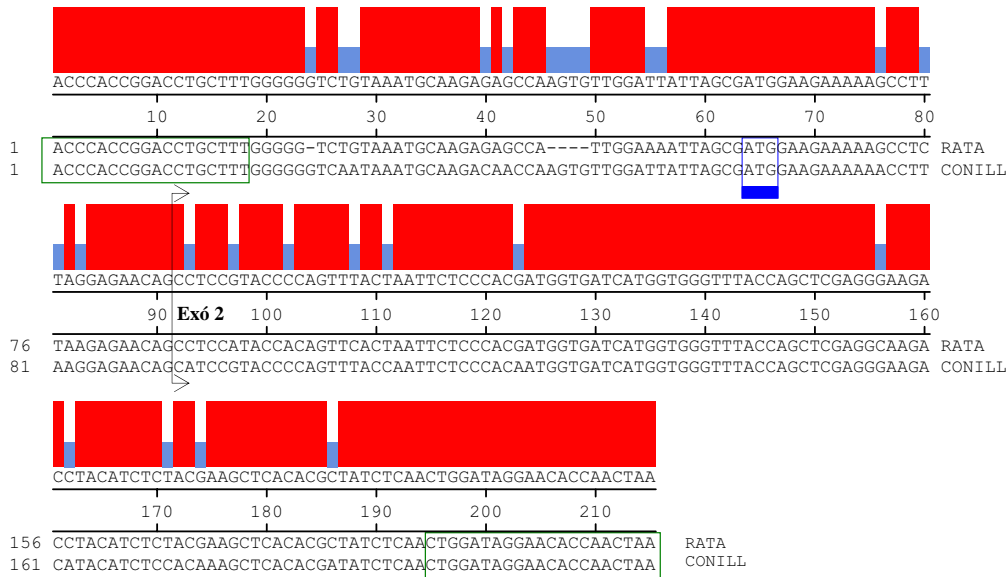


Figura 2.4.8: Alineament de la porció del gen *Pfkfb1* muscular de rata i conill. Els requadres verds indiquen els *primers*, mentre que el requadre blau indica el codó d'inici de la traducció. La fletxa marca l'inici del segon exó del gen *Pfkfb1*. A la part superior de la seqüència consens (que en aquest cas es la seqüència de rata, obtinguda d'una base de dades contrastada) s'hi representa l'homologia entre les seqüències en vermell s'indica la coincidència mentre les bandes blaves indiquen divergència entre les seqüències.

- **Seqüència del gen Pfkfb1 que codifica per la isoforma hepàtica de l'enzim PFK-2**

En la figura 2.4.9 es presenta l'alineament de les seqüències del gen Pfkfb1 de rata (NM012621, que codifica per la isoforma hepàtica) i conill (obtinguda experimentalment) corresponent a l'amplificació produïda pel parell de *primers* LF1 i REV2.

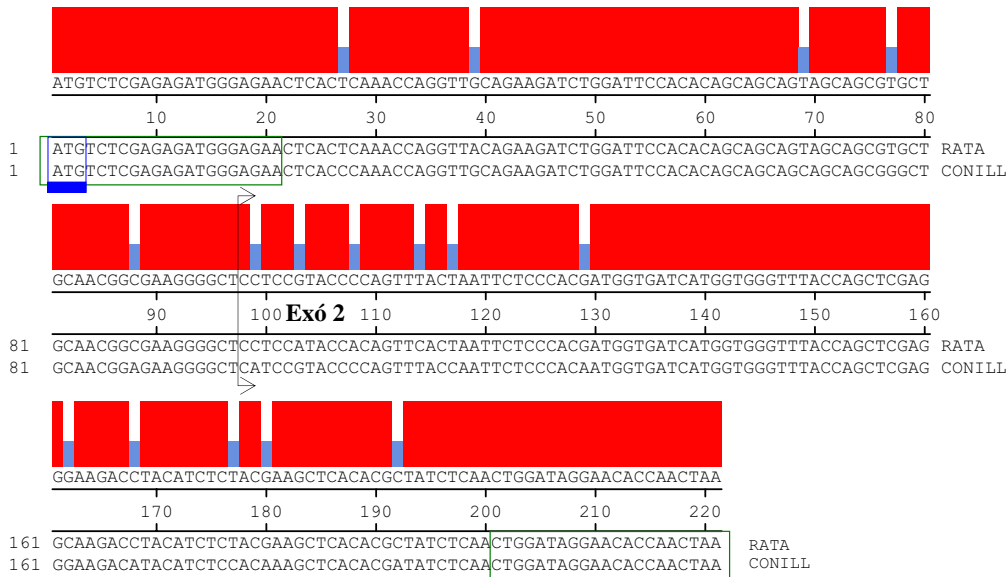
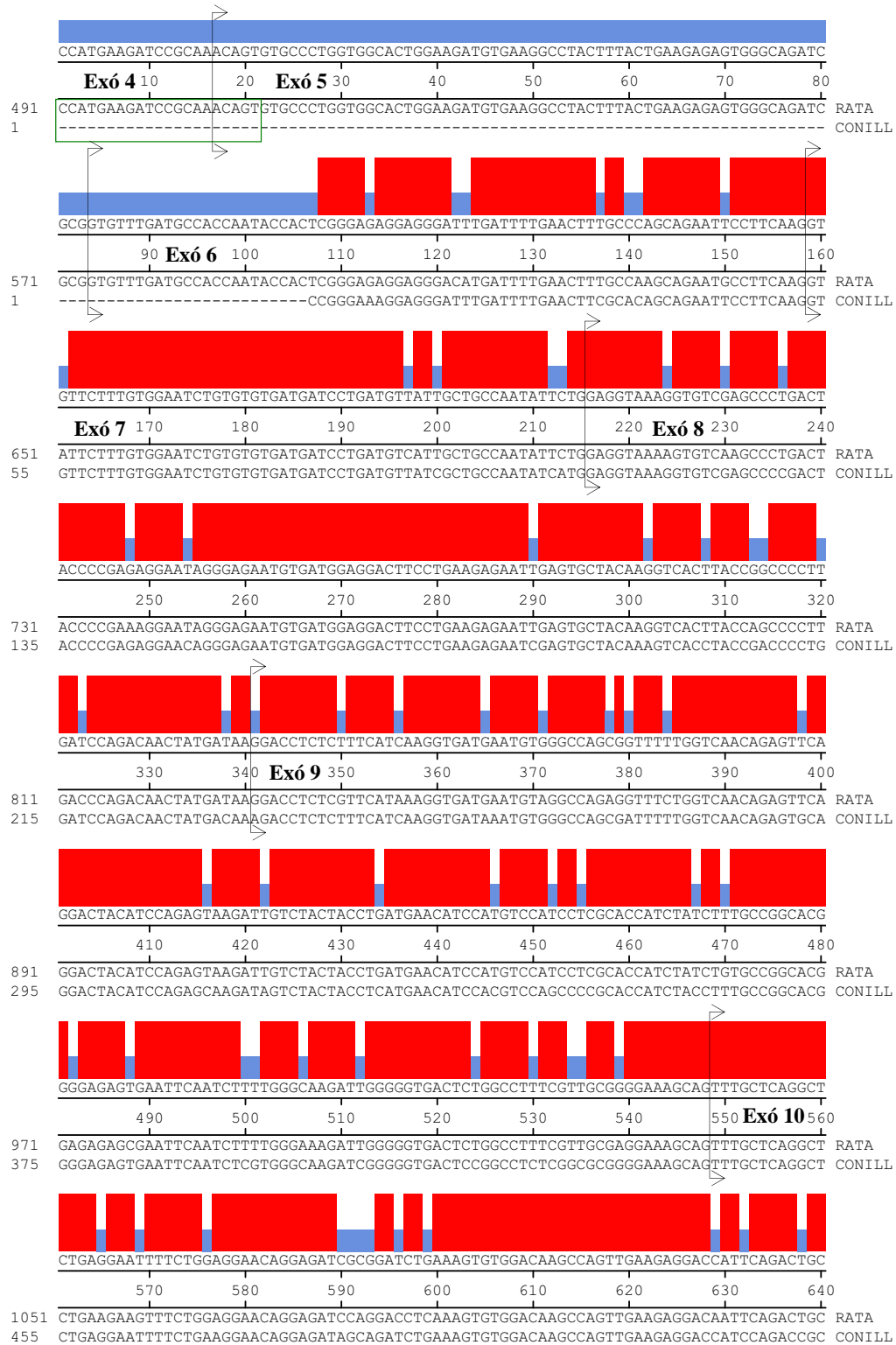


Figura 2.4.9: Alineament de la seqüència NM012621 i el fragment seqüenciat de conill, corresponent a l'amplificació LF1-REV2. Els requadres verds indiquen els *primers*, mentre que el requadre blau indica el codó d'inici de la traducció. La fletxa marca l'inici del segon exó del gen Pfkfb1. A la part superior de la seqüència consens (que en aquest cas es la seqüència de rata, obtinguda d'una base de dades contrastada) s'hi representa l'homologia entre les seqüències en vermell s'indica la coincidència mentre les bandes blaves indiquen divergència entre les seqüències.

- **Seqüència del gen Pfkfb2 que codifica per la isoforma cardíaca de l'enzim PFK-2**

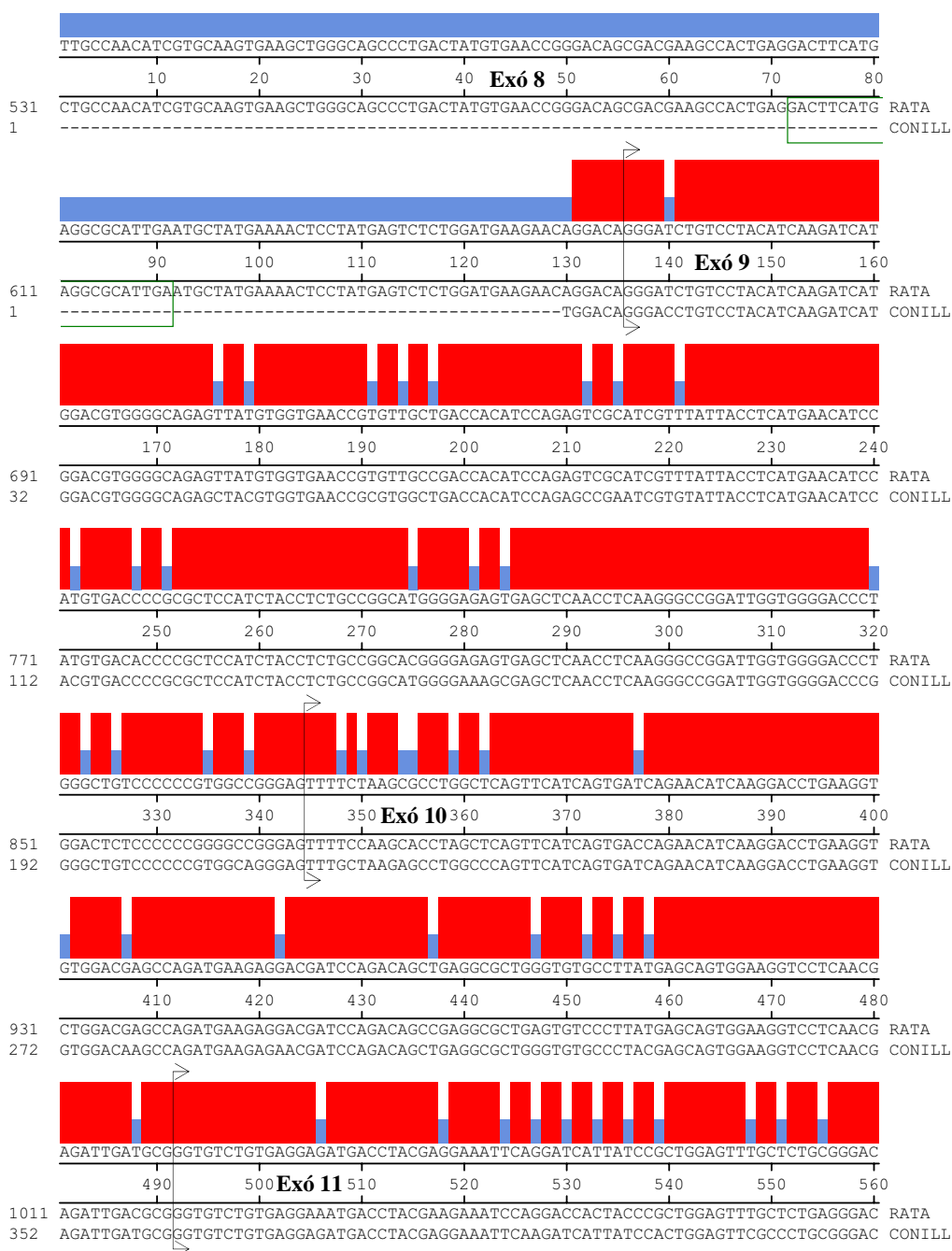
Alineament de les seqüències del gen Pfkfb2 de rata i conill (obtinguda experimentalment) corresponent a l'amplificació produïda pel parell de *primers* F491 i R1387.

CAPÍTOL 2



• Seqüència del gen *Pfkfb4* que codifica per la isoforma de testicle de l'enzim PFK-2

Alineament de les porcions del gen *Pfkfb4* de rata i conill (obtinguda experimentalment) corresponents a l'amplificació produïda pel parell de primers F602 i R1344.



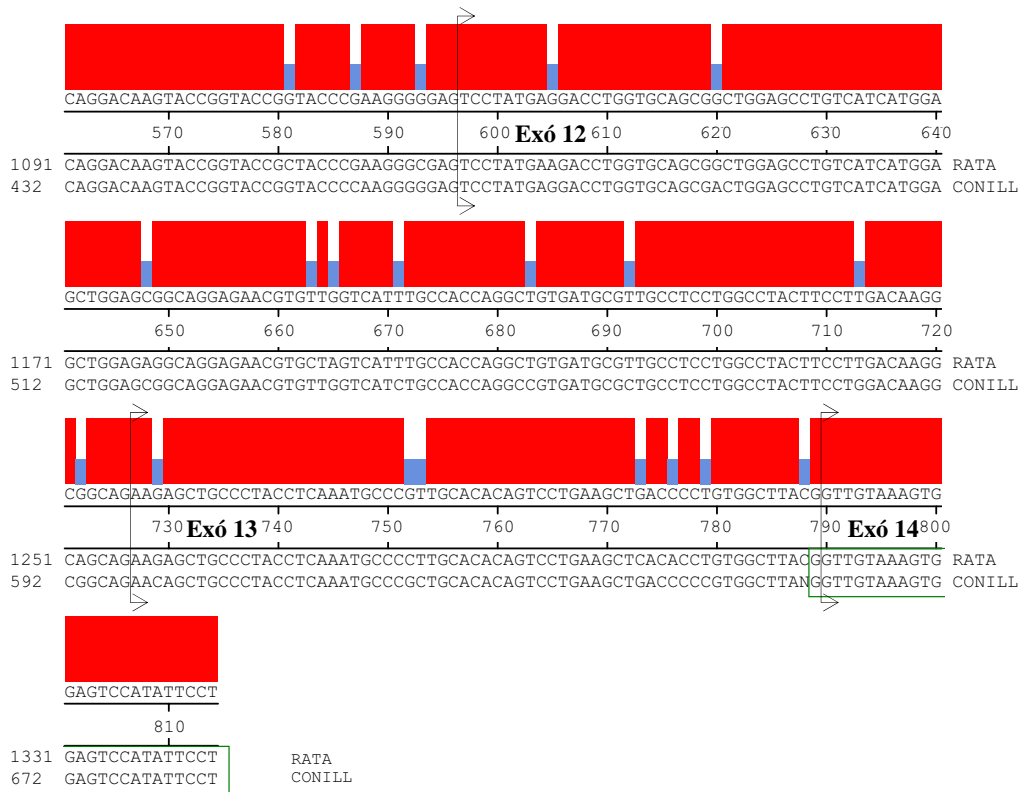


Figura 2.4.11: Alineament de la porció del gen Pfkfb4 de rata (NM019333) i conill (obtinguda pel protocol Big Dye Terminator v3.1) corresponent a l'amplificació produïda pel parell de primers F602 i R1344. Els requadres verds indiquen els primers. Les fletxes marca l'inici d'un nou exó del gen Pfkfb4. A la part superior de la seqüència consens (que en aquest cas es la seqüència de rata, obtinguda d'una base de dades contrastada) s'hi representa l'homologia entre les seqüències, en vermell s'indica la coincidència, mentre les bandes blaves indiquen divergència entre les seqüències. Al final de l'exó 13 apareix una N en la seqüència de conill, analitzant les seqüències obtingudes s'aprecia dimorfisme C/T on C és molt lleugerament més abundant.

2.4.5- PCR a temps real

La tècnica de PCR quantitativa a temps real (Real Time PCR) permet quantificar el contingut d'un determinat DNA o RNA en una mostra. Teòricament hi ha una relació quantitativa entre la quantitat de motlle inicial i la quantitat de producte obtingut al final de cadascun dels cicles de la reacció de PCR. Aquest fet combinat amb un mètode de detecció del producte de PCR fa possible inferir la quantitat de motlle en una mostra, sempre i quan es valori la reacció de PCR en la seva fase exponencial, o sigui en la regió lineal quan es treballa amb gràfiques sobre logaritmes. En la tesi s'utilitza aquesta tècnica per valorar la quantitat de RNA missatger dels diferents gens a estudi en les diferents mostres analitzades, així doncs permet avaluar el nivell d'expressió dels diferents gens en cadascuna de les etapes o estadis estudiats.

Existeixen diferents assaigs de Real-Time però per aquest estudi s'ha escollit l'anàlisi Taqman. En aquest cap es basa en una activitat 5'-3' polimerasa i 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa (Giulietti A., i col 2001). Es dissenyen dos oligonucleòtids (primers) específics del gen diana (gen que s'estudia), i una sonda situada enmig de l'amplicó definit pels dos primers. Aquesta sonda està marcada amb un fluoròfor a l'extrem 5' i un *quencher* (o apagador, silenciador) a l'extrem 3'. Mentre la sonda es mantingui intacte, el silenciador bloqueja l'emissió de fluorescència per part del fluoròfor, fet que s'anomena FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). En successius cicles de PCR la sonda i els primers s'enganxen amb el motlle, llavors la DNA polimerasa (amb activitat 5'-3' polimerasa i 5'-3' exonucleasa) a mesura que replica el motlle i degrada la sonda, així el fluoròfor queda lliure i pot emetre fluorescència. Quants més cicles es duguin a terme més fluorescència es produirà. Tota la reacció es pot veure en la figura 2.4.12.

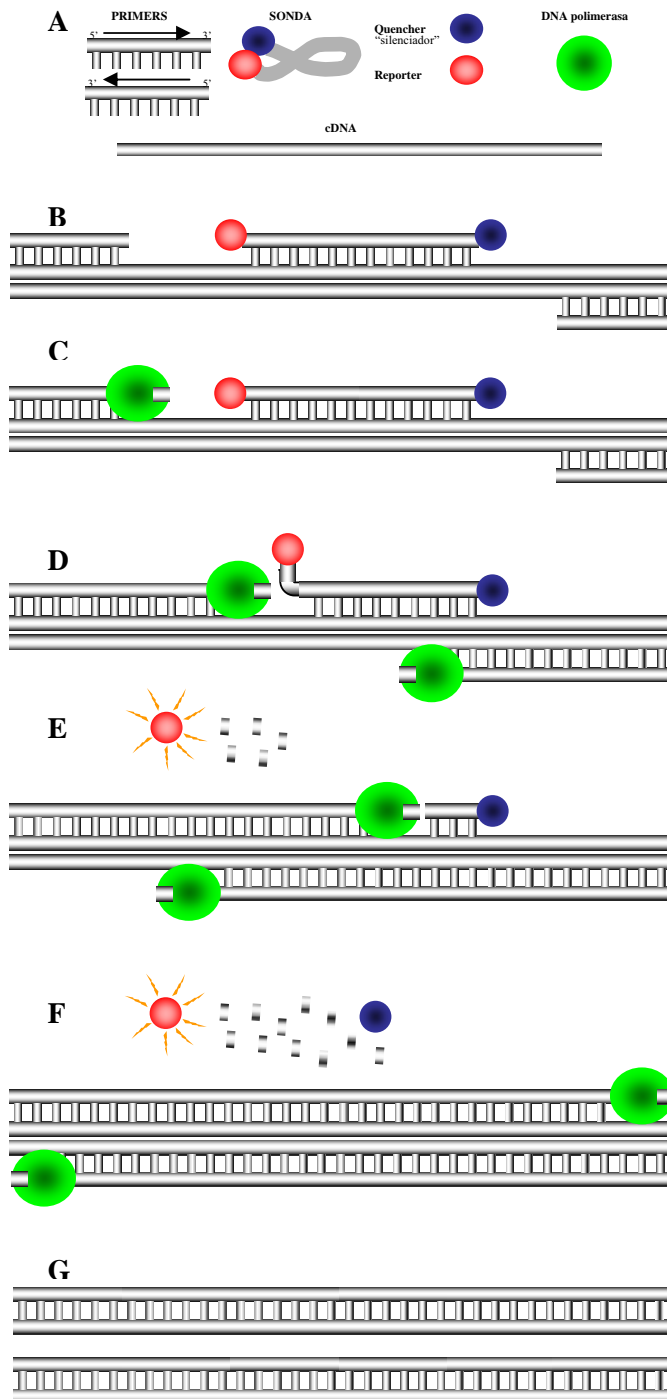


Figura 2.4.12: Esquema de la reacció de PCR a temps real.

A) Apareixen els elements implicats en la Real-Time PCR. 2 Primers (forward i reverse), la sonda (amb el *quencher* i el *reporter*), el cDNA i la DNA polimerasa.

B) Es mostra el segon cicle de la Real-Time PCR, ja es disposa de 2 cadenes de DNA. Els primers i la sonda troben les regions complementaries i si enganxen (annealing)

C) La DNA polimerasa reconeix la doble cadena (primer+cDNA) i comença a replicar el cDNA des dels extrems 5' cap al 3'.

D) La DNA polimerasa arriba a la zona on hi ha la sonda unida, mentre segueix replicant el DNA, comença a degradar la sonda amb la seva activitat exonucleasa 5'-3'.

E) El *reporter* queda alliberat de la zona d'interacció amb el *quencher* i pot començar a emetre fluorescència.

F) La DNA polimerasa acaba de replicar el DNA.

G) Al final d'un cicle de Real-Time PCR s'obté el doble del material genètic inicial.

REACTIUS

cDNA, provinent de la retrotranscripció.

TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (comprada a *Applied Biosystems*) conté la Taq-polimerasa, tampó d'assaig, dNTP i MgCl₂ tots ells necessaris per la reacció de PCR.

Assay-on-Demand, dissenyats per *Applied Biosystems* sobre els gens 18S, Pfkfb2, Pfkfb3, Pfkfb4 en rata i 18S i Pfkfb3 en conill.

Primers i sonda específics, per determinar els gens *muscle-Pfkfb1*, *liver-Pfkfb1*, *brain-Pfkfb3* en rata. Per conill s'han dissenyat els necessaris per detectar els gens *muscle-Pfkfb1*, *liver-Pfkfb1*, Pfkfb2 i Pfkfb4.

Els gens descrits en les bases de dades, sovint són emprats per les empreses per establir assaigs optimitzats, en el cas de la casa *Applied Biosystems* es coneix com *Assay-on-Demand*. Pels assaigs que no es compren directament a la casa comercial, requereixen un disseny i estandardització previes.

PROTOCOL

1. Preparació de la mescla de reacció, TaqMan Universal PCR Master Mix 2X, *primers (forward/reverse)*, sonda i aigua sobre un volum final de 20 µl.
2. Afegir la mostra de cDNA, 5 µl a la dilució adequada.
3. Col·locar la placa al termociclador específic, que presenta un hardware i un software per detectar la fluorescència després pel *reporter*, que en tots els casos serà FAM.
4. Iniciar el procediment de PCR a temps real:
 - a. Pas inicial, 50 °C durant 2 minuts.
 - b. Desnaturalització inicial: 10 minuts a 95 °C.
 - c. *Melting*: 15 segons a 95 °C.
 - d. *Annealing/extend*: 1 minut a 60 °C.
 - e. Repetir els passos c-d fins a completar 40 cicles.
5. Recollir els resultats i analitzar-los.

2.4.5.1.- Assaigs de PCR a temps real

2.4.5.1.1.- Assay-on-Demand

Aquest tipus assaigs han estat dissenyats per la casa comercial *Applied Biosystems*, permeten detectar l'expressió de gens, dels quals hi ha la seqüència en bases de dades, a través de la tècnica de PCR a temps real. Els assaigs escollits són els descrits en la taula ... Concretament s'ha detectat l'expressió dels gens *Pfkfb2*, *Pfkfb3*, *Pfkfb4* i 18S en rata, mentre que amb les mostres de conill només han estat compatibles els assaigs per detectar l'expressió dels gens *Pfkfb3* i 18S.

Gen	mRNA	Exons	Seqüència consens
Pfkfb2	NM080477	2-3	GCAGGGAAGAAATGCTCATGGGCTT
Pfkfb3	NM057135	15-16	CAGCTGCCCGGACAACCTTTGCTAG
Pfkfb4	NM019333	10-11	ACGAGATTGACGCGGGTGTCTGTGA
18S	comú rata-ratolí-humà		TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG

Taula 2.4.9: Seqüències proporcionades per la casa comercial i els exons implicats en l'assaig.

PROTOCOL

- Preparació de la mescla de reacció, TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 µl, Assay-on-Demand 1.25 µl i aigua estèril 6.25 µl.
- Afegir 5 µl de cDNA a la dilució adequada.
- Iniciar el protocol de PCR a temps real en el termociclador.

2.4.5.1.2.- Detecció de *Pfkfb1* muscular en rata

La detecció de la isoforma muscular en rata a través de la tècnica de PCR a temps real s'ha realitzat emprant els oligonucleòtids encebadors i la sonda dissenyats sobre la seqüència X15579 que comprèn la unió dels exons 1 i 2.

Primer	X15579		Cadena	Seqüència
	Inici	Final		
M1FOR	70	91	+	AATGCAAGAGAGCCATTGGAAA
M2REV	162	140	-	CCATCGTGGGAGAATTAGTGAAC
SONDA	110	139	+	AGCCTCTAAGAGAACAGCCTCCATACCACA

Taula 2.4.10: Primers i sonda emprats en la detecció del gen Pfkfb1 que codifica per la isoforma muscular en rata.

2.4.5.1.3.- Detecció de Pfkfb1 hepàtica en rata

La detecció de la isoforma hepàtica en rata a través de la tècnica de PCR a temps real s'ha realitzat emprant els oligonucleòtids encebadors i la sonda dissenyats sobre la seqüència NM012621 que comprèn la unió dels exons 1 i 2.

Primer	NM012621		Cadena	Seqüència
	Inici	Final		
L1FOR	50	71	+	GGATTCCACACAGCAGCAGTAG
L2REV	136	114	-	TCACCATCGTGGGAGAATTAGTG
SONDA	105	89	-	TATGGAGGAGCCCCTTC + MGB

Taula 2.4.11: Primers i sonda emprats en la detecció del gen Pfkfb1 que codifica per la isoforma hepàtica en rata.

2.4.5.1.4.- Detecció de Pfkfb3 total (cervell-ubiqua) en rata

La detecció de tots els productes generats pel gen Pfkfb3 (isoformes cerebral, ubiqua i les altres) en rata a través de la tècnica de PCR a temps real s'ha realitzat emprant els oligonucleòtids encebadors i la sonda dissenyats sobre la seqüència R2BK1 (NM057135) que comprèn la unió dels exons 10 i 11.

En primer terme s'han alineat totes les seqüències que es generen com a producte del gen Pfkfb3, R2BK1-8. La regió comú entre totes les isoformes comprèn els exons 1-13, a partir d'aquest exó, es produeixen una sèrie de *splicing's* alternatius que generen les 8 isoformes. L'assaig adquirit a través de la casa comercial Applied Biosystems per la detecció per PCR a temps real del gen Pfkfb3, només detecta les isoformes R2BK1 i R2BK4, perquè han dissenyat els oligonucleòtids i la sonda en base al punt d'unió dels exons 15 i 16.

Primer	NM012621		Cadena	Seqüència
	Inici	Final		
PKFFB3F	1443	1468	+	ACTGCGTGAGCAAGACAAATACTACT
PKFB3R	1518	1501	-	CTCCAGGCGCTGGACAAG
SONDA	1470	1494	+	CCGCTATCCCACAGGCGAGTCCTAC

Taula 2.4.12: *Primers* i sonda emprats en la detecció del gen *Pfkfb3* que codifica per les isoformes ubíqua i de cervell en rata.

2.4.5.1.5.- Detecció de *Pfkfb1* muscular en conill

La detecció de la isoforma muscular del gen *Pfkfb1* en conill a través de la tècnica de PCR a temps real s'ha realitzat emprant els oligonucleòtids encebadors i la sonda (Taula 2.4.13) dissenyats sobre la seqüència obtinguda en el protocol de seqüenciació entre els *primers* MF1-REV2 que comprèn la unió dels exons 1 i 2.

Primer	MF1-REV2_Conill		Cadena	Seqüència
	Inici	Final		
M2FOR_Rab	46	71	+	AGTGTGGATTATTAGCGATGGAAGA
REV2_Rab	144	121	-	TAAACCCACCATGATCACCATTGT
Sonda	79	108	+	TTAAGGAGAACAGCATCCGTACCCAGTTT

Taula 2.4.13: *Primers* i sonda emprats en la detecció del gen *Pfkfb1* que codifica per la isoforma muscular en conill.

2.4.5.1.6.- Detecció de *Pfkfb1* hepàtica en conill

La detecció de la isoforma hepàtica del gen *Pfkfb1* en conill a través de la tècnica de PCR a temps real s'ha realitzat emprant els oligonucleòtids encebadors i la sonda (Taula 2.4.14) dissenyats sobre la seqüència obtinguda en el protocol de seqüenciació entre els *primers* LF1-REV2 que comprèn la unió dels exons 1 i 2.

Primer	LF1-REV2_Conill		Cadena	Seqüència
	Inici	Final		
L2FOR_Rab	34	56	+	AGGTTGCAGAAGATCTGGATTCC
REV2_Rab	150	127	-	TAAACCCACCATGATCACCATTGT
Sonda	96	125	+	CTCATCCGTACCCCAGTTTACCAATTCTCC

Taula 2.4.14: Primers i sonda emprats en la detecció del gen *Pfkfb1* que codifica per la isoforma hepàtica en conill.

2.4.5.1.7.- Detecció de *Pfkfb2* en conill

En la detecció del gen *Pfkfb2* en conill a través de la tècnica de PCR a temps real s'han emprant els oligonucleòtids encebadors i la sonda (Taula 2.4.15) dissanyats sobre la seqüència obtinguda en el protocol de seqüenciació entre els primers F491-R1387, concretament permet detectar la unió dels exons 10 i 11.

Primer	Pfkfb2_Conill		Cadena	Seqüència
	Inici	Final		
F_Pfkfb2_Rab	551	573	+	ACCTACGAGCAGTGGGAAGATCCT
R_Pfkfb2_Rab	632	610	-	ACCGCTTCTCAATCTCTGCATAG
Sonda_Pfkfb2	607	586	-	CATTTCCTCGCACACGCCAGCA

Taula 2.4.15: Primers i sonda emprats en la detecció del gen *Pfkfb2* que codifica per la isoforma cardíaca en conill.

2.4.5.1.8.- Detecció de *Pfkfb4* en conill

En la detecció del gen *Pfkfb4* en conill a través de la tècnica de PCR a temps real s'han emprant els oligonucleòtids encebadors i la sonda (Taula 2.4.16) dissanyats sobre la seqüència obtinguda en el protocol de seqüenciació entre els primers F602-R1344, concretament permet detectar la unió dels exons 10 i 11.

Primer	Pfkfb4_Conill		Cadena	Seqüència
	Inici	Final		
F_Pfkfb4_Rab	335	356	+	GTGGAAGGTCCTCAACGAGATT
R_Pfkfb4_Rab	421	399	-	GCGAACTCCAGTGGATAATGATC
Sonda Pfkfb4	385	358	-	TAGGTCATCTCCTCACAGACACCCGCAT

Taula 2.4.16: Primers i sonda emprats en la detecció del gen Pfkfb4 que codifica per la isoforma de testicle en conill.

2.4.5.2.- Optimització dels assaigs de PCR a temps real

Per cada gen que s'ha analitzat, s'han estandarditzat les condicions d'assaig. Això implica trobar la combinació adequada de la concentració de *primers*, *forward* i *reverse*, i sonda. Així com la dilució de la mostra que obtingui un valor Ct entre els 20 i 30 cicles, d'aquesta manera es poden observar canvis d'expressió.

2.4.5.2.1.- Optimització dels "forward i reverse primers"

L'assaig de PCR a temps real dut a terme amb *primers* i sonda que no han estat avaluats abans, ha de ser optimitzat. Cal fer un assaig previ per conèixer la concentració de cadascun dels *primers*, per aquest assaig s'ha utilitzat la matriu que apareix en la Taula 2.4.17. Com a resultat de l'assaig es representen les gràfiques en 3D; ΔRn (eix Y) vs *primers* (eixos X i Z) i Ct (eix Y) vs *primers* (eixos X i Z) (Fig. 2.4.13). Amb aquestes representacions es pot escollir la combinació de *primers* òptima per l'assaig, concretament serà aquella que redueixi la fluorescència (ΔRn) sense afectar el valor Ct. Aquest protocol s'ha repetit per cadascun dels gens que s'analitzen amb un assaig no estandarditzat per un casa comercial. Concretament la optimització dels *primers* per l'assaig de PCR a temps real dels gens analitzats en aquest estudi es recullen en la Taula 2.4.18.

Concentració del <i>Reverse primer</i>	Concentració del <i>Forward primer</i> (nM)		
	300	600	900
300	300 / 300	600 / 300	900 / 300
600	300 / 600	600 / 600	900 / 600
900	300 / 900	600 / 900	900 / 900

Taula 2.4.17: Matriu de concentracions de primers: combinacions entre el forward i reverse primer des de 300 nM a 900 nM.

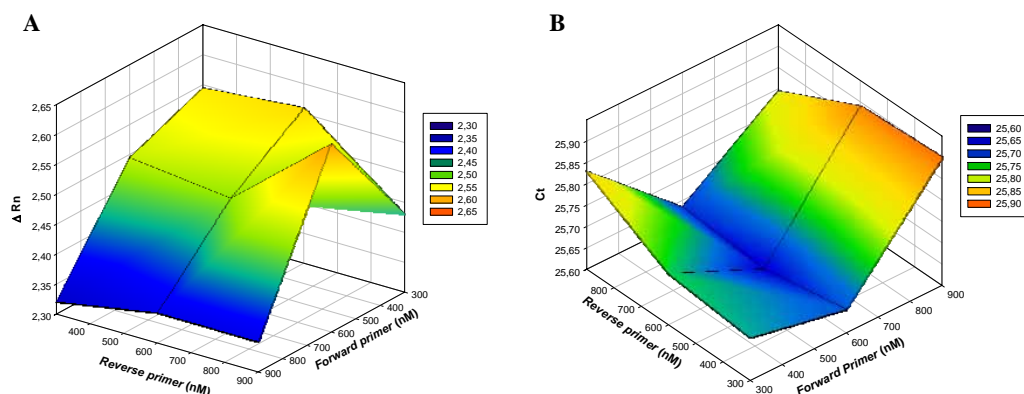


Figura 2.4.13: Optimització dels primers per la detecció del gen Pfkfb3-Total. En la gràfica A s'aprecia la representació en 3D, de la fluorescència (ΔRn) respecte als primers (*forward* i *reverse*). En la gràfica B es representa el valor Ct respecte als primers.

Gen	cDNA motlle	Concentració de primer (nM)		Concentració de Sonda (nM)
		Forward	Reverse	
18 S	Múscul de rata	<i>Assay-on-Demand</i>		
Pfkfb1_Muscular	Múscul de rata	900	900	200
Pfkfb1_Hepàtica	Fetge de rata	900	900	200
Pfkfb2	Cor de rata	<i>Assay-on-Demand</i>		
Pfkfb3	Cervell de rata	<i>Assay-on-Demand</i>		
Pfkfb3_Total	Cervell de rata	600	900	150
Pfkfb4	Testicle de rata	<i>Assay-on-Demand</i>		
18 S	Múscul de conill	<i>Assay-on-Demand</i>		
Pfkfb1_Muscular	Múscul de conill	600	900	200
Pfkfb1_Hepàtica	Fetge de conill	300	600	150
Pfkfb2	Cor de conill	600	900	250
Pfkfb3	Cervell de conill	<i>Assay-on-Demand</i>		
Pfkfb4	Testicle de conill			

Taula 2.4.18: Resultats de l'optimització de tots els assaigs dissenyats per aquest estudi.

2.4.5.2.1.- Optimització de la sonda

Per tal d'acabar de posar a punt l'assaig de PCR a temps real, cal concretar la concentració de sonda. Es realitza un banc de proves amb les concentracions (50-100-150-200-250 nM), amb els resultats es realitza una representació com la que apareix a la figura 2.4.14. La concentració de sonda òptima per l'assaig, és aquella que presenta un valor de Ct més baix amb un valor de fluorescència més alt.

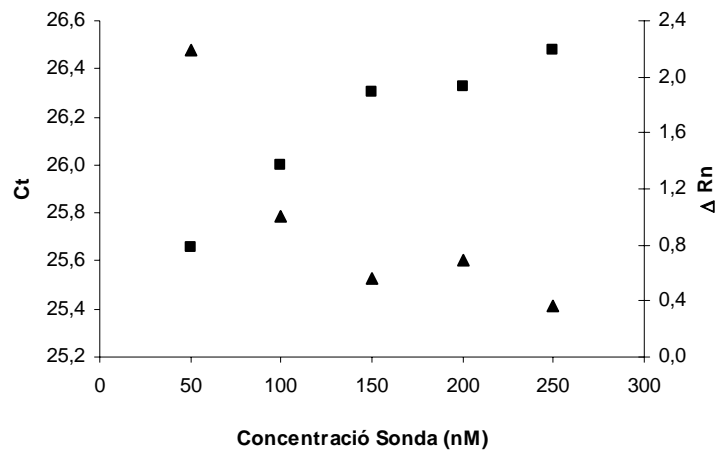


Figura 2.4.14: Optimització de la sonda de gen Pfkfb3-Total. S'hi representa la fluorescència, ΔRn , (■) a l'eix d'ordenades de la dreta i el valor Ct (▲) a l'eix d'ordenades de l'esquerra. A l'eix d'abcises s'hi representa la concentració de sonda (nM). Concretament en aquest cas s'ha escollit 150 nM com a concentració òptima de sonda.

2.4.5.3.- Resultat de la PCR a temps real

2.4.5.3.1.- Què s'obté? i què indica?

Un cop fet l'assaig s'obté una corba per cada mostra tal i com s'aprecia a la figura 2.4.15A, increment de fluorescència a l'eix d'ordenades respecte al nombre de cicles en el d'abcises. S'observa una primera fase on la fluorescència és indetectable, línia basal, però a partir d'un determinat cicle del termociclador es comença a detectar un increment de fluorescència, degut a l'acumulació de producte de PCR, és la fase exponencial on es suposa que l'eficiència és del 100 % (en cada cicle es duplica el cDNA). És en aquesta fase on la valoració de la reacció és específica i precisa. Després d'aquesta fase s'observa una fase lineal on els components de la reacció comencen a esgotar-se i l'acumulació de producte és més lenta. Finalment s'arriba a un plató on no hi ha acumulació de producte.

Si el gràfic anterior en representem en escala logarítmica de l'increment de fluorescència en l'eix d'ordenades figura 2.4.15B, s'obté una linealització de la corba en fase exponencial. En aquesta fase exponencial es pot establir un llindar o *threshold*, logaritme d'una fluorescència que es trobarà sempre en la fase exponencial. Aquest valor és arbitrari i el fixa l'investigador, així doncs, per cada gen a estudiar s'establirà un el llindar específic. El cicle del termociclador en el qual una mostra arriba al llindar és el que es coneix com a *Ct value* (*cicle on s'assoleix el threshold*). El valor *Ct* pot relacionar-se amb la quantitat de motlle present a la mostra. Així doncs, a major quantitat de motlle, el *Ct* serà menor perquè l'amplificació generarà una mateixa fluorescència (llindar) per un menor nombre de cicles.

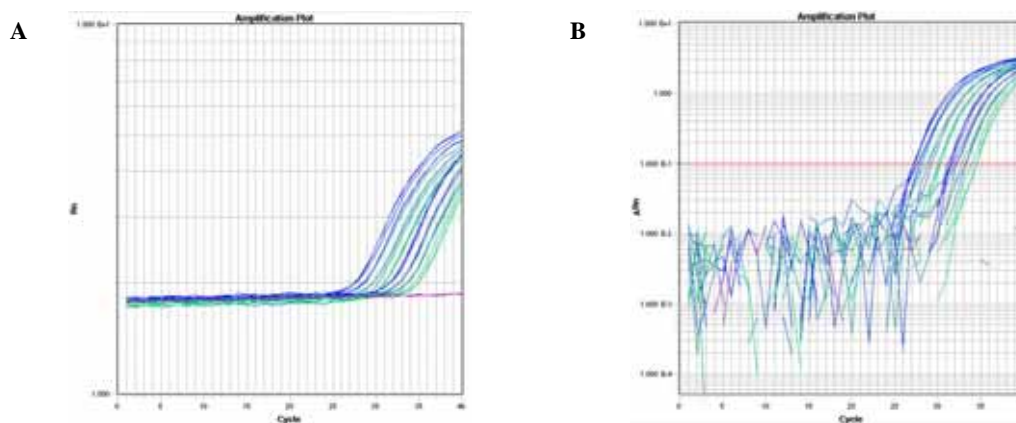


Figura 2.4.15: Comparació dels resultats de fluorescència en front al nombre de cicles en escala lineal (A) i en escala logarítmica (B).

