
UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**PAPER DE LA INSULINA I FACTORS DE CREIXEMENT TIPUS
INSULINA EN LA REGULACIÓ DEL CREIXEMENT
I METABOLISME EN TRUITA I ORADA**

Tesi Doctoral

Núria Montserrat Pulido

**RESUM DE RESULTATS
I DISCUSSIÓ**

I. RESPOSTA AL CREIXEMENT COMPENSATORI UTILITZANT PROTOCOLS DE DEJUNI I REALIMENTACIÓ EN TRUITA IRISADA I ORADA. RESPOSTA A LA REALIMENTACIÓ.

El creixement compensatori es dóna de manera natural en poblacions animals quan tornen a tenir disponibilitat de nutrients després de períodes desfavorables en el seu cicle normal de vida (moviments migratoris, reproducció, temperatura, etc.). Es caracteritza per elevades taxes de creixement en els individus, hiperfàgia i una millora en l'eficiència alimentària (revisat per Ali i col., 2003). Tenint en compte que el sistema hormonal juga un paper central en la regulació del creixement i de la utilització de nutrients en peixos, el creixement compensatori representa un model endocrí de gran interès a estudiar en Aqüicultura, ja que la rendibilitat de les explotacions pot incrementar notablement (Hayward i col., 1997).

S'han descrit diferents graus de compensació de creixement (Jobling ,1994). La compensació en el creixement és total, quan els animals privats d'aliment (dejunats) assoleixen, després de la realimentació, la mateixa mida i pes que els animals control (contínuament alimentats). Per contra, la compensació en el creixement és parcial si els animals prèviament dejunats, no assoleixen la mateixa mida i pes que els animals control contemporanis, però mostren després de la realimentació, taxes de creixement específiques (SGRs) comparables als animals control. Per últim, la sobre-compensació en el creixement es dóna quan els animals dejunats assoleixen un pes i SGRs superiors als animals control després de la realimentació.

Per tal d'estudiar el paper de la insulina i dels IGFs en el fenomen del creixement compensatori en truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) i en orada (*Sparus aurata*), els animals van ser sotmesos a diferents períodes de dejuni (1, 2 i 4 setmanes en truita irisada; 1, 3 i 4 setmanes en orada) seguits de períodes de realimentació saciant (1 mes en el cas de la truita, i de 1 i 2 mesos en el cas de l'orada). De manera addicional, després d'un període de dejuni d'1 mes, es van estudiar els efectes de la realimentació en truita irisada durant diferents dies (0, 1, 2, 4, 7,15 i 29).

Variacions en els paràmetres morfològics durant el creixement compensatori.

Tant en la truita irisada com en orada, es va observar un patró de resposta similar enfront al dejuni, encara que en graus diferents. A nivell morfològic les truites dejunades van mostrar una disminució en el pes corporal, pes del fetge i en l'índex hepatosomàtic (HIS). De la mateixa manera, en orada, el dejuni va provocar disminucions significatives en el pes corporal, el pes del fetge, l'HIS i en el factor de condició (CF). En ambdues espècies, la taxa de creixement específica (SGR) va disminuir significativament durant els períodes de dejuni establerts.

Amb la realimentació les dues espècies van mostrar una recuperació en els paràmetres morfològics que havien disminuït prèviament en els diferents períodes de dejuni. Pel que fa a l'efecte de la realimentació sobre les SGRs en la truita irisada, es va observar una compensació total en el creixement en els animals dejunats durant una setmana. Els grups dejunats durant 2 i 4 setmanes van mostrar una compensació parcial en el creixement, ja que malgrat les SGRs van superar la del grup control, els pesos finals després de la realimentació van ser inferiors al grup control. Altres autors, han descrit compensacions totals (Dobson i Holmes, 1984; Quinton i Blake, 1990; Nikki i col., 2004) o parcials en la mateixa espècie (Revisat per Ali i col., 2003).

Pel que fa a l'orada, la compensació en el creixement després d'un mes de realimentació és parcial en els grups dejunats prèviament durant 1 i 3 setmanes, ja que el pes final i les SGRs són similars a les del grup control. Per contra, el grup dejunat durant 4 setmanes, després d'1 mes de realimentació no supera ni pes final ni les SGRs del grup control. Després de dos mesos de realimentació, cap dels grups dejunats va superar el pes final ni les SGRs del grup control, suggerint que un mes de realimentació sembla ser el temps òptim per induir compensació en el creixement en aquestes espècies.

En espàrids només trobem dos estudis que analitzen el creixement compensatori. En la pàguera (*Pagrus pagrus*), Rueda i col. (1998) van descriure una compensació total en el creixement després de 7, 14 i 28 dies de dejuni seguits de 91 dies de realimentació. Recentment en orada, Eröldogan i col. (2006), han observat una compensació parcial en el creixement utilitzant un protocol experimental on els cicles de dejuni i realimentació alternaven durant un total de 7 setmanes.

En els citats estudis, al igual que en els presents, el grau de catabolisme induït pel dejuni, resulta ser un factor crític a l'hora d'analitzar la resposta compensatòria en el creixement (Picha i col., 2006).

Variacions