2.4.5.3.2.-Normalització del resultats

La reacció de PCR és exponencial, aquest fet provoca que petites variacions de la quantitat de motlle inicial derivin en grans variacions del resultat final. Per assegurar que es carrega la mateixa quantitat de mostra a cada pou i per tan la mateixa quantitat de cDNA total els resultats s'han de normalitzar enfront d'un gen de referència o *Housekeeping*, el qual no varia la seva expressió en les condicions experimentals. Per aquests estudis s'utilitza com a *Housekeeping* el gen que codifica pel RNA ribosòmic 18S (*18S*).

2.4.5.3.3.-Càlcul dels resultats, quantificació relativa

A una mostra de cDNA se li assigna un valor arbitrari, es realitza un banc de dilucions on cada dilució correspondre a una quantitat de cDNA relativa al valor arbitrari assignat a la mostra inicial (Giulietti i col 2001).

Es realitza la PCR a temps real amb el banc de dilucions i s'obté un valor Ct per cada dilució. A continuació es construeix una corba estàndard (Fig. 2.4.16) on a l'eix d'abcises hi haurà el logaritme de la quantitat de cDNA (unitats arbitràries) i a l'eix d'ordenades el valor Ct. El pendent d'aquesta recta indica l'eficiència de la reacció de PCR, essent 100 % eficient aquella reacció que presenti un pendent de -3.322 (Fig. 2.4.17). Amb les corbes estàndard construïdes es pot inferir en unitats arbitràries la quantitat de motlle existent a cada mostra, tan pel gen a estudi, com pel gen de referència (*18S*). Per comparació entre la quantitat de la situació experimental i la control es calcula la variació d'expressió d'un determinat motlle, o sigui gen.

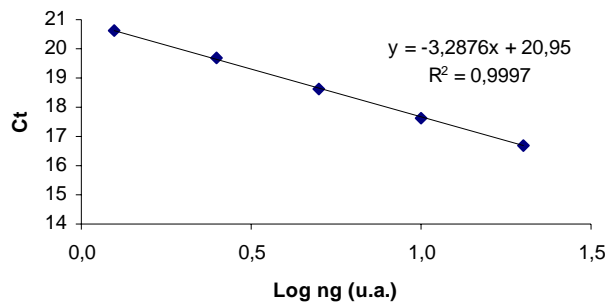


Figura 2.4.16: Corba estàndard del gen 18S en rata. El logaritme de la quantitat de cDNA (Log ng) es representa en unitats arbitràries (u.a.)

$$AE = 10^{(-1 / \text{pendent})}$$

$$\% E = (AE - 1) \times 100$$

Figura 2.4.17: Equacions per determinar l'eficiència d'una reacció de PCR a temps real. On l'eficiència és E, l'amplificació exponencial és AE.

En la taula que es presenta a continuació es mostren les rectes estàndards obtingudes pels diferents gens estudiats en rata i conill.

GEN	cDNA motlle	Y = a X + b		% Eficiència
		a	b	
18 S *	Múscul de rata	-3,2876	20,950	101,45 [#]
Pfkfb1_Muscular	Múscul de rata	- 3,5761	34,099	90,39
Pfkfb1_Hepàtica	Fetge de rata	- 3,7436	33,850	84,98
Pfkfb2 *	Cor de rata	- 3,7910	32,766	83,56
Pfkfb3 *	Cervell de rata	- 3,9440	33,643	79,29
Pfkfb3_Total	Cervell de rata	- 3,6563	34,424	87,72
Pfkfb4 *	Testicle de rata	- 3,8835	30,280	80,93
<hr/>				
18 S *	Múscul de conill	- 3,4686	17,949	94,22
Pfkfb1_Muscular	Múscul de conill	- 3,4299	33,794	95,68
Pfkfb1_Hepàtica	Fetge de conill	- 3,1405	35,918	108,17 [#]
Pfkfb2	Cor de conill	-3,4181	33,99	96,14
Pfkfb3 *	Cervell de conill	-3,4328	34,362	95,57
Pfkfb4	Testicle de conill			

Taula 2.4.19: Rectes estàndards dels gens estudiats en mostres de rata. * indica els gens analitzats amb *Assay-on-Demand*. [#] valors superiors al 100 % eficiència són fruit de les dades experimentals, totalment inversemblants matemàticament parlant.

CAPÍTOL 3

RESULTATS

3.1.- Patró d'expressió dels diferents gens que codifiquen per PFK-2/FBPasa-2 en el transcurs del desenvolupament del teixit muscular esquelètic i cardíac.

3.2.- Diferències entre un múscul de contracció ràpida (*TA*) i un múscul de contracció lenta (*Soleus*).

3.3.- Paper de la Fru-2,6-P₂ en la contracció del múscul esquelètic

3.4.- Estudi de la regulació de la isoforma muscular de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en temps llargs d'estimulació i durant el descans.

3.1.- Patró d'expressió dels diferents gens que codifiquen per PFK-2/FBPasa-2 en el transcurs del desenvolupament del teixit muscular esquelètic i cardíac.

3.1.1.- Introducció

L'origen prenatal del teixit muscular es remunta als mioblasts que constitueixen la capa mesodèrmica de l'embrió. La formació d'aquests mioblast és el resultat de la divisió mitòtica i posterior diferenciació de les cèl·lules mare pluripotencials (*stem cells*). Les cèl·lules filles resultants de la divisió mitòtica poden iniciar el camí de la diferenciació o bé tornar a produir un nou cicle de divisió cel·lular (Swatland, 1994). El nombre de divisions que realitzi la *stem cell* podria ser molt important en la formació de la fibra muscular, quantes més divisions es donin, més mioblasts podran seguir en el camí que dur a la formació del múscul (miogènesi) (Campion i col. 1979; Swatland, 1994). Aquests mioblasts es fusionen per constituir els miotubs, que són cèl·lules allargades plurinucleades que acabaran constituïnt les miofibril·les.

L'especificació, la proliferació i la diferenciació terminal de les cèl·lules del múscul esquelètic són controlades per una sèrie de combinacions d'activitats d'alguns factors de transcripció, tots ells presenten un domini característic basic-hèlix-gir-hèlix (bHLH); MyoD, Myf5, miogenina i les proteïnes Mrf4. Aquestes proteïnes interaccionen amb unes altres proteïnes bHLH-E, el resultat són els heterodímers miogènics bHLH-E capaços d'unir-se a determinades regions del DNA (E-box) presents en promotors i potenciadors de gens musculars.

La presència d'uns altres factors de transcripció membres de les famílies MEF2 i SRF, permet la co-regulació de la transcripció gènica en múscul.

En mamífers, Myf5 i Mrf4 s'expressen en el desenvolupament embrionari de manera transitòria, activant la transcripció de MyoD1 i miogenina. La miogenina només apareix en mioblasts fusionats i s'encarrega d'iniciar la construcció de la maquinària contràctil. La seva expressió es constitutiva i imprescindible.

En el desenvolupament del múscul s'ha observat una transició de isoformes de MHC, la qual es troba present en tots els tipus de fibres musculars. En el fetus s'expressa una isoforma embrionària, que més tard és substituïda gradualment per la isoforma neonatal. Finalment, l'estímul que rep la fibra muscular acaba definint el tipus adult predominant; I, II_A, II_X o II_D, II_B (Serrano i col. 2000).

En la diferenciació de les *stem cells* cap a cardiomiòcits (revisat per Boheler i col. 2002a), s'activa l'expressió de gens característics de la musculatura estriada cardíaca. En les primeres etapes apareixen els mRNA dels factors de transcripció GATA-4 i Nkx2.5, més endavant apareix l'mRNA del factor de transcripció ANT així com d'altres proteïnes α MHC, β MHC, MLC-2v, l'intercanviador de Na^+ - Ca^{2+} . L'aparició de les proteïnes sarcomèriques s'estableix seguint el següent ordre: la titina de la línia Z, a actinina, miomesina, titina de la banda M, MHC, α -actina, troponina T cardíaca i proteïna M (Boheler i Wobus, 2002b). Els cardiomiòcits presents en l'estadi fetal i prenatal expressen la troponina I característica dels músculs lents i una gran proporció de β MHC respecte α MHC (Westfall i col. 1996)

3.1.2.- Concentració de Fru-2,6-P₂ en diferents teixits de rata

Per tal de dur a terme aquest estudi s'han extret diversos teixits d'individus adults. Un cop pulveritzats els teixits i realitzats els extractes bàsics corresponents es mesura la concentració de Fru-2,6-P₂.

La concentració de Fru-2,6-P₂ depèn de l'estat de desenvolupament, del teixit, de les condicions nutricionals (Annex-1) i de l'exercici (3.4.2). En la figura 3.1.1 s'aprecia com en funció del teixit estudiat les concentracions de Fru-2,6-P₂ són diferents, aquest fet es deu bàsicament a la presència predominant d'una o altra isoforma de PFK-2/FBPasa-2.

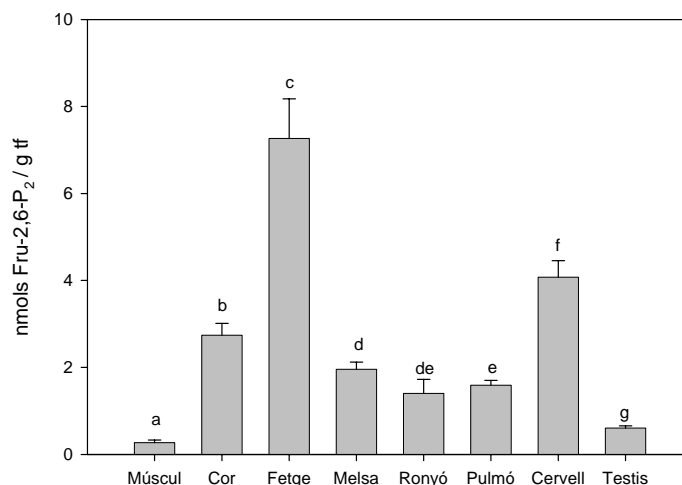


Figura 3.1.1: Contingut de Fructosa-2,6-P₂ en teixits de rata adulta. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

Centrant l'estudi en el múscul (múscul esquelètic) i el cor (múscul cardíac) s'aprecia com en l'estadi adult la presència d'aquest metabòlit difereix en funció del tipus de teixit muscular analitzat. A partir d'aquestes divergències es planteja l'estudi del metabòlit en el desenvolupament i creixement dels teixits musculars esquelètic i cardíac.

En el cor la concentració de Fru-2,6-P₂ presentada en la figura 3.1.2.A mostra com aquest metabòlit oscil·la durant el període pre i post part. S'observa un valor elevat de Fru-2,6-P₂ durant els estadis fetal (19 dies), neonat 10 dies i adult, mentre que als 2 i 5 dies la concentració és significativament inferior.

La concentració de Fru-2,6-P₂ en el múscul (figura 3.1.2.B) presenta uns valors elevats en l'estadi fetal (19 dies) disminuint fins a establir-se en un 25% als 2 dies de vida mantenint aquest nivell fins que l'individu és adult, moment en el qual la concentració d'aquest metabòlit és aproximadament un 10% del valor mesurat en fetus.

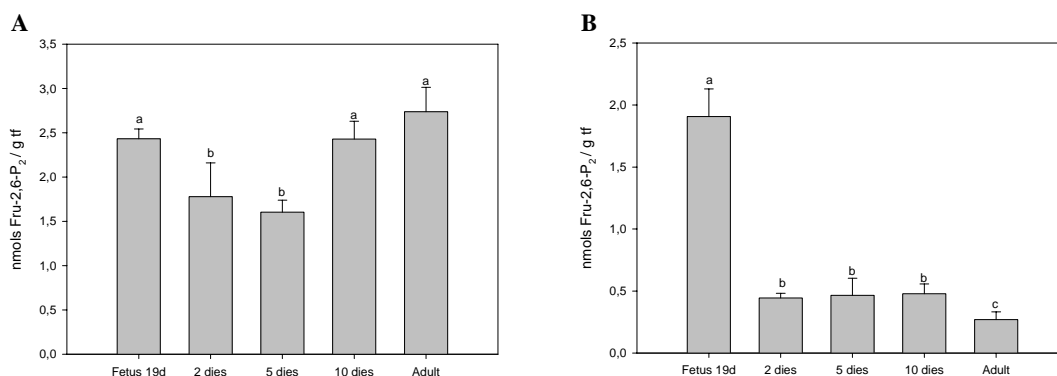


Figura 3.1.2: Contingut de Fru-2,6-P₂ en cor (A) i múscul esquelètic (B) de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta (p<0,05).

Els resultats obtinguts, coincidint amb altres resultats descrits, suggereixen que les variacions de les concentracions de Fru-2,6-P₂ al llarg del desenvolupament poden coincidir amb canvis del perfil isoenzimàtic PFK-2/FBPasa-2 del múscul esquelètic i del cor, per aquesta raó es planteja l'anàlisi de les diferents isoformes de PFK-2/FBPasa-2 durant desenvolupament i creixement del cor i del múscul esquelètic.

3.1.3.- Contingut dels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2

S'han avaluat els continguts de les diferents isoformes de PFK-2 en cor i múscul de rata en diferents estadis de desenvolupament, a partir dels extractes neutres de les diferents mostres analitzades i emprant la tècnica del *western-blot*, que ens permet detectar la presència i quantitat de les isoformes, muscular, hepàtica, cardíaca i ubíqua.

3.1.3.1.- Cor de rata

- **La isoforma muscular (m-PFK2)**

En cor de rata adulta s'expressa la isoforma muscular de l'enzim PFK-2. De fet la presència d'aquesta isoforma s'observa tal i com es presenta en la figura 3.1.3 durant tot el desenvolupament, des de l'estadi fetal fins a l'estadi adult. L'expressió d'aquesta forma isoenzimàtica és significativament menor en els estadis post-natals (2, 5 i 10 dies) en relació amb l'estadi adult.

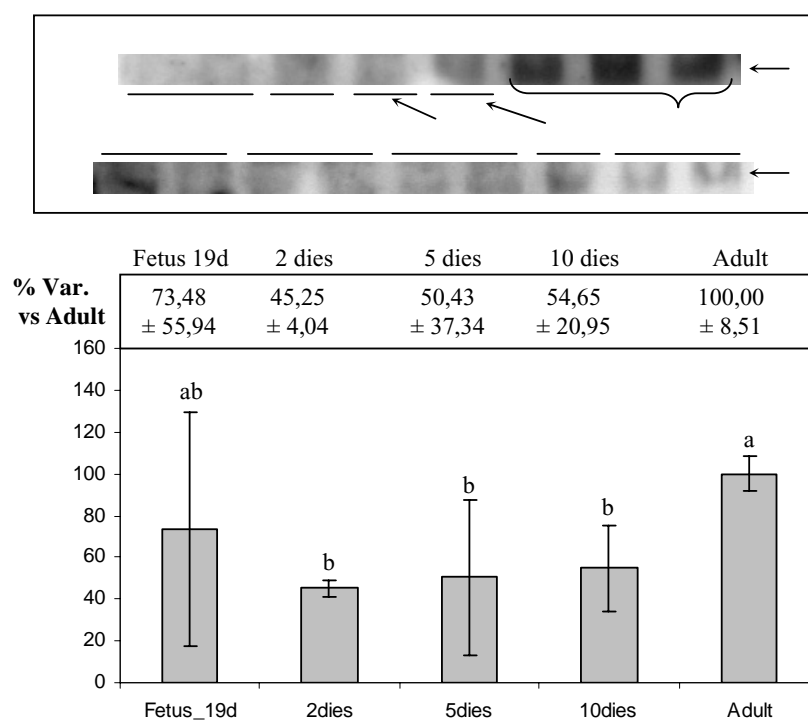


Figura 3.1.3: La isoforma m-PFK2, en cor de rata de diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **La isoforma hepàtica de PFK-2 (l-PFK2)**

Analitzant les membranes i les pel·lícules d'autoradiografia, ha estat impossible quantificar la presència de la isoforma hepàtica de l'enzim PFK-2 mitjançant la tècnica de *western blot*. Amb les eines emprades no s'ha detectat la presència d'aquesta isoforma.

- **La isoforma cardíaca de PFK-2 (h-PFK2)**

Si comparem la presència d'aquesta isoforma entre els diferents estadis i l'estadi adult s'observa que, en l'estadi fetal, i en les dies 2 i 5 els valors es mantenen entre el 10% i 20%, mentre que al desè dia s'observa un increment significatiu de l'expressió per assolir el 50% de l'expressió que presenta el cor d'un individu adult. Així doncs, la isoforma cardíaca presenta un increment considerable al llarg del desenvolupament.

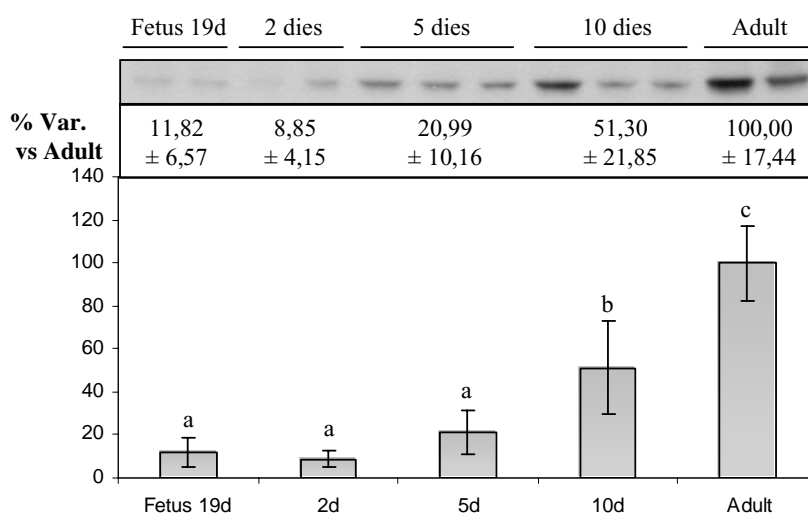


Figura 3.1.4: La isoforma h-PFK2 en cor de rata de diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups, establint la següent relació de significàncies. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **La isoforma ubíqua de PFK-2 (u-PFK2)**

La presència de la isoforma ubíqua de l'enzim PFK-2 és molt abundant en l'estadi fetal, reduint-se aproximadament fins al 20 % als 2 dies de vida. La reducció d'aquesta isoforma és gradual a partir d'aquest moment, arribant a valors inferiors al 2% en l'estadi adult.

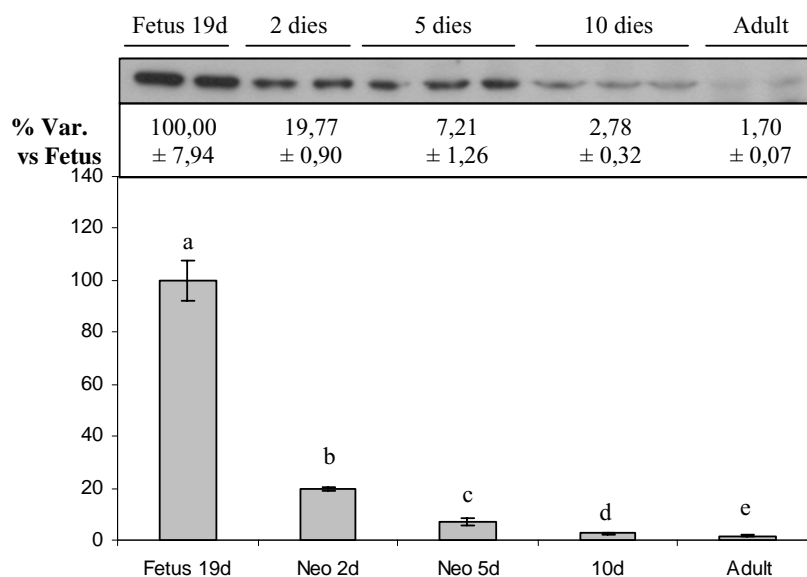


Figura 3.1.5: La isoforma u-PFK2 en cor de rata de diferents estadis de desenvolupament. Per tal de mostrar un film sense mostres sobreexposades s'han carregat les següents quantitats de proteïna als pous; 10 µg prot. (fetus), 20 µg prot. (2d) i 50 µg prot. (5d, 10d i adult). Tal i com s'ha fet en els altres estudis s'ha corregit la intensitat mesurada per la intensitat generada pels µg de proteïna carregats. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

Resum:

En el desenvolupament i creixement del cor de rata, les isoformes de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 segueixen patrons d'expressió diferents; la isoforma ubíqua molt abundant en l'estadi fetal disminueix la seva presència a mesura que l'individu va creixent, mentre les isoformes cardíaca i muscular presenten el seu màxim en l'estadi adult. No ha estat possible detectar la isoforma hepàtica.

3.1.3.2.- Múscul esquelètic de rata

- **La isoforma muscular (m-PFK2)**

L'expressió de la isoforma muscular de l'enzim PFK-2 en múscul de fetus i de neonats de 2 i 5 dies és inferior al 4% respecte la seva presència en múscul adults. Es podria dir que a al voltant del dia 10 de vida s'inicia l'expressió d'aquesta isoforma.

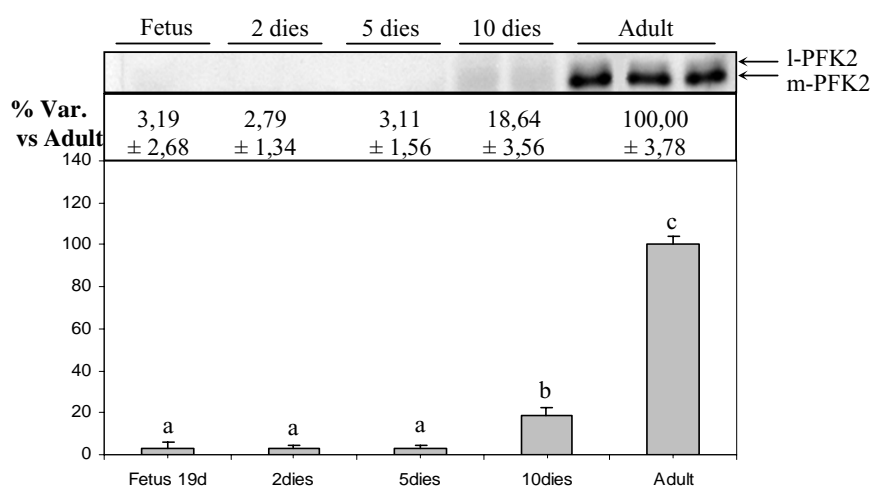


Figura 3.1.6: La isoforma m-PFKF2 en múscul de rata de diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **La isoforma hepàtica (l-PFK2)**

Per a la detecció d'aquesta isoforma s'utilitza el mateix anticòs que per a l'isoforma muscular, la qual cosa ens permet observar que el seu patró d'expressió és similar. Fins que l'individu no és adult no s'aprecia amb claredat (Figura 3.1.7). A més, es pot fer una comparació entre les isoformes muscular i hepàtica, s'observa que la presència de la isoforma hepàtica en el múscul esquelètic és molt inferior a la isoforma muscular. A l'estadi adult, la isoforma hepàtica representa un 10 % de la detecció conjunta.

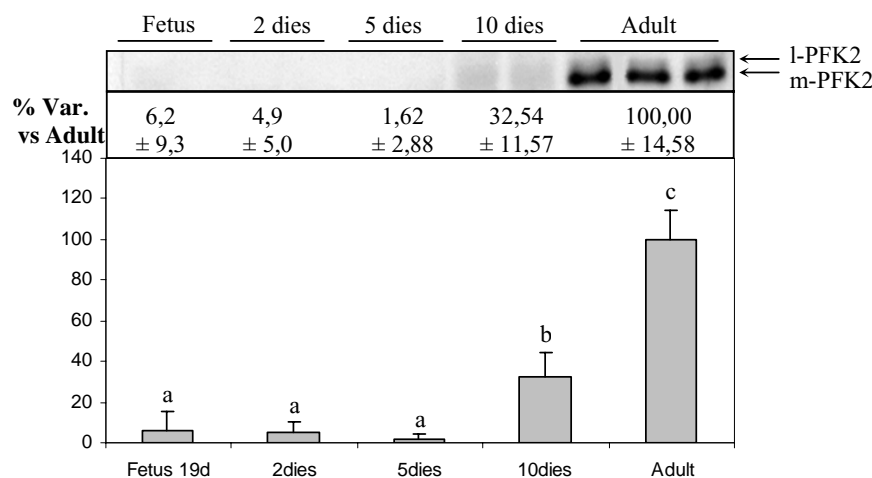


Figura 3.1.7: La isoforma l-PFKF2 en múscul de rata de diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **La isoforma cardíaca de PFK-2**

La presència de la isoforma cardíaca es pot observar en la figura 3.1.8, s'aprecia una banda visible des de l'estadi fetal fins a l'individu adult. En les primeres etapes, s'assoleix del 10% a 15%, i no és fins al desè dia en què s'incrementa la seva presència fins aproximadament al 30 % de la presència en l'estadi adult.

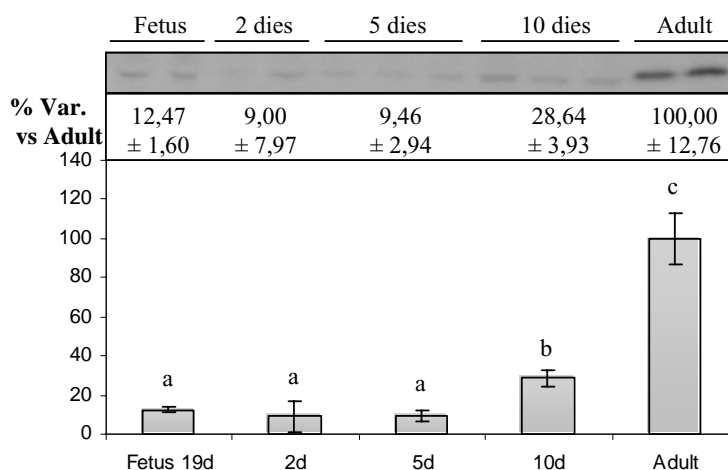


Figura 3.1.8: La isoforma h-PFKF2 en múscul de rata de diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

• **La isoforma ubiqua de PFK-2**

Analitzant la presència de la isoforma ubiqua en múscul esquelètic, es detecta una major quantitat d'isoforma en l'estadi fetal, per posteriorment anar disminuint fins a l'estadi adult, on només queda el 30 % de la isoforma present en l'estadi fetal. Tot i que el resultat dels 10 dies mostra un augment, aquest no és significatiu.

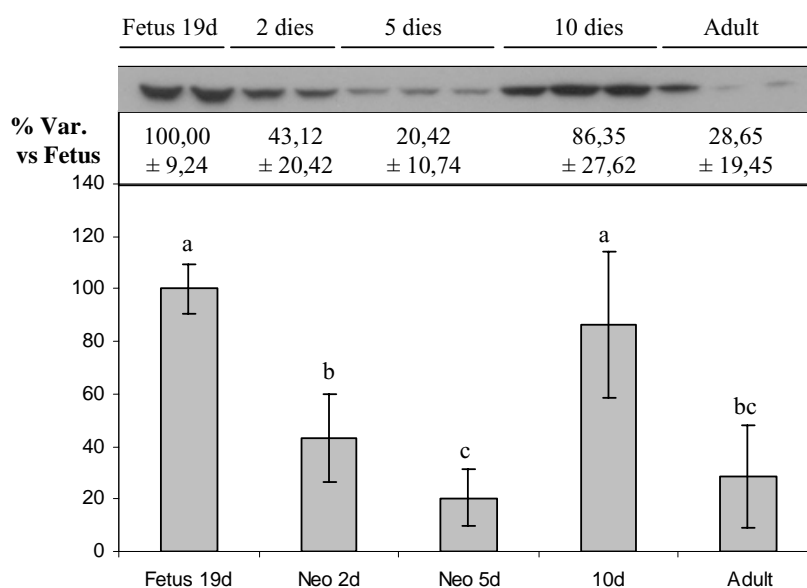


Figura 3.1.9 : La isoforma u-PFKF2 en múscul de rata de diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

Resum:

En el desenvolupament i creixement del múscul de rata, les isoformes muscular, hepàtica i cardíaca de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 presenten el seva màxima expressió en l'individu adult, mentre que l'expressió de la isoforma ubiqua disminueix en l'adult respecte l'estadi fetal.

3.1.4. Expressió dels gens que codifiquen pels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2

3.1.4.1.- Cor de rata

- **Expressió del gen Pfkfb1**

En la introducció s'han presentat els gens i les isoformes que genera cadascun d'ells, tot i així cal tenir present que el gen Pfkfb1 genera 3 mRNA per un procés de *splicing* alternatiu, els quals codifiquen per 3 isoformes de PFK-2/FBPasa-2; fetal (F), muscular (M) i hepàtica (L). En aquest cas s'han dissenyat els primers i les sondes necessàries per detectar els mRNA de les formes muscular (Pfkfb1_M) i hepàtica (Pfkfb1_L). Les quals presenten una expressió diferencial.

En aquest teixit l'expressió de la isoforma muscular no presenta variacions significatives a mesura que l'individu creix (Figura 3.1.10). La isoforma hepàtica presenta un patró diferent (Figura 3.1.11), al néixer es produeix una disminució significativa de l'expressió que es manté fins a l'estadi adult on augmenta presentant valors intermedis que no difereixen significativament de la resta d'estadis.

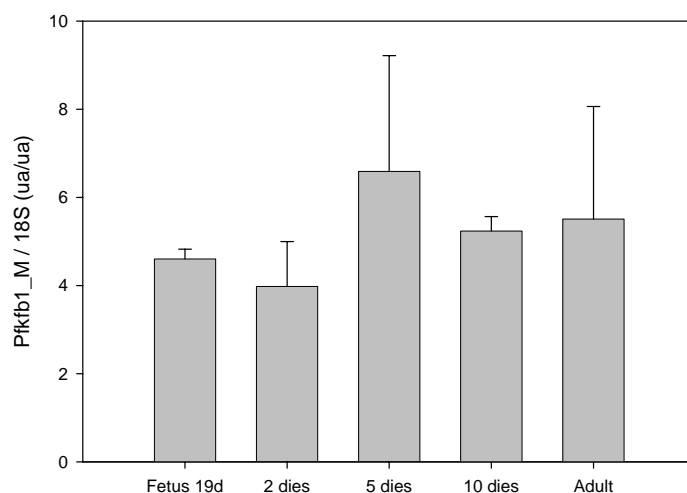


Figura 3.1.10: Expressió del gen Pfkfb1-M en cor de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

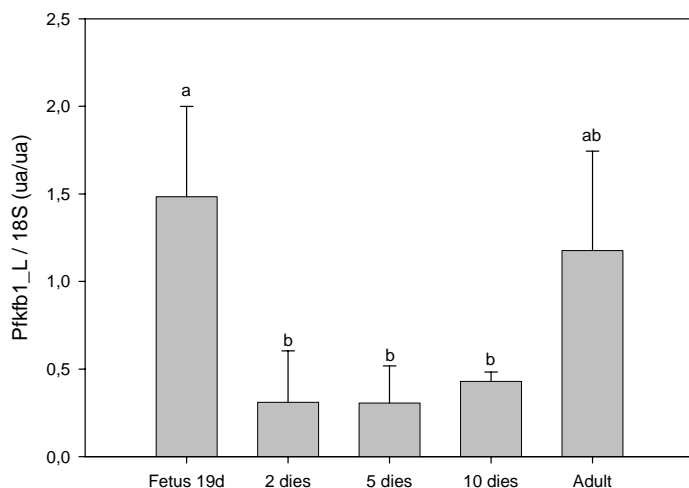


Figura 3.1.11: Expressió del gen Pfkfb1-L en cor de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **Expressió del gen Pfkfb2**

El gen Pfkfb2 codifica per la isoforma cardíaca (H) de PFK-2/FBPasa-2. Tal i com s'aprecia en la figura 3.1.12 es produeix una augment gradual d'expressió tot i que només presenten diferències significatives els cors d'individus de 10 dies de vida i els que es troben en l'estadi adult.

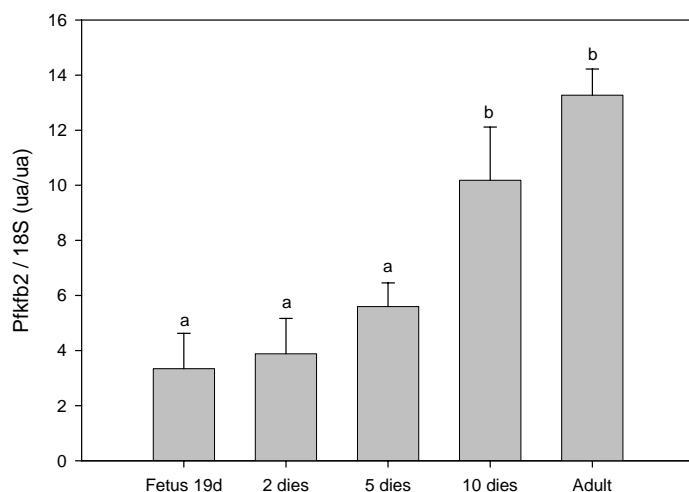


Figura 3.1.12: Expressió del gen Pfkfb2 en cor de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **Expressió del gen Pfkfb3**

El gen Pfkfb3 codifica per la isoforma ubíqua (U) i la cerebral (B) de PFK-2/FBPasa-2. En la bibliografia es descriu un procés de *splicing* alternatiu que genera 8 isoformes d'aquesta proteïna. Amb l'assay-on-demand adquirit amb Applied Biosystems només es poden detectar 2 dels 8 mRNA que s'originen a partir d'aquest gen (Figura 3.1.13A). Així doncs, es va analitzar el gen emprant el kit de la casa comercial i amb els primers i la sonda que s'han dissenyat emprant una regió comú a totes les isoformes del gen i diferent de la resta de gens (Figura 3.1.13B). En cap dels casos s'aprecien diferències significatives en l'expressió d'aquest gen entre els estadis estudiats. Analitzant amb més detall la figura 3.1.13A s'observa una tendència, s'aprecia una disminució gradual de l'expressió tot i que no és significativa.

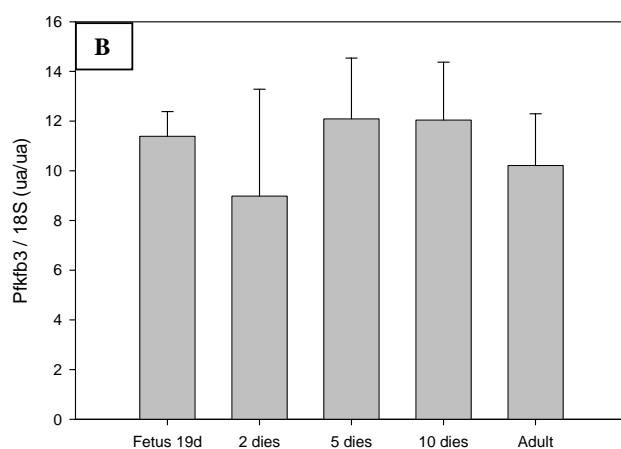
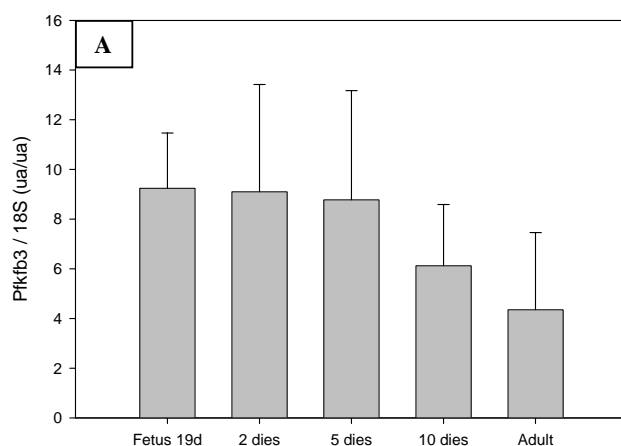


Figura 3.1.13: Expressió del gen Pfkfb3 en cor de rata a diferents estadis de desenvolupament. Assay-on-demand (A) i Total (B). Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

• **Expressió del gen Pfkfb4**

El gen Pfkfb4 codifica per la isoforma de testicle (T) PFK-2/FBPasa-2. En la figura 3.1.14 s'aprecia una nivell d'expressió constant al llarg de tot el desenvolupament del cor, la única diferència significativa es presenta entre el cor de 5 dies de vida i el de l'individu adult.

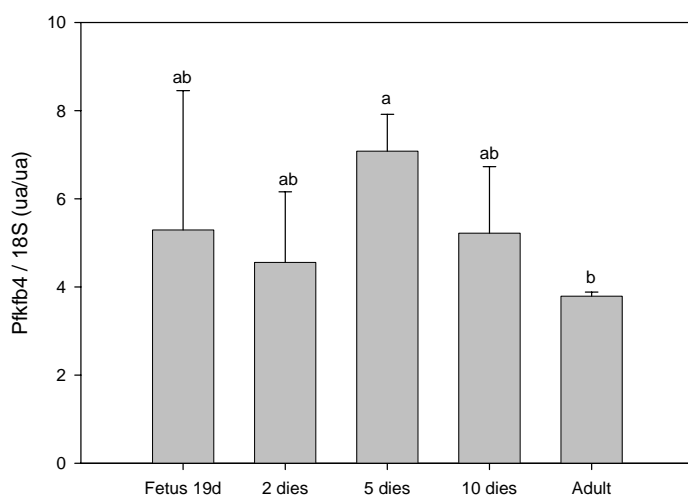


Figura 3.1.14: Expressió del gen Pfkfb4 en cor de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

Resum: En cor de rata el patró d'expressió dels gens Pfkfb1_M, Pfkfb3_Total i Pfkfb4 no es modifica en el desenvolupament i creixement del teixit. Analitzant l'assaig amb el gen Pfkfb3, s'aprecia una tendència a la baixa des del moment en que neix, tot i que aquesta disminució no és significativa. L'expressió del gen Pfkfb2 augmenta progressivament a mesura que el cor creix.

3.1.4.2.- Múscul esquelètic de rata

- Expressió del gen **Pfkfb1**

En el múscul esquelètic s'aprecia el mateix patró d'expressió pels gens Pfkfb1-M i Pfkfb1_L, concretament el nivell d'expressió és molt baix fins al desè dia de vida, entre aquest estadi i l'adult es produeix un augment d'expressió que suposa un increment entre 15-20 vegades respecte la situació fetal en ambdós casos (Figures 3.1.15/16).

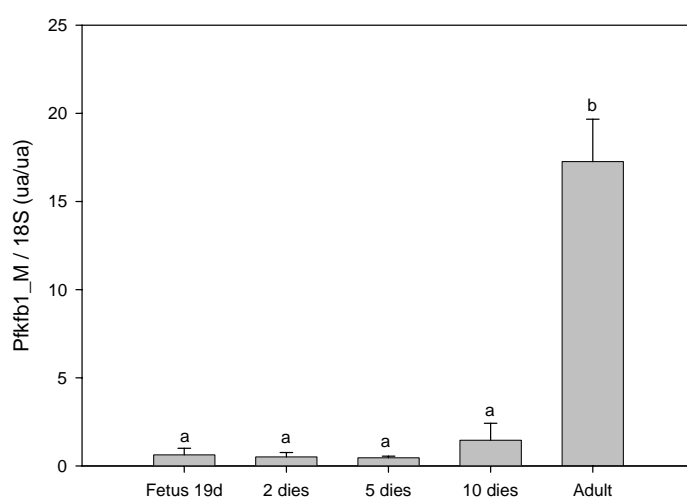


Figura 3.1.15: Expressió del gen Pfkfb1-M en múscul de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

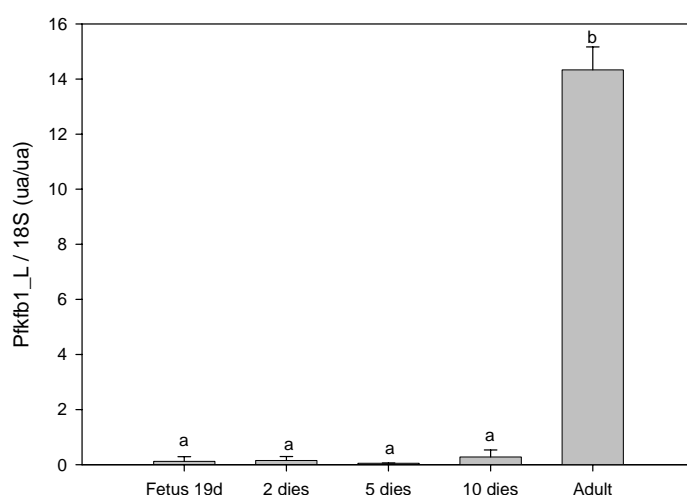


Figura 3.1.16: Expressió del gen Pfkfb1-L en múscul de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

• **Expressió del gen Pfkfb2**

L'expressió del gen Pfkfb2 es manté constant durant tots els estadis analitzats. La única diferència s'aprecia entre els músculs de 5 dies i els adults.

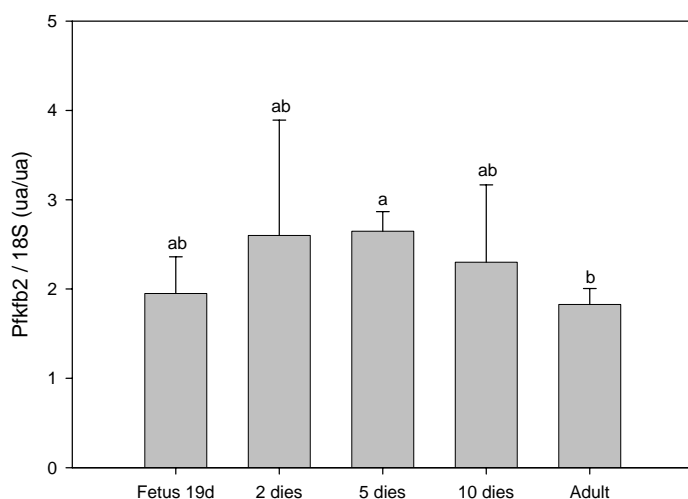


Figura 3.1.17: Expressió del gen Pfkfb2 en múscul de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

• **Expressió del gen Pfkfb3**

La valoració d'algunes isoformes generades pel gen Pfkfb3 (3.1.18A), així com l'assaig per detectar l'expressió de tots els mRNA que s'originen d'aquest gen (3.1.18B), proporcionen el mateix patró d'expressió. S'observa una expressió molt reduïda i constant del gen fins als 10 dies, en l'individu adult l'expressió augmenta fins a 7 vegades.

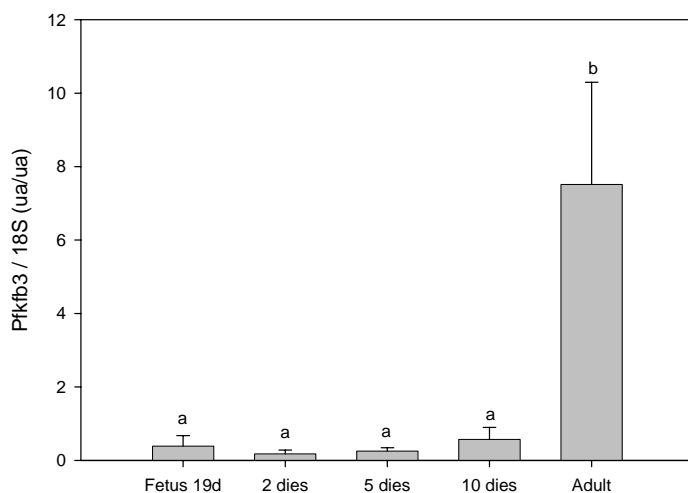


Figura 3.1.18A: Expressió del gen Pfkfb3 en múscul de rata a diferents estadis de desenvolupament. Assay-on-demand (A). Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

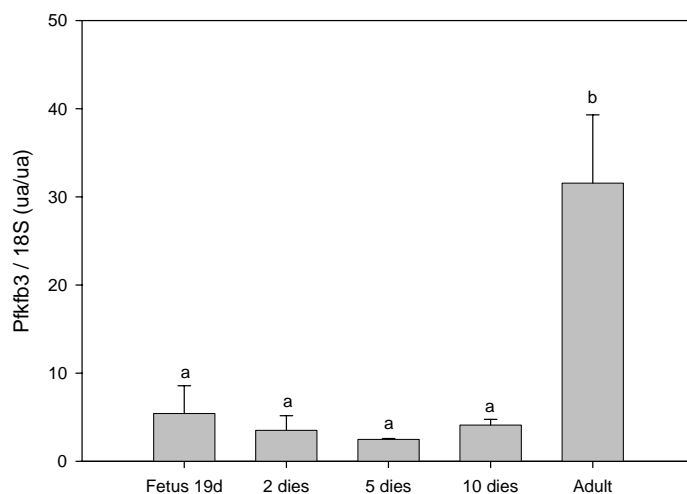


Figura 3.1.18B: Expressió del gen Pfkfb3 total en múscul de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **Expressió del gen Pfkfb4**

L'estudi d'expressió del gen Pfkfb4 presenta una tendència poc marcada, per les grans dispersions d'aquest assaig. Analitzant les mitjanes s'observa com l'expressió és molt baixa fins al desè dia, duplicant o fins i tot triplicant aquest valor en l'estadi adult.

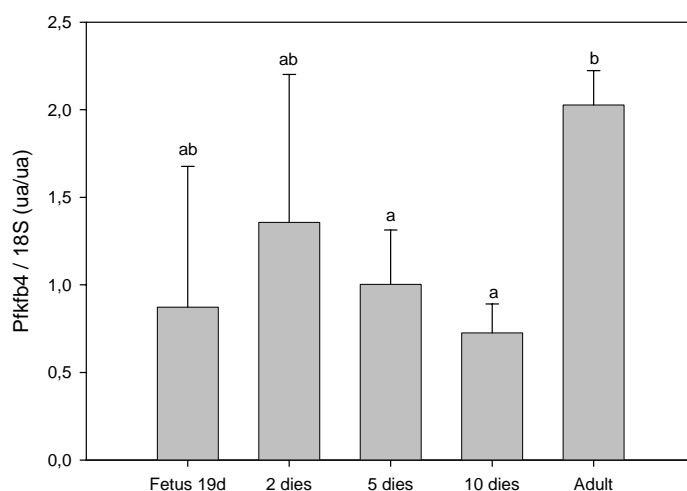


Figura 3.1.19: Expressió del gen Pfkfb4 en múscul de rata a diferents estadis de desenvolupament. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

RESULTATS

Resum cor: En cor de rata el patró d'expressió dels gens Pfkfb1_M, Pfkfb3_Total i Pfkfb4 no es modifica en el desenvolupament i creixement del teixit. Analitzant l'assaig amb el gen Pfkfb3, s'aprecia una tendència a la baixa des del moment en que neix, tot i que aquesta disminució no és significativa. L'expressió del gen Pfkfb2 augmenta progressivament a mesura que el cor creix.

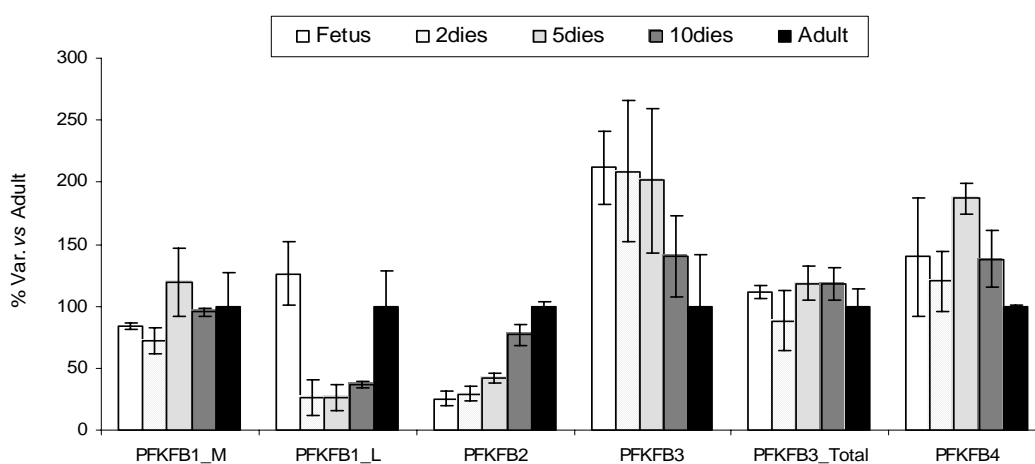


Figura 3.1.20: % variació de l'expressió dels diferents gens respecte l'expressió en l'estadi adult. Es presenta de manera independent l'expressió dels diferents gens en els diferents estadis de desenvolupament.

Resum múscul: En múscul de rata el patró d'expressió del gen Pfkfb2, tot i oscil·lar, no varia significativament. L'expressió del gen Pfkfb4 presenta una tendència ascendent en l'estadi adult, tot i que no és significativament diferent de l'estadi fetal. Els gens Pfkfb1 (M i L), Pfkfb3 (parcial i total) presenten un augment dràstic en la seva expressió en l'estadi adult (Figura 3.1.21).

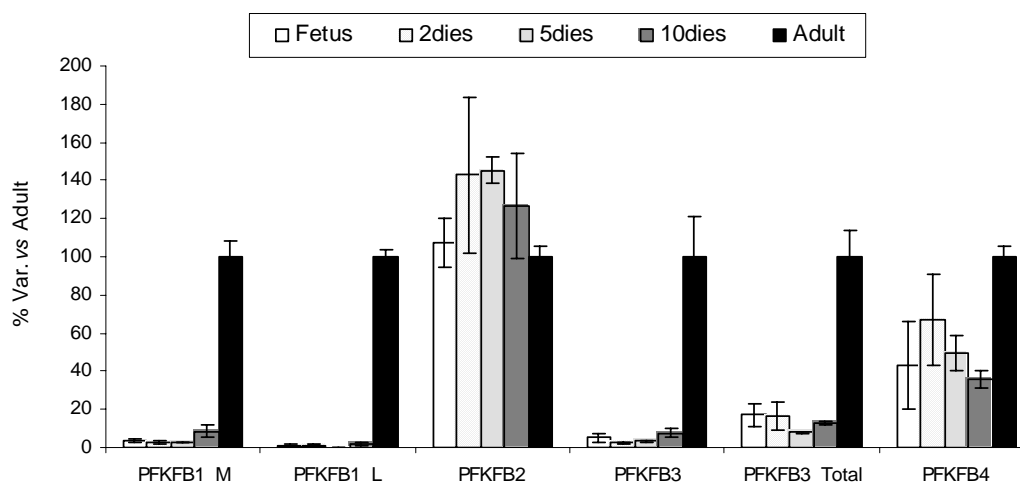


Figura 3.1.21: % variació de l'expressió dels diferents gens respecte l'expressió en l'estadi adult. Es presenta de manera independent l'expressió dels diferents gens en els diferents estadis de desenvolupament.

3.1.5 Discussió

Kasten i col. (1993), amb un estudi que englobava l'estadi neonatal i l'envelliment, van postular que el contingut de Fru-2,6-P₂ varia en funció del teixit i de l'estat de desenvolupament o creixement dels diferents teixits. Els resultats presentats (figura 3.1.2) segueixen aquest postulat, en el múscul la Fru-2,6-P₂ disminueix dràsticament en el moment de néixer i es manté en valors entre el 10% i 20% del contingut fetal fins a l'estadi adult. En el cor, la Fru-2,6-P₂ presenta una davallada del 15% en el moment de néixer, que es manté fins al cinquè dia, i posteriorment recupera els valors de l'estadi fetal.

Així doncs en el moment de néixer el contingut de Fru-2,6-P₂ canvia tan en el cor com en el múscul, aquesta modificació podria anar associada a la modificació de la demanda energètica que experimenten ambdós teixits, per tal d'obtenir l'energia necessària perquè es desenvolupi la nova activitat contràctil. El cor haurà de mantenir en solitari la circulació

sanguínia, fins al moment de néixer aquesta activitat la compartia amb el cor de la mare. El múscul, per la seva banda, haurà de dur a terme diverses funcions, sostenir el cos de l'individu i permetre la seva mobilitat. A aquests teixits neonatals encara els caldrà cert temps perquè adquireixin les característiques pròpies del teixit adult, cal que s'adaptin a la nova càrrega de treball.

En aquest procés d'adquisició de noves característiques, en el múscul hi juga un paper molt important la formació de la placa motora, s'ha observat com la inervació del múscul és clau en el manteniment de la diferenciació cel·lular, concretament emprant protocols de denervació s'ha vist com els músculs retornaven a un estadi desdiferenciat similar a l'estadi fetal (Cadefau i col. 1999).

Tres dies després de néixer el múscul comença a diferenciar-se en tipus de fibres ràpides o lentes, com a conseqüència de la inervació expressant-se formes enzimàtiques característiques de cadascuna d'elles, com per exemple la MM de la creatina quinasa (CK) i la fosfoglicerat mutasa (PGM) (Andrés i col. 1989)

El desenvolupament és doncs un període amb molts canvis que sobretot s'evidencien si es comparen estadis fetals i neonatals, l'existència d'isoformes específiques per cada estadi o la modificació de la relació d'expressió d'isoformes del mateix enzim són les principals maneres de regular les diferents vies metabòliques.

En aquest sentit s'ha observat un augment de l'activitat PFK-1 durant el desenvolupament, tan del múscul (Dunaway and col. 1986a) com del cor (Dunaway and col. 1986b), aquest augment s'associa a l'increment de l'expressió de la subunitat M de l'enzim. Aquesta subunitat presenta una menor inhibició per ATP i un increment de l'afinitat per la Fru-6-P, la Fru-2,6-P₂ i l'AMP (Dunaway i Kasten, 1989). Així doncs, petites quantitats de Fru-2,6-P₂ en el cor i el múscul són efectives en la regulació de l'activitat PFK-1 per l'elevat percentatge que representa la subunitat M, en el contingut total de PFK-1 en aquests teixits.

Durant el desenvolupament es produeix una transició de isoformes de la cadena pesada de la miosina (MHC), la qual es troba present en tots els tipus de fibres musculars. En el fetus s'expressa una isoforma embrionària, que més tard serà substituïda gradualment per la isoforma neonatal. Aquesta serà reemplaçada per la isoforma adulta quan l'estímul que rebí la fibra muscular ho determini, és precisament aquest estímul el que acabarà definint el tipus predominant; I, II_A, II_X o II_D, II_B (Serrano i col. 2000).

Segons Santalucia i col. (1992), l'abundància relativa de GLUT1-GLUT4 en el múscul depèn de l'estadi de desenvolupament i de la composició de fibres. En l'estadi fetal de múscul de rata s'expressa GLUT1 com a transportador de glucosa predominant, la qual és fortament reprimida en el naixement i durant els primers dies de vida com a conseqüència de les alteracions que es produeixen en un pas previ a la traducció (Wang i Hu, 1991; Santalucia i col. 1992). En canvi, GLUT4 en l'estadi fetal presenta molt baixa expressió però en el moment de néixer es produeix una contínua inducció de l'expressió (Wang i Hu, 1991; Santalucia 1992; Castelló 1994)

Les canvis en el contingut de Fru-2,6-P₂ podrien anar associats a variacions en les relacions de les activitats quinasa i bisfosfatasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, o bé a la modificació del patró d'expressió de les diferents isoformes de l'enzim en el desenvolupament dels teixits. Es va optar per analitzar la segona opció perquè la isoforma muscular de l'enzim no s'expressa fins que el múscul està totalment diferenciat, fins i tot s'ha proposat aquesta isoforma com un indicador de maduresa muscular (Vandoolaeghe i col. 1999). Així doncs, qui és el responsable de la síntesi de Fru-2,6-P₂ en l'estadi fetal del múscul? Si el control de Fru-2,6-P₂ en el desenvolupament es pot donar per variacions en els nivells d'expressió de les isoformes en múscul, perquè no ho hauria de ser també en el cor?

Analitzant l'expressió gènica (figures 3.1.10-14) i proteica (3.1.3-5) de les isoformes de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en cor, no s'aprecien modificacions en els gens Pfkfb1_M i Pfkfb4 (testicle) fet que es reflexa en l'expressió proteica de la isoforma de múscul. Analitzant l'assaig amb el gen Pfkfb3 i Pfkfb3_Total (cervell/placenta), s'aprecia una tendència a la baixa des del moment en que neix, en el primer dels dos assaigs, encara que

aquesta disminució no sigui significativa, el contingut proteic d'isoforma ubíqua disminueix a mesura que l'individu va desenvolupant-se. L'expressió del gen *Pfkfb2* així com la presència de la isoforma cardíaca de PFK-2/FBPasa-2 augmenten progressivament a mesura que el cor creix.

Així doncs, podria dir-se que la Fru-2,6-P₂ observada en l'estadi fetal és sintetitzada bàsicament per la isoforma ubíqua, la disminució de la seva presència al durant el desenvolupament provoca la davallada del contingut del metabòlit, però als 10 dies la síntesi de la isoforma de cor podria compensar la pèrdua de la isoforma ubíqua, augmentant el contingut de Fru-2,6-P₂. Cal recordar que en l'estadi adult el cor presenta una isoforma pròpia que s'encarrega de la regulació dels nivells d'aquest metabòlit.

En l'estadi fetal del múscul es presenta una elevada concentració de Fru-2,6-P₂ i la única isoforma de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 que podria explicar aquests nivells és la isoforma ubíqua present de manera abundant en l'estadi fetal (figura 3.1.9), la resta d'isoformes no es detecten o la seva presència és mínima. La disminució dràstica en el contingut de Fru-2,6-P₂ després del naixement, podria ser deguda a la disminució del 50% del contingut de isoforma ubíqua. A partir dels 10 dies hi ha una lleu aparició de la isoforma muscular, hepàtica i cardíaca, però no és fins a l'estadi adult on realment s'observa la isoforma pròpia del teixit, precisament en aquest estadi, es presenta el contingut de Fru-2,6-P₂ més baix, fruit de la relació entre les activitats quinasa i bisfosfatasa de la isoforma.

L'expressió gènica de les isoformes muscular, hepàtica i cardíaca de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 correlaciona amb la l'anàlisi proteic, però la detecció de la isoforma ubíqua no. De fet els patrons d'expressió no tenen res a veure, el proteic presenta un descens gradual fins a l'estadi adult, amb una petita oscil·lació als 10 dies, mentre el mRNA en l'estadi adult és 7 vegades més abundant que en la resta.

Una explicació a aquest fet seria que la forma ubíqua necessités una expressió més elevada que les altres isoformes degut a una vida mitja més petita que les altres isoformes. Segons descriuen Riera i col. (2003), els quals van realitzar un experiment de diferenciació

miogènica en cèl·lules C2C12, i van observar com en aquest procés, la Fru-2,6-P₂ present en les cèl·lules anava disminuint, així com el contingut de la isoforma ubiqua, tan a nivell de missatger com de proteïna. La degradació de la proteïna es dur a terme a través de la via proteolítica del ubiquitina-proteasoma. A mesura que es produeix la diferenciació es redueix la vida mitja de la isoforma ubiqua passa de 10h a 6h

3.1.6 Conclusions

- 1.- La concentració de Fru-2,6-P₂ depèn del teixit i de l'estadi de desenvolupament.
- 2.- L'expressió gènica i proteica de les diferents isoformes de PFK-2/FBPasa-2 en cor es correlacionen, observant-se una substitució d'isoformes en aquest teixit, en l'estadi fetal actua la isoforma ubiqua i en l'estadi adult hi trobem la isoforma del propi teixit. Aquest canvi d'isoforma podria explicar el patró d'oscil·lació observat en la concentració de Fru-2,6-P₂.
- 3.- En el múscul l'expressió gènica i proteica de les isoformes muscular, hepàtica, cardíaca correlacionen, però la isoforma ubiqua no, a nivell gènic l'expressió es produeix bàsicament en l'estadi adult, però a nivell proteic, observem la seva presència sobretot en l'estadi fetal.
- 4.- El senyal d'inici d'expressió per a la isoforma muscular de PFK-2/FBPasa-2 no correspon a l'inici de la inervació, la qual es dona al voltant dels 3 dies de vida.

3.2.- Diferències entre un múscul de contracció ràpida (TA) i un múscul de contracció lenta (Soleus).

3.2.1.- Introducció

Els músculs esquelètic, tal i com s'ha comentat, són teixits heterogenis constituïts per fibres musculars, las quals poden ser de diferents tipus, la proporció entre aquestes diferents fibres acaba definint el comportament del múscul. La fibra majoritària confereix al múscul les seves característiques, però aquestes poden adaptar-se a condicions canviant per la presència dels altres tipus de fibres en el mateix múscul (Pette i Staron, 1988).

En determinades circumstàncies s'han detectat canvis morfològics i bioquímics en les fibres musculars, fet que pot donar-se per un increments en els percentatges d'alguna fibra o bé a l'adaptació de la pròpia fibra per tenir una millor resposta a les noves exigències. Aquests canvis s'aprecien en el cas de l'adaptació que experimenten els atletes en entrenaments de resistència (Gollnick i col.1972; Tesch i Karlsson 1985) o de potenciació de la velocitat (Cadefau i col. 1990), aquests canvis també ha estat observat en cavalls (Serrano i col. 2000) o altres models animals, com per exemple electroestimulació (Pette i col. 1972,1973). La inactivitat dels músculs també provoca una transició de fibres (Green i col. 1983, 1984).

El múscul *tibialis anterior* (TA), presenta aproximadament un 95% de fibres de contracció ràpida o de tipus II, en TA de conill s'ha detectat 50% corresponen a II_B (Aigner i col, 1993; Hämmäläinen i Pette, 1993), el 45% de fibres II_A i el 5% restant correspondria a fibres del tipus I (Leberer i Pette, 1984, 1986). En múscul *soleus*, exponent dels músculs de contracció lenta, presenta bàsicament fibres de tipus I, amb una proporció ínfima de fibres II_A.

En la bibliografia apareixen nombrosos articles per caracteritzar el contingut i composició dels músculs ràpids i lents, però en cap d'ells s'analitzen les isoformes de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, així doncs aquest estudi pretén analitzar l'expressió de les diferents isoformes d'aquests enzim en els dos tipus de músculs.

3.2.2.- Concentració de Fru-2,6-P₂

La concentració de Fru-2,6-P₂ depèn del teixit i del seu metabolisme, tal i com ja s'ha mostrat en la figura 3.1.1 dins l'estudi realitzat en diferents teixits de rata. En aquest cas s'analitza la concentració d'aquest metabòlit en dos teixits musculars, que es diferencien per la seva composició de fibres. Tal i com s'aprecia en la figura 3.2.1 la concentració de Fru-2,6-P₂ del múscul *soleus* representa un 30% de la concentració d'aquest metabòlit en el múscul *TA*.

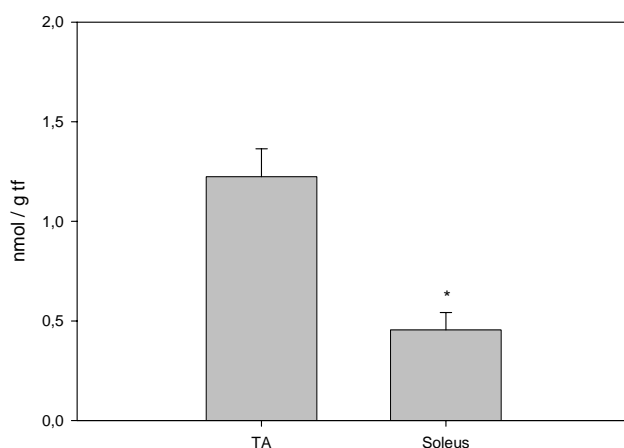


Figura 3.2.1: Concentració de Fru-2,6-P₂ en músculs TA i Soleus de conill. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades. *Significativament diferent de TA (p<0,05).

3.2.3.- Activitat PFK-2

La valoració de l'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 requereix una gran quantitat de mostra per aquest motiu només s'ha avaluat en teixits d'individus adults. Tal i com es mostra en la figura 3.2.2, la determinació de l'activitat PFK-2 en els músculs *soleus* presenta un valor inferior al mesurat en músculs *TA*. És aproximadament un 30% - 40% menor, però aquesta diferència no és estadísticament significativa.

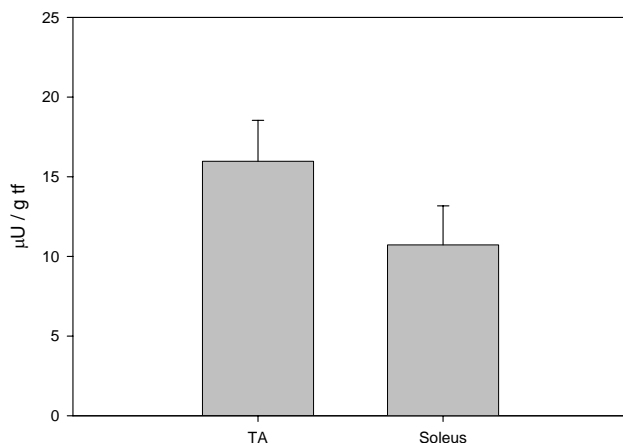


Figura 3.2.2: Activitat PFK-2 en músculs TA i Soleus de conill. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades. *Significativament diferent al TA (p<0,05).

3.2.4.- Contingut dels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2

- **La isoforma muscular (m-PFK2)**

L'expressió proteica de la isoforma muscular en *soleus* és significativament inferior a la presentada pels músculs TA, tal i com s'aprecia en la figura 3.2.3.

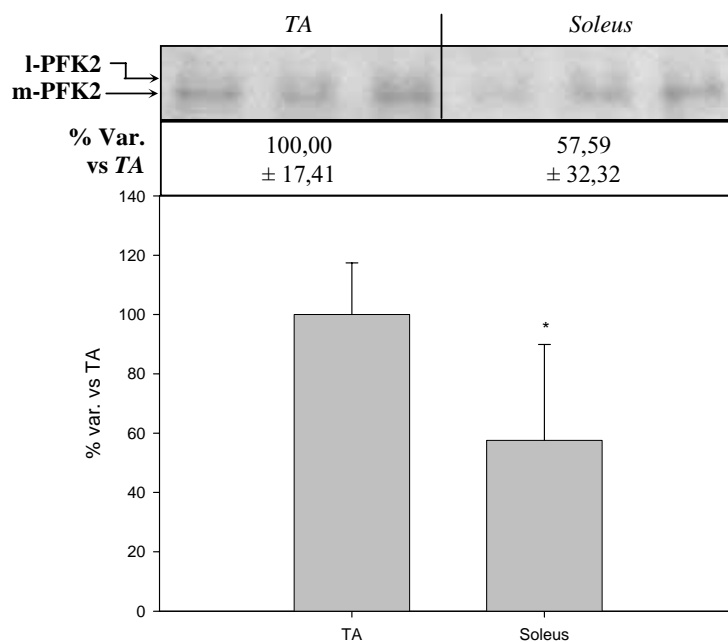


Figura 3.2.3: Percentatge de la isoforma m-PFK2, %variació respecte al múscul TA. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades entre els grups. Les diferències significatives es presenten com: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

- **La isoforma hepàtica (l-PFK2)**

La isoforma hepàtica de l'enzim PFK-2 s'expressa significativament menys en els músculs de contracció lenta (*soleus*) que en els músculs de contracció ràpida (TA), tal i com s'aprecia amb la figura que es presenta a continuació.

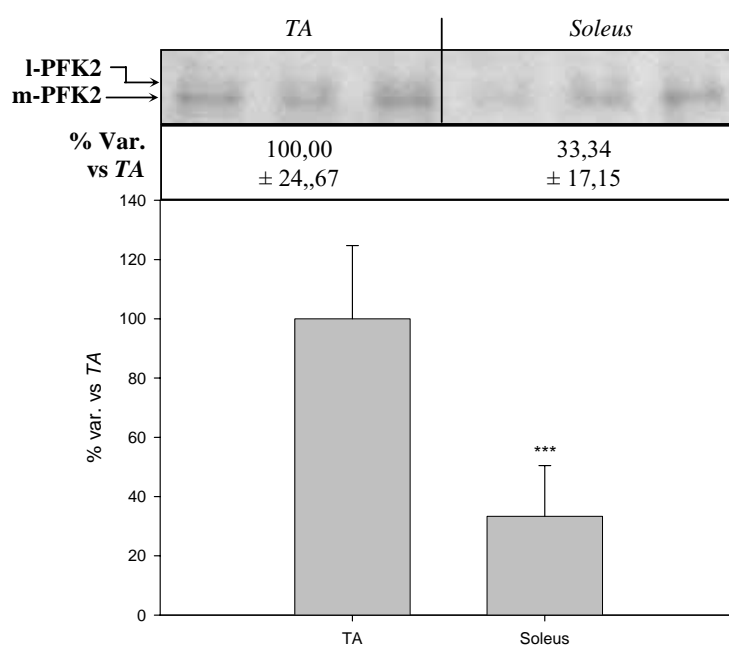


Figura 3.2.4: Percentatge de la isoforma l-PFK2, %variació respecte al múscul TA. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades entre els grups. Les diferències significatives es presenten com: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

- **La isoforma cardíaca (h-PFK2)**

L'expressió de la isoforma cardíaca de l'enzim PFK-2 es dona de la mateixa manera en músculs TA i *soleus*.

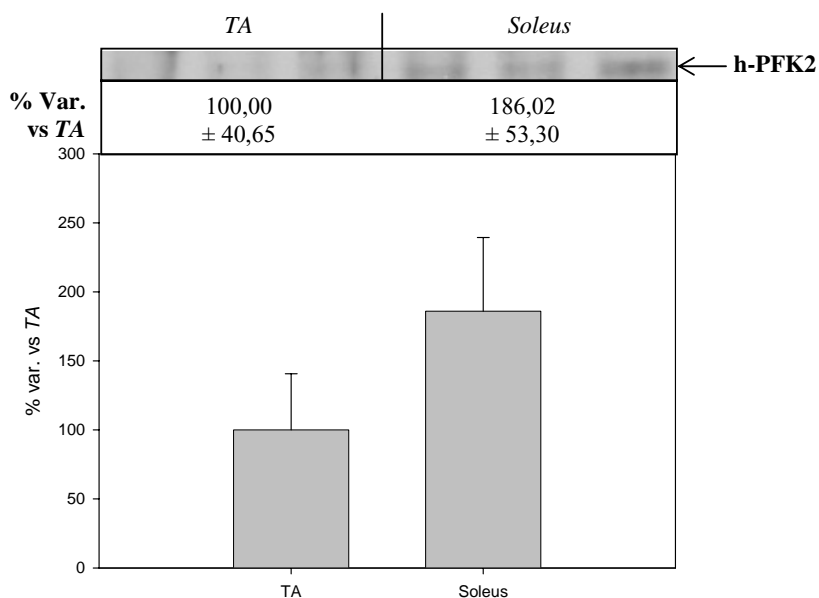


Figura 3.2.5: Percentatge de la isoforma h-PFK2, %variació respecte al múscul TA. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades entre els grups.

Resum: Els músculs de contracció lenta expressen menys isoforma muscular i hepàtica de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 que els músculs de contracció ràpida. En quan a la isoforma cardíaca, no s'observen diferències significatives tot i apreciar-se una tendència a l'alça.

3.2.5. Expressió dels gens que codifiquen pels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2

- Expressió del gen *Pfkfb1*

L'expressió del gen *Pfkfb1* en la seva isoforma muscular presenta un patró d'expressió diferent en funció del tipus muscular. Els músculs *soleus* només presenten un 15%-25% de l'expressió d'aquesta isoforma en els músculs de contracció ràpida (*TA*).

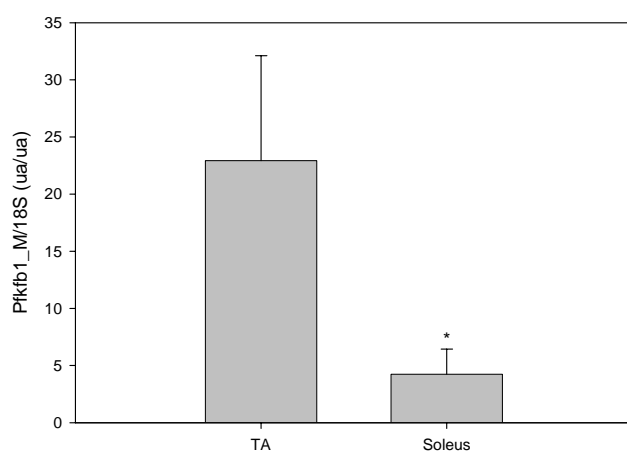


Figura 3.2.6: Expressió del gen *Pfkfb1-M* en músculs *TA* i *Soleus* de conill. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades. Les diferències significatives es presenten com: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

En l'estudi de l'expressió de la isoforma hepàtica del gen *Pfkfb1* s'observa una distribució similar a la que presentava la isoforma muscular, però en aquest cas, les diferències, en principi aparents, no són significatives, aquest fet és fruit de la gran dispersió de les dades obtingudes.

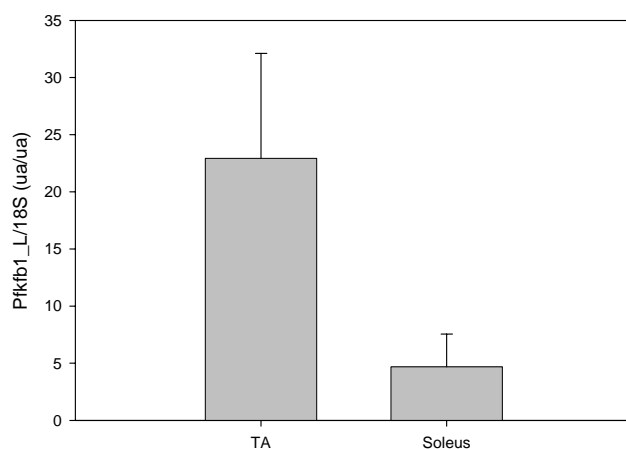


Figura 3.2.7: Expressió del gen *Pfkfb1-L* en músculs *TA* i *Soleus* de conill. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades.

- **Expressió del gen Pfkfb2**

El gen Pfkfb2 en *soleus* presenta una augment respecte a l'expressió que s'observa en els músculs TA, aquest augment no és estadísticament significatiu fruit de la gran dispersió en les dades obtingudes.

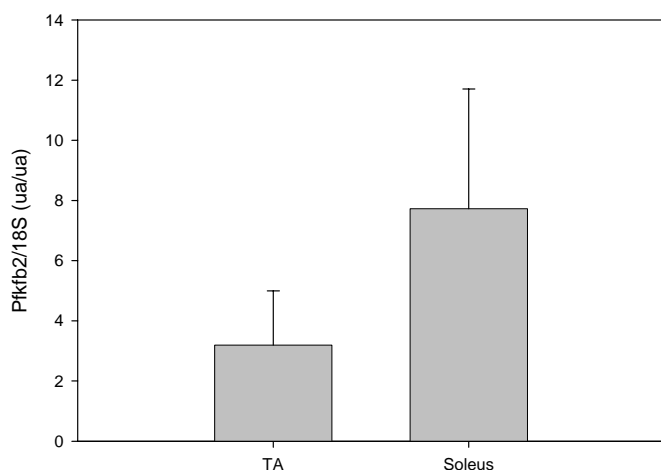


Figura 3.2.8: Expressió del gen Pfkfb2 en músculs TA i Soleus de conill. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades.

- **Expressió del gen Pfkfb3**

En els músculs *soleus* l'expressió del gen Pfkfb3, corresponent a algunes de les isoformes que poden obtenir-se per *splicing* alternatiu, és significativament menor a la que presenten els músculs TA.

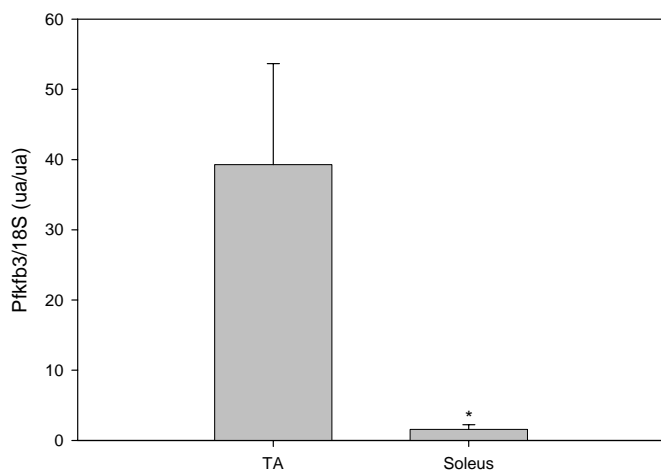


Figura 3.2.9: Expressió del gen Pfkfb3 en músculs TA i Soleus de conill. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta. Les diferències significatives es presenten com: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

- **Expressió del gen Pfkfb4**

L'expressió del gen Pfkfb4 no presenta diferències significatives quan comparem músculs de contracció ràpida (*TA*) amb músculs de contracció lenta (*soleus*).

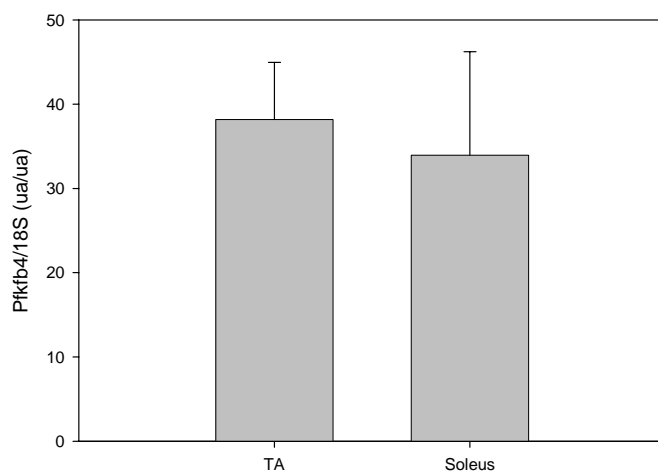


Figura 3.2.10: Expressió del gen Pfkfb4 en músculs TA i Soleus de conill. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm S.D., els grups presenten una $n = 3$ animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta.

3.2.6. Discussió

En aquest apartat s'han comparat dos músculs esquelètics, un eminentment de contracció ràpida (*TA*) i l'altre de contracció lenta, (*soleus*). Els músculs de contracció lenta presenten tot un seguit d'adaptacions que els permeten treballar amb un metabolisme més aeròbic, i per tan no depenen de la glucòlisi per obtenir l'energia necessària per dur a terme la seva funció.

El primer que observem en l'estudi és la reducció del contingut de Fru-2,6-P₂ en el *soleus*, aquesta circumstància hauria de ser esperable doncs aquest metabòlit és l'activador al·lostèric més potent de la PFK-1, l'enzim encarregat de regular el flux glucolític, quanta menys quantitat de Fru-2,6-P₂ presenti el múscul lent menys activa estarà la glucòlisi.

L'activitat quinasa de la PFK-2/FBPasa-2 presenta una tendència a la baixa en els músculs de contracció lenta, en altres estudis realitzats en rata en el nostre grup, Bassols i col. 1986, s'han observat diferències significatives entre els dos tipus de múscul, això podria indicar que en nombre d'animals emprats en l'assaig potser és escàs per la dispersió que genera aquesta tècnica.

L'estudi d'expressió de les isoformes de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, a nivell proteic i de mRNA, presenta molt bona correlació, la producció de mRNA en la transcripció i maduració no presenta pèrdues en el procés de traducció, doncs observem la mateixa relació entre la presència de cada isoforma en els dos tipus de múscul. La isoforma muscular, la hepàtica i la ubiqua presenten un nivell d'expressió superior en els músculs de contracció ràpida, mentre la isoforma cardíaca es més abundant en el *soleus*.

3.2.7. Conclusions

1.- El contingut de Fru-2,6-P2 dels músculs de contracció ràpida són més elevats com a conseqüència d'una major activitat de l'enzim PFK-2/FBPasa-2.

2.- El patró d'expressió de les isoformes muscular, hepàtica i ubíqua de PFK-2/FBPasa-2 és superior en els músculs de contracció ràpida, en canvi la isoforma cardíaca és més abundant en els músculs de contracció lenta. La isoforma de testicle presenta el mateix patró d'expressió en els dos tipus musculars.

3.3.- Paper de la Fru-2,6-P₂ en la contracció del múscul esquelètic

3.3.1.- Introducció

Regula la PFK-1 tal i com passa en el fetge i per tan controla la glucòlisi?

El cicle d'excitació-contracció-relaxació (ECR) dels músculs és activat pel potencial d'acció que es propaga a través de la membrana, a partir d'aquí el potencial és reconegut i transmès a través dels túbuls-T cap al reticle sarcoplasmàtic (RS). A continuació es produeix un alliberament de Ca²⁺ per part del RS, provocant un increment de Ca²⁺ al mioplasma., el qual activa el sistema regulador de la maquinària contràctil (dependent de calci) i es genera la contracció del múscul. Finalment, la recuperació de les concentracions de calci en el mioplasma, a través de proteïnes segrestadores de calci o a través del transport a cap al RS emprant la Ca²⁺-ATPasa, permet la relaxació muscular.

Les fibres musculars disposen de tots els elements que componen el sistema d'ECR, però s'han descrit components moleculars específics pels diferents tipus de fibra, aquest fet es tradueix en la cinètica de l'ECR segons el tipus de fibra, existint fibres de contracció ràpida o bé lenta.

El model de l'electroestimulació crònica a baixa freqüència (ECBF) es basa en la imposició d'un patró d'estimulació propi de les motoneurons que innerven les fibres lentes a un múscul de contracció ràpida. Al sotmetre un múscul de contracció ràpida com el tibialis anterior (TA) a l'ECBF, concretament a 10Hz, s'obté una adaptació gradual cap al fenotip dels músculs de contracció lenta. Aquest model permet relacionar els canvis funcionals amb els processos moleculars produïts durant l'adaptació (revisat a: Pette i Vrbová, 1992).

Per veure l'efecte de l'adaptació muscular a l'activitat contràctil, el model d'ECBF a diferència dels entrenaments, permet treballar amb un sol múscul sense la interferència d'altres canvis, produïts per altres parts del cos. D'altra banda amb aquest model s'aconsegueix que totes les unitats motores motoneurons s'estimulin simultàniament, no segueixin l'estimulació gradual i jeràrquica observada en un exercici "normal".

Un dels primers canvis detectables en músculs TA sotmesos a ECBF és l'increment en el temps necessari per assolir la tensió màxima i en el temps de relaxació (revisat per: Pette i Vrbová, 1992). L'alentiment del temps de contracció i de relaxació és causat per canvis en el sistema de segrestament de Ca^{2+} i en l'expressió de les diferents isoformes de les proteïnes miofibril·lars (Brown i col. 1983).

L'estímul contràctil característic de les fibres lentes provoca l'activació de la proteïna fosfatasa-2B (PP2B) o calcineurina a través del Ca^{2+} -CaM. La calcineurina desfosforila el factor de transcripció NFAT (Nuclear Factor of activated T cells), el qual es desplaça fins al nucli on juntament amb altres factors de transcripció promourà l'expressió dels gens característics de les fibres lentes. En canvi en les fibres de contracció ràpida, la calcineurina no és activada, conseqüentment no pot desfosforilar NFAT i per tan els factors de transcripció present promouran l'expressió dels gens propis de les fibres ràpides (Hughes, 1998)

L'electroestimulació de baixa freqüència o els entrenaments de resistència provoca la transformació de les fibres II_B a I a través de l'activació de la calcineurina. L'administració de CsA, inhibidor de la calcineurina, s'evita la transformació de fibres (Dunn i col. 1999). En ratonins transgènics on la calcineurina s'expressa constitutivament s'observa un major nombre de fibres lentes però no s'aprecia hipertrofia dels músculs, indicant que calen altres elements que faciliten o intervenen en la transformació de fibres (Nayas i col 2000).

Les fibres musculars d'una unitat motora, al ser sotmeses al mateix patró d'activitat neuronal presenten el mateix fenotip. Les unitats motores A (fibres II_B) pateixen una disminució del 90-100% de la potencia de contracció, després de ser sotmeses a 1800 contraccions a una freqüència de 10Hz., mentre que les unitats motores C (fibres I) no mostren cap senyal de fatiga o pèrdua de potencia de contracció i les unitats motores B (fibres II_A) mostren una reacció intermèdia (Edström i Kugelber, 1968). La resistència a la fatiga és una característica del tipus de fibres, de manera que els músculs seran més o menys resistents a la fatiga segons la composició de fibres que presenten.

L'increment en la resistència a la fatiga observat en músculs sotmesos a l'ECBF, en s'ha atribuït a l'increment de la capil·larització i perfusió dels músculs (Hudlická i col. 1984) i a l'increment detectat en la capacitat de les vies aeròbiques-oxidatives (Hudlická i col. 1977; Škorjanc i col. 1998). L'increment en la capil·larització i la disminució del diàmetre de les fibres permet un major subministrament d'oxigen a les fibres musculars en contracció (Hudlická i col. 1997) promovent el canvi de metabolisme.

Les fibres de contracció ràpida sotmeses a ECBF han de fer front a l'augment de la demanda energètica exigida per l'activitat contràctil continuada. Aquestes fibres han d'adaptar-se a la nova situació per seguir subsistint, les adaptacions presentades corresponen a canvis en l'activitat i expressió de diferents enzims implicats en el metabolisme energètic. Concretament es potencia la capacitat oxidativa aeròbica (cicle de l'àcid cítric, l'oxidació d'àcids grassos, la utilització de cossos cetònics i la cadena respiratòria) i es disminueix l'activitat d'enzims implicats en la glucòlisi (Brown i col. 1976; Pette i col. 1972, 1973)

L'increment en la capacitat oxidativa aeròbica correlaciona amb un augment de mitocondries (Salmons i col. 1978). Reichman i col (1985) descriuen, en músculs sotmesos a ECBF, una correlació lineal entre l'activitat citrat sintasa (marcador del contingut de mitocondries i capacitat oxidativa aeròbica) i l'increment de la resistència a la fatiga. Altres enzims del cicle de l'àcid cítric també presenten augments d'activitat. També s'ha observat un augment dels enzims implicats en el transport dels àcids grassos i la seva oxidació (palmitoil-CoA transferasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, 3-ketoacil-CoA tiolasa) i en els enzims de la cadena respiratòria (NADH citocrom c reductasa, succinat-citocrom c reductasa, citocrom c oxidasa) (Reichmann i col. 1991).

Els enzims relacionats amb la transferència de fosfats d'alta energia disminueixen a mesura que s'incrementa el temps ECBF, Henriksson i col (1986) detecten una reducció del 50% en l'activitat CK i AMP deaminasa, mentre l'adenilat quinasa perd un 75% de l'activitat inicial. En l'entrenament de resistència, una variant de la transformació de fibres ràpides a lentes, la creatina quinasa (CK) no presenta un augment d'activitat però si que

s'aprecia un canvi d'expressió, s'incrementa l'expressió de la isoforma MB (Apple i col 1985).

L'ECBF, en músculs de contracció ràpida, promou canvis en l'expressió de diferents isoformes de la glucogen fosforilasa quinasa (GFQ), a les 10 setmanes s'observa l'aparició de l'isoforma característica de les fibres de contracció lenta la qual provoca una disminució de l'activitat GFQ (Lawrence i col. 1986). En la lactat deshidrogenasa (LDH) també s'observa un canvi d'expressió, s'aprecia un augment progressiu de l'expressió de la subunitat-H i una reducció de l'expressió de la subunitat-M (Simoneau i Pette, 1989).

L'únic enzim implicat en la glucòlisi que presenta una augment d'expressió amb l'ECBF és l'hexoquinasa (HK) (Pette i col. 1972, 1973). Concretament s'incrementa la presència de HKII des de les primeres hores d'estimulació (Weber i Pette, 1990). Aquest fet, podria indicar que la fosforilació de la glucosa és un pas limitant pel manteniment d'una activitat contràctil sostinguda, en músculs de contracció ràpida. Si s'atura l'estimulació, les alteracions en l'expressió de l'HKII reverteixen recuperant els nivells d'expressió basals en unes 15 hores (Weber i Pette 1990).

L'ECBF s'ha comentat que induïa el canvi de fenotip de contracció ràpida a lenta. Aquesta transició es produeix a través de dos processos; en el primer, les fibres ràpides es transformen en lentes, fet que implica un canvi d'expressió de proteïnes (Pette, 1991) i una degradació de les proteïnes que s'han deixat d'expressar. El segon procés és el recanvi de fibres ràpides danyades, per fibres lentes generades de nou (Maier i col. 1986).

En múscul esquelètic de rata, s'ha descrit que la transició de fibres es basa només en el procés de transformació de fibres intactes (Delp i Pette, 1994; Putman i col. 1999). Contràriament, en múscul esquelètic de conill s'ha observat que la transició de fibres es dona en part a través d'una transformació d'aquestes i en part a partir d'una degeneració i regeneració de noves fibres. En múscul de contracció ràpida de conill electroestimulat crònicament a baixa freqüència el 15-20% de les fibres de contracció ràpida pateixen una

degeneració i són reemplaçades per fibres de contracció lenta, les quals són originades a partir de la proliferació de cèl·lules satèl·lit (Maier i col. 1986, 1988; Lexell i col. 1992).

Tan en la transformació com en la substitució de fibres és necessària l'acció d'algun sistema proteolític si bé es creu que els sistemes proteolítics implicats en cada cas són diferents. Els tres sistemes proteolítics principalment implicats són: les catepsines lisosomals, les calpaïnes citoplasmàtiques (Belcastro i col. 1998) i el sistema de proteosomes dependents d'ATP i relacionats amb l'ubiquitina (Lecker i col. 1999). S'ha demostrat que tots ells es troben incrementades en l'ECBF (Ordway i col. 2000; Parreño i col. 2001).

Durant l'estimulació s'aprecia l'activació de la calpaïna citosòlica, així com una translocació cap a les estructures miofibril·lars i microsomals (Sultan i col. 2001). Essent més pronunciada la translocació de la μ -calpaïna que la m-calpaïna, suggerint que la μ -calpaïna podria estar implicada en el procés de transformació de fibres, mentre la m-calpaïna estaria més aviat implicada en els processos de necrosis. El sistema de proteosomes es troba incrementant en resposta a l'estimulació crònica a baixa freqüència, en fibres necrotitzades i en fibres IIA aparentment intactes, fet que suggereix que possiblement aquest sistema proteolític estaria implicat en la regeneració de fibres i en la transformació de fibres (Sultan i col. 2001). S'ha proposat que el procés de proteòlisi podria ser un pas limitant en la transició de fibres ràpides a lentes, durant l'estimulació crònica a baixa freqüència (Termin i Pette, 1992).

El grup de la Dra. Cussó s'ha especialitzat en l'estudi de les adaptacions que es produeixen en el model d'ECBF, sobretot les que afecten la via glucolítica. Concretament el model emprat en aquest estudi sotmet el múscul *Tibialis anterior* a un protocol d'ECBF durant 24 hores i un descans de 48 hores. Amb aquests músculs es realitza un test d'exercici per analitzar l'estat del teixit i la resposta de la via glucolítica a l'exercici. En primer lloc, cal saber si el model escollit manté la mateixa resposta contràctil en front de la fatiga ocasionada per l'electroestimulació. Cal avaluar l'estat metabòlic en les diferents situacions experimentals, centrant l'anàlisi, en la glucòlisi, via on intervé la Fru-2,6-P₂.

3.3.2.- Estudi de la força dels músculs *Tibialis Anterior* en diferents situacions contràctils.

Per dur a terme aquest estudi va caldre seguir el protocol quirúrgic (apartat 2.2.2.2) per tal d'implantar els elèctrodes als conills escollits. Havent complert el post-operatori, es distribueixen els animals en grups: control, electroestimulats (E24h) o electroestimulats descansats (E24h+D48h). El protocol de força es realitza seguint el procediment experimental descrit en l'apartat (2.2.2.5.1), a 10Hz durant 8 minuts. Tal i com s'aprecia en les gràfiques mostrades en la figura (3.3.1), la tensió inicial cau estrepitosament en músculs sotmesos a un protocol d'electroestimulació crònica de baixa freqüència (10Hz) durant 24 hores. La tensió inicial es recupera parcialment en músculs que han descansat 24 hores després de finalitzar l'electroestimulació, però no assoleixen valors controls de tensió inicial fins a les 48 hores de descans.

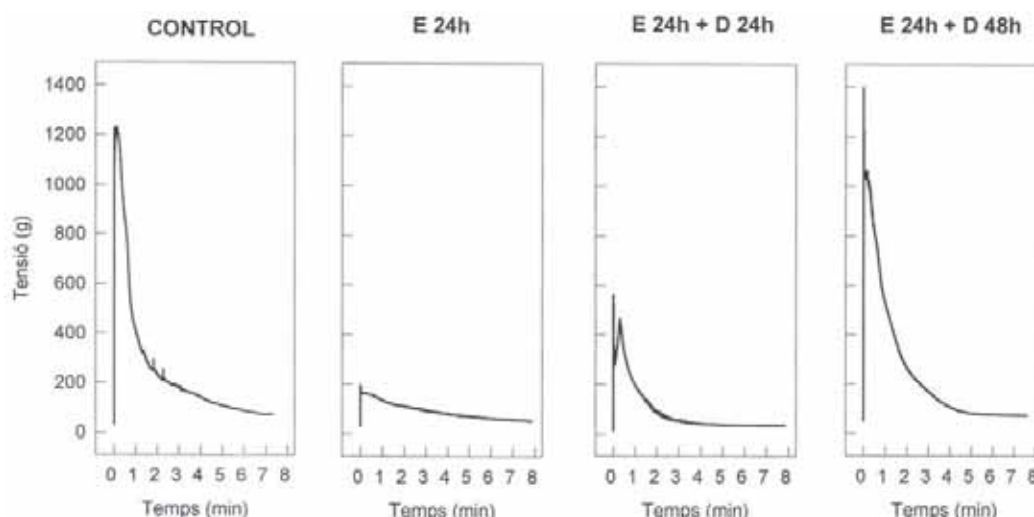


Figura 3.3.1: Tensió del múscul TA sotmès al protocol de força 10Hz. La tensió mesurada en grams pel dinamòmetre acoblat al sistema de registre descrit en l'apartat 2.2.2.5.1.

3.3.3.- Test de fatiga en músculs sotmesos a diferents situacions contràctils.

Seguint el mateix protocol quirúrgic que en el test de força anterior, s'aplica el test de fatiga (apartat 2.2.2.5.2, 2 minuts a 40Hz durant 330ms/s) en el moment adequat en funció del grup i s'obtenen els registres que apareixen a la (figura 3.3.2) Els registres de fatiga dels músculs electroestimulats presenten una disminució en la tensió inicial i un perfil diferent

dels músculs control, la variació entre la tensió inicial i final és molt menor. El descans de 48 hores permet recuperar parcialment la tensió inicial així com el perfil de fatiga característic dels músculs control *TA*. En la mateixa figura apareix el registra contràctil d'un múscul *Soleus*, on s'aprecia com la tensió inicial i la final presenten molt poca variació.

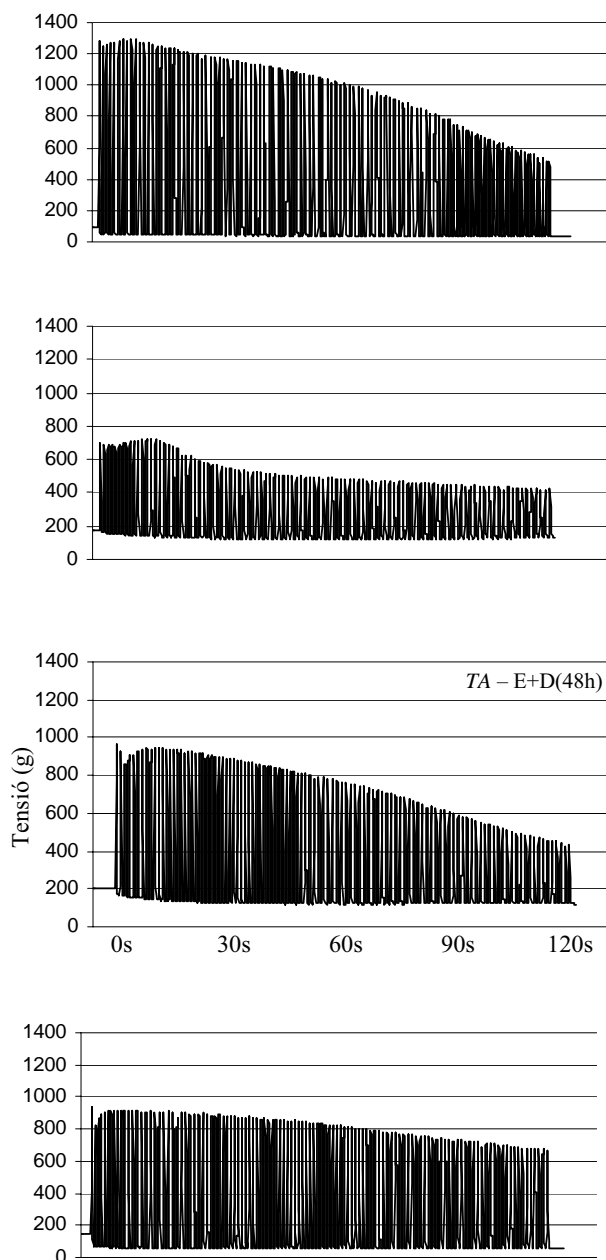


Figura 3.3.2: Registre de contracció muscular obtingut amb el test de fatiga a 40Hz. Apareixen els registres de músculs *TA*: control, estimulat durant 24h [E(24h)], i descansat 48h [E+D(48h)] i *Soleus*.

Analitzant quantitativament les dades, es pot mesurar l'índex de fatiga de cada múscul, considerant la tensió inicial i la final, per tal de normalitzar les dades es relaciona amb pes del múscul (Figura 3.3.3).

El múscul *Soleus* sotmès al test de fatiga presenta una tensió final molt semblant a la tensió inicial, obtenint així un índex de fatiga elevat. Els músculs *TA* de conill sotmesos al test de fatiga, presenten un índex menor al presentat pel múscul *soleus*, en aquest el múscul *TA* si presenta certa fatiga al finalitzar el test. L'electroestimulació contínua a baixa freqüència durant 1 dia, altera el comportament del múscul *TA*, en aquest cas quan es realitza el test de fatiga a 40Hz, la tensió inicial s'ha reduït a la meitat si la comparem amb els *TA* control, a partir d'aquí s'observa una lleu disminució de la tensió generada, obtenint al final del test un índex de fatiga intermedi, entre els *TA* control i els *soleus*. Finalment al deixar que els músculs es recuperin de l'exercici provocat amb l'electroestimulació, es recupera pràcticament la tensió inicial produïda en el test de fatiga així com l'índex de fatiga.

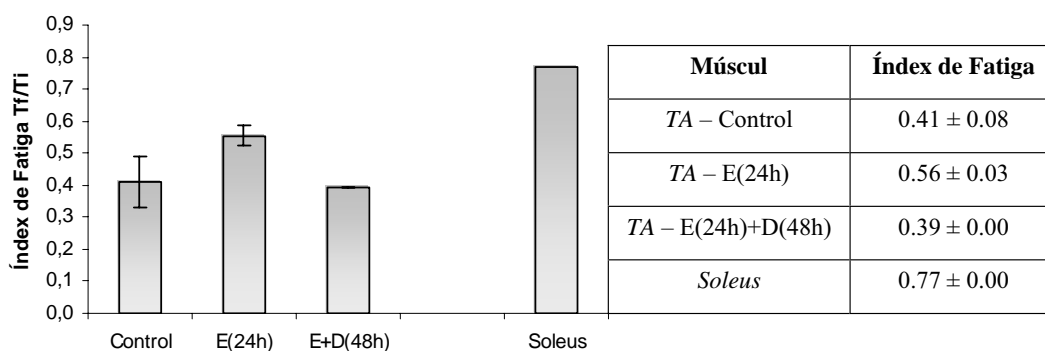


Figura 3.3.3: Índex de fatiga. Correspon al quocient Tensió Final / Tensió Inicial corregit pel pes del múscul. Cal tenir en compte l'estat inicial del múscul, per comprendre el vertader significat de l'índex.

Observant els perfils dels registres contràctils obtinguts en el test de fatiga (40Hz), pot apreciar-se com la pèrdua de força que experimenta el múscul a mesura que es perllonga l'exercici no segueix una equació lineal, de fet la davallada en la força no és evident fins als 20-30 segons, a partir d'aquest moment la pèrdua de força és proporcional al pas del temps.

S'han calculat 2 pendents: 0s-30s i 30s-120s del test de fatiga (Taula 3.3.1). El primer parcial no presenta una bona correlació lineal, perquè en aquest període apareixen algunes irregularitats, com per exemple oscil·lacions, estabilitzacions. En el segon parcial mesurat, es pot veure una correcta correlació entre la força/tensió i el temps, de fet és una relació inversament proporcional.

Múscul	0s-30s		30s-120s	
	Pendent	r	Pendent	r
TA – Control	-4,21	0,928	-8,59	0,995
TA – E (24h)	-4,35	0,825	-1,58	0,975
TA – E + D(48h)	-4,98	0,979	-4,98	0,979
<i>Soleus</i>	-1,10	0,834	-2,76	0,991

Taula 3.3.1: Pendents dels registres contràctils obtinguts amb el test de fatiga.

3.3.4.- Concentració dels metabòlits energètics

En músculs control i electroestimulats-descansats, la concentració d'ATP no presenta modificacions durant els 10 segons de test d'exercici. En els músculs electroestimulats, els nivells d'ATP són inferiors als presentats pel músculs control, essent significativament diferents en la situació de repòs i als 3 segons del test d'exercici.

Analitzant els nivells de creatina fosfat (CrP) i creatina, s'aprecia una davallada en la CrP a partir dels 3 segons, tan en els músculs controls com en els recuperats, el descens implica l'augment de creatina no fosforilada. Als músculs fatigats no s'aprecien alteracions en els nivells d'aquest 2 metabòlits en els 10 segons.

RESULTATS

		TEMPS ESTIMULACIÓ (s)			
		0	1	3	10
ATP	Control	6,03 ± 0,15	6,01 ± 0,31	6,49 ± 0,26	5,42 ± 0,51
	E(24h)	5,07 ± 0,47*	5,54 ± 0,24	4,83 ± 0,42*	5,42 ± 0,68
	E+D(48h)	5,90 ± 0,30	5,71 ± 0,22	5,91 ± 0,30	5,38 ± 0,38
CrP	Control	18,33 ± 1,17	16,11 ± 1,46	15,36 ± 0,82	7,75 ± 1,60abc
	E(24h)	17,12 ± 0,99	19,63 ± 0,39	15,86 ± 0,60	15,47 ± 1,79
	E+D(48h)	16,34 ± 1,19	16,46 ± 0,09	14,61 ± 1,14	6,41 ± 1,53abc
Creatina	Control	17,50 ± 1,17	18,54 ± 1,64	19,29 ± 1,72	26,59 ± 1,33a
	E(24h)	18,72 ± 0,99	16,21 ± 0,39	19,98 ± 0,61	20,37 ± 1,80
	E+D(48h)	17,10 ± 1,19	16,97 ± 0,08	18,82 ± 1,14	27,02 ± 1,54a

Taula 3.3.2: Concentració dels metabolits energètics. ATP, Creatina fosfat i Creatina en músculs control, electroestimulats (24h) i electroestimulats descansats (48h). Els valors són la mitjana ± SD (n=3-6). Les concentracions estan expressades en mmol/g de teixit fresc. ^aSignificativament diferent del repòs (p<0,05); ^bSignificativament diferent de 1s (p<0,05); ^cSignificativament diferent de 3s (p<0,05); *Significativament diferent del control (p<0,05).

3.3.5.- Consum d'ATP i pH

El consum d'ATP es mesura amb l'equació Katz i col. (1986):

$$\text{Consum d' ATP} = [2 \times (-\Delta\text{ATP})] + [-\Delta\text{CP}] + [1,5 \times (\Delta\text{Lactat})] + [1,5 \times (\Delta\text{Piruvat})]$$

En el primer segon del test d'exercici s'aprecia un consum d'ATP superior en músculs control. Als 3 segons el consum d'ATP en músculs electroestimulats és superior als músculs control, el descans de 48 hores previ al test ha permès que en aquest punt el consum d'ATP d'aquests músculs sigui superior a la resta de situacions. Finalment als 10 segons, els consums dels músculs control i els electroestimulats-descansats presenten el mateix nivell mentre que en músculs fatigats, electroestimulats durant 24 hores, el consum d'ATP és 10 vegades més baix.

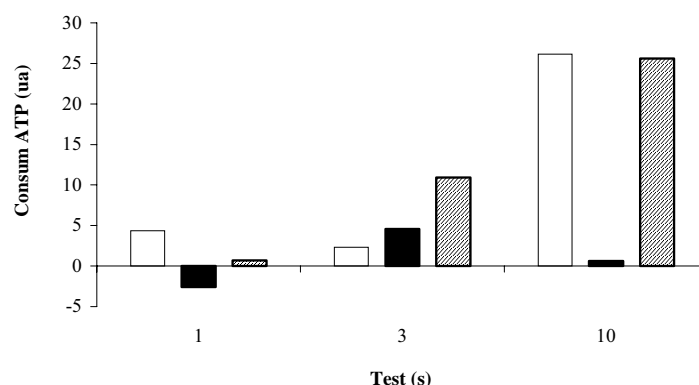


Figura 3.3.4: Consum d'ATP. Els músculs controls ens presenten com □, els músculs electroestimulats durant 24h (■) i els músculs E(24h)+D(48h) (▨). L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t- student amb dades no aparellades, entre tots els grups. *Significativament diferent del control a 1 segon ($p < 0,05$); ^aSignificativament diferent del múscul pre-estimulat i descansat a 1 segon ($p < 0,05$)

El pH pot mesurar-se empíricament emprant les concentracions d'alguns metabòlits a través de l'equació proposada per Sahlin i col. (1975).

$$pH \text{ teòric} = 7,06 - (0,0226 \times ([Lactat] + [Piruvat]))$$

Els músculs control i els estimulats-descansats presenten pràcticament el mateix perfil, a partir del tercer segon del test d'exercici comença a provocar la disminució del pH. La diferència entre aquests dos grups es presenta al tercer segon del test d'exercici, en els músculs control s'intueix una disminució però aquesta no estadísticament significativa, mentre que els músculs estimulats-descansats presenten diferències significatives a partir d'aquest estadi. El pH en els músculs estimulats durant 24 hores no es modifica amb el test d'exercici.

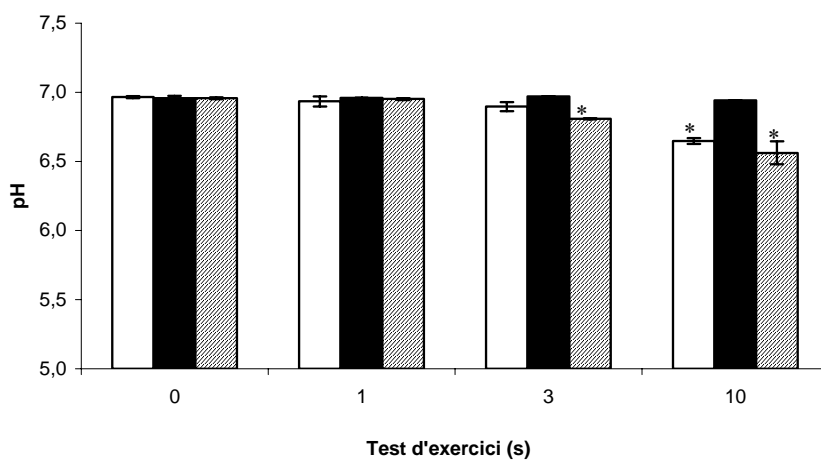


Figura 3.3.5: pH intramuscular teòric. Els músculs controls ens presenten com □, els músculs electroestimulats durant 24h (■) i els músculs E(24h)+D(48h) (▨). L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t- student amb dades no aparellades, entre tots els grups. *Significativament diferent del control en repòs ($p < 0,05$).

3.3.6.- Concentració dels metabòlits intermediaris de la via glucolítica

Anàlisi de la situació inicial prèvia al test d'exercici

Els músculs control i electroestimulat-descansat presenten els mateixos valors per a tots i cadascun dels metabòlits intermediaris com es pot observar en les taules 3.3.3 i 3.3.4. En canvi, els músculs electroestimulats durant 24h, presenten modificacions en les concentracions d'alguns d'aquest metabòlits si es pren com a referència els músculs control. S'observa una disminució significativa en el glucogen, Glu-6-P i Fru-1,6-P₂. La glucosa es troba augmentada, mentre la resta de metabòlits (Glu-1-P, Fru-6-P, GAP, DHAP, lactat i piruvat) presenten valors control.

Anàlisi del test d'exercici

Analitzant els resultats del test (taula 3.3.4), s'observen 2 patrons de comportaments en els músculs estudiats, per un costat els músculs control juntament amb els estimulats-descansats i en el segon grup els músculs estimulats durant 24h.

En el primer grup, la glucosa es manté constant al llarg de tot el test. El GAP, la DHAP i la Glu-1-P presenten augments tot i no arribar a ser significatius. La Glu-6-P, la Fru-6-P, la Fru-1,6-P₂, el lactat i el piruvat presenten augments al llarg del test d'exercici essent significatius entre els 3segons i els 10 segons en funció del metabòlit.

Els músculs electroestimulats no presenten variacions significatives en cap dels metabòlits analitzats, mantenint així les concentracions inicials prèvies al test d'exercici.

	Control	E(24h)	E+D(48h)
Glucogen	68,01 ± 1,51	35,54 ± 4,17*	68,54 ± 3,16

Figura 3.3.3: Concentració de glucogen. Els valors són la mitjana ± SEM (n=3-6). Les concentracions en µmol de glucosa/g teixit fresc. *Significativament diferent del control (p<0,05).

RESULTATS

		TEMPS ESTIMULACIÓ (s)			
		0	1	3	10
Glucosa	Control	1,08 ± 0,12	1,27 ± 0,28	1,13 ± 0,29	1,41 ± 0,35
	E(24h)	1,88 ± 0,28*	2,48 ± 0,93	2,19 ± 0,62	4,07 ± 1,25 ^{a*}
	E+D(48h)	1,07 ± 0,22	1,02 ± 0,04	1,17 ± 0,05	1,08 ± 0,35
Glu-1-P	Control	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,15 ± 0,02
	E(24h)	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	E+D(48h)	0,12 ± 0,04	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,13 ± 0,02
Glu-6-P	Control	1,07 ± 0,12	0,43 ± 0,16	1,44 ± 0,39	3,45 ± 0,63 ^{abc}
	E(24h)	0,48 ± 0,13*	0,36 ± 0,03	0,34 ± 0,05	0,55 ± 0,13
	E+D(48h)	1,18 ± 0,56	0,56 ± 0,18	0,72 ± 0,19	2,24 ± 0,17 ^{abc}
Fru-6-P	Control	0,19 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,24 ± 0,06	0,50 ± 0,08 ^{abc}
	E(24h)	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,03
	E+D(48h)	0,25 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,35 ± 0,02 ^b
Fru-1,6-P₂	Control	0,67 ± 0,10	0,64 ± 0,32	1,48 ± 0,32	1,77 ± 0,36 ^a
	E(24h)	0,31 ± 0,06*	0,19 ± 0,07*	0,21 ± 0,02*	0,42 ± 0,03*
	E+D(48h)	0,71 ± 0,18	0,87 ± 0,02	2,35 ± 0,18	2,43 ± 0,01 ^{ab}
GAP	Control	9,00 ± 1,00	7,00 ± 4,00	23,0 ± 9,00	19,0 ± 5,00
	E(24h)	10,1 ± 2,62	9,30 ± 2,71	8,40 ± 4,01	14,6 ± 1,97
	E+D(48h)	4,00 ± 0,00	8,00 ± 4,00	11,0 ± 1,00	7,00 ± 1,00
DHAP	Control	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,24 ± 0,05	0,27 ± 0,11
	E(24h)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,02
	E+D(48h)	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,00
Piruvat	Control	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,40 ± 0,03 ^{ab}
	E(24h)	0,22 ± 0,07	0,20 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,20 ± 0,04
	E+D(48h)	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,44 ± 0,01 ^{ab}
Lactat	Control	4,04 ± 0,30	5,42 ± 1,61	7,04 ± 1,43	17,8 ± 0,94 ^{abc}
	E(24h)	4,08 ± 0,76	4,36 ± 1,24	4,02 ± 1,17	4,87 ± 0,70
	E+D(48h)	4,43 ± 0,31	4,71 ± 0,34	10,8 ± 0,22 ^{ab}	21,6 ± 3,69 ^{abc}

Taula 3.3.4: Concentració de metabòlits intermediaris de la glucòlisi. Els valors són la mitjana ± SEM (n=3-6). Les concentracions en µmol/g teixit fresc. Excepte GAP, expressat en (nmol/g teixit fresc). ^aSignificativament diferent del repòs (p<0,05); ^bSignificativament diferent d'1s (p<0,05); ^cSignificativament diferent de 3s (p<0,05); * Significativament diferent del control en repòs (p<0,05).

3.3.7.- Concentració dels sucres bisfosforilats; Fru-2,6-P₂ i Glu-1,6-P₂

L'electroestimulació contínua a 10Hz dels músculs TA provoca un augment en la concentració de Fru-2,6-P₂, el descans d'aquests músculs durant 48 hores no remet aquest augment significatiu. Analitzant el test d'exercici, s'aprecia com els músculs control presenten un augment transitori en la concentració de Fru-2,6-P₂ durant el primer segon, en canvi els músculs electroestimulats, tan els no descansats com els descansats 48 hores, presenten un augment significatiu en la concentració d'aquest metabòlit en tots els temps del test d'exercici.

		TEMPS ESTIMULACIÓ (s)			
		0	1	3	10
	Control	0,86 ± 0,10	2,29 ± 0,03 [#]	1,02 ± 0,35	0,89 ± 0,14
Fru-2,6-P₂	E(24h)	2,32 ± 0,12*	2,00 ± 0,40*	2,86 ± 0,53 ^{*a}	2,17 ± 0,57 ^{*a}
	E+D(48h)	2,36 ± 0,10*	1,89 ± 0,48*	2,02 ± 0,23 ^{*a}	2,14 ± 0,67 ^{*a}

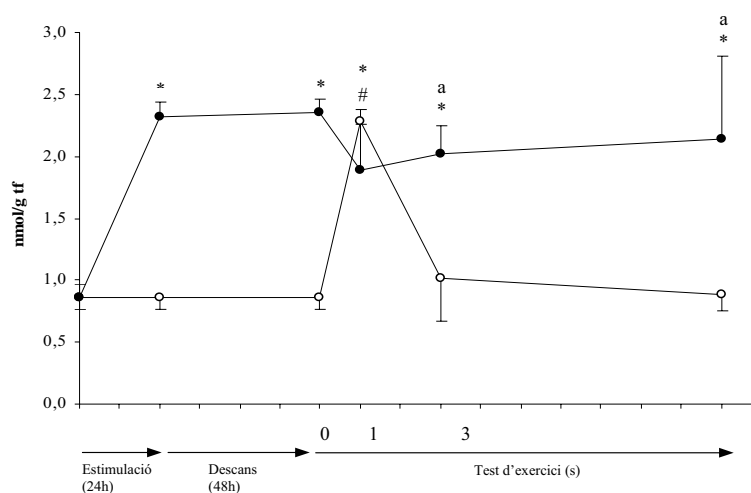


Figura 3.3.6: Taula i gràfica on es presenta el contingut de Fru-2,6-P₂. Els valors són la mitjana ± SEM (n=3-6), en nmols/g teixit fresc. El símbol (o) representa els músculs controls i (●) els músculs E(24h)+D(48h). En músculs control, [#]Significativament diferent del control en repòs (p<0,05). En músculs electroestimulats; *Significativament diferent del control en repòs (p<0,05); ^aSignificativament diferent del múscul control en la mateixa condició (p<0,05).

RESULTATS

En l'avaluació de la Glu-1,6-P₂ (Figura 3.3.7), s'observa com l'electroestimulació provoca un augment significatiu en la concentració d'aquest metabòlit. El descans tal i com passava amb la Fru-2,6-P₂ no aconsegueix disminuir la seva concentració.

Analitzant amb més detall el que succeeix en el test d'exercici, apareixen 2 patrons de comportament, per un costat els músculs control i els electroestimulats-descansats en els quals la concentració d'aquest metabòlit disminueix en el primer segon del test per posteriorment recuperar-se fins a la situació control als 10 segons. En canvi, en els músculs electroestimulats la concentració de Glu-1,6-P₂ no disminueix en tot el test, essent en tots els casos significativament superior a la concentració dels músculs control en estat de repòs.

		TEMPS ESTIMULACIÓ (s)			
		0	1	3	10
	Control	56,15 ± 6,79	24,48 ± 4,50 [#]	30,09 ± 4,54 [#]	81,66 ± 29,78
Glu-1,6-P₂	E(24h)	108,72 ± 10,72*	216,0 ± 70,0*	115,0 ± 15,0*	120,0 ± 15,0
	E+D(48h)	119,87 ± 28,2*	38,42 ± 6,51 ^a	48,32 ± 2,85	98,25 ± 27,12

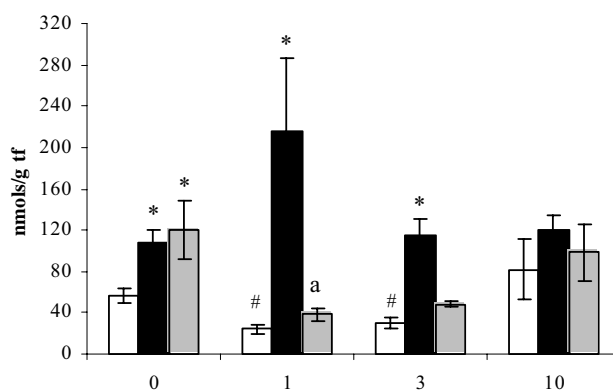


Figura 3.3.7: Taula i gràfica on es presenta el contingut de Glu-1,6-P₂. Els valors són la mitjana ± SEM (n=3-6), en nmols/g teixit fresc. Els músculs controls es presenten com □, els músculs electroestimulats durant 24h (■) i els músculs E+D(48h) (▨). En músculs control, [#]significativament diferent del control en repòs (p<0,05); En músculs E+D(48h), ^aSignificativament diferent del repòs (p<0,05); *Significativament diferent del múscul control en la mateixa condició (p<0,05)

3.3.8.- Paràmetres glucolítics i glucogenolítics.

El model experimental que inclou el test d'exercici permet fer l'anàlisi de la via glucolítica, a través dels increments de metabòlits concrets generats entre els diferents temps del test.

Per tal de conèixer l'estat de la via glucolítica es poden calcular els següents paràmetres; flux glucolític, flux glucogenolític i els quocients Glu-6-P/Glucosa, Fru-1,6-P₂/Fru-6-P. Els fluxos glucolític i glucogenolític foren descrits sota les equacions que es presenten a continuació per Katz i col. al 1986.

$$\text{Flux glucogenolític} = \Delta\text{Glu}\cdot 1\cdot P + \Delta\text{Glu}\cdot 6\cdot P + \Delta\text{Fru}\cdot 6\cdot P + 0.5 \times (\Delta\text{Lactat} + \Delta\text{Piruvat})$$

$$\text{Flux glucolític} = 0.5 \times (\Delta\text{Lactat} + \Delta\text{Piruvat})$$

El flux glucolític calculat en els músculs de l'estudi (figura 3.3.8A) genera dos patrons de conducta, en el primer patró s'hi col·loquen els músculs control i els estimulats-descansats, en aquest grup el flux va augmentant a mesura els músculs s'exerciten, indicant el bon funcionament de la glucòlisi. En l'altre grup hi hauria els músculs estimulats no recuperats, que no presenten flux glucolític, indicant que els músculs són incapaços de respondre als nous estímuls produïts en el test d'exercici. Analitzant amb més detall els músculs que responen al test d'exercici s'aprecia que la resposta dels músculs estimulats-descansats als 3 segons és superior a la resposta dels músculs control.

El flux glucogenolític (Figura 3.3.8B) obtingut després d'aplicar el test d'exercici presenta la mateixa distribució que el flux glucolític, els músculs estimulats no recuperats pràcticament no responen al test, mentre els músculs control i els estimulats-descansats van augmentant a mesura que s'augmenta el temps d'exercici, tot i que entre els dos grups no s'aprecien diferències significatives.

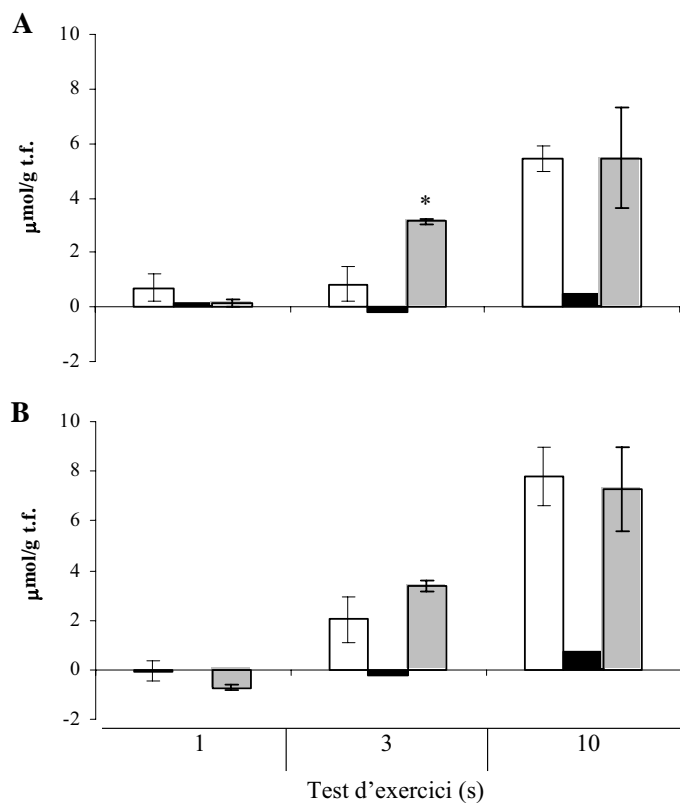


Figura 3.3.8: Flux glucolític (A) i glucogenolític (B). Els músculs controls ens presenten com □, els músculs electroestimulats durant 24h (■) i els músculs E(24h)+D(48h) (▨). *Significativament diferent del control a 3 segons ($p < 0,05$); ^aSignificativament diferent del múscul pre-estimulat i descansat a 1 segon ($p < 0,05$)

El quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P, involucra el substrat i el producte de la reacció catalitzada per la PFK-1, aquesta reacció és el punt clau de regulació de la via glucolítica. Per aquest motiu i per complementar l'estudi a través de les equacions proposades per Katz, s'ha calculat aquest quocient. En la figura 3.3.9 s'observa com el quocient dels músculs electroestimulats-descansats augmenten significativament respecte a la situació control en repòs en tots els punts del test d'exercici. Aquestes diferències també s'aprecien analitzant cada situació particular dins del test d'exercici respecte el múscul control en les mateixes situacions. La variació més gran que s'observa analitzant els quocients es presenta en el

tercer segon del test d'exercici, moment en el qual el quocient dels músculs electroestimulats-descansats és 3 vegades més gran que en presentat pels músculs control, fet que concorda amb el flux glucolític on només els 3 segons s'observen diferències entre aquests dos grups. Els músculs electroestimulats durant 24 hores, es manté estable durant tot el test d'exercici, fet que indica la baixíssima activitat glucolítica d'aquests músculs tal i com s'apreciava amb l'anàlisi del flux glucolític.

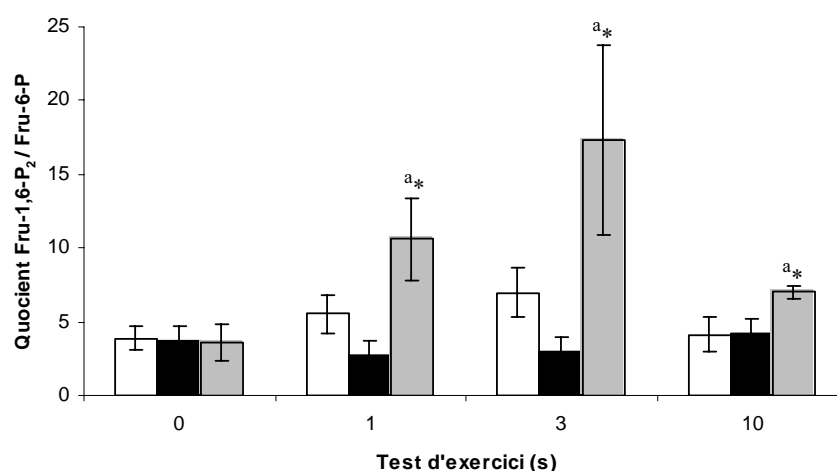


Figura 3.3.9: Quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P. Els músculs controls ens presenten com □, els músculs electroestimulats durant 24h (■) i els músculs E(24h)+D(48h)(▣). *Significativament diferent del control en repòs (p<0,05); ^aSignificativament diferent del múscul electroestimulats-descansats en repòs (p<0,05)

L'estudi del quocient Glu-6-P/Glucosa, permet conèixer l'estat de la reacció catalitzada per l'hexoquinasa, aquest pas permet que la glucosa pugui utilitzar-se ja sigui per a la síntesi de glucogen com per la degradació a través de la glucòlisi, essent doncs el segon punt clau de regulació d'aquesta via.

En la figura 3.3.10 s'observa com en la situació "repòs", prèvia al test d'exercici, els músculs electroestimulats durant 24 hores, que evidentment no estan en repòs, presenten un quocient significativament inferior al dels músculs control. Durant tot el test d'exercici, el quocient d'aquests músculs es manté constant. En canvi els quocients dels músculs control i electroestimulats-descansats augmenten als 10 segons.

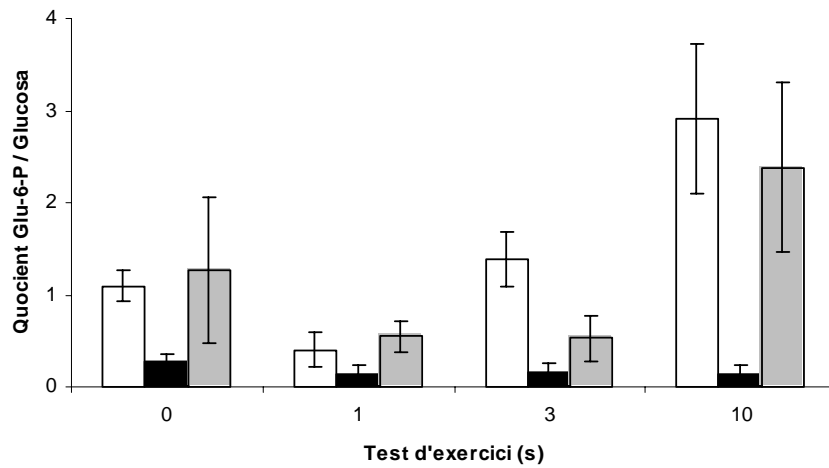


Figura 3.3.10: Quocient Glu-6-P/Glucosa. Els músculs controls ens presenten com □, els músculs electroestimulats durant 24h (■) i els músculs E(24h)+D(48h)(▣). *Significativament diferent del control a 3 segons ($p < 0,05$); ^aSignificativament diferent del múscul pre-estimulat i descansat a 1 segon ($p < 0,05$)

3.3.9.- Discussió

L'electroestimulació crònica de baixa freqüència i el descans

L'electroestimulació contínua de baixa freqüència (ECBF) aplicada a un múscul de contracció ràpida, com el TA, s'ha comentat que provoca la transició de les fibres ràpides cap a fibres lentes. Aquest procés de transformació afecta a l'estructura i composició de les fibres de manera gradual, el conjunt de modificacions permet assolir el nou fenotip.

En el nostre estudi, l'electroestimulació es manté durant 24 hores, en aquest temps ja podem observar-se canvis en les fibres del múscul TA. El primer que s'aprecia és la reducció/pèrdua de l'activitat contràctil del múscul (Figures 3.3.1-2), moment on es considera que el múscul TA es troba fatigat. Aquesta fatiga podria deure's a la pèrdua d'activitat contràctil de les fibres IID o ràpidament fatigables (FF), majoritàries en el múscul TA (Aigner i col., 1993). Els estudis de Cadefau (1993) i Conjard (1999), amb el mateix model d'electroestimulació, mostres com les fibres de tipus I o no fatigables (S) i les IIA o fatiga resistents (FR) mantenen l'activitat contràctil mentre que les fibres IID i algunes IIA no contribueixen a la força. La inactivitat de les fibres IID pot ser deguda a la inactivació parcial i reversible de la Ca^{2+} -ATPasa del RS (Matsushita i col. 1991; Frías i col. 2005) i a una disminució de la concentració de K^+ produïda per la disfunció de la Na^+/K^+ ATPasa del sarcolema (Green i col. 1992).

En múscul de contracció ràpida l'ECBF provoca un desordre del mecanisme d'excitació-contracció, alterant-se el RS i els túbuls-T, de manera que el sistema d'entrada i manteniment de Ca^{2+} es modifica, aquest fet manté a les fibres de contracció ràpida en un estat refractari, en el qual no pot respondre a estímuls contràctils (Frías i col. 2005).

Les diferències apreciables entre els protocols de força (Fig. 3.3.1) i fatiga (Fig.3.3.2), es produeixen per la freqüència emprada en l'assaig. Amb els 10Hz no s'aconsegueix activar les fibres II_A i I després de l'electroestimulació, en canvi amb el test de fatiga els 40Hz produeixen l'estimulació de les fibres II_A (FR) i I (S). L'índex de fatiga (Fig. 3.3.3) que

s'observa en els músculs electroestimulats és generat bàsicament per les fibres resistents a la fatiga. Observant-se un augment en l'índex de fatiga dels músculs electroestimulats fins a un valor intermedi, entre els músculs *TA* controls i els *Soleus*. Si s'observen els valors de tensió, s'aprecia la pèrdua aproximadament del 50% de la tensió inicial dels músculs E(24h) respecte als controls, degut a la resposta de les fibres no fatigades.

Les 48 hores de descans permeten que les fibres musculars es recuperin de l'esgotament o fatiga induïts en l'electroestimulació.

El pH intracel·lular (Fig. 3.3.5) no es veu modificat després de l'ECBF, així com tampoc s'observa una producció de lactat (taula 3.3.4), aquests dos fets poden explicar-se perquè les fibres de tipus I i IIA, responsables de la contracció del múscul en aquesta fase, presenten un metabolisme més aeròbic que les fibres de contracció ràpida, inactives en aquesta situació.

En l'anàlisi dels metabòlits energètics (Taula 3.3.2) l'ECBF provoca una lleu disminució en el contingut d'ATP, mentre la CrP i la creatina es mantenen, l'obtenció d'energia d'aquests músculs es veu garantida per la via metabòlica aeròbica de les fibres I i II_A.

En l'ECBF durant 24 hores, s'observa la disminució en el contingut de glucogen (Taula 3.3.3), i s'aprecia un augment de GLUT4 (transport a membrana) i GLUT1 (expressió) (Castelló i col. 1993), tot plegat permet explicar l'augment en els nivells de Glucosa (Taula 3.3.4) en aquesta situació.

Parra i col. (1995) van observar en aquest tipus de músculs un augment en l'activitat HK, però en el nostre estudi els músculs electroestimulats presenten una menor concentració de Glu-6-P (taula 3.3.4) producte de la reacció de l'HK. Analitzant els enzims que regulen el contingut de glucogen, Prats i col. (2002a-b) van observar que la glucogen sintasa estava activada i s'havia augmentat la seva expressió, mentre GF es troba desactivada i la concentració d'aquesta proteïna és constant. El conjunt provoca que el múscul sotmès a

ECBF durant 24 hores intenti resintetitzar glucogen, aquesta resíntesi podria donar-se en les fibres fatigades.

L'existència d'aquest canvi en el metabolisme del múscul TA sotmès a ECBF durant 24 hores es reforçat pels resultats de Parra i col. (1995) on observen la disminució de l'activitat PFK1 i aldolasa en aquests músculs. En l'anàlisi de la LDH durant l'ECBF s'observa un canvi en l'expressió de les isoformes M i H, mentre M va disminuint la seva expressió, H la incrementa, Simoneau i Pette (1999) s'adonen que aquesta transició depèn de l'espècie i observen una major expressió de H-LDH en aquells músculs que tinguin menor capacitat aeròbica-oxidativa basal, és el cas del TA.

Altres autors han analitzat enzims del cicle de Krebs (metabolisme aeròbic) observant un augment d'activitat en CS i SDH (Pette i col. 1972, 1973)

Després de 48 hores s'aconsegueix que els músculs recuperin; l'estructura dels RS, prèviament desorganitzada per la ECBF (Frías i col. 2005), la capacitat contràctil i l'índex de fatiga, en altres paraules totes les fibres tornen a ser funcionals. A nivell metabòlic es restableixen tots els metabòlits excepte la Fru-2,6-P₂ que es manté elevada.

Test d'exercici

L'aplicació del test d'exercici en els músculs que s'estàn electroestimulats, no provoca canvis en la concentració dels diferents metabòlits (Taula 3.3.2-6), això és lògic si es té en consideració que aquests músculs porten 24 hores "funcionant" i per tan realitzar un exercici durant 1, 3 o 10 segons més, no hauria d'afectar a la concentració del metabòlit. També s'observa com el flux glucolític i glucogenolític no es modifiquen en tot el test, corroborant la idea que aquests músculs han canviat el seu metabolisme, no utilitzen la glucòlisi per generar energia per la contracció, segueixen un patró metabòlic més propi de les fibres de tipus I.

En els músculs control i en els estimulats-descansats s'aprecia un comportament similar, la Glu-6-P, la Fru-6-P, la Fru-1,6-P₂, el lactat i el piruvat presenten augments al llarg del test d'exercici essent significatius entre els 3segons i els 10 segons en funció del metabòlit (Taula 3.3.4). L'augment de lactat és el principal responsable de l'acidificació del medi intracel·lular (Fig. 3.3.5), correlacionen perfectament aquests dos elements.

Analitzant els paràmetres glucolítics: el flux glucolític (Fig. 3.3.9) i quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P (Fig. 3.3.10), s'observen canvis entre els dos tipus de músculs que poden realitzar la glucòlisi. Concretament als 3 segons els músculs estimulats-descansats presenten el flux glucolític augmentat respecte els músculs control. En els músculs estimulats-descansats, el quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P, és significativament superior en tots els temps del test. Això ens indica que l'activitat PFK-1 és troba augmentada en aquests músculs.

El principal afector al·lostèric de la PFK-1 ja s'ha comentat que era la Fru-2,6-P₂, precisament aquest metabòlit és l'únic que presenta un contingut diferents entre els músculs control i els estimulats-descansats durant el test d'exercici. La Fru-2,6-P₂ (Fig.3.3.7) presenta un augment transitori en el primer segon del test d'exercici dels músculs control, aquest fet ja havia estat detectat per Cadefau i col. (1993). Els músculs estimulats-descansats mantenen elevat el contingut de Fru-2,6-P₂ durant tot el test d'exercici.

En músculs de granota, Wegener i col. (1990 i 2002) relacionen els augments puntuals de Fru-2,6-P₂ quan s'inicia un exercici amb l'increment de la glucòlisi en els primers moments de la contracció muscular.

La Fru-2,6-P₂ és l'únic element divergent, dels components analitzats en aquest estudi, entre els músculs control i els estimulats-descansats durant el test d'exercici, precisament aquesta divergència és la que podria explicar l'increment del flux glucolític en els músculs estimulats-descansats durant els primers instants de l'exercici. Així doncs, es podria dir que l'electroestimulació i el descans en aquests músculs ha permès una millora en la resposta al nou l'exercici (test d'exercici), s'ha establert una mena de pre-condicionament.

En aquest punt, cal seguir fent recerca perquè ens trobem amb una nova situació desconcertant, com es poden mantenir valors elevats de Fru-2,6-P₂ en el múscul, sabent que la isoforma muscular de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 presenta una relació quinasa/bisfosfatasa favorable a la bisfosfatasa i que la seva regulació depèn principalment del substrat, Fru-6-P, el qual en el nostre estudi presenta la mateixa concentració que el múscul en repòs. En el següent apartat de resultats s'intenta resoldre la incògnita.

3.3.10.- Conclusions

1.- L'electroestimulació contínua de baixa freqüència durant 24 hores provoca alteracions estructurals que disminueixen la resposta fisiològica del múscul de contracció ràpida, concretament les alteracions que es produeixen afecten les fibres de contracció ràpida, II_D / fatigables, les quals entren en un estat refractari. La resposta contràctil es recupera si el múscul descansa durant 48 hores.

2.- En els músculs estimulats-descansats, el quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P, és significativament superior en tots els temps del test. Això ens indica que l'activitat PFK-1 és troba augmentada en aquests músculs.

3.- De tots els metabòlits estudiats la Fru-2,6-P₂ és l'únic element que difereix entre els músculs control i els estimulats-descansats durant el test d'exercici, aquesta divergència podria explicar l'increment del flux glucolític en els músculs estimulats-descansats durant els primers instants de l'exercici.

4.- Els resultats obtinguts demostren que la Fru-2,6-P₂ està implicada en l'increment del flux glucolític que es produeix en els primers segons de l'estimulació muscular, sempre i quan els nivells dels metabòlits de la glucòlisi estiguin restablerts i el múscul no es trobi en un estat refractari fatigat.

3.4.- Estudi de la regulació de la isoforma muscular de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en temps llargs d'estimulació i durant el descans.

3.4.1.- Introducció

La funció de la Fru-2,6-P₂ sobre PFK-1 en el múscul esquelètic és controvertida per les escasses dades que s'han publicat sobre les variacions en funció de l'activitat muscular. Fins ara s'han observat canvis molt puntuals i en temps molt curts durant l'estimulació elèctrica, els quals remetent immediatament i que fa difícil pensar en alguna regulació específica de la glucòlisi muscular per part d'aquest metabòlit.

L'inici del vol dels insectes ve acompanyat d'un increment en el consum d'oxigen i una ràpida activació del metabolisme muscular del vol. Diversos insectes voladors obtenen l'energia per volar emprant l'oxidació dels hidrats de carboni, presentant com a pas limitant del flux glucolític la PFK-1 (Crabtree, B. and co. 1975).

Storey (1983) presenta la primera demostració que Fru-2,6-P₂ és un potent activador de la fosfofructoquinasa en invertebrats, concretament en l'enzim del múscul volatori. La Fru-2,6-P₂ disminueix a la S_{0,5} per la Fru-6-P i interacciona sinèrgicament amb altres afectors (sobretot AMP) de la PFK-1 de múscul de l'insecte, així com disminueix la inhibició deguda a elevats nivells d'ATP. Aquests mateixos efectes han estat observats en l'enzim PFK-1 de mamífers (Uyeda, K. i col. 1981).

Estudiant el múscul gastrocnemius de granota, concretament els canvis en els metabòlits i afectors quan se sotmet el múscul a exercici d'alta intensitat, en aquest cas a nadar, i la seva posterior recuperació, Krause, U. and Wegener, G. (1996) suggereixen que el flux

glucolític en el múscul està modulats per senyals externs al múscul i que la Fru-2,6-P₂ és el senyal clau en aquest procés, basant-se tan en els seus estudis com els precedents de Minatogawa i col., 1984, Cadefau i col.1993; Wegener-1990 i Krause-1995).

Scholnick i col. (1996) presenten la primera evidència de correlació que suggereix que la disminució del contingut de Fru-2,6-P₂ provoca l'augment de la gluconeogènesi en múscul esquelètic de llagardaix (*Dipsosaurus dorsalis*).

La Fru-2,6-P₂ ha estat proposada com el punt clau per integrar el metabolisme muscular dins del metabolisme de tot el cos, a través de l'acció de diferents hormones, neuromoduladors que acaben modificant la concentració de Fru-2,6-P₂ d'alguns òrgans i fins i tot a múscul esquelètic d'invertebrats (revisat per Candy, i col. 1997).

En quan a l'electroestimulació, Bassols i col. (1986) descriuen com a 25Hz s'observen augment puntuals (als 10 segons) de Fru-2,6-P₂ en *gastrocnemius* mentre les a 5 Hz observen modificacions en el seu contingut

A les potes de granotes en estat de repòs, la Fru-2,6-P₂ es molt baixa però s'incrementa ràpidament durant el primer segon. (Wegener i col. 1990, 2002).

Segons l'estudi presentat per Minatogawa i col. (1984), la Fru-2,6-P₂ no tindria cap efecte sobre la glucòlisi dels músculs esquelètics sotmesos a estimulacions que produeixen tetània, mentre que podria estar involucrada en el control de la glucòlisi en músculs estimulats a baixes freqüències durant curts períodes.

En altres experiments realitzats en mamífers, s'observa un patró de comportament similar, on l'estimulació elèctrica provoca increments puntuals i en temps molt curts (1s) que remetent immediatament (Cadefau i col. 1993).

L'estimulació crònica a baixa freqüència d'un múscul de contracció ràpida provoca increments significatius de Fru-2,6-P₂, des de les 3 hores fins al quart dia d'electroestimulació, a partir d'aquest punt i fins als 50 dies d'estimulació continua, la concentració d'aquesta molècula disminueixen fins a arribar als valors control (Green i col. 1991). La denervació provoca un augment en la Fru-2,6-P₂, en aquest cas l'augment ha estat caracteritzat i atribuït a un canvi en l'expressió de l'isoenzim responsable de la síntesi i degradació d'aquest metabòlit, PFK-2/FBPasa-2, en aquesta situació tan particular s'incrementa l'expressió de la isoforma L (típicament de fetge), la qual presenta una relació quinasa/bisfosfatasa superior a la presentada per la isoforma muscular, permetent mantenir elevada la concentració de Fru-2,6-P₂ (Cadefau i col. 1999).

La dieta és també un element que pot provocar canvis en la composició d'aquest metabòlit a nivell hepàtic i muscular (Mentón i col. 1999). En el cas de les dietes riques en àcids grassos, tan la disposició en cis-, o trans- dels àcids grassos saturats o insaturats, provoquen un increment en la concentració d'aquest metabòlit tan a nivell hepàtic com muscular (Annex 1).

El dejú provoca la reducció dels nivells de Fru-2,6-P₂ tan en múscul cardíac com esquelètic. Una administració aguda d'insulina i glucosa sobre la dieta provoquen un augment de la concentració d'aquest metabòlit en múscul esquelètic, aquest fet no

s'observa quan s'administra insulina i glucosa en rates en dejú (French, T.J. & co. 1988). El dejú, la hipoglucèmia i la diabetes provoquen una disminució de la Fru-2,6-P₂ en fetge, estudis realitzats per Kuwajima and co. 1982.

3.4.2.- Concentració de Fru-2,6-P₂ en diferents situacions contràctils

En els músculs TA l'electroestimulació contínua durant 24 hores a baixa freqüència (10Hz) provoca un augment significatiu en la concentració de Fru-2,6-P₂ (Figura 3.4.1), pràcticament es duplica la presència d'aquest metabòlit. Els músculs electroestimulats més 48 hores de descans encara presenten nivells significativament elevats, però si el descans es perllonga fins als 7 dies els músculs recuperen els nivells de Fru-2,6-P₂, característics de múscul control.

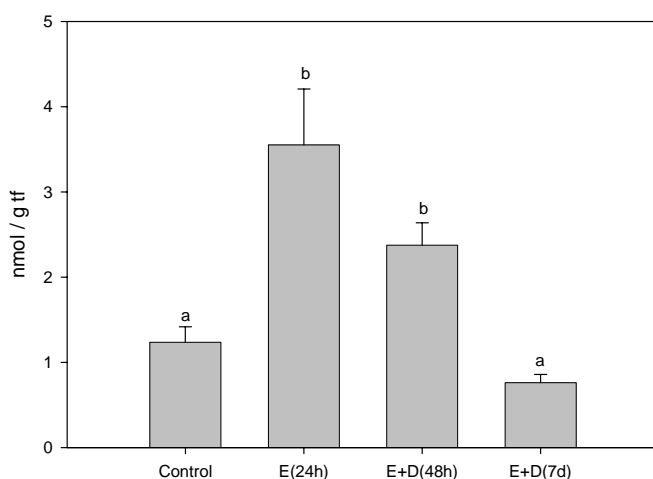


Figura 3.4.1: Concentració de Fru-2,6-P₂ en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n ≥ 5 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta (p<0,05).

3.4.3.- Activitat PFK-2

L'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 augmenta significativament en els músculs electroestimulats, fins i tot en aquells que han descansat 48 hores quan es compara músculs TA en repòs.

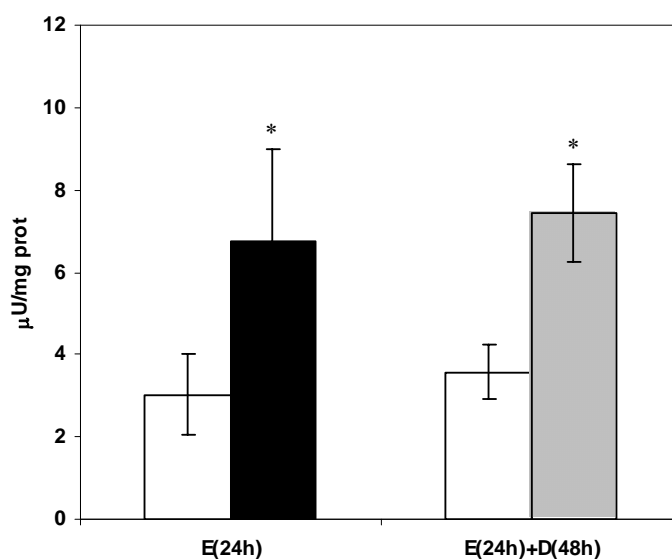


Figura 3.4.2: Activitat PFK-2. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm SD (n=3-6). Les dades s'expressen en μ U/mg proteïna. Els músculs controls ens presenten com □, els músculs electroestimulats durant 24h (■) i els músculs E(24h)+D(48h) (▣). *Significativament diferent del control ($p < 0,05$).

3.4.4.- Contingut dels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2

A partir dels resultats anteriors, no es pot saber si l'increment d'activitat detectat és degut a la isoforma muscular o bé per un canvi d'expressió de les diferents isoformes. Per tal de resoldre la incògnita, es planteja estudiar l'expressió de les diverses isoformes en múscul electroestimulat i durant el posterior descans.

- **La isoforma muscular (m-PFK2)**

En la figura que es presenta a continuació, s'observa la determinació de la isoforma muscular de l'enzim PFK-2 a través de la tècnica del *western-blot*. D'aquest estudi es desprèn que el contingut de la isoforma muscular es manté constant durant les 24 hores d'electroestimulació, a partir d'aquest moment (comença la fase de descans) s'aprecia una disminució en el contingut d'aquest isoenzim, presentant un contingut significativament inferior a la situació control a les 12 hores i 24 hores de descans. Posteriorment s'augmenta el contingut d'isoenzim fins arribar als nivells de la situació

control a les 48 hores de descans. En els músculs electroestimulats-descansats 7 dies el contingut de la isoforma muscular de l'enzim PFK-2 és significativament superior.

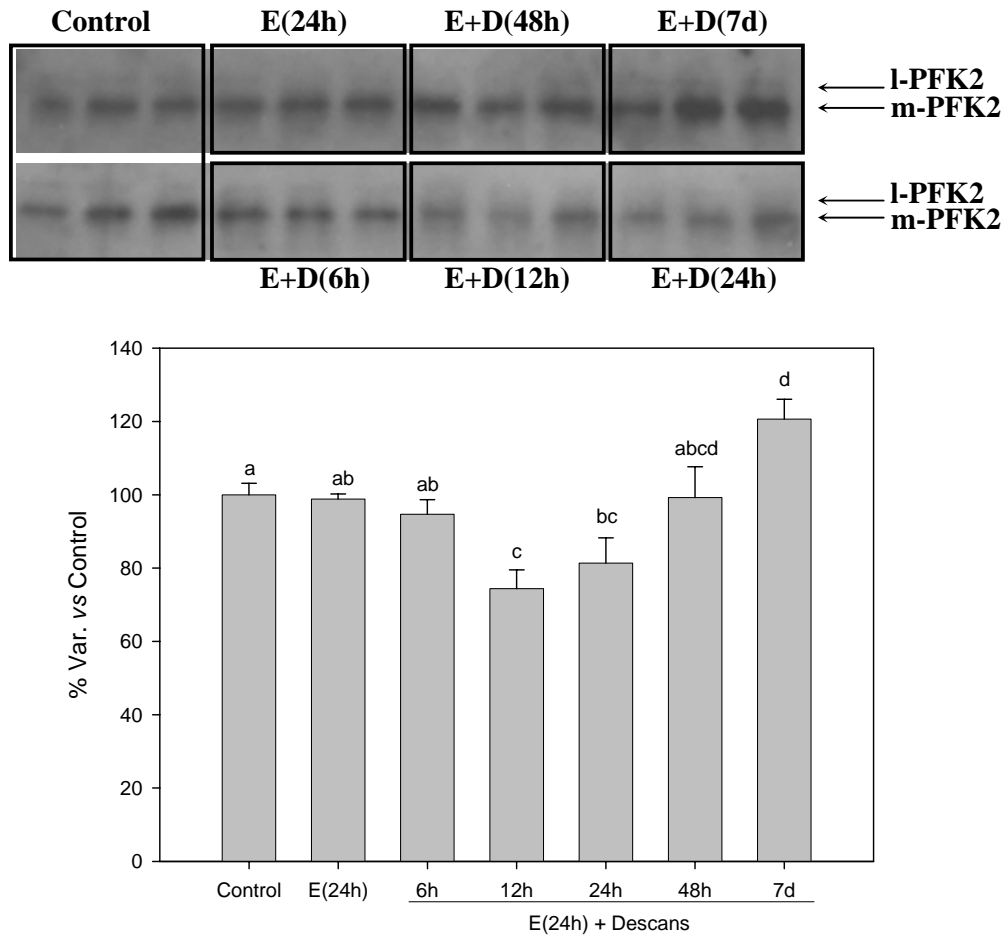


Figura 3.4.3: La isoforma m-PFK2 en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **La isoforma hepàtica (l-PFK2)**

L'electroestimulació contínua a 10Hz durant 24 hores provoca una disminució d'aquesta isoforma d'aproximadament el 20%, respecte la situació control. Aquesta disminució es manté durant el període de descans, recuperant els nivells control als 7 dies de descans.

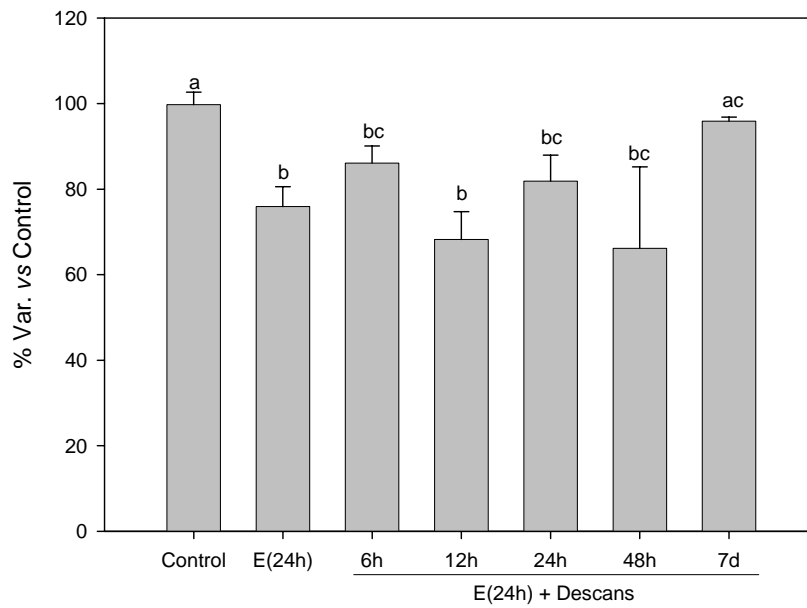
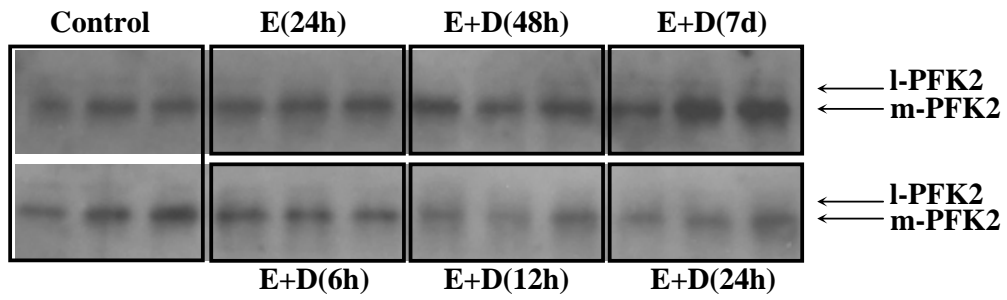


Figura 3.4.4: La isoforma I-PFK2 en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n superior a 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, entre tots els grups. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

3.4.5. Expressió dels gens que codifiquen pels isoenzims de PFK-2/FBPasa-2

- **Expressió del gen Pfkfb1**

L'electroestimulació a baixa freqüència contínua durant 24 hores provoca la disminució significativa de l'expressió de la isoforma muscular del gen Pfkfb1, fins a representar un 25% de l'expressió d'un múscul control en situació de repòs. Fins a les 48 hores de descans posteriors a l'electroestimulació no es recupera el nivell d'expressió d'aquest gen, tot i que en aquest punt de l'estudi la desviació és molt elevada provocant que aquesta expressió no sigui diferent significativament a la situació control ni a la situació E(24h). Si s'augmenta el temps de descans, fins als 7 dies, el nivell d'expressió és plenament el de la situació control.

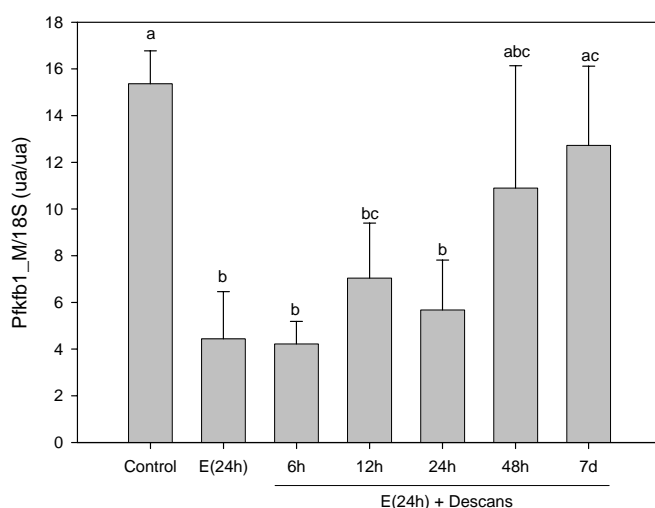


Figura 3.4.6: Expressió del gen Pfkfb1-M en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana \pm S.D., els grups presenten una $n = 3$ animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades. cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

En l'estudi de l'expressió de la isoforma hepàtica del gen Pfkfb1, s'aprecia un patró similar al mostrat per la isoforma muscular, en aquesta ocasió però la disminució de l'expressió produïda per l'electroestimulació durant 24 hores és entre 15%-20% i es manté reduïda tot i el descans. Només quan el temps de descans és de 7 dies s'observa una recuperació del nivell d'expressió del gen en qüestió.

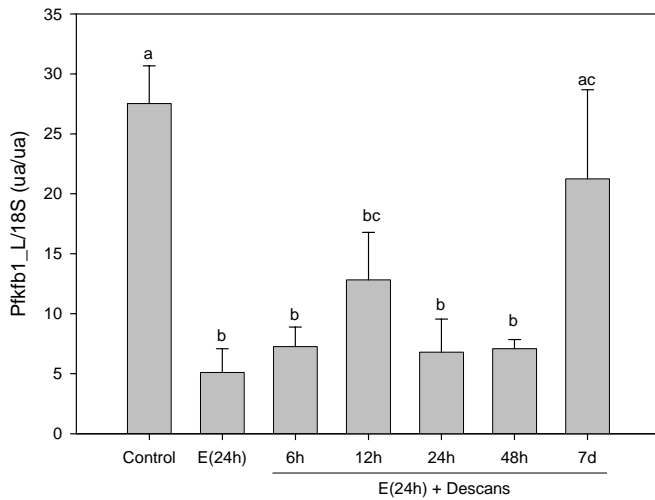


Figura 3.4.7: Expressió del gen Pfkfb1-L en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **Expressió del gen Pfkfb2**

L'electroestimulació de 24 hores promou la transcripció del gen Pfkfb2, tot i que no s'observen diferències significatives entre aquest punt i el control, fruit de la desviació pròpia del grup. Analitzant el descans, s'observa que a les 12 hores s'aprecien diferències significatives entre aquesta situació i els músculs control, aquest fet fa pensar que augmentant el nombre d'animals analitzats podríem veure diferències significatives entre els músculs control i els E(24h), fet que es repetiria possiblement els descansos de 6 hores. Més enllà de les 12 hores de descans els resultats indiquen un retorn a la situació control.

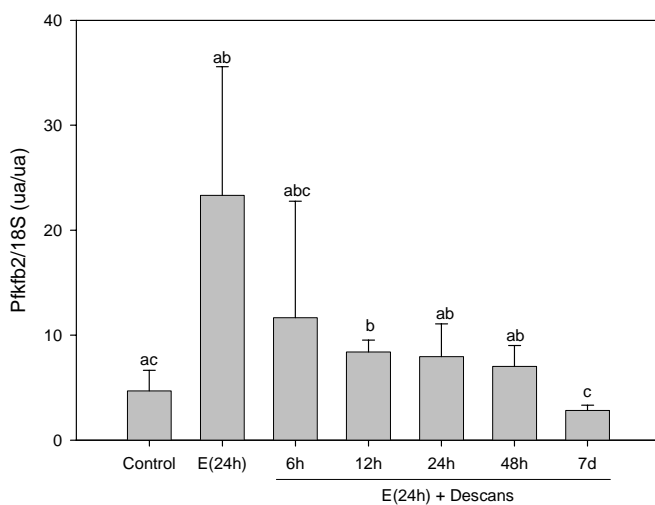


Figura 3.4.8: Expressió del gen Pfkfb2 en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **Expressió del gen Pfkfb3**

L'expressió del gen Pfkfb3 s'avalua amb un *assay-on-demand* dissenyat per la casa comercial *Applied Biosystems*, aquest assaig específic per a la detecció del gen en rata, s'ha assajat en conill, obtenint una bona eficiència en l'experiment de PCR a temps real. Aquest gen característic de cervell també es transcriu en el múscul. Analitzant les dades obtingudes, s'aprecia una reducció de l'expressió del gen amb l'electroestimulació, tot i no ser significativa. Amb el descans la tendència es confirma, l'expressió del gen ha estat reduïda fins assolir un 10%-15% de l'expressió control. A les 48 hores de descans s'observa la recuperació dels nivells d'expressió, per la variació del grup. Posteriorment, als 7 dies de descans, el nivell d'expressió és igual als músculs control.

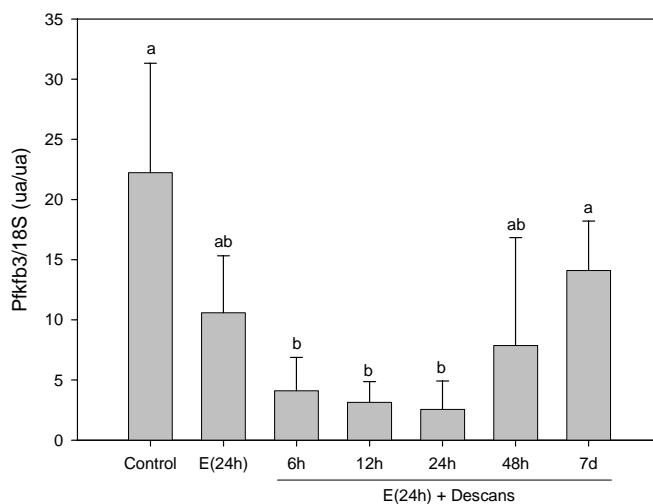


Figura. 3.4.9: Expressió del gen Pfkfb3 en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades. Cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta ($p < 0,05$).

- **Expressió del gen Pfkfb4**

L'expressió d'aquest gen Pfkfb4 es redueix amb l'electroestimulació, E(24h), fins assolir valors corresponents al 50%-60% de l'expressió en la situació control. El descans promou la transcripció, recuperant el nivell d'expressió a les 12 hores, a partir d'aquest moment l'expressió no és significativament diferent de la situació control.

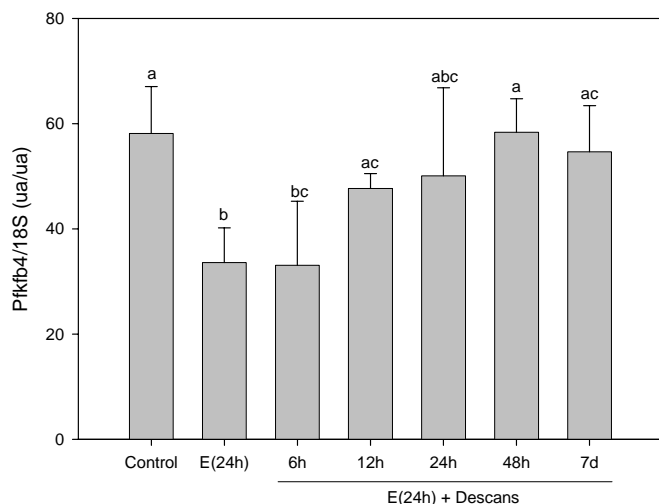


Figura 3.4.10: Expressió del gen Pfkfb4 en músculs TA de conill sotmesos a diferents situacions contràctils. Els resultats obtinguts es presenten com a mitjana +/- S.D., els grups presenten una n = 3 animals. L'anàlisi estadístic realitzat ha estat t-student amb dades no aparellades, cada lletra representa una mitjana significativament diferent a la resta (p<0,05).

RESUM - Múscul esquelètic de conill durant l'electroestimulació i el descans

L'electroestimulació contínua durant 24 hores provoca una disminució en l'expressió dels gens Pfkfb1_M , Pfkfb1_L, Pfkfb3, Pfkfb4, en tot els casos en aturar l'estimulació s'inicia el procés de recuperació de l'expressió, però la velocitat de recuperació depèn del gen, Pfkfb4 recupera l'expressió a les 12 hores de descans, Pfkfb1_M a les 48 hores i els gens Pfkfb1_L i Pfkfb3 als 7 dies s'observa el restabliment de l'expressió dels músculs control. El gen Pfkfb2 a diferència dels altres, experimenta una augment de la seva expressió amb l'electroestimulació i amb el descans aquesta expressió va disminuint, recuperant els nivells d'expressió controls a partir de les 24 hores de descans.

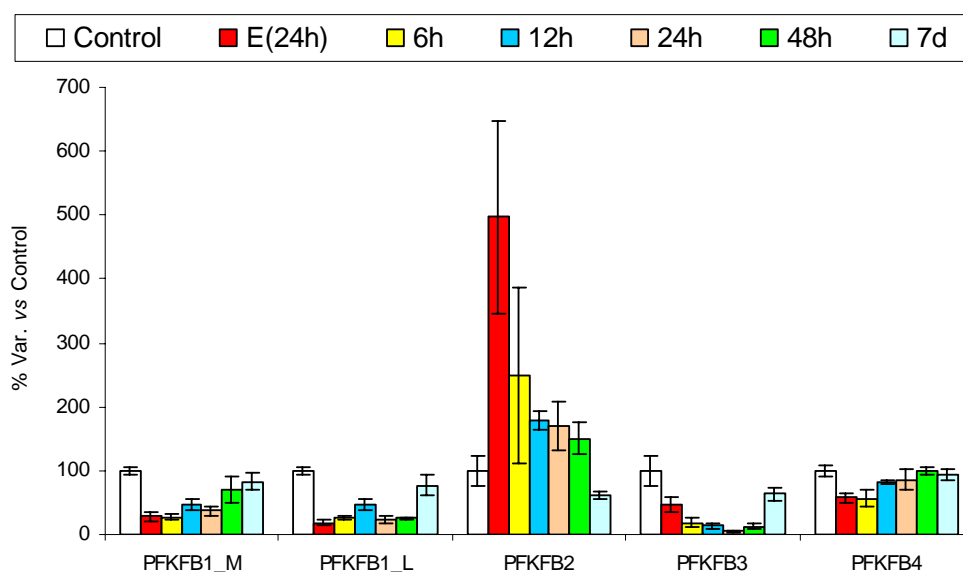


Figura resum múscul-contracció: % variació de l'expressió dels diferents gens respecte l'expressió en la situació control. Es presenta de manera independent l'expressió dels diferents gens en les diferents situacions contràctils.

3.4.6.- Discussió

Com ja s'ha vist anteriorment, la concentració de Fru-2,6-P₂ (Fig. 3.4.1) augmenta amb l'electroestimulació crònica de baixa freqüència (10Hz) (ECBF) durant 24h/dia (apartat 3.3.7). En les primeres 48 hores de descans posteriors a l'ECBF encara s'aprecien nivells elevats de Fru-2,6-P₂, que desapareixen en músculs descansat durant 7 dies, tornant a valors similars de múscul control .

Aquest augment de concentració de Fru-2,6-P₂ coincideix amb un augment de l'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, responsable de la síntesi de la Fru-2,6-P₂, el qual es manté fins a les 48 hores de descans.

Així doncs, cal pensar que l'efecte de l'augment de l'activitat quinasa tindria com a conseqüència un augment de la concentració d'aquest metabòlit bisfosforilat, coincidint aquesta afirmació amb els nostres resultats. Però, s'ha de tenir en compte que la relació d'activitat quinasa/bisfosfatasa de la isoforma muscular és favorable a l'activitat

bisfosfatasa, la qual cosa ens indica que possiblement l'ECBF provoca un canvi dels perfil isoenzimàtic de la PFK-2/FBPasa-2 en el múscul estimulat.

Com s'ha comentat a la introducció l'ECBF porta a un canvi de tipus de múscul, de contracció ràpida a contracció lenta, anteriorment, a través d'una sèrie de canvis estructurals i/o canvis en l'expressió de determinades proteïnes o fins i tot, canvis d'isoformes de la mateixa proteïna.. A més, també s'ha observat que si s'elimina l'activitat contràctil d'un múscul, aquest també pateix canvis d'expressió de proteïnes. Específicament, en un estudi sobre denervació es va observar un augment de Fru-2,6-P₂, degut a un canvi d'isoforma en l'enzim regulador, concretament s'augmentava l'expressió de la isoforma hepàtica (Cadefau i col. 1999).

Així doncs, amb aquests antecedents calia analitzar les diverses isoformes, Analitzant l'expressió gènica de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 durant l'electroestimulació i el posterior descans (Figures 3.4.6-10) s'observa com el múscul TA electroestimulat durant 24 hores presenta una reducció de l'expressió dels gens Pfkfb1_M/L, 3 i 4 així com un augment del gen Pfkfb2, aquest canvi d'expressió del múscul TA és similars a l'expressió d'aquestes isoformes en el múscul Soleus (Figures 3.2.6-10).

Els canvis adquirits amb l'electroestimulació no són permanents, així els períodes de descans provocaran el retorn als nivells d'expressió del múscul control, el qual es donarà més o menys ràpidament en funció del gen. El gen Pfkfb4 a les 12 hores, Pfkfb2 a les 24 hores, Pfkfb1_M ho fa a les 48 hores i els gens Pfkfb1_L i 3 no es recuperen fins als 7 dies de descans.

En el cas de la isoforma muscular s'aprecia la davallada en el contingut proteic quan el múscul ha descansat de 12 a 24 hores, en canvi a nivell gènic l'expressió es redueix un 60% amb l'electroestimulació i es manté així fins a les 24 hores de descans.

L'expressió gènica és regulada per factors de transcripció de manera que la seva activació o desactivació pot realitzar-se en temps molt curts, en canvi l'expressió proteica requereix temps més llargs tan per a la síntesi com per a la degradació, és precisament aquesta circumstància la que permet explicar les discrepàncies observades entre l'expressió gènica i proteica de la isoforma muscular

Així doncs, considerant els resultats obtinguts, l'augment en la concentració de Fru-2,6-P₂ en músculs electroestimulats es degut al canvi en el perfil d'expressió de les isoformes de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, més concretament l'augment de la isoforma cardíaca, en qual l'activitat quinasa és més elevada que l'activitat bisfosfatasa. Durant el descans l'expressió gènica de les isoformes retorna a l'estat original més ràpidament que l'expressió proteica fet que podria explicar que a les 48 hores els nivells de Fru-2,6-P₂ es mantinguin elevats tot i presentar el mateix nivell d'expressió gènica que els músculs control.

3.4.7.- Conclusions

- 1.-** L'electroestimulació crònica de baixa freqüència durant 24 hores genera un augment de Fru-2,6-P₂, el qual es manté durant 48 hores però als 7 dies de descans ha retornat a l'estat inicial.
- 2.-** L'augment de Fru-2,6-P₂ és degut a un augment en l'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2.
- 3.-** L'electroestimulació crònica de baixa freqüència durant 24 hores provoca un canvi en l'expressió de mRNA dels gens que codifiquen per PFK-2/FBPasa-2 en els músculs TA, passant a ser un perfil d'expressió més proper al presentat pel múscul Soleus.
- 4.-** L'increment en l'expressió de la isoforma cardíaca durant l'electroestimulació justifica l'increment d'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 i com a conseqüència un increment en la concentració de Fru-2,6-P₂.
- 5.-** La rapidesa en que es modifiquen els patrons d'expressió, amb l'estimulació i el descans, dels diversos isoenzims varia per a cada un d'ells, la qual cosa implica sistemes diferents de regulació.

CAPÍTOL 4

DISCUSSIÓ GENERAL

En aquest estudi s'ha pogut observar com la presència de la Fru-2,6-P₂, depèn de l'estadi de desenvolupament, del teixit. Concretament en el múscul també existeixen diferències en quan al contingut d'aquest metabòlit en funció del tipus majoritari de fibres que presenti i l'activitat contràctil que realitzi.

Les canvis en el contingut de Fru-2,6-P₂ poden associar-se a variacions en el contingut de substrat, producte i/o altres metabòlits activadors o inhibidors que modulen les activitats quinasa i bisfosfatasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, o bé a la modificació del patró d'expressió de les diferents isoformes de l'enzim.

El desenvolupament és un període amb molts canvis que sobretot s'evidencien si es comparen estadis fetals i neonatals, l'existència d'isoformes específiques per cada estadi o la modificació de la relació d'expressió d'isoformes del mateix enzim són les principals maneres de regular les diferents vies metabòliques. Durant el desenvolupament del cor i del múscul Dunaway i col. (1986a, b) han detectat augments en l'activitat PFK-1 deguts a un increment de la isoforma M de l'enzim. Andrés i col. (1989), analitzant les diferents isoformes de PGM i CK, observen que la innervació juga un paper clau en la diferenciació muscular.

Vandoolaeghe i col. (1999) analitzant la diferenciació muscular en cèl·lules en cultiu, van arribar a la conclusió que la isoforma muscular de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 només s'expressa en l'individu adult, així doncs durant el desenvolupament del múscul hauria d'expressar-se alguna altra isoforma per sintetitzar i mantenir els nivells elevats de Fru-2,6-P₂ observats.

Així doncs, després d'analitzar els resultats obtinguts en aquest treball, podria dir-se que la Fru-2,6-P₂ observada en l'estadi fetal tan del cor com del múscul és sintetitzada bàsicament per la isoforma ubiqua, la disminució de la seva presència durant el desenvolupament provoca la davallada del contingut del metabòlit. En el cas del cor, la regulació dels nivells d'aquest metabòlit en l'adult, la dur a terme la isoforma cardíaca que augmenta la seva expressió des del moment en que neix l'individu, de manera que es compensa la desaparició de la isoforma ubiqua amb la nova síntesi de la isoforma cardíaca, observant en l'adult la mateixa concentració de Fru-2,6-P₂ que en l'estadi fetal. En canvi en el múscul la degradació de la isoforma ubiqua no és compensada per cap isoforma, de fet la resta d'isoformes presenten un patró d'expressió bastant semblant, totes elles apareixen bàsicament en l'estadi adult, moment en el qual s'observa la concentració més baixa del metabòlit.

A mesura que l'individu creix, el múscul acaba de diferenciar-se i s'especialitza en un tipus de contracció ràpida (TA) o lent (*soleus*). Els músculs de contracció lenta presenten tot un seguit d'adaptacions que els permeten treballar amb un metabolisme més aeròbic, i per tan no depenen de la glucòlisi per obtenir l'energia necessària per dur a terme la seva funció.

El contingut de Fru-2,6-P₂ en el *soleus*, és menor que el del TA, aquesta circumstància hauria de ser esperable doncs aquest metabòlit és l'activador al·lostèric més potent de la PFK-1, l'enzim encarregat de regular el flux glucolític, quanta menys quantitat de Fru-2,6-P₂ presenti el múscul lent menys activa estarà la glucòlisi. L'activitat quinasa de la PFK-2/FBPasa-2 presenta una tendència a la baixa en els músculs de contracció lenta, en altres estudis realitzats en rata en el nostre grup, Bassols i col. 1986, s'han observat diferències significatives entre els dos tipus de múscul.

La menor presència del metabòlit en *soleus* s'acaba de justificar en el moment en que s'analitza l'expressió de les isoformes de PFK-2/FBPasa-2, aquest múscul presenta una expressió més elevada de la isoforma cardíaca en comparació amb el TA, però la resta d'isoformes s'expressen molt menys.

L'electroestimulació contínua de baixa freqüència (ECBF) aplicada a un múscul de contracció ràpida, com el TA, s'ha comentat que provoca la transició de les fibres ràpides cap a fibres lentes. Aquest procés de transformació afecta a l'estructura i composició de les fibres de manera gradual, el conjunt de modificacions permet assolir el nou fenotip.

En el model proposat (ECBF durant 24 hores), s'aconsegueix modificar algunes característiques del múscul TA de manera transitòria, durant el descans de 48 hores es recupera la capacitat contràctil.

La primera conseqüència del procediment ECBF és la reducció/pèrdua de l'activitat contràctil del múscul, moment on es considera que el múscul TA es troba fatigat. Els estudis de Cadefau (1993) i Conjard (1999), amb el mateix model d'electroestimulació, mostren com les fibres de tipus I o no fatigables (S) i les IIA o fatiga resistents (FR) mantenen l'activitat contràctil mentre que les fibres IID i algunes IIA no contribueixen a la força. La inactivitat de les fibres IID pot ser deguda a la inactivació parcial i reversible de la Ca^{2+} -ATPasa del RS (Matsushita i col. 1991; Frías i col. 2005) i a una disminució de la concentració de K^+ produïda per la disfunció de la Na^+/K^+ ATPasa del sarcolema (Green i col. 1992).

En múscul de contracció ràpida l'ECBF provoca una desordre del mecanisme d'excitació-contracció, alterant-se el RS i els túbuls-T, de manera que el sistema d'entrada i manteniment de Ca^{2+} es modifica, aquest fet manté a les fibres de contracció ràpida en un estat refractari, en el qual no pot respondre a estímuls contràctils (Frías i col. 2005).

En l'anàlisi dels metabòlits energètics l'ECBF provoca una lleu disminució en el contingut d'ATP, mentre la CrP i la creatina es mantenen, l'obtenció d'energia d'aquests músculs es veu garantida per la via metabòlica aeròbica de les fibres I i II_A.

En l'ECBF durant 24 hores, s'observa la disminució en el contingut de glucogen (Taula 3.3.3), i s'aprecia un augment de GLUT4 (transport a membrana) i GLUT1 (expressió) (Castelló i col. 1993), tot plegat permet explicar l'augment en els nivells de Glucosa (Taula 3.3.4) en aquesta situació.

Parra i col. (1995) van observar en aquest tipus de músculs un augment en l'activitat HK, però en el nostre estudi els músculs electroestimulats presenten una menor concentració de Glu-6-P (taula 3.3.4) producte de la reacció de l'HK. Analitzant els enzims que regulen el contingut de glucogen, Prats i col. (2002a-b) van observar que la glucogen sintasa estava activada i s'havia augmentat la seva expressió, mentre GF es troba desactivada i la concentració d'aquesta proteïna és constant. El conjunt provoca que el múscul sotmès a ECBF durant 24 hores intenti resintetitzar glucogen, aquesta resíntesi podria donar-se en les fibres fatigades.

Després de 48 hores s'aconsegueix que els músculs recuperin; l'estructura dels RS, prèviament desorganitzada per la ECBF (Frías i col. 2005), la capacitat contràctil i l'índex de fatiga, en altres paraules totes les fibres tornen a ser funcionals. A nivell metabòlic es restableixen tots els metabòlits excepte la Fru-2,6-P₂ que es manté elevada.

Test d'exercici

L'aplicació del test d'exercici en els músculs que s'estan electroestimulats, no provoca canvis en la concentració dels diferents metabòlits (Taula 3.3.2-6), això és lògic si es té en consideració que aquests músculs porten 24 hores "funcionant" i per tan realitzar un exercici durant 1, 3 o 10 segons més, no hauria d'afectar a la concentració del metabòlit. També s'observa com el flux glucolític i glucogenolític no es modifiquen en tot el test, corroborant la idea que aquests músculs han canviat el seu metabolisme, no utilitzen la glucòlisi per generar energia per la contracció, segueixen un patró metabòlic més propi de les fibres de tipus I.

En els músculs control i en els estimulats-descansats s'aprecia un comportament similar, la Glu-6-P, la Fru-6-P, la Fru-1,6-P₂, el lactat i el piruvat presenten augments al llarg del test d'exercici essent significatius entre els 3 segons i els 10 segons en funció del metabòlit (Taula 3.3.4). L'augment de lactat és el principal responsable de

l'acidificació del medi intracel·lular (Fig. 3.3.5), correlacionen perfectament aquests dos elements.

Analitzant els paràmetres glucolítics: el flux glucolític (Fig. 3.3.9) i quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P (Fig. 3.3.10), s'observen canvis entre els dos tipus de músculs que poden realitzar la glucòlisi. Concretament als 3 segons els músculs estimulats-descansats presenten el flux glucolític augmentat respecte els músculs control. En els músculs estimulats-descansats, el quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P, és significativament superior en tots els temps del test. Això ens indica que l'activitat PFK-1 és troba augmentada en aquests músculs.

El principal afector al·lostèric de la PFK-1 ja s'ha comentat que era la Fru-2,6-P₂, precisament aquest metabòlit és l'únic que presenta un contingut diferents entre els músculs control i els estimulats-descansats durant el test d'exercici. La Fru-2,6-P₂ (Fig.3.3.7) presenta un augment transitori en el primer segon del test d'exercici dels músculs control, aquest fet ja havia estat detectat per Cadefau i col. (1993). Els músculs estimulats-descansats mantenen elevat el contingut de Fru-2,6-P₂ durant tot el test d'exercici.

La Fru-2,6-P₂ és l'únic element divergent, dels components analitzats en aquest estudi, entre els músculs control i els estimulats-descansats durant el test d'exercici, precisament aquesta divergència és la que podria explicar l'increment del flux glucolític en els músculs estimulats-descansats durant els primers instants de l'exercici. Així doncs, es podria dir que l'electroestimulació i el descans en aquests músculs ha permès una millora en la resposta al nou l'exercici (test d'exercici), s'ha establert una mena de pre-condicionament.

En aquest punt, cal seguir fent recerca perquè ens trobem amb una nova situació desconcertant, com es poden mantenir valors elevats de Fru-2,6-P₂ en el múscul, sabent que la isoforma muscular de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 presenta una relació quinasa/bisfosfatasa favorable a la bisfosfatasa i que la seva regulació depèn principalment del substrat, Fru-6-P, el qual en el nostre estudi presenta la mateixa concentració que el múscul en repòs. En el següent apartat de resultats s'intenta resoldre la incògnita.

L'augment de concentració de Fru-2,6-P₂ durant l'ECBF i el posterior descans, coincideix amb un augment de l'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, responsable de la síntesi de la Fru-2,6-P₂, el qual es manté almenys fins a les 48 hores de descans.

Així doncs, cal pensar que l'efecte de l'augment de l'activitat quinasa tindria com a conseqüència un augment de la concentració d'aquest metabòlit, coincidint aquesta afirmació amb els nostres resultats. Però, s'ha de tenir en compte que la relació d'activitat quinasa/bisfosfatasa de la isoforma muscular és favorable a l'activitat bisfosfatasa, la qual cosa ens indica que possiblement l'ECBF provoca un canvi dels perfil isoenzimàtic de la PFK-2/FBPasa-2 en el múscul estimulat.

Existint un precedent que demostra el canvi d'expressió de les isoformes del l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en el múscul denervat (Cadeau i col. 1999), s'encamina l'estudi cap a la determinació de les isoformes de l'enzim. Analitzant l'expressió gènica de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 durant l'electroestimulació i el posterior descans s'observa com el múscul TA electroestimulat durant 24 hores presenta una reducció de l'expressió dels gens *Pfkfb1_M/L*, 3 i 4 així com un augment del gen *Pfkfb2*, aquest canvi d'expressió del múscul TA és similar a l'expressió d'aquestes isoformes en el múscul *soleus*.

Els canvis adquirits amb l'electroestimulació no són permanents, així els períodes de descans provocaran el retorn als nivells d'expressió del múscul control, el qual es donarà més o menys ràpidament en funció del gen. El gen *Pfkfb4* a les 12 hores, *Pfkfb2* a les 24 hores, *Pfkfb1_M* ho fa a les 48 hores i els gens *Pfkfb1_L* i 3 no es recuperen fins als 7 dies de descans.

L'expressió gènica és regulada per factors de transcripció de manera que la seva activació o desactivació pot realitzar-se en temps molt curts, en canvi l'expressió proteica requereix temps més llargs tan per a la síntesi com per a la degradació, és precisament aquesta circumstància la que permet explicar les discrepàncies observades entre l'expressió gènica i proteica de la isoforma muscular

Així doncs, considerant els resultats obtinguts, l'augment en la concentració de Fru-2,6-P₂ en músculs electroestimulats es degut al canvi en el perfil d'expressió de les isoformes de l'enzim PFK-2/FBPasa-2, més concretament l'augment de la isoforma cardíaca, en qual l'activitat quinasa és més elevada que l'activitat bisfosfatasa. Durant el descans l'expressió gènica de les isoformes retorna a l'estat original més ràpidament que l'expressió proteica fet que podria explicar que a les 48 hores els nivells de Fru-2,6-P₂ es mantinguin elevats tot i presentar el mateix nivell d'expressió gènica que els músculs control.

CAPÍTOL 5

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts amb els experiments realitzats en múscul i cor en diferents estadis de desenvolupament permeten concloure:

1. La concentració de Fru-2,6-P₂ depèn del teixit i de l'estadi de desenvolupament.
2. L'expressió gènica i proteica de les diferents isoformes de PFK-2/FBPasa-2 en cor es correlacionen, observant-se una substitució d'isoformes en aquest teixit, en l'estadi fetal actua la isoforma ubiqua i en l'estadi adult hi trobem la isoforma del propi teixit. Aquest canvi d'isoforma podria explicar el patró d'oscil·lació observat en la concentració de Fru-2,6-P₂.
3. En el múscul l'expressió gènica i proteica de les isoformes muscular, hepàtica, cardíaca correlacionen, però la isoforma ubiqua no, a nivell gènic l'expressió es produeix bàsicament en l'estadi adult, però a nivell proteic, observem la seva presència sobretot en l'estadi fetal.
4. El senyal d'inici d'expressió per a la isoforma muscular de PFK-2/FBPasa-2 no correspon a l'inici de la inervació, la qual es dona al voltant dels 3 dies de vida.

CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts en l'anàlisi comparatiu d'un múscul de contracció ràpida i lenta, es pot concloure:

5. El contingut de Fru-2,6-P₂ dels músculs de contracció ràpida són més elevats com a conseqüència d'una major activitat de l'enzim PFK-2/FBPasa-2.
6. El patró d'expressió de les isoformes muscular, hepàtica i ubíqua de PFK-2/FBPasa-2 és superior en els músculs de contracció ràpida, en canvi la isoforma cardíaca és més abundant en els músculs de contracció lenta. La isoforma de testicle presenta el mateix patró d'expressió en els dos tipus musculars.

Dels resultats obtinguts en l'estudi del paper de la Fru-2,6-P₂ en la contracció muscular generada pel model experimental utilitzat en aquest treball, es pot concloure:

7. L'electroestimulació contínua de baixa freqüència durant 24 hores provoca alteracions estructurals que disminueixen la resposta fisiològica del múscul de contracció ràpida, concretament les alteracions que es produeixen afecten les fibres de contracció ràpida, II_D / fatigables, les quals entren en un estat refractari. La resposta contràtil es recupera si el múscul descansa durant 48 hores.
8. En els músculs estimulats-descansats, el quocient Fru-1,6-P₂/Fru-6-P, és significativament superior en tots els temps del test. Això ens indica que l'activitat PFK-1 és troba augmentada en aquests músculs.
9. De tots els metabòlits estudiats la Fru-2,6-P₂ és l'únic element divergent, entre els músculs control i els estimulats-descansats durant el test d'exercici, aquesta divergència podria explicar l'increment del flux glucolític en els músculs estimulats-descansats durant els primers instants de l'exercici.
10. Els resultats obtinguts demostren que la Fru-2,6-P₂ està implicada en l'increment del flux glucolític que es produeix en els primers segons de l'estimulació muscular, sempre i quan els nivells dels metabòlits de la glucòlisi estiguin restablerts i el múscul no es trobi en un estat refractari fatigat.

Dels resultats obtinguts en l'estudi de la regulació de la isoforma muscular de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 en l'exercici, es pot concloure:

11. L'electroestimulació crònica de baixa freqüència durant 24 hores genera un augment de Fru-2,6-P₂, el qual es manté durant 48 hores però als 7 dies de descans ha retornat a l'estat inicial.
12. L'augment de Fru-2,6-P₂ és degut a un augment en l'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2.
13. L'electroestimulació crònica de baixa freqüència durant 24 hores provoca un canvi en l'expressió de mRNA dels gens que codifiquen per PFK-2/FBPasa-2 en els músculs TA, passant a ser un perfil d'expressió més proper al presentat pel múscul Soleus.
14. L'increment en l'expressió de la isoforma cardíaca durant l'electroestimulació justifica l'increment d'activitat quinasa de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 i com a conseqüència un increment en la concentració de Fru-2,6-P₂.
15. La rapidesa en que es modifiquen els patrons d'expressió, amb l'estimulació i el descans, dels diversos isoenzims varia per a cada un d'ells, la qual cosa implica sistemes diferents de regulació.

Com a conclusions generals:

1. La Fru-2,6-P₂ juga un paper important en la regulació de la glucòlisi en els primers instants de l'exercici.
2. En el múscul, la isoforma predominant de l'enzim PFK-2/FBPasa-2 presenta una regulació bàsicament per substrat, això provoca que per observar-se increments de Fru-2,6-P₂, els quals permeten potenciar la glucòlisi, sigui necessària una regulació gènica, és a dir, es modifica el patró d'expressió de les isoformes de l'enzim, estratègia ja observada en altres enzims.

CAPÍTOL 6

BIBLIOGRAFIA

A

- Ai,H.; Ihlemann,J.; Hellsten,Y.; Lauritzen,H.P.M.M.; Hardie,D.G.; Galbo,H. and Ploug,T. (2002)** Effect of fiber type and nutritional state on AICAR and contraction stimulated glucose transport in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 282(6), E1291-E1300.
- Aigner,S.; Gohlsch,B.; Hämäläinen,N.; Staron,R.S.; Uber,A.; Wehrle,U.; Pette,D. (1993)** Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscle of the rabbit: heavy chain IId predominates. *Eur. J. Biochem.* 211, 367-372.
- Aigner,S. and Pette,D. (1992)** Fast-to-slow transition in myosin heavy chain expression of rabbit muscle fibres induced by chronic low-frequency stimulation. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 46: 311-317.
- Andrés,V.; Cussó,R. and Carreras,J. (1989)** Distribution and developmental transition of phosphoglycerate mutase and creatine phosphokinase isozymes in rat muscles of different fiber-type composition. *Differentiation* 41(1):72-77.
- Apple,F.S.; Rogers,M.A.; Casal,D.C.; Sherman,W.M. and Ivy,J.C. (1985)** Creatine kinase-MB isoenzyme adaptations in stressed human skeletal muscle of marathon runners. *J. Appl. Physiol.* 59(1), 149-153.
- Aragón,J.J.; Torheim,K. and Lowenstein,J.M. (1980)** On a possible role of IMP in the regulation of phosphorylase activity in skeletal muscle. *FEBS Letters* 117, K56-K64.
- Aragón,J.J.; Torheim,K.; Goodman,M.N. and Lowenstein,J.M. (1981)** Replenishment of citric acid cycle intermediates by the purine nucleotide cycle in rat skeletal muscle. *Curr. Top. Cell Regul.* 18, 131-149.
- Åstrand,P.O. and Rodahl,K. (1986)** Textbook of work physiology. Physiological bases of exercise. 3^aed. Ed: McGraw-Hill Book Company.

B

- Balon,T.W. (1998)** Role of nitric oxide in contraction induced glucose transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441, 87-95.
- Bangsbo,J.; Gollnick,P.D.; Graham,T.E.; Juel,C.; Kiens,B.; Minuzo,M. and Saltin,B.(1990)** anaerobic energy production and O₂ deficit-debt relationship during exhaustive exercise in humans. *J. Physiol.* 422: 539-559.
- Bar,A. and Pette,D. (1988)** Three fast myosin heavy chain in adult rat skeletal muscle. *FEBS Letters* 235, 153-55.

- Barnard,R.J.; Edgerton,V.R.; Furukawa,T. and Peter,J.B. (1971)** Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* 220: 410-414.
- Baron,A.D.; Brechtel,G.; Wallace,P.; Edelman,S.V. (1988)** Rates and tissue sites of non-insulin and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am. J. Physiol.*, 255, E769-E774.
- Bassols,A.M.; Carreras,J. and Cussó,R. (1986)** Changes in glucose 1,6-bisphosphate content in rat skeletal muscle during contraction. *Biochem. J.* 240, 747-751.
- Bassols,A.M.; Andrés,V.; Ballarín,M.; Mahy,N.; Carreras,J. and Cussó,R. (1991)** Identification of guanine and adenine nucleotides as activators of glucose-1,6-bisphosphatase activity from rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 291(1), 121-125.
- Beneke,R., Pollman,C., and Leithäuser,R.M. (2002)** How anaerobic is the Wingate Anaerobic Test for humans? *Eur.J.Appl.Physiol.* 87, 388-92.
- Bigland-Ritchie,B. Cafarelli,E. and Vollestad,N.K. (1986)** Fatigue of submaximal static contractions. *Acta Physiol. Scand.* 128 137-148.
- Boheler,K.R.; Czyz,J.; Tweedie,D.; Yang,H.-T.; Anisimov,S.V. and Wobus,A.M. (2002a)** Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation Research* 91, 189-201.
- Boheler,K.R. and Wobus,A.M. (2002b)** Myocardial aging and stem cell biology. **In: Mattson MP.; van Zant,G. eds.** Stem Cells: a cellular fountain of youth? New York, NY: Elsevier Science; 2002:141-177
- Boscá,L.; Challiss,R.A.J. and Newsholme,E.A. (1985)** The effect of fructose 2,6-bisphosphate on muscle fructose-1,6-bisphosphatase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 828(2), 151-154.
- Bottinelli,R. and Reggiani,C. (2000)** Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in Biophysics & Molecular Biology.* 73, 195-262.
- Boule,N.G.; Weisnagel,S.J.; Lakka,T.A.; Tremblay,A.; Bergman,R.N.; Rankinen,T., Leon,A.S.; Skinner,J.S.; Wilmore,J.H.; Rao,D.C. and Bouchard,C. (2005)** Effects of exercise training on glucose homeostasis; the HERITAGE Family Study. *Diabetes Care* 28, 108-114.
- Bradford,M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1981.
- Broberg,S. and Sahlin,K. (1989)** Adenine nucleotide degradation in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J.Appl. Physiol.* 67(1), 116-122.
- Bruni,P.; Vandoolaeghe,P.; Rousseau,G.G.; Hue,L. and Rider,M.H. (1999)** Expression and regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isozymes in white adipose tissue. *Eur. J. Biochem.* 259, 756-761.
- Buhl,E.S.; Jessen,N.; Schmitz,O.; Pedersen,S.B; Pedersen,O.; Holman,G.D. and Lund,S. (2001)** Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D- ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes* 50, 12-17.
- Buller,A.J.; Eccles,J.C. and Eccles,R.M. (1960)** Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses. *J.Physiol.*, 150: 417-439.
- Burke,R.E.; Levine,D.N.; Zajac,F.E.; Tsairis,P. and Engel,W.K. (1971)** Mammalian motor units: physiological-histochemical correlations in three types in cat gastrocnemius. *Science* 174: 709-712.
- Burke,R.E.; Levine,D.N.; Tsairis,P. and Zajac,F.E. (1973)** Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *Journal of Physiology* 234: 723-748.

C

- Cadefau, J.; Casademont, J.; Grau, J.M.; Fernández, J.; Balaguer, A.; Vernet, M.; Cussó, R. and Urbano-Márquez, A. (1990)** Biochemical and histochemical adaptation to sprint training in young athletes. *Acta Physiol. Scand.* 140, 341-351.
- Cadefau, J.A.; Parra, J.; Tauler, A.; Cusso, R. (1999)** Contractile activity modifies Fru-2,6-P₂ metabolism in rabbit fast twitch skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 274 (45): 31961- 31966.
- Cadefau, J.A.; Parra, J.; Cussó, R.; Heine, G.; Pette, D. (1993)** Responses of fatigable and fatigue-resistant fibres of rabbit muscle to low-frequency stimulation. *Pflügers Arch* 424, 529-537.
- Candy, D.J.; Becker, A. and Wegener, G. (1997)** Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B, 497-512.
- Castelló, A.; Cadefau, J.A.; Cussó, R.; Testar, X.; Hesketh, J.E.; Palacin, M. and Zorzano, A. (1993)** GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporter expression is differentially regulated by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 268(20), 14998-15003.
- Castelló, A.; Rodríguez-Manzanares, J.C.; Camps, M. Pérez-Castillo, A.; Testar, X.; Palacín, M.; Santos, A. and Zorzano, A. (1994)** Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to new neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 269, 5905-5912.
- Chen, Z.P.; McConell, G.K.; Michell, B.J.; Snow, R.J.; Canxy, B.J. and Kemp, B.E. (2000)** AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 279, E1202-E1206.
- Chen, H.C.; Bandyopadhyay, G.; Sajan, M.P.; Kanoh, Y.; Standaert, M.; Farese Jr., R.V. and Farese, R.V. (2002)** Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* 277, 23554-23562.
- Chesney, J.; Mitchell, R.; Benigni, F.; Bacher, M.; Spiegel, L.; Al-Aded, Y., Han, J.H.; Metz, C. and Bucala, R. (1999)** An inducible gene product for 6-phospho-fructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3047-3052.
- Chikri, M. and Rousseau, G.G. (1995)** Rat gene coding for heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: characterization of an unusual promoter region and identification of four mRNAs. *Biochemistry* 34, 8876-8884.
- Cleland, P.J.; Appleby, G.J.; Rattigan, S. and Clark, M.G. (1989)** Exercise-induced translocation of protein kinase C and production of diacylglycerol and phosphatidic acid in rat skeletal muscle in vivo. Relationship to changes in glucose transport. *J. Biol. Chem.* 264, 17704-17711.
- Conjard, A. and Pette, D. (1999)** Phosphocreatine as a marker of contractile activity in single muscle fibres. *Pflügers Archive.* 438, 278-282.
- Crabtree, B. and Newsholme, E.A. (1975)** Insect muscle. *Academic Press, London, New York.* (Usherwood, P.N.R. ed.) pp 405-500
- Cross, D.A.; Alessi, D.R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995)** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378(6559), 785-789.

D

- Darville, M.I.; Crepin, K.M.; Hue, L. and Rousseau, G.G. (1989)** 5' flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6543-6547.
- Darville, M.I.; Chikri, M.; Lebeau, E.; Hue, L. and Rousseau, G.G. (1991)** A rat gene encoding heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Letters* 288, 91-94.
- Darville, M.I.; Antonie, I.V.; and Rousseau, G.G. (1993)** Characterization of an enhancer upstream from the muscle-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Nucleic Acid* 20, 3575-3583.
- Darville, M.I.; Antonie, I.V.; Mertens-Strijthagen, J.R.; Dupriez, V.J. and Rousseau, G.G. (1995)** An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis. *Oncogene* 11(8), 1509-1517.
- Daugaard, J.R.; Nielsen, J.N.; Kristiansen, S.; Andersen, J.L.; Hargreaves, M. and Richter, E.A. (2000)** Fiber type-specific expression of GLUT4 in human skeletal muscle: influence of exercise training. *Diabetes* 49, 1092-1095.
- De Los Pinos, E.; Fernández de Mattos, S.; Joaquin, M. and Tauler, A. (2001)** Insulin inhibits glucocorticoid-stimulated L-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Biochem. J.* 353, 267-273
- Derave, W.; Lund, S.; Holman, G.D.; Wojtaszewski, J.; Pedersen, O. and Richter, E.A. (2000a)** Contraction-stimulated muscle glucose transport and GLUT4 surface content are dependent on glycogen content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277, E1103-E1110.
- Derave, W.; Ai, H.; Ihlemann, J.; Witters, L.A.; Kristiansen, S.; Richter, E.A. and Ploug, T. (2000b)** Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes* 49, 1281-1287.
- Depré, C.; Rider, M.H. and Hue, L. (1998)** Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* 258, 277-290.
- Deprez, J.; Vertommen, D.; Alessi, D.R.; Hue, L. and Rider, M.H. (1997)** Phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 272, 17269-17275.
- Deprez, J.; Bertrand, L.; Alessi, D.R.; Krause, U.; Hue, L. and Rider, M.H. (2000)** Partial purification and characterization of a wortmannin-sensitive and insulin-stimulated protein kinase that activates heart 6-phosphofructo-2-kinase. *Biochem. J.* 347, 305-312.
- Dickens, M.; Svitek, A.C.; Culbert, A.A.; O'Brien, M.R. and Tavaré, M.J. (1998)** Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* 273, 20144-20149.
- Douen, A.G.; Ramlal, T.; Rastogi, S.; Bilan, P.J.; Cartee, G.D.; Vranic, M.; Holloszy, J.O. and Klip, A. (1990)** Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265(23), 13427-13430.
- Dubouchaud, H.; Butterfield, G. E.; Wolfel, E.E.; Bergman, B.C. and Brooks, G.A. (2000)** Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinol. Metab.* 278, E571-E579.
- Dudley, G.A. and Terjung, R.L. (1985)** Influence of aerobic metabolism on IMP accumulation in fast-twitch muscle. *Am. J. Physiol.* 248, C37-C42.

- Dunaway,G.A.; Kasten,T.P.; Nickols,G.A. and Chesky,J.A. (1986a)** Regulation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase during aging and development. *Mechanisms of Ageing and development*. 36, 13-26.
- Dunaway,G.A.; Kasten,T.P. and Kolm,P. (1986b)** Alteration of 6-phosphofructo-1-kinase isozyme pools during heart development and aging. *J. Biol. Chem.* 261, 17170-17173.
- Dunaway,G.A.; and Kasten,T.P. (1989)** Physiological relevance of the changing subunit composition and regulatory properties of the 6-phosphofructo-1-kinase isozyme pools during heart and muscle development. *Mol. Cell. Biochem.* 87, 71-77.
- Dupriez,V.J.; Darville,M.I.; Antonie,I.V.; Gegonne,A.; Ghysdael,J. and Rousseau,G.G. (1993)** Characterization of a hepatoma mRNA transcribed from a third promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-encoding gene and controlled by ets oncogene-related products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90,8224-8228.

E

- Eccles, J.C.; Gutman, E. and Hink, P. (1963)** The effects of use and disuse on neuromuscular functions. (Eds) *Prague: Cze. Acad. Of Sci.* pp.111-128.
- Edwards,R.H. (1981)** Human muscle function and fatigue. *Ciba Found Symp.* 82, 1-18.
- El-Maghrabi,M.R.; Claus,T.H.; Pilkis,J. and Pilkis,S.J. (1982)** Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79(2), 315-319.
- El-Maghrabi,M.R.; Correia,J.J.; Heil,P.; Pate,T.; Cobb,C. and Pilkis,S.J. (1986)** Tissue distribution, immunoreactivity and physical properties of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5005-5009.
- Eyer,P. Hofer,H.W.; Krystek,E. and Pette,D. (1971)** Synthesis of glucose 1,6-bisphosphate by the action of crystalline rabbit muscle phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 20(2), 153-159.

F

- Fisher,J.S.; Nolte,L.A.; Kawanaka,K.; Han,D.H.; Jones,T.E. and Holloszy,J.O. (2002)** Glucose transport rate and glycogen synthase activity both limit skeletal muscle glycogen accumulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282(6), E1214-E1221.
- Flecknell,P.A. (1987)** In: *Laboratory Animal Anaesthesia. An introduction for research workers and technicians.* Academic Press Limited, London.
- Frank,S.K. and Fromm,H.J. (1982)** Effect of streptozotocin-induced diabetes on the turnover of hexokinase II in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 379-384.
- French,T.J.; Holness,M.J.; MacLennan,P.A. and Sugden,M.C. (1988)** Effects of nutritional status and acute variation in substrate supply on cardiac and skeletal-muscle fructose 2,6-bisphosphate concentrations. *Biochem. J.* 250(3), 773-779.
- Frías,J.A.; Cadefau,J.A.; Prats,C.; Morán,M.; Megías,A. and Cussó,R. (2005)** Disturbances of the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system in 24-h electrostimulated fast-twitch skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 1668, 64-74.
- Fryer,L.G.; Hajdуч,E.; Rencurel,F.; Salt,I.P.; Hundal,H.S.; Hardie,D.G. and Carling,D. (2000)** Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes*, 49, 1978-1985.

Furst,D.; Winkemeir,O. and Weber,K. (1992) Mammalian skeletal muscle protein C: purification from bovine muscle, binding to titin and the characterization of a full length human c-DNA. *J.Cell.Sci.* 102, 769-78.

G

Geeves,M.A. and Lehrer,S.S. (1994) Dynamics of the muscle thin filament regulatory switch: the size of the cooperative unit. *Biophys.J.* 67, 273-82.

Giulietti,A.; Overbergh,L.; Valckx,D.; Decallomme,R.; Boullion,R. and Mathieu,C. (2001) An overview of Real-Time quantitative PCR: Applications of quantify cytokine gene expression. *Methods* 25: 386-401.

Green, H.J.; (1990) Manifestations and sites of neuromuscular fatigue. *Biochem. Exerc.* VII(21),13-25.

Green, H.J.; Cadefau, J.; Pette, D. (1991) Altered glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-biphosphate levels in low-frequency stimulated rabbit fast-twitch muscle. *FEBS Lett.*, 282(1): 107-109.

Green,H.J.; Ball-Burnett,M.; Chin,E.R.; Dux,L. and Pette,D. (1992) Time-dependent increases in Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase content of low-frequency-stimulated rabbit muscle. *FEBS Letters* 310(2), 129-131.

Grossbard,L. and Schemike,R.T. (1966) Multiple hexokinases of rat tissues. *J. Biol. Chem.* 241(15), 3546-3560.

Guha,S.K. and Rose,Z.B. (1982) Brain glucose bisphosphate requires inosin monophosphate. *J. Biol. Chem.* 257, 6634-6637.

H

Hamilton,J.A.; Callaghan,M.J.; Sutherland,R.L. and Watts,C.K. (1997) identification of PRG1, a novel progestin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Mol. Endocrinol.* 11,490-502.

Hardie,D.G.; Carling,D. and Carlson,M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev.Biochem.* 67: 821-855.

Harris,R.C.; Hultman,E. and Nordesjo,L.O. (1974) Glycolytic intermediates and high energy phosphates determined in biopsy samples of musculus femoris of man at rest. Methods and variance of values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 33, 102-120.

Hasemann,C.A.; Istvan,E.S.; Uyeda,K. and Deisenhofer,J. (1996) The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase reveals distinct domain homologies. *Structure* 4, 1017-1029.

Hayashi,T.; Hirshman,M.F.; Kurth,E.J.; Winder,W.W. and Goodyear,L.J.. (1998) Evidence for 5'AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47, 1369-1373.

Heine-Suñer,D.; Díaz-Guillén,M.A.; Lange,A.L. and Rodríguez de Córdoba (1998) Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2) *Eur. J. Biochem.* 254, 103-110.

Hennig,R. and Lømo,T. (1985a) Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature*, 314: 164-166.

- Henriksson,J.; Chi,M.M.-Y.; Hintz,C.S.; Young,D.A.; Kaiser,K.K.; Salmons,S. and Lowry,O.H. (1986)** Chronic stimulation of mammalian muscle: changes in enzyme of six metabolic pathways. *Am. J. Physiol.* 251, C614-C632.
- Hermansen,L. (1981)** Effect of metabolic changes on force generation in skeletal muscle during maximal exercise. *Ciba Found Symp.* 82, 75-88.
- Hers,H. and Hue,L. (1983)** Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 617-653. *Review.*
- Higaki,Y.; Hirshman,M.F.; Fujii,N. and Goodyear,L.J. (2001)** Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes* 50(2), 241-247.
- Hirano,K.; Hirano,M. and Kanaide,H. (2004)** Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *J. Smooth Muscle Res.* 40(6), 219-236.
- Hofmann,S. and Pette,D. (1994)** Low-frequency stimulation of rat fast-twitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose transporter 4 (GLUT4). *Eur. J. Biochem.* 219, 307-315.
- Holloszy,J.O.; Constable,S.H. and Young,D.A. (1986)** Activation of glucose transport in muscle by exercise. *Diabetes Metab. Rev.* 1(4), 409-423.
- Horton,W.; Miyashita,T.; Kohno,K.; Hassel,J.R. and Yamada,Y. (1987)** Identification of a phenotype-specific enhancer in the first intron of the rat collagen II gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(24), 8864-8868.
- Hue,L. (1981a)** The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 52, 247-331. *Review.*
- Hue,L.; Blackmore,P.F. and Exton,J.H. (1981b)** Fructose 2,6-bisphosphate. Hormonal regulation and mechanism of its formation in liver. *J. Biol. Chem.* 256(17), 8900-8903.
- Hue,L.; Blackmore,P.F.; Shikama,H.; Robinson-Steiner,A. and Exton,J.H. (1982)** Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts, and perfused hindlimbs *J. Biol. Chem.* 257(8), 4308-4313.
- Hue,L. and Rider,M.H. (1987)** Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* 245, 313-323. *Review.*
- Hue,L.; Beauloye,C.; Marsin,A.S.; Bertrand,L.; Horman,S. and Rider,M.H. (2002)** Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1091-1097.
- Hundal,H.S.; Ahmed,A.; Gumà,A.; Mitsumoto,Y.; Marette,A.; Rennie,M.J. and Klip,A. (1992)** Biochemical and immunocytochemical localización of the Glut5 glucose transporter in human skeletal muscle. *Biochem. J.* 286, 339-343.
- Hundal,H.S.; Darakshsan,F.; Kristiansen,S.; Blakemore,S.J. and Richter,E.A. (1998)** Glut5 expression and fructose transport in human skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441, 35-45.
- Hultman,E. and Sjöholm (1983)** Electromyogram, force and relaxation time during and after continuous electrical stimulation of human skeletal muscle in situ. *J. Physiol.* 339: 33-40.
- Hutber,C.; Hardie,D.G. and Winder,W.W. (1997)** Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase. *Am. J. Physiol.* 272, E262-E266.

I

- Ihleman, J.; Galbo, H. and Ploug, T. (1999a)** Calphostin C is an inhibitor of contraction, but no insulin-stimulated glucose transport, in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 167, 69-75.
- Ihleman, J.; Ploug, T.; Hellsten, Y. and Galbo, H. (1999b)** Effect of tension on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 277: E208-E214.
- Ihleman, J.; Ploug, T.; Hellsten, Y. and Galbo, H. (2000)** Effect of stimulation frequency on contraction-induced glucose transport in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 279: E862-E867.

J

- Joaquin, M.; Salvado, C.; Bellosillo, B.; Lange, A.J.; Gil, J. and Tauler, A. (1997a)** Effect of growth factors on the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 2846-2851.
- Joaquin, M.; Rosa, J.L.; Bartrons, R.; Tauler, A. (1997b)** Expression of the F-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA during liver regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1334, 256-260.
- Jorgensen, S.B.; Viollet, B.; Andreelli, F.; Frosing, C.; Birk, J.B.; Schjerling, P.; Vaulont, S.; Richter, E.A. and Wojtaszewski, J.F.P. (2004)** Knockout of the alpha2 but not alpha 1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 279, 1070-1079.

K

- Kasten, T.P. and Dunaway, G.A. (1993)** Fructose-2,6-bisphosphate: changes during neonatal maturation and aging of rat and potential role in regulation of glucose utilization. *Mechanisms of Ageing and development* 68, 37-45.
- Katz, A.; Sahlin, K. and Henriksson, J. (1986)** Muscle ATP turnover rate during isometric contraction in humans. *J Appl Physiol.* 60(6):1839-1842.
- Katz, A. and Sahlin, K. (1988)** Regulation of lactic acid production during exercise. *J. Appl. Physiol.* 65(2), 509-18. *Review*
- Katzen, H.M. and Schimke, R.T. (1965)** Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54(4), 1218-1225.
- Kessler, R. and Eschrich, K. (2001)** Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Mol. Brain Res.* 87, 190-195.
- Kitamura, K. and Uyeda, K. (1987)** The mechanism of activation of heart fructose-6-phosphate, 2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 262, 679-681.
- Kitamura, K.; Uyeda, K. Kangawa, K.; Matsuo, H. (1989)** Purification and characterization of rat skeletal muscle fructose-6-phosphate, 2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 264, 9799-9806.
- Klip, A. and Paquet, M.R. (1990)** Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 13(3), 228-43. *Review*

- Kojima,H.; Ishijima,A. and Yanagida,T. (1994)** Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12962-66.
- Kountz,P.D.; El-Maghrabi,M.R. and Pilkis,S.J. (1985)** Isolation and characterization of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from bovine liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 238(2), 531-543.
- Koval,J.A.; DeFronzo,R.A.; O'Doherty,R.M.; Printz,R.; Ardehali,H.; Granner,D.K. and Mandarino,L.J. (1998)** Regulation of hexokinase II activity and expression in human muscle by moderate exercise. *Am. J. Physiol.* 274, E304-E308.
- Kraft, T.; Hornemann,T.; Stolz,M.; Nier,V. and Wallimann,T. (2000)** Coupling of creatine kinase to glycolytic enzymes at the sarcomeric I-band of skeletal muscle: biochemical study in situ. *J. Muscle Research and Cell Motility* 21(7), 691-703.
- Krause,U. and Wegener,G. (1996)** Control of adenine nucleotide metabolism and glycolysis in vertebrate skeletal muscle during exercise. *Experientia* 52(5), 396-403.
- Krause,U. and Wegener,G. (1996b)** Control of glycolysis in vertebrate skeletal muscle during exercise. *Am. J. Physiol.* 270, R821-R829.
- Kristiansen,S.; Nielsen,J.N.; Bourgoïn,S.; Klip,A.; Franco,M. and Richter,E.A. (2001)** GLUT4 translocation in skeletal muscle studied with a cell-free assay: involvement of phospholipase D. *Am. J. Physiol.* 281(3), E608-E618.
- Kugelberg,E. and Edström,L. (1968)** Differential histochemical effects of muscle contractions on phosphorylase and glycogen in various types of fibres: relation to fatigue. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* 31(5): 415-23.
- Kurland,I.; El-Maghrabi,M.R.; Correia,J. and Pilkis,S.J. (1992)** Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Properties of phospho- and dephospho-forms and of two mutants in which Ser32 has been changed by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 4416-4423.
- Kurth-Kraczek,E.J.; Hirshman,M.F.; Goodyear,L.J. and Winder,W.W. (1999)** 5'AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48, 1667-1671.
- Kuwajima,M. and Uyeda,K. (1982)** The tissue distribution of fructose-2,6-P₂ and fructose-6-P,2-kinase in rats and effect of starvation, diabetes and hypoglycemia on hepatic fructose-2,6-P₂ and fructose-6-P,2-kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 104(1), 84-88.

L

- Labeit,S. and Kolmerer,B. (1995)** Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 270, 293-96.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259): 680-5.
- Lange,A.J.; Espinet,C.; Hall,R.; El-Maghrabi,M.R.; Vargas,A.M.; Miksicek,R.J.; Granner,D.K. and Pilkis,S.J. (1992)** Regulation of gene expression of rat skeletal muscle/liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: isolation and characterization of a glucocorticoid response element in the first intron of the gene. *J. Biol. Chem.* 267, 15673-15680.
- Lamb,G.D. (2002)** Excitation-contraction coupling and fatigue mechanisms in skeletal muscle: studies with mechanically skinned fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 23(1), 81-91. *Review.*
- Lawrence,J.C.Jr and Roach,P.J. (1997)** New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* 46, 541-547.

- Leeuw,T. and Pette,D. (1993)** Coordinate changes in the expression of troponin subunit and myosin heavy chain isoforms during fast-to slow transition of low-frequency stimulated rabbit muscle. *Eur.J.Appl.Physiol.* 213, 1039-46.
- Lin,K.; Kurland,I.J.; Li,L.; Lee,Y.H.; Okar,D.; Marecek,J.F., and Pilkis,S.J. (1994)** Evidence for NH₂- and COOH-terminal interactions in rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 269(24), 16953-16960.
- Lømo,T.; Massoulié,J. and Vigny,M. (1985)** Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms. *The Journal of Neuroscience* 5(5), 1180-1187.
- Lømo,T. (2003)** What controls the position, number, size, and distribution of neuromuscular junctions on rat muscle fibers? *Journal of Neurocytology* 32, 835-848.
- Lowry,O.H. and Passonneau,J.V. (1972)** A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York, London.
- Lowenstein,J.M. (1972)** Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol. Rev.* 52, 382-414.
- Lund,S.; Holman,G.D.; Schmitz,O. and Pedersen,O. (1995)** Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92, 5817-5821.

M

- Maier,A.; Gambke,B. and Pette,D. (1986)** Degeneration-regeneration as a mechanism contributing to the fast to slow conversion of chronically stimulated fast-twitch rabbit muscle. *Cell Tissue Res* 244: 635-643.
- Mandarino,L.J.; Printz,R.L.; Cusi,K.A.; Kinchington,P.; O'Doherty,R.M.; Osawa,H.; Sewell,C.; Consoli,A.; Granner,D.K. and DeFronzo,R.A. (1995)** Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. *Am. J. Physiol.* 269, E701-E708.
- Manzano,A; Perez,J.Z.; Nadal,M.; Estivill,X. Lange,A. and Bartrons,R. (1999)** Cloning, expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Gene* 229, 83-89.
- Marsin,A.S.; Bouzin,C.; Bertrand,L. and Hue,L. (2002)** The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 30778-30783.
- Matsushita,S.; Dux,L. and Pette,D. (1991)** Separation of active and inactive (nonphosphorylating) Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum subfractions from low-frequency-stimulated rabbit muscle. *FEBS Letters* 294, 203-206.
- Mentón,I.; Caseras,A.; Fernández,F. and Baanante,I.V. (1999)** Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *Biochemica et Biophysica Acta* 1491, 220-228
- Millevoi,S.; Trombitas,K.; Kolmerer,B.; Kostin,S.; Schaper,J.; Pelin,K.; Granzier,H. and Labeit,S. (1998)** Characterization of nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. *J.Mol.Biol.* 282, 111-23.
- Minatogawa,Y. and Hue,L. (1984)** Fructose 2,6-bisphosphate in rat skeletal muscle during contraction. *Biochem J.* 223, 73-79.

Mu,J.; Brozinick,J.T.Jr.; Valladares,O.; Bucan,M. and Birnbaum,M.J. (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Molecular Cell* 7, 1085-1094.

Musi,N.; Hayashi,T.; Fujii,N.; Hirshman,M.F.; Witters,L.A. and Goodyear,L.J. (2001) AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 280(5), E677-84.

Mutch,B.J.C. and Banister,E.W. (1983) Ammonia metabolism in exercise and fatigue: a review. *Med. Sci. Sports Exer.* 15, 41-50.

N

Navarro-Sabaté,A.; Manzano,A; Riera,L.; Rosa,J.L.; Ventura,F. and Bartrons,R. (2001) The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* 264, 131-138.

Newsholme,E.A. and Start,C. (1974) Regulation in metabolism. *Wiley, London.*

Nesher,R.; Karl,I.E. and Kipnis,D.M. (1985) Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am. J. Physiol.* 249, C226-C232.

Nielsen,J.N.; Frosing,C.; Sajan,M.P.; Miura,A.; Standaert,M.L.; Graham,D.A.; Wojtaszewski,J.F.P.; Farese,R.V. and Richter,E.A. (2003) Increased atypical PKC activity in endurance-trained human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1147-1153.

Nishizuka,Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.

Noda,L. (1958) Adenosine triphosphate-adenosine monophosphate transphosphorylase. III. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 232(1), 237-250.

O

Obach, M.; Navarro-Sabaté,A.; Caro,J.; Kong,X.; Duran,J.; Fómez,M.; Perales,J.C.; Ventura,F.; Rosa,J.L. and Bartrons,R. (2004) 6-phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains Hypoxia-inducible Factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 279(51):53562-70.

O'Doherty,R.M.; Bracy,D.P.; Granner,D.K. and Wasserman,D.H. (1996) Transcription of the rat skeletal muscle hexokinase II gene is increased by acute exercise. *J. Apply Physiol.* 81, 789-793.

Ohlendieck,K.; Briggs,F.N.; Lee,K.F.; Wechsler,A.W. and Campbell,K.P. (1991) Analysis of excitation-contraction-coupling components in chronically stimulated canine skeletal muscle. *Eur.J.Biochem.* 202, 739-747.

Ohlendieck,K.; Murray,B.E.; Froemming,G.R.; Maguire,P.B.; Leisner,E.; Traub,I. and Pette,D. (1999) Effects of chronic low-frequency stimulation on Ca²⁺-regulatory membrane proteins in rabbit fast muscle. *Pflügers Arch* 438, 700-708.

Okagaki,T.; Weber,F.E.; Fischman,D.A.; Vaughan,K.T.; Mikawa,T. and Reinach,F.C. (1993) The major myosin binding domain of skeletal muscle MYBP-C (C-protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif. *J.Cell.Biol.* 123, 619-26.

Okamura,N. and Sakakibara,R. (1998) A common phosphorylation site for cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C in human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2039-2042.

Okar,D.A.; Manzano,A.; Navarro-Sabatè,A.; Riera,L. Bartrons,R. and Lange,A.J. (2001) PFK-2/FBPase-2: marker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences* 26(1), 30-35.

P

Parreño,M; Pol,A; Cadefau,J.A.; Parra,J.; Alvarez,L.; Membrilla,E. and Cussó,R. (2001) Changes of skeletal muscle proteases activities during a chronic low-frequency stimulation period. *Plügers Arch.* 442(5), 745-51.

Parra,J. and Pette,D. (1995) Effects of low-frequency stimulation on soluble and structure-bound activities of hexokinase and phosphofructokinase in rat fast-twitch muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1251(2), 154-60.

Passonneau,J.V.; Lowry,O.H.; Schulz,D.W. and Brown J.G. (1969) Glucose 1,6-diphosphate formation by phosphoglucomutase in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 244(3), 902-909.

Perrini,S.; Henriksson,J.; Zierath,Z.R. and Widegren,U. (2004) Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. *Diabetes* 53, 21-24.

Perry,S.V. (1998) Troponin T: genetics, properties and function. *J.Muscle Res.Cell Motil.* 19, 575-602.

Peter,J.B.; Barnard,R.J.; Edgerton,V.R.; Gillespie,C.A. and Stempel,K.E. (1972) Metabolic profiles of three fiber of skeletal muscle in guinea pigs and rabbit. *Biochemistry* 11, 2627-2633.

Pette,D. and Staron,R. S. (1997) Mammalian skeletal muscle fibre type transition. *Int.Rev.Cytol.* 170, 143-223.

Pette,D. and Vrbová,G. (1985) Invited review: neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. Review. *Muscle and Nerve* 8, 676-689.

Pierreux,C.E.; Stafford,J.; Demonte,D.; Scott,D.K.; Vandenhaute,J.; O'Brien,R.M.; Granner,D.K. Rousseau,G.G. and Lemaigre,F.P. (1999) Antiglucocorticoid activity of hepatocyte nuclear factor-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 8961-8966.

Pilkis,S.J.; El-Maghrabi,M.R.; Pilkis,J.; Claus,T.H. and Cumming,D.A. (1981a) Fructose-2,6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase. *J.Biol. Chem.* 256, 3171-3174.

Pilkis,S.J.; El-Maghrabi,M.R.; Pilkis,J. and Claus,T.H. (1981b) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 256, 3619-3622.

Pilkis,S.J.; Claus,T.H.; Kurland,I.J. and Lange,A.J. (1995) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 799-835. Review

Ploug,T.; Galbo,H.; Vinten,J.; Jorgensen,M. and Richter,E.A. (1987) Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *Am. J. Physiol.* 253, E12-E20.

Ploug,T.; van Deurs,B.; Ai,H.; Cushman,S.W. and Ralston,E. (1998) Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J. Cell Biol.* 142(6), 1429-46.

Prats,C.; Bernal,C.; Cadefau,J.A.; Frías,J.A.; Tibolla,M. and Cussó,R. (2002) Glycogen depletion and resynthesis during 14 days of chronic low-frequency stimulation of rabbit muscle. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1573, 68-74.

Prats,C. (2002b) Estudi del metabolisme del glicogen durant el treball muscular. *Tesi doctoral*

R

- Rakus,D.; Pasek,M.; Krotkiewski,A. and Dzugaaj,A. (2003)** Muscle FBPase in complex with muscle aldolase is insensitive to AMP inhibition. *FEBS Letters* 547,11-14.
- Ramaiah,A. (1976)** Regulation of glycolysis in skeletal muscle. *Life Sci* 19,455-466.
- Richter,E.A.; Garetto,L.P.; Goodman,M.N. and Ruderman,N.B. (1982)** Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. *J. Clin. Invest.* 69(4), 785-793.
- Richter,E.A.; Cleland,P.J.; Rattigan,S. and Clark,M.G. (1987)** Contraction associated translocation of protein kinase C in rat skeletal muscle. *FEBS Letters* 277, 232-236.
- Rider,M.H. and Hue,L. (1984)** Activation of rat heart phosphofructokinase-2 by insulin *in vivo*. *FEBS Letters* 176, 484-488.
- Rider,M.H.; Foret,D. and Hue,L. (1985)** Comparison of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo-2-kinase. Evidences for distinct isozymes. *Biochem. J.* 231(1), 193-196.
- Rider,M.H. and Hue,L. (1986a)** *Biochem. Soc. Trans.* 14, 321-322.
- Rider,M.H. and Hue,L. (1986b)** Phosphorylation of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase C and comparison of the fructose-2,6-bisphosphatase activity of these two enzymes. *Biochem. J.* 240, 57-61.
- Rider,M.H.; VanDame,J.;Lebeau,E.; Vertommen,D.; Vidal,H.; Rousseau,G.G.; Vandekerckhove,J. and Hue,L. (1992a)** The two forms of bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase result from alternative splicing. *Biochem. J.* 285, 405-411.
- Rider,M.H.; Van Dame,J.; Vertommen,D.; Michel,D.; Vandekerckhove,J. and Hue,L. (1992b)** Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Letters* 310, 139-142.
- Rider,M.H.; Bertrand,L.; Vertommen,D.; Michels,P.A.; Rousseau,G.G. and Hue,L. (2004)** 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem. J.* 381, 561-579. Review
- Riera,L.; Manzano,A.; Navarro- Sabaté,A.; Perales,J.C. and Bartrons,R. (2002)** Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1589, 89-92.
- Riera,L.; Obach,M.; Navarro-Sabaté,A.; Duran,J.; Perales,J.C.; Viñals,F.; Rosa,J.L.; Ventura,F. and Bartrons,R. (2003)** Regulation of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway during myogenic C2C12 cell differentiation. *FEBS Letters* 550, 23-29.
- Roberts,C.K.; Barnard,R.J.; Jasman,A. and Balon,T.W. (1999)** Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 277, E390-E394.
- Rose,A.J. and Hargreaves,M. (2003)** Exercise increases Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II activity in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 553, 303-309.
- Rose,A.J.; Mitchell,B.J.; Kemp,B.E. and Hargreaves,M. (2004)** Effect of exercise on protein kinase C activity and localization in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 561, 861-870.
- Rose,A.J. and Richter,E.A. (2005)** Skeletal muscle glucose uptake during exercise: How is it regulated? *Physiology* 20, 260-270. Review

Ryder, J.W.; Kawano, Y.; Galuska, D.; Fahlman, R.; Wallberg-Henriksson, H.; Charron, M.J. and Zierath, J.R. (1999) Postexercise glucose up take and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4-deficient mice. *FASEB J.*, 13, 2246-2256.

S

Sahlin, K.; Harris, R.C. and Hultman, E. (1975) Creatine kinase equilibrium and lactate content compared with muscle pH in tissue samples obtained after isometric exercise. *Biochem. J.* 152, 173-180.

Sahlin, K. and Katz, A. (1988) Purine nucleotide metabolism. *Med. Sports Sci.* 27, 120-139.

Sahlin, K.; Katz, A. and Broberg, S. (1990) Tricarboxylic acid cycle intermediates in human muscle during prolonged exercise. *Am J Physiol* 259, C834-C841.

Sakai, A. Kato, M.; Fukasawa, M.; Ishiguro, M.; Furuya, E. and Sakakibara, R. (1996) Cloning of cDNA encoding for a novel isozyme of fructose 6-phosphate, 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from human placenta. *J. Biochem.* 119, 506-511.

Sakata, J.S. and Uyeda, K. (1990) Bovine heart fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(13), 4951-4955.

Sakata, J.; Abe, Y. and Uyeda, K. (1991) Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate, 2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 266, 15764-15770.

Sakakibara, R.; Kato, M.; Okamura, N.; Nakagawa, T.; Komada, Y.; Tominaga, N.; Shimojo, M. and Fukasawa, M. (1997) Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 122-128.

Salmons, S. and Vrbová, G. (1969) The influence of activity on some contractile characteristics of mammalian fast and slow muscles. *J. Physiol.* 201, 535-549.

Santalucia, T.; Camps, M.; Castelló, A.; Munoz, P.; Nuel, A.; Testar, X.; Palacin, M. and Zorzano, A. (1992) Developmental regulation of GLUT1 (erythroid/Hep G2) and GLUT4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology* 130, 837-846.

Scholnick, D.A. and Gleeson, T.T. (1996) Regulation of skeletal muscle metabolism in the lizard *Dipsosaurus dorsalis* by fructose-2,6-bisphosphate. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 2), R1447-1451.

Schuler, M. and Pette, D. (1996) Fiber transformation and replacement in low-frequency stimulated rabbit fast-twitch muscles. *Cell & Tissue Research* 285, 297-303.

Schwarz, G.; Leisner, E. and Pette, D. (1983) Two telestimulation system for chronic indirect muscle stimulation in caged rabbits and mice. *Pflügers Arch.* 398, 130-133.

Serrano, A.L., Quiroz-Rothe, E., and Rivero, J.-L.L. (2000) Early and long-term changes of equine skeletal muscle in response to endurance training and detraining. *Pflügers Archive - Eur. J. Physiol.* 441, 263-74.

Serresse, O.; Lortie, G.; Bouchard, C. and Boulay, M.R. (1988) Estimation of the contribution of the various energy systems during maximal work of short duration. *Int. J. Sports Med.* 9, 456-460.

Shulman, G.I.; Rothman, D.L.; Jue, T.; Stein, P.; DeFronzo, R.A. and Shulman, R.G. (1990) Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N. Engl. J. Med.* 322, 223-228.

- Simoneau, J.A. and Pette, D. (1990)** Species-specific responses of muscle lactate dehydrogenase isoenzymes to increased contractile activity. *Pflügers Arch.* 413, 679-681.
- Skalecki, K.; Mularczyk, W. and Dzugaj, A. (1995)** Kinetic properties of D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase isolated from human muscle. *Biochem. J.* 310, 1029-1035.
- Slater, E.P.; Rabenau, O.; Karin, M. Baxter, J.D. and Beato, M. (1985)** Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 5(11), 2984-2992.
- Solaro, R.J. and Rarick, H.M. (1998)** Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac filaments. *Circ.Res.* 83, 471-80.
- Sols, A. (1981)** Multimodulation of enzyme activity. *Curr. Top. Cell Regul.* 19, 77-101. *Review*
- Spitz, F.; De Vasconcelos, Z.A.; Chatelet, F.; Demignon, J.; Kahn, A.; Mira, J.C.; Maire, P. and Daegelen, D. (1998)** Proximal sequences of the aldolase A fast muscle-specific promoter direct nerve- and activity-dependent expression in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 273(24), 14975-14981.
- Storey, K.B. (1983)** Regulation of cockroach flight muscle phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate. Role in the activation of muscle metabolism during flight. *FEBS Letters* 161(2), 265-268.
- Sugden, P.H. and Newsholme, E. (1975)** The effects of ammonia, inorganic phosphate and potassium ions on the activity of phosphofructokinases from muscle and nervous tissues of vertebrates and invertebrates. *Biochem.J.* 150, 113-122.
- Summers, S.A.; Kao, A.W.; Kohn, A.D.; Backus, G.S.; Roth, R.A.; Pessin, J.E. and Birnbaum, M.J. (1974)** The role of glycogen synthase kinase 3 β in insulin-stimulated glucose metabolism. *J Biol Chem.* 274(25), 17934-17940.

T

- Tang, W.; Sencer, S. and Hamilton, S.L. (2002)** Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front. Biosci.* 7, d1583-d1589.
- Taniyama, M.; Kitmura, K.; Thomas, H.; Lawson, J.W.R. and Uyeda, K. (1988)** Isozymes of fructose 6-phosphate-2,6-bisphosphatase in rat and bovine heart, liver, and skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical research communications* 157(3), 949-954.
- Tesch, P.A. and Karlsson, J. (1985)** Muscle fiber types and size in trained and untrained muscle of elite athletes. *J. Appl. Physiol.* 59, 1716-1720.
- Tsuchiya, Y. and Uyeda, K. (1994)** Bovine heart fructose 6-P,2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase mRNA and gene structure. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 467-474.

U

- Uyeda, K.; Furuya, E. and Luby, L.J. (1981)** The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J.Biol. Chem.* 256, 8394-8399.

V

- Vandoolaeghe,P and Rousseau,G.G. (1997)** C/EBP binds over the TATA box and can activate the M promoter of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 247-250.
- van Schaftingen,E.; Hue,L. and Hers,H.G. (1980a)** Study of the fructose-6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in the liver in vivo. *Biochem.J.* 192, 263-271.
- van Schaftingen,E.; Hue,L. and Hers,H.G. (1980b)** Control of the fructose-6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of a low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase. *Biochem.J.* 192, 887-895.
- van Schaftingen,E.; Hue,L. and Hers,H.G. (1980c)** Fructose 2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochem.J.* 192, 897-901.
- van Schaftingen,E. and Hers,H.G. (1980d)** Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase, most likely fructose 2,6-bisphosphate, from phosphoric acid and fructose 6-phosphoric acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1524-1531.
- vanSchaftingen,E.; Jett,M.F.; Hue,L. and Hers,H.G. (1981a)** Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose-2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3483-3486.
- vanSchaftingen,E. and Hers,H.G. (1981b)** Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2861-2863.
- vanSchaftingen,E. Davies,D.R. and Hers,H.G. (1981c)** Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 362-368.
- van Schaftingen,E.; Lederer,E.; Bartrons,R. and Hers,H.G. (1982)** A kinetic study of pyrophosphate: fructose-2,6-bisphosphate from potato tubers. *Eur. J. Biochem.* 129, 191-195.
- van Schaftingen (1987)** Fructose-2,6-bisphosphate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 59, 315-395.
- Ventura,F.; Rosa,J.L.; Ambrosio,S.; Pilkis,S.J. and Bartrons,R. (1992)** Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Evidence for a neural-specific isozyme. *J. Biol. Chem.* 267(25), 17939-17943.
- Ventura,F.; Ambrosio,S.; Bartrons,R.; El-Maghrabi,M.R.; Lange,A.J. and Pilkis, S.J. (1995)** Cloning and expression of a catalytic core bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 1140-1148.
- Villar-Palasi,C. and Laner,J. (1960)** Insulin-mediated effect on the activity of UDPG-glycogen transglucosylase of muscle. *Biochem Biophys Acta*, 39, 171-173.
- Vogt,C.; Yki-Jarvinen,H.; Iozzo,P.; Pipek,R.; Pendergrass,M.; Koval,J.; Ardehali,H.; Printz,R.; Granner,D.; DeFronzo,R. and Mandarino,L. (1998)** Effects of insulin on subcellular localization of hexokinase II in human skeletal muscle in vivo. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 83, 230-234.
- Vollestad,N.J. and Sejersted,O.M. (1988)** Biochemical correlates of fatigue. *Eur. J. Appl. Physiol.* 57, 336-347.

W

- Wang,C. and Hu,S.M. (1991)** Developmental regulation in the expression of rat heart glucose transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 1095-1100.
- Watanabe,F. and Furuya,E. (1999)** Tissue-specific alternative splicing of rat brain fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphate. *FEBS Letters* 458, 304-308.

- Weber,F.E. and Pette,D. (1988)** Contractile activity enhances the synthesis of hexokinase II in rat skeletal muscle. *FEBS Letters* 238, 71-73.
- Weber,F.E. and Pette,D. (1990a)** Rapid up- and down-regulation of hexokinase II in rat skeletal muscle in response to altered contractile activity. *FEBS Letters* 261, 291-293.
- Weber,F.E. and Pette,D. (1990b)** Changes in free and bound forms and total amount of hexokinase isozyme II of rat muscle in response to contractile activity. *Eur.J.Biochem.* 191, 85-90.
- Wegener,G.; Krause,U. and Thuy,M. (1990)** Fructose 2,6-bisphosphate and glycolytic flux in skeletal muscle of swimming frog. *FEBS Letters* 267, 257-260.
- Wegener,G. and Krause,U. (2002)** Different modes of activating phosphofructokinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, in working vertebrate muscle. *Biochemical Society Transactions* 30 (2), 264-270.
- Westerblad,H.; Allen,D.G.; Bruton,J.D.; Andrade,F.H. and Lannergren,J. (1998)** Mechanisms underlying the reduction of isometric force in skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol Scand.* 162(3), 253-260. *Review.*
- Westfall,M.V.; Samuelson,L.C. and Metzger,J.M (1996)** Troponin I isoform expression in developmentally regulated in differentiating embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *Dev. Dyn.* 206, 24-38.
- Whitehead,J.P.; Soos,M.A.; Aslesen,R.; O'Rahilly,S. and Jensen,J. (2000)** Contraction inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate-1/2-associated phosphoinositide 3-kinase activity, but not protein kinase B activation or glucose uptake, in rat muscle. *Biochemical Journal* 349, 775-81.
- Whitlock,D.M. and Terjung,R.L. (1987)** ATP depletion in slow-twitch muscle of rat. *FEBS Letters* 267, 257-260.
- Wilkie,D.R. (1983)** The control of glycolysis in living muscle studied by nuclear resonance and other techniques. *Biochem. Soc. Trans.* 11, 244-246.
- Winder,W.W. and Duan,C. (1992)** Control of fructose 2,6 diphosphate in muscle of exercising fasted rats. *Am J Physiol* 262, E919-E924.
- Winder,W.W. (2001)** Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 91, 1017-1028.
- Wright,D.C.; Geiger,P.C.; Rheinheimer,M.J.; Han,D.H. and Holloszy,J.O. (2004)** Phorbol esters affect skeletal muscle glucose transport in a fiber type-specific manner. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E305-E309.
- Wright,D.C.; Geiger,P.C.; Holloszy,J.O. and Han,D.H. (2005)** Contraction and hypoxia stimulated glucose transport is mediated by a Ca^{2+} -dependent mechanism in slow twitch rat soleus muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E1062-E1066.

Z

- Zorzano,A.; Balon,T.W.; Goodman,M.N. and Ruderman,N.B. (1986)** Additive effects of prior exercise and insulin on glucose and AIB uptake in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 251, E21-E26.
- Zorzano,A.; Muñoz,P.; Camps,M.; Mora,C.; Testar,X.; Palacín,M. (1996)** Insulin-induced redistribution of GLUT4 glucose carriers in the muscle fiber. In search of GLUT4 trafficking pathways. *Diabetes* 45, S70-S81.

BIBLIOGRAFIA

- Zorzano,A.; Fandos,C.; Palacín,M. (2000)** Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. *Biochem. J.* 349, 667-688.
- Zorzano,A.; Palacín,M. and Gumà,A. (2005)** Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 183, 43-58. *Review*

ANNEX 1

**Effects of dietary *trans* fatty acids, saturated fatty acids
and fat levels on glucose metabolism in experimental
animals.**

1 **Effects of dietary *trans* fatty acids, saturated fatty acids and fat levels**
2 **on glucose metabolism in experimental animals.**

3 **Claudio A. Bernal^{1,2}, Jordi Rovira³, María E. Colandré¹, Roser Cussó³ and Joan A.**
4 **Cadefau³.**

5 **Affiliations:** ¹ Cátedra Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias
6 Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

7 ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
8 (CONICET), Santa Fe, Argentina.

9 ³ Departamento de Ciencias Fisiológicas I, Facultad de Medicina,
10 Universidad de Barcelona. Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer
11 (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

12 **Correspondence and proofs should be sent to:** Prof. Claudio Bernal, PhD - Cátedra
13 Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad
14 Nacional del Litoral, C.C. 242. (3000) Santa Fe, Argentina. Telephone: 54-342-
15 4575211, Fax: 54-342-4575221, e-mail: cbernal@fbc.unl.edu.ar

16 **Short title:** Effects of dietary fats on glucose metabolism

17 **Keywords:** *Trans* fatty acids – saturated fatty acids – dietary fat – glucose
18 metabolism.

1 **Abbreviations:**

2 FA: fatty acids; *c*FA: *cis* unsaturated fatty acids; sFA: saturated fatty acids (MsFA:
3 moderate sFA and HsFA: high sFA); *t*FA: *trans* unsaturated fatty acids; TG:
4 triacylglycerol; ATP: adenosine triphosphate; TCr: total creatine; G-6-P: glucose-6-
5 phosphate; G-1-P: glucose-1-phosphate; G-1,6-P₂: glucose-1,6-bisphosphate; F-6-P:
6 fructose-6-phosphate; F-1,6-P₂: fructose-1,6-bisphosphate; F-2,6-P₂: fructose-2,6-
7 bisphosphate; DHAP: dihydroxyacetone-phosphate; Gly-3-P: glyceraldehyde-3-
8 phosphate; PFK-1: 6-phosphofructo-1-kinase; CS: citrate synthase; AOAC: Association
9 of Official Analytical Chemists; FTIR: Fourier Transform Infrared.

1 **Abstract**

2 Here we examine whether the level of dietary *cis* FA, or the isomers (*trans/cis*) and/or
3 the saturation of the fatty acids (FA) at high dietary fat levels altered the intracellular
4 glucose metabolites and certain regulatory enzyme activities in skeletal muscle and
5 liver. Rats were fed for 30 days on either a recommended control diet (7% of *cis* FA,
6 w/w) or a high fat diet (20% of FA, w/w). The high fat diet was enriched with either *cis*
7 FA (*cFA*), *trans* FA (*tFA*), a moderate proportion of saturated FA (*MsFA*), or a high
8 proportion of saturated FA (*HsFA*). The most striking findings were observed in
9 gastrocnemius muscle with a *HsFA* diet. There was a significant increase in: G-6-P
10 (306%), G-1-P (245%), F-6-P (400%), F-1,6-P₂ (86%), Gly-3-P (38%), pyruvate
11 (341%), lactate (325%), citrate (79%) and the bisphosphorylated sugars as compared to
12 the *cFA* diet. These changes were paralleled by an increase in muscle TG (49%) and a
13 decrease in glucose (39%). In addition, the amount of *cis* FA, and the other types of FA
14 (i.e. *tFA* and *MsFA*) led to no great differences in glucose metabolism as compared to
15 the respective control group. These data support the hypothesis that glucose changes
16 induced by a *HsFA* diet are a multifaceted abnormality. Glucose and lactate transport
17 and intracellular glucose metabolism could be the key biochemical defects involved in
18 this detrimental effect on glucose metabolism.

1 **Introduction**

2 Many epidemiological and experimental studies (Lichtenstein *et al.* 1998;
3 Grundy *et al.* 2002, Riccardi *et al.* 2004) suggest that the amount and type of fats
4 consumed influence the development and subsequent progression of several major
5 diseases, including coronary heart disease, obesity, diabetes and cancer. It is widely
6 known that a high intake of saturated fatty acids (sFA) (Storlien *et al.* 1991; Alsaif &
7 Duwaih, 2004) and *trans* fatty acids (*tFA*) (Clevidence *et al.* 1997; Ascherio *et al.*
8 1999) has an adverse impact on the plasma lipid profile, and increases the risk of
9 developing cardiovascular diseases and type 2 diabetes.

10 The effect of diets high in fatty acids (FA) on glucose metabolism in humans
11 and in experimental animal models is well documented (Uusitupa *et al.* 1994;
12 Lichtenstein & Schwab, 2000). Such effects are influenced by the dietary FA
13 composition. Animals fed on high sFA diets develop glucose intolerance (Wang *et al.*
14 2002) and impairment of insulin action in both skeletal muscle and liver (Storlien *et al.*
15 1991; Oakes *et al.* 1997). Kim *et al.* (1996) reported that when rats were fed a high
16 saturated fat diet, glycolysis was suppressed and glycogen synthesis was altered in
17 skeletal muscle. They hypothesized that these changes might lead to the development of
18 insulin resistance. However, whereas *n*-3 polyunsaturated FA improve insulin action, *n*-
19 6 polyunsaturated FA have a slight negative impact on insulin sensitivity (Storlien *et al.*
20 1991; Mohan & Das, 2001; Taouis *et al.* 2002).

21 Several studies (Judd *et al.* 1994; Zock & Katan, 1997) have shown that *tFA*
22 increase both total and LDL cholesterol levels, resembling some of the dietary sFA
23 effects. Although a number of conflicting results have been shown described, some
24 studies indicated that *tFA* decreased HDL cholesterol (Judd *et al.* 1994) and increased
25 plasma lipoprotein (a) levels (Aro *et al.* 1997). The specific effect of dietary *tFA* on the

1 glucose metabolic pathway, as compared with sFA and/or *cis* FA (*cFA*) at high fat
2 levels, has not been determined. Dietary *tFA* might exert different effects on the glucose
3 oxidation pathway, as they do on lipid metabolism. In this regard, Louheranta *et al.*
4 (1999) showed that a *tFA* diet had no effect on glucose and insulin metabolism as
5 compared to a monounsaturated fatty acid diet in young healthy women. Alternatively,
6 Alstrup *et al.* (1999) demonstrated in mouse β cells that *tFA* potentiate glucose-
7 stimulated insulin secretion more than *cFA* of the same carbon-chain length. This is
8 probably due to a differential effect on glucose oxidation. Cromer *et al.* (1995)
9 demonstrated that *tFA* might inhibit glucose oxidation in adipocytes isolated from rats.

10 Therefore, high levels of dietary FA might alter glucose tolerance. This effect
11 appears to be dependent on the type of FA. We can also assume that a suppression of
12 intracellular glucose metabolism by competition for substrate oxidation might precede
13 and/or cause insulin resistance in skeletal muscle. On the basis of these assumptions, we
14 aimed to evaluate the glucose metabolites and some key enzyme activities involved in
15 skeletal muscle and liver glucose metabolism on an experimental animal model. The
16 variables were: 1) the amount of dietary *cFA*, and 2) the isomers (*trans-cis*) and/or the
17 degree of saturation (high/moderate) of dietary fat.

1 **Materials and methods**

2 *Materials*

3 Nutrients for diet preparations were chemical grade, with the exception of corn
4 oil (Mazola, Argentina), sucrose, cellulose, and corn starch, which were commercial
5 grade obtained from a local source. The same corn oil was used to prepare both
6 isomerised and saturated fats, as described previously (Colandré et al. 2003).
7 Biochemical reagents, enzymes and standards were purchased from Sigma Chemical
8 Co. (St. Louis, MO, USA) or Roche Molecular Biochemicals (Barcelona, Spain).
9 Plasma glucose kits were purchased from Wiener Co. (Rosario, Argentina). Catalytic
10 palladium in charcoal was from AlphaAesar Co (MA, USA). Solvents and reagents used
11 for quantifying FA were chromatography grade. All the other chemicals used were of
12 the highest analytical grade.

13 *Animals, diets and tissue preparation*

14 All the animal studies were conducted in accordance with the principles of our
15 School of Biochemistry regulations, compiled using the *Guide to the Care and Use of*
16 *Experimental Animals of the Laboratory* (Institute of Laboratory Animal Resources,
17 Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996). Male Wistar rats
18 weighing 80 – 100 g were supplied by the “Comisión Nacional de Energía Atómica”
19 (Buenos Aires, Argentina). They were housed in the animal quarters under controlled
20 conditions ($23 \pm 2^\circ$ C and 12 hour light-dark cycle) in individual cages. The animals had
21 free access to water and a standard diet until reaching a weight of 120 – 130 g. After
22 this, they were randomly divided into five weight-matched groups and fed each diet “ad
23 libitum” for 30 days.

24 All diets were nutritionally adequate and differed either in the amount of *c*FA, or
25 in the FA composition (Table 1). The control (C) diet was based on the American

1 Institute of Nutrition Ad Hoc Committee recommendation (AIN-93G diet formulated
2 for the growth, pregnancy and lactation phases of rodents) (Reeves *et al.* 1993). It
3 contained 70 g per kg of fat. All others diets were enriched by replacing carbohydrate
4 with fat, to attain 200 g per kg (38.5 % of energy as fat). These enriched fat diets
5 contained 30 g per kg of corn oil to exceed the essential fatty acids recommendations,
6 and 170 g per kg of fats with different compositions. The *c*FA diet was enriched with
7 170 g per kg of *c*FA from corn oil; the *t*FA diet enriched with 170 g per kg of
8 isomerised corn oil containing 300 g per kg of *t*FA; MsFA enriched with a moderate
9 proportion of sFA based on a blend of corn oil (119 g per kg) and hydrogenated corn oil
10 (59 g per kg); and HsFA enriched with 170 g per kg of sFA from hydrogenated corn oil.

11 [Please insert Table 1]

12 The preparation of the experimental dietary fats and the methodology for
13 evaluating the FA composition of each one was recently described (Colandré *et al.*
14 2003). The FA composition of the experimental fats used is shown in Table 2. Each diet
15 was freshly prepared every 3 days during the experimental period.

16 [Please insert Table 2]

17 Body weight and food consumption were measured throughout the experimental
18 period. After 30 days of dietary treatment, rats were anaesthetised with acepromazine (1
19 mg/ kg b.w.) and ketamine (100 mg/ kg b.w.) and blood was collected in heparinized
20 tubes. After blood collection, gastrocnemius muscle and liver samples were taken.
21 Plasma was separated by centrifugation at 3000 xg for 10 minutes. Sample tissues were
22 immediately frozen at -80°C and stored until analysis. For glycolytic metabolites and
23 enzyme analysis, a portion of each sample was lyophilized and stored under dry
24 conditions at -20°C .

1 *Analysis of muscle and liver glycogen concentrations*

2 Glycogen was extracted from about 4-5 mg of dry tissue by acid treatment at
3 100°C (Adamo & Graham, 1998). The glucose produced was measured using the
4 enzymatic method with fluorimetric techniques (Lowry & Passonneau, 1972).

5 *Analysis of metabolite concentrations*

6 Plasma glucose levels were determined using commercial kits (Wiener,
7 Argentina).

8 ATP, creatine, phosphate creatine, glucose, G-6-P, G-1-P, F-6-P, F-1,6-P₂,
9 DHAP, Gly-3-P, lactate, pyruvate and citrate were extracted by acid treatment from 3-5
10 mg of dry muscle and liver tissue in ice cold 0.5 M perchloric acid. After centrifugation
11 and neutralization, aliquots of the extracts were used. Measurements were carried out
12 using enzymatic methods with fluorimetric techniques (Lowry & Passonneau, 1972).

13 About 5-10 mg of dry tissue powder was homogenized in 5 volumes of 50 mM
14 NaOH and kept at 90°C for 10 minutes. The extracts were neutralized with ice cold
15 acetic acid and the soluble materials were used to measure F-2,6-P₂ (Van Schaftingen *et al.*
16 *al.* 1982) and G-1,6-P₂ (Passonneau *et al.* 1969). To minimize the effect of blood and
17 connective tissue in the freeze dried tissue, the total creatine (TCr) content (sum of
18 phosphate creatine and creatine) for a given individual sample was determined. It was
19 then used to adjust individual metabolite concentrations (Sabina *et al.* 1984).

20 *Determination of liver and muscle triacylglycerol content*

21 Fresh liver and muscle tissue samples were homogenized in 10 volumes of
22 saline solution and used to measure triacylglycerol (TG), by the method of Laurel *et al.*
23 (1966).

24 *Analysis of enzyme activities*

1 Powdered muscle and liver were homogenized in 70 volumes (w/v) of ice cold
2 extraction buffer (containing 50 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 30 mM KF, 30 mM
3 β mercaptoethanol, pH 7.0). The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 15 min at
4 4°C and the supernatant was used to measure the activities of PFK-1 (Cadefau *et al.*
5 1990). CS activity in liver and muscle was assessed according to Bass *et al.* (1969).

6 *Statistics*

7 We used the unpaired Student t test to determine the statistical differences
8 between dietary levels of *cis* unsaturated fats (C diet vs *cFA* diet). Comparisons of FA
9 composition at high level of dietary fats (200 g per kg) were established by one way
10 analysis of variance (ANOVA, 1 x 4). When ANOVA showed significant differences
11 between dietary groups, the Tukey test was performed. All differences were considered
12 significant at $p < 0.05$. Values are expressed as mean \pm SEM of five or six animals per
13 group.

1 **Results**

2 There was no difference between the diets in either average daily food energy
3 intake (kJ/day, mean \pm SEM; C diet: 273.6 ± 13.1 , cFA diet: 265.0 ± 6.8 , tFA diet:
4 247.7 ± 4.2 , MsFA diet: 254.9 ± 11.5 and HsFA diet: 270.7 ± 21.2 ; $p > 0.05$) or body
5 weight gain (g/30 days, mean \pm SEM; C diet: 133.9 ± 6.6 , cFA diet: 139.2 ± 4.1 , tFA
6 diet: 136.3 ± 4.3 , MsFA diet: 133.6 ± 6.5 and HsFA diet: 138.7 ± 4.3 ; $p > 0.05$). There
7 were no differences between the groups in the levels of some metabolites related to the
8 energetic content of the tissues. These metabolites also reflect the storage conditions
9 and the manipulations of the samples. The values (mean \pm SEM) of these metabolite
10 contents in muscle were ATP ($\mu\text{mol/g d.t.}$): C diet: 25.56 ± 1.62 , cFA diet: $28.50 \pm$
11 2.44 , tFA diet: 26.56 ± 2.15 , MsFA diet: 25.92 ± 1.25 and HsFA diet: 26.59 ± 1.07 . The
12 values for total Creatine ($\mu\text{mol/g d.t.}$) in muscle were: C diet: 119.7 ± 4.4 , cFA diet:
13 115.5 ± 6.1 , tFA diet: 117.5 ± 3.2 , MsFA diet: 113.7 ± 5.9 and HsFA diet: 115.9 ± 2.9 .
14 The ATP values ($\mu\text{mol/g d.t.}$; mean \pm SEM) in liver were: C diet: 7.08 ± 0.39 , cFA diet:
15 6.79 ± 0.31 , tFA diet: 7.11 ± 0.31 , MsFA diet: 7.44 ± 0.25 and HsFA diet: 8.25 ± 0.26 .

16 When levels of cFA were considered, no differences were found in plasma
17 glucose concentrations under fasted conditions, or in muscle and liver TG content
18 (Table 3). However, the type of FA in the high fat diets affected plasma glucose
19 concentrations and muscle TG content. These were both higher in the HsFA diet ($p <$
20 0.05 vs. cFA). Liver TG content was higher in tFA, MsFA and HsFA diets ($p < 0.05$ vs.
21 cFA).

22 [Please insert Table 3]

23 Compared with the recommended levels of fat, high levels of cFA significantly
24 decreased pyruvate concentration and increased F-6-P, G-1,6-P₂ and F-2,6-P₂ in muscle
25 (Table 4). No differences were observed in all the other metabolites analyzed in muscle

1 or liver. In addition, no changes in muscle PFK-1 and CS or in hepatic PFK-1 and CS
2 activities were observed after 30 days of the high *c*FA level diet. The enzyme activity
3 values (mean \pm SEM; U/g d.t.) in muscle were PFK-1: C diet: 196.9 ± 10.3 vs. *c*FA diet:
4 196.2 ± 19.7 and CS: C diet: 62.6 ± 6.8 vs. *c*FA diet: 64.5 ± 6.3 . In liver, the PFK-1
5 values were: C diet: 3.19 ± 0.23 vs. *c*FA diet: 3.14 ± 0.17 and CS: C diet: 18.1 ± 0.9 vs.
6 *c*FA diet: 17.9 ± 1.8 .

7 [Please insert Table 4]

8 The effects of different compositions of FA at high fat levels on muscle and liver
9 metabolites are shown in Figures 1, 2, 3 and 4. Thus, Figure 1 shows a significant
10 reduction in glucose levels and a significant increase of G-6-P, F-6-P and F-1,6-P₂ in the
11 gastrocnemius muscle of rats fed a HsFA diet as compared to a *c*FA diet. In addition,
12 muscle G-6-P and F-6-P were increased in HsFA diet vs. *t*FA and vs. MsFA diets; and
13 muscle F-6-P in HsFA diet vs. MsFA diet. No differences were observed in muscle and
14 liver glucose, G-6-P, F-6-P and F-1,6-P₂ between *c*FA, *t*FA and MsFa diets. In
15 gastrocnemius muscle, the HsFA diet significantly increased the G-1-P levels as
16 compared to any other type of high fat level diet. The glycogen level is slightly reduced
17 by the HsFA diet, reaching statistical significance only between HsFA diet and MsFA
18 diet (Figure 2) in muscle. No differences were detected in hepatic G-1-P and glycogen
19 content between the high dietary fat groups. The HsFA diet increased the muscle
20 pyruvate, lactate and citrate levels either vs. *c*FA, *t*FA or MsFA diets. The *t*FA diet
21 increased the muscle pyruvate levels vs. *c*FA diet. Strikingly, the HsFA diet also
22 significantly increased the citrate levels in liver, with no changes in the other
23 metabolites analyzed (Figure 3). G-1,6-P₂ and F-2,6-P₂ were not changed by any type of
24 FA at high levels of fat intake either in muscle or liver. However, in muscle both
25 bisphosphorylated sugars are significantly higher in HsFA diets with respect to the C

1 diet. The values (mean \pm SEM) of these metabolite concentrations in muscle were G-
2 1,6-P₂ (nmol/g d.t.): C diet: 233.4 \pm 41.3, cFA diet: 455.7 \pm 46.3*, tFA diet: 400.2 \pm
3 54.2*, MsFA diet: 390.3 \pm 59.0* and HsFA diet: 393.2 \pm 54.5*. The values of F-2,6-P₂
4 (nmol/g d.t.) were: C diet: 4.27 \pm 0.27, cFA diet: 6.57 \pm 0.68*, tFA diet: 3.55 \pm 0.25,
5 MsFA diet: 5.73 \pm 0.16* and HsFA diet: 6.82 \pm 0.18*.

6 [Please insert Figure 1]

7 [Please insert Figure 2]

8 [Please insert Figure 3]

9 Figure 4 shows some regulatory enzyme activities in the muscle and liver of rats
10 fed high fat levels with different compositions of FA. No differences in PFK-1 and
11 citrate synthase activities in muscle and liver were observed between the dietary groups.
12 However, the muscle F-1,6-P₂/F-6-P ratio, used as an index of flux through PFK-1, was
13 significantly reduced by the HsFA diet, mainly with respect to the C diet. The values
14 (mean \pm SEM) of the F-1,6-P₂/F-6-P ratio in gastrocnemius muscle were: C diet: 26.5 \pm
15 1.21, cFA diet: 13.37 \pm 0.64*, tFA diet: 18.31 \pm 2.37, MsFA diet: 12.69 \pm 0.90* and
16 HsFA diet: 5.80 \pm 1.09* (* p < 0.05 vs C diet).

17 [Please insert Figure 4]

1 **Discussion**

2 Dietary fats have been shown to lead to insulin resistance (Storlien *et al.* 1997)
3 and glucose metabolism changes. It is widely recognized that both the amount and type
4 of dietary fatty acids modify insulin sensitivity in the muscle and liver of experimental
5 animals (Storlien *et al.* 1986). In addition, intracellular glucose metabolism suppression
6 might precede and/or cause insulin resistance in skeletal muscle of rats fed a high fat
7 diet (Kim *et al.* 2000). In view of these assumptions, we evaluated the glucose
8 metabolites and some key enzyme activities in skeletal muscle and liver on an
9 experimental dietary model. The variables were: 1) the amount of dietary *c*FA, and 2)
10 the isomers (*trans-cis*) and/or the saturation of FA at high dietary fat levels.

11 Many studies show that changes in glucose utilization/ regulation are induced by
12 the amount of FA (Lichtenstein *et al.* 1998; Riccardi *et al.* 2004). However, to our
13 knowledge, no comparisons have been made of the effects of low vs. high levels of fat
14 on glucose metabolites and some key regulatory enzyme activities, using corn oil as the
15 source of *c*FA. In addition, in order to approximate the high fat intake observed in many
16 western countries, we set an upper limit for high dietary fat levels of 38.5 % of energy.
17 Other research has used higher and non-realistic amounts of fat.

18 The levels of dietary *c*FA did not change the muscle and liver TG content under
19 our experimental conditions. In addition, dietary *c*FA levels did not lead to pronounced
20 changes in glucose metabolism. The most remarkable changes at high levels of *c*FA are
21 the increases in F6-P, F-2,6-P₂ and G-1,6-P₂ in muscle. High levels of the allosteric
22 effectors F-2,6-P₂ and G-1,6-P₂ in muscle could maintain the glycolytic pathway,
23 increasing muscle glucose utilization. F-2,6-P₂ and G-1,6-P₂ are potent allosteric
24 activators of PFK-1 and can facilitate flux through this glycolytic control point. On the

1 other hand, citrate, an allosteric inhibitor of PFK-1, is not influenced by dietary levels of
2 cFA.

3 Our most striking finding is that the type of dietary FA, rather than the level of
4 fat content per se, may be a decisive factor in the detrimental effects of dietary fat on
5 muscle glucose metabolites. Under our experimental conditions, animals fed HsFA
6 showed significantly increased muscle TG content. This is associated with significantly
7 elevated plasma glucose levels, and with changes in muscle glucose metabolites. Thus,
8 the high levels of muscle G-6-P, G-1-P, F-6-P, F-1,6-P₂, Gly-3-P, lactate, piruvate and
9 citrate in rats fed a HsFA diet are associated with low muscle glucose and normal
10 glycogen muscle stores, and reveal a glucose metabolic defect. Many mechanisms
11 might partially explain the impairment of glucose metabolism. If the intracellular
12 glucose-fatty acids cycle is operating in gastrocnemius muscle, as was initially proposed
13 in heart and hemidiaphragm (Randle *et al.* 1963), the TG excess in a HsFA diet can lead
14 to a reduction in glucose oxidation, via a mechanism of substrate competition for
15 oxidation in the Krebs Cycle. Thus, the high availability and oxidation of muscle lipids
16 could lead to increased levels of Acetyl CoA. In turn, this could reduce the PDH
17 activity, and therefore increase the pyruvate and lactate levels in rats fed HsFA. PDH
18 activity is regulated by phosphorylation of the E1 subunit (pyruvate decarboxylase
19 activity) by PDH kinase. In keeping with our theory, it has been shown that a high fat
20 diet significantly increased PDH kinase-4 isoform expression, with a corresponding
21 decrease in PDH activity (Pehleman *et al.* 2005). The inhibition of PDH activity could
22 be at least partly responsible for the increases in intermediary glycolytic metabolites,
23 including Glycerol-3P. Since, Glycerol-3P is a regulatory metabolite in TG synthesis
24 (Maggs *et al.* 1995), it is reasonable to suggest that raised levels of Glycerol-3P could
25 increase TG synthesis, impairing the glucose metabolism. The higher availability and

1 probably the oxidation of TG in the muscle of HsFA fed animals could also increase the
2 muscle citrate levels, thereby reducing the PFK-1 and HK activities. Despite the fact
3 that, in this study, the “in vitro” PFK-1 activity was normal and the bisphosphorylated
4 sugars are high, the very low F-1-6P₂/ F-6-P ratio in the HsFA diet indicates that flux
5 through the PFK-1 could be inhibited. The high citrate level might counteract the effect
6 of bisphosphorylated sugars (Andrés *et al.* 1990). The high lactate production contributes
7 to an acidic environment that could inhibit PFK-1 activity.

8 The elevated levels of plasma glucose, associated with low glucose
9 concentration in gastrocnemius muscle, might suggest a deficiency in glucose transport
10 in the muscle of rats fed a HsFA diet. This data is clearly consistent with that previously
11 reported by Kahn & Pedersen (1993) and Barnard *et al.* (1995). A reduction of GLUT 4
12 gene expression in the muscle of animals fed 80 % of fat (% of Energy) for 7 weeks was
13 described (Kahn & Pedersen, 1993). In addition, a HsFA diet might inhibit the glucose
14 transporter by increasing muscle diacylglycerol concentrations. At the molecular level,
15 Montell *et al.* (2001) suggested that in addition to synthesising TG, HsFA appear to
16 induce insulin resistance by increasing diacylglycerol concentrations. The *c*FA and *t*FA
17 seem to produce mainly TG. The mechanism by which increased diacylglycerol content
18 may interfere with insulin sensitivity could be mediated by PKC activity. PKC appears
19 to be a major signal in insulin-stimulated glucose transport, blocking the activation of
20 phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K), which is associated with the insulin receptor
21 (IRS-1). In the presence of increased levels of fatty acids, a high concentration of
22 diacylglycerol activates a serine kinase (PKC-θ), causing the serine phosphorylation of
23 IRS-1 (Yu *et al.* 2002). Serine phosphorylated IRS-1 cannot recruit PI3K and thus
24 inhibits GLUT-4 translocation.

1 A significant accumulation of lactate was found in skeletal muscle. This does not
2 exclude the possibility that there was both an overproduction of lactate and a decrease in
3 lactate transport in response to the HsFA diet. Skeletal muscle lactate concentrations are
4 not only regulated by the rate of glycolysis, but also by the efficiency of trans-
5 sarcolemmal lactate transport. This transport process is in turn regulated by the quantity
6 of available MCT proteins and their subcellular distribution. The intracellularly
7 produced lactate leaves the cell via simple diffusion and via two monocarboxylate
8 transporter proteins (MCT1 and MCT4) (Bonen, 2001). Experimental studies have
9 demonstrated that Streptozotocin-induced diabetes alters lactate metabolism in skeletal
10 muscle (Py *et al.* 2001), causing increased lactate production and decreased lactate
11 transport. Juel *et al.* (2004) report that MCT1 content is reduced in the skeletal muscle
12 of patients with type 2 diabetes, but scarce information is available to date. Moreover,
13 supporting the plausible theory that there is a decrease in lactate and glucose transport,
14 studies of the muscle of experimental animals have reported (Storlien *et al.* 1996)
15 changes in the FA composition of membrane phospholipids induced by a high HsFA
16 diet. These alterations could affect membrane fluidity or permeability, leading to
17 changes in glucose and/or lactate transport.

18 In agreement with data recently reported by our group (Colandré *et al.* 2003),
19 HsFA increased liver TG content. However, this significant shift did not impact on the
20 hepatic glucose metabolism to the same extent as observed in muscle. The significant
21 increase in hepatic citrate levels with a HsFA diet, seems to have a negligible impact on
22 the glycolytic pathway after 30 days of feeding. It is not known whether feeding an
23 HsFA diet for longer periods would lead to other hepatic metabolic disorders.

24 To our knowledge, this is the first study reporting the effect of dietary *t*FA at
25 high fat levels on glucose metabolites in the muscle and liver of experimental animals.

1 A noteworthy aspect of this study is the differential metabolic response of the muscle
2 glucose metabolites to high fat levels enriched with *t*FA as compared to HsFA. In this
3 study, dietary HsFA resulted in an increase in gastrocnemius muscle TG content.
4 However, there was no TG content difference in rats fed high levels of *t*FA. This lack of
5 TG alteration was associated with an absence of changes in the glucose metabolites in
6 this muscle. This reinforces the potential link between TG levels and the development
7 of glucose metabolism changes in muscle. In addition, as mentioned above for HsFA,
8 the significant accumulation of liver TG in the *t*FA diet does not seem to induce
9 significant changes in hepatic glucose metabolism. This experimental data may be
10 consistent with previous results from Louheranta *et al.* (1999), in which a *t*FA diet in
11 young healthy women resulted in changes in the plasma lipids profile, but no changes in
12 glucose and insulin metabolism. On the other hand, Alstrup *et al.* (1999) have found
13 that *t*FA potentiate glucose-stimulated insulin secretion more than the corresponding *cis*
14 isomers. This is associated with a differential glucose oxidation response in mouse β -
15 cells.

16 Finally, the high fat level MsFA diet, has a lesser effect on muscle and liver
17 glucose metabolism. This might indicate that a certain level of dietary sFA has to be
18 reached to induce glucose metabolic changes. Alternatively, dietary *c*FA might
19 counteract the negative impact of sFA on glucose metabolism. If the latter is true, these
20 results might provide some evidence of the advantageous effect of replacing sFA with
21 *c*FA.

22 In summary, under our experimental conditions, dietary fats have greater
23 detrimental effects on glucose metabolism in muscle than in liver. The type of dietary
24 FA rather than the level of dietary fat content has an impact on muscle glucose
25 metabolism. Glycolytic changes induced by the HsFA diet in muscle were a

- 1 multifaceted abnormality. Glucose and lactate transport and intracellular glucose
- 2 metabolism could play a key role in the biochemical defects involved in the detrimental
- 3 effect of a HsFA diet on glucose metabolism.

1 **Acknowledgements**

2 We wish to thank Walter DaRú and Adolfo Larese for their technical assistance.
3 We are also grateful to Drs Ricardo Grau and Miguel A. Baltanás for their valuable
4 collaboration and advice on the fat isomerization and hydrogenation procedure. We are
5 grateful to Mr. Robin Rycroft for his editorial support. Finally, we are grateful for the
6 financial support received from: the Universidad Nacional del Litoral- Cursos de
7 Acción para la Investigación y Desarrollo (CAI+D 2000 N° 13-1-22)- Secretaría de
8 Ciencia y Técnica- UNL; the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y
9 Tecnológicas (PIP N° 02930. Resol. 127/04); the Ministerio Español de Ciencia y
10 Tecnología – BFI2002-00218; the FISS of the Instituto Carlos III (Red de Centros
11 RCMN-C03708); and the Agencia Española de Cooperación Internacional.

1 References

- 2 Adamo KB & Graham TE (1998) Comparison of traditional measurements with
3 macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol* **84**,
4 908-913.
- 5 Alsaif MA & Duwaihyy MMS (2004) Influence of dietary fat quantity and composition
6 on glucose and insulin sensitivity in rats. *Nutr Res* **24**, 417-425.
- 7 Alstrup KK, Gregersen S, Jensen HM, Thomsen JL & Hermansen K (1999) Differential
8 effects of *cis* and *trans* fatty acids on insulin release from isolated mouse islets.
9 *Metabolism* **48**, 22-29.
- 10 Andrés V, Carreras J & Cussó R (1990) Regulation of muscle phosphofructokinase by
11 physiological concentrations of bisphosphorylated hexoses: effect of alkalinization.
12 *Biochem Biophys Res Comm* **172**, 328-334.
- 13 Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I & Mutanen M (1997) Stearic acid, *trans*
14 fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins,
15 lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* **65**,
16 1419-1426.
- 17 Ascherio A, Katan MB, Zock PL, Stampfer MJ & Willet WC (1999) *Trans* fatty acids
18 and coronary heart disease. *N Engl J Med* **340**, 1994-1998.
- 19 Barnard RJ, Youngren JF & Martin DA (1995) Diet, not aging, causes skeletal muscle
20 insulin resistance. *Gerontology* **41**, 205-211.
- 21 Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S & Pette D (1969) Metabolic differentiation of
22 distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem* **10**, 198-
23 206.
- 24 Bonen A (2001) The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and
25 muscle. *Eur J Appl Physiol* **86**, 6-11.

- 1 Cadefau J, Casademont J, Grau JM, Fernández J, Balaguer A, Vernet M, Cussó R &
2 Urbano-Márquez A (1990) Biochemical and histochemical adaptation to sprint
3 training in young athletes. *Acta Physiol Scand* **140**, 341-351.
- 4 Clevidence BA, Judd JT, Schaefer EJ, Jenner JL, Lichtenstein AH, Muesing RA, Wittes
5 J & Sunkin ME (1997) Plasma lipoprotein (a) levels in men and women consuming
6 diets enriched in saturated, *cis*-, or *trans*-monounsaturated fatty acids. *Arterioscler*
7 *Thromb Vasc Biol* **17**, 1657-1661.
- 8 Colandré ME, Diez RS & Bernal CA (2003) Metabolic effects of *trans* fatty acids on an
9 experimental dietary model. *Brit J Nutr* **89**, 631-638.
- 10 Cromer KD, Jenkins TC & Thies EJ (1995) Replacing *cis* octadecenoic acid with *trans*
11 isomers in media containing rat adipocytes stimulates lipolysis and inhibits glucose
12 utilization. *J Nutr* **125**, 2394-2399.
- 13 Grundy SM, Abate N & Chandalia M (2002) Diet composition and the metabolic
14 syndrome: What is the optimal fat intake?. *Am J Med* **113**, S25-S29.
- 15 Judd JT, Clevidence BA, Muesing RA, Wittes J, Sunkin ME & Podczasy JJ (1994)
16 Dietary *trans* fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men
17 and women. *Am J Clin Nutr* **59**, 861-868.
- 18 Juel C, Holten MK & Dela F (2004) Effects of strength training on muscle lactate
19 release and MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans. *J*
20 *Physiol* **556**, 297-304.
- 21 Kahn BB & Pedersen O (1993) Suppression of GLUT 4 expression in skeletal muscle
22 of rats that are obese from high fat feeding but not from high carbohydrate feeding
23 or genetic obesity. *Endocrinology* **132**, 13-22.
- 24 Kim JK, Wi JK & Youn JH (1996) Metabolic impairment precedes insulin resistance in
25 skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes* **45**, 651-658.

- 1 Kim JY, Nolte LA, Hansen PA, Han D, Fergusom K, Thompson PA & Holloszy JO
2 (2000) High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat
3 mass. *Am J Physiol* **279**, R2057-R2065.
- 4 Laurell S (1966) A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scand J*
5 *Clin Lab Invest* **18**, 668-672.
- 6 Lichtenstein AH, Kennedy E, Barrier P, Danford D, Ernst ND, Grundy SM, Leveille
7 GA, Van Horn L, Williams CL & Booth SL (1998) Dietary fat consumption and
8 health. *Nutr Rev* **56**, S3-S28.
- 9 Lichtenstein AH & Schwab US (2000) Relationship of dietary fat to glucose
10 metabolism. *Atherosclerosis* **150**, 227-243.
- 11 Louheranta AM, Turpeinen AK, Vidgren HM, Schwab US & Uusitupa MIJ (1999) A
12 high-*trans* fatty acid diet and insulin sensitivity in young healthy women.
13 *Metabolism* **48**, 870-875.
- 14 Lowry OH & Passonneau JV (1972) *A flexible system of enzymatic analysis*. New York:
15 Academic.
- 16 Maggs DG, Jacob R, Rife F, Lange R, Leone P, During MJ, Tamborlane WV &
17 Sherwin RS (1995) Interstitial fluid concentrations of glycerol, glucose and amino
18 acids in human quadriceps muscle and adipose tissue. Evidence for significant
19 lipolysis in skeletal muscle. *J Clin Invest* **96**, 370-377.
- 20 Mohan IK & Das UN (2001) Prevention of chemically induced diabetes mellitus in
21 experimental animals by polyunsaturated fatty acids. *Nutrition* **17**, 126-151.
- 22 Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noé V, Ciudad C, Macé K & Gomez-Foix
23 AM (2001) DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin
24 stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**,
25 E229-E237.

- 1 Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ & Kraegen EW (1997) Mechanisms
2 of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes*
3 **46**, 1768-1774.
- 4 Passonneau JV, Lowry OH, Schulz DW & Brown JG (1969) Glucose 1,6 diphosphate
5 formation by phosphoglucomutase in mammalian tissues. *J Biol Chem* **244**, 902-
6 909.
- 7 Pehleman TL, Peters SJ, Heigenhauser GJ & Spriet LL (2005) Enzymatic regulation of
8 glucose disposal in human skeletal muscle after a high-fat, low-carbohydrate diet. *J*
9 *Appl Physiol* **98**, 100-107.
- 10 Py G, Eydoux N, Perez-Martin A, Raynaud E, Brun JF, Préfaut C & Mercier J.
11 Streptozotocin-induced diabetes decreases rat sarcolemmal lactate transport.
12 *Metabolism* **50**, 418-424.
- 13 Randle PJ, Garland PB, Hales CN & Newsholme EA (1963) The glucose fatty acid
14 cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes
15 mellitus. *Lancet*, 785-794.
- 16 Riccardi G, Giacco R & Rivellese AA (2004) Dietary fat, insulin sensitivity and the
17 metabolic syndrome. *Clin Nutr* **23**, 447-456.
- 18 Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory
19 rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing
20 committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939-1951.
- 21 Sabina RL, Swain JL, Bradley WG & Holnes CW (1984) Quantification of metabolites
22 in human skeletal muscle during rest and exercise. A comparison of methods.
23 *Muscle Nerve* **7**, 77-82.

- 1 Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ & Kraegen EW (1986) Fat feeding
2 causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and
3 obesity in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **251**, E576-E583.
- 4 Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S & Kraegen EW (1991)
5 Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats.
6 Relationship to muscle triglyceride and w-3 fatty acids in muscle phospholipid.
7 *Diabetes* **40**, 280-289.
- 8 Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, O'Connor J, Caterson ID, Cooney GJ, Jenkins AB
9 & Baur LA (1996) Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance. *Lipids*
10 **31**, S261-S265.
- 11 Storlien LH, Kriketos D, Jenkins AB, Baur LA, Pan DA, Tapsell LC & Calvert GD
12 (1997) Does dietary fat influence insulin action?. *Ann NY Acad Sci* **827**, 287-301.
- 13 Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M & Delarue J (2002) n-3
14 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signalling in
15 muscle. *Am J Physiol* **282**, E664-E671.
- 16 Uusitupa M, Schwab U, Mäkimattila S, Karhapää P, Sarkkinen E, Maliranta H, Agren J
17 & Penttilä I (1994) Effects of two high-fat diets with different fatty acid
18 compositions on glucose and lipid metabolism in healthy young women. *Am J Clin*
19 *Nutr* **59**, 1310-1316.
- 20 Van Schaftingen E, Lederer E, Bartrons R & Hers HG (1982) A kinetic study of
21 pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. *Eur J*
22 *Biochem* **129**, 191-195
- 23 Wang Y, Miura Y, Kaneko T, Li J, Qin LQ, Wang PY, Matsui H & Sato A (2002)
24 Glucose intolerance induced by a high-fat/low-carbohydrate diet in rats. Effects of
25 nonesterified fatty acids. *Endocrine* **17**, 185-191.

- 1 Yu C, Chen Y & Cline GW (2002) Mechanism by which fatty acids inhibits insulin
2 activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-
3 kinase activity in muscle. *J Biol Chem* **277**, 50230-50236.
- 4 Zock PL & Katan MB (1997) *Trans* fatty acids, lipoproteins, and coronary risk. *Can J*
5 *Physiol Pharmacol* **75**, 211-216.

1 Table 1: Composition of the experimental diets

	C diet	<i>c</i> FA diet	<i>t</i> FA diet	MsFA diet	HsFA diet
Ingredient	g/ kg diet				
Corn starch	529.5	399.5	399.5	399.5	399.5
Casein	200	200	200	200	200
Sucrose	100	100	100	100	100
Corn oil	70	200	30	149	30
Isomerized corn oil	---	---	170	---	---
Hydrogenated corn oil	---	---	---	51	170
Fibre	50	50	50	50	50
Mineral mixture	35	35	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10	10	10
L-Cystine/L-Methionine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Energy (kJ/100g)	1656.9	1928.8	1928.8	1928.8	1928.8

- 2 C: Control; *c*FA: *cis* fatty acids; *t*FA: *trans* fatty acids; MsFA: moderate level of
- 3 saturated fatty acids; HsFA diet: high level of saturated fatty acids.
- 4 Vitamin and mineral mixtures were prepared according to Reeves et al. (1993).

1 Table 2: Fatty acid composition of experimental fats

Fatty acids	Experimental corn oil		
	Non treated	Isomerized	Hydrogenated
16:0	10.78*	10.87	11.23
<i>c</i> 16:1	0.20	0.10	0.15
18:0	2.24	2.61	59.33
<i>t</i> 18:1	nd	26.47	10.47
<i>c</i> 18:1	31.36	25.41	17.22
<i>t,t</i> 18:2	nd	2.09	nd
<i>t,c</i> 18:2 + <i>c,t</i> 18:2	0.48	1.35	nd
<i>c,c</i> 18:2	52.85	29.57	0.50
<i>t,c,c</i> 18:3	0.06	0.03	nd
<i>c,c,c</i> 18:3	0.75	0.41	nd
20:0	0.52	0.52	0.68
<i>t</i> 20:1	0.12	0.07	nd
<i>c</i> 20:1	0.24	0.13	0.22
22:0	0.20	0.18	0.12
24:0	0.20	0.19	0.08
% <i>trans</i> FA	0.66	30.00	10.47
% saturated FA	13.94	14.38	71.44

2

3 * Values are means as a weight percentage (w/w) of the total fatty acid methyl esters.

4 nd: not detected.

5

6

1 Table 3: Plasma glucose and triacylglyceride content in muscle and liver

2

	C diet	<i>c</i> FA diet	<i>t</i> FA diet	MsFA diet	HsFA diet
Plasma Glucose	6.50 ± 0.17	6.11 ± 0.11	6.61 ± 0.28	-	7.56 ± 0.44*
TG Gastrocnemius	1.45 ± 0.34	1.86 ± 0.04	2.40 ± 0.57	-	2.77 ± 0.21*
TG Liver	8.10 ± 0.06	8.02 ± 0.71	17.09 ± 1.48*	14.27 ± 1.38*	13.29 ± 0.89*

3

4 Plasma glucose concentration (mM) and muscle and liver triacylglyceride (TG) content values (μmol/g w.t.) are mean ± SEM of 5 or 6 animals.

5 The comparison of *cis* FA levels was not significantly different, by unpaired Student *t* test, at $p < 0.05$. Comparison of FA composition at high6 dietary fat levels was established by Anova (1 x 4) followed by the Tukey test. * $p < 0.05$ vs. *c*FA. See section Materials and Methods for details.

7





1 Table 4: Effect of *cis* unsaturated fat level on glycolytic metabolite concentration in the muscle and liver

	Muscle		Liver	
	C diet	<i>c</i> FA diet	C diet	<i>c</i> FA diet
Glycogen ($\mu\text{mol glucose/g d.t.}$)	125.9 \pm 3.3	131.7 \pm 4.5	887.1 \pm 76.0	793.2 \pm 46.8
Glucose ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	2.91 \pm 0.36	2.88 \pm 0.32	26.3 \pm 1.4	25.4 \pm 2.2
G-1-P ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	0.14 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02
G-6-P ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	0.71 \pm 0.16	1.12 \pm 0.13	1.39 \pm 0.16	1.02 \pm 0.08
F-6-P ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	0.14 \pm 0.01	0.20 \pm 0.02*	0.38 \pm 0.04	0.26 \pm 0.02
F-1,6-P ₂ ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	3.71 \pm 0.66	2.75 \pm 0.35	0.18 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02
DHAP ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	0.28 \pm 0.05	0.21 \pm 0.07	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03
Gly-3-P ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
Lactate ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	6.27 \pm 0.59	4.98 \pm 0.40	19.4 \pm 1.50	18.6 \pm 1.8
Pyruvate ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	0.34 \pm 0.03	0.22 \pm 0.03*	0.35 \pm 0.07	0.26 \pm 0.01
Citrate ($\mu\text{mol/g d.t.}$)	0.43 \pm 0.04	0.53 \pm 0.06	0.55 \pm 0.09	0.50 \pm 0.09
F-2,6-P ₂ (nmol/g d.t.)	4.27 \pm 0.27	6.57 \pm 0.68*	25.0 \pm 2.5	26.0 \pm 3.0
G-1,6-P ₂ (nmol/g d.t.)	233.4 \pm 41.3	455.7 \pm 46.3*	185.0 \pm 26.3	203.6 \pm 23.3

2 C diet: control diet (70 g per kg of dietary fat); *c*FA diet: *cis* unsaturated fatty acids diet (200 g per kg of dietary fat). Values are mean \pm SEM of

3 5 or 6 animals. * $p < 0.05$ vs. C diet. See section Materials and Methods for details.

1 Fig. 1 Legend

2 Glucose, G-6-P, F-6-P and F-1,6-P₂ content in the muscle and liver of animals fed high
3 levels of fat.  cFA diet,  tFA diet,  MsFA diet,  HsFA diet. Each
4 column represents mean \pm SEM of 5 to 6 animals. Values with different superscript
5 letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test, after significant differences
6 were found by one way ANOVA (1x4). See section Materials and Methods for details.

1 Fig. 2 Legend

2 G-1-P and Glycogen content in the muscle and liver of animals fed high levels of fat.

3  cFA diet,  tFA diet,  MsFA diet,  HsFA diet. Each column

4 represents mean \pm SEM of 5 to 6 animals. Values with different superscript letters are

5 significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test, after significant differences were

6 found by one way ANOVA (1x4). See section Materials and Methods for details.

1 Fig. 3 Legend





2 Pyruvate, lactate and citrate content in muscle and liver of animals fed high levels of fat.

3  cFA diet,  tFA diet,  MsFA diet,  HsFA diet. Each column

4 represents mean \pm SEM of 5 to 6 animals. Values with different superscript letters are

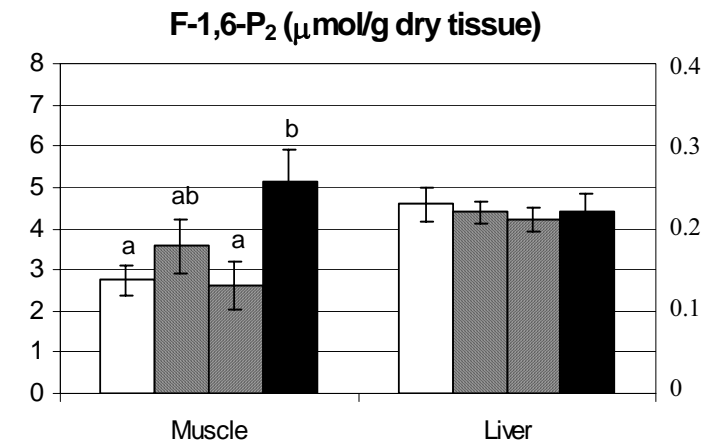
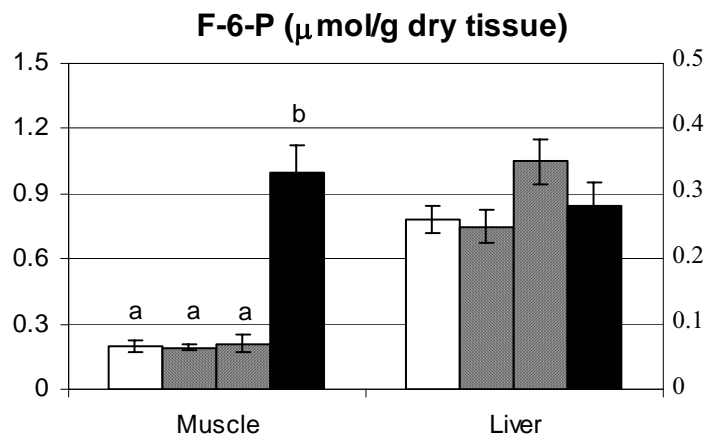
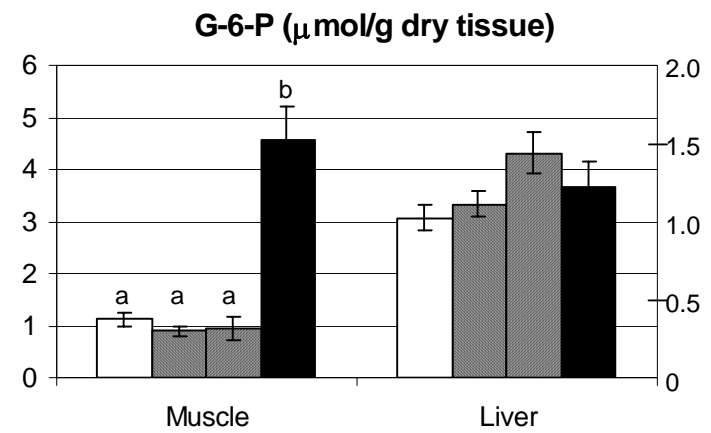
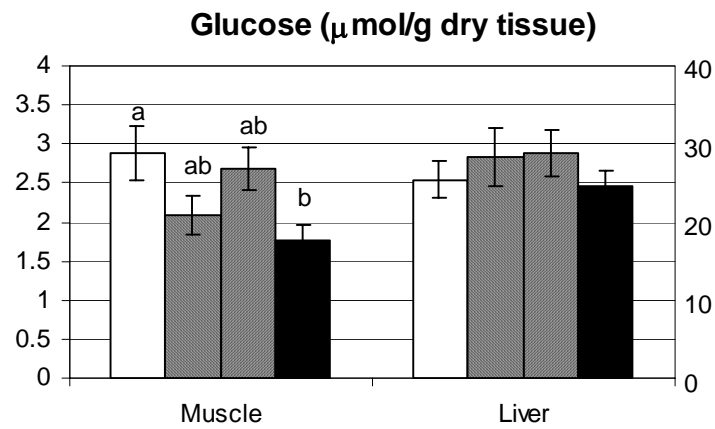
5 significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test, after significant differences were

6 found by one way ANOVA (1x4). See section Materials and Methods for details.

- 1 Fig. 4 Legend:
- 2 PKK-1 and CS activities in the muscle and liver of animals fed high levels of fat.
- 3  cFA diet,  tFA diet,  MsFA diet,  HsFA diet. Each column
- 4 represents mean \pm SEM of 5 to 6 animals. Values with different superscript letters are
- 5 significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test, after significant differences were
- 6 found by one way ANOVA (1x4). See section Materials and Methods for details.
- 7

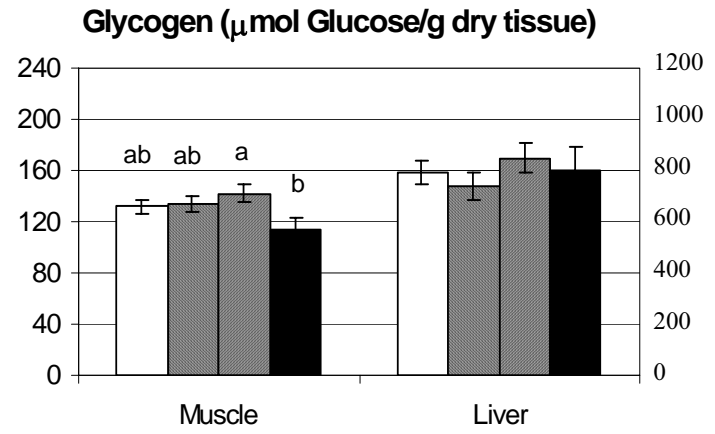
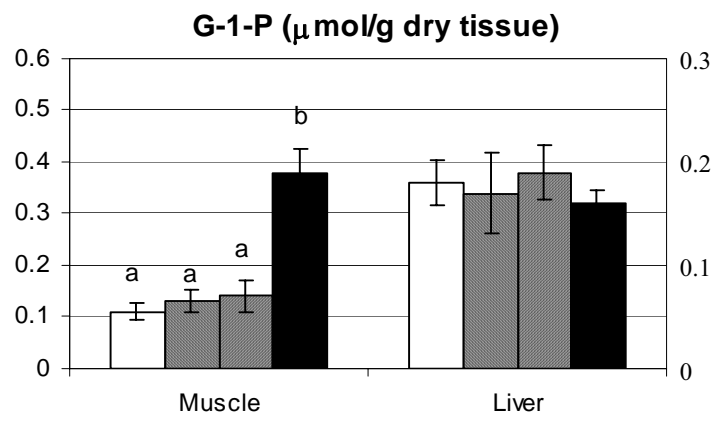
1 Fig. 1

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34



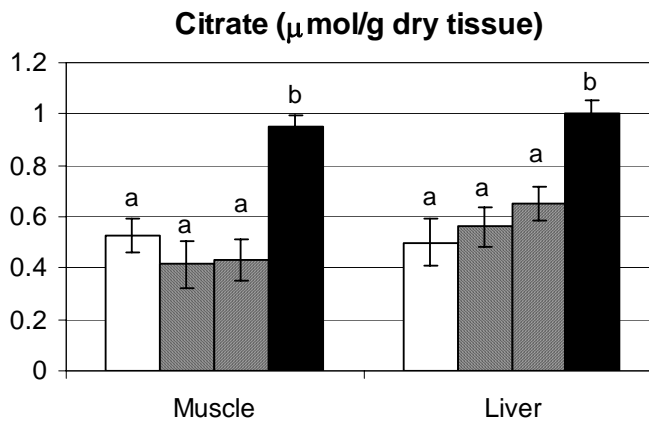
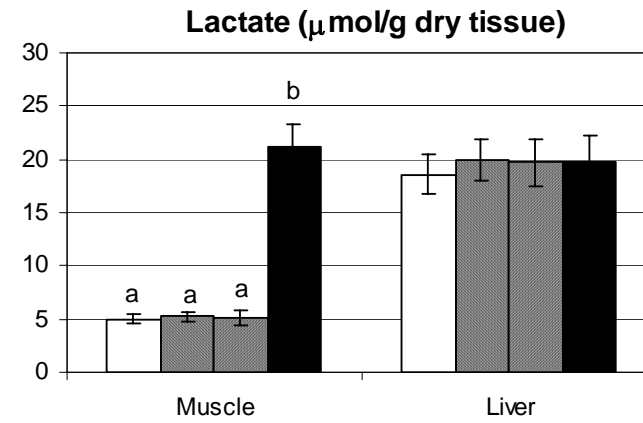
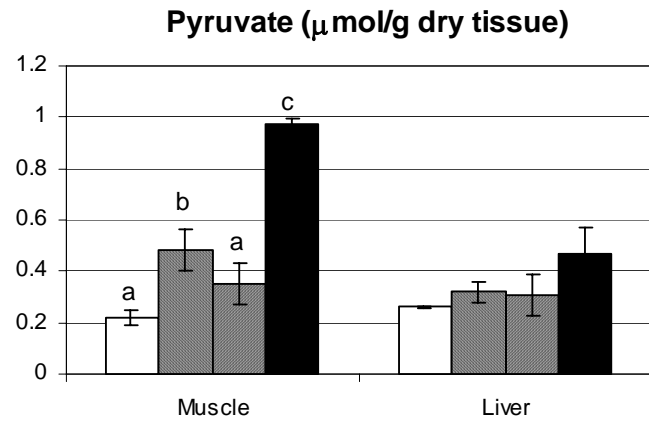
1 Fig. 2

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22



1 Fig. 3

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33



1 Fig. 4

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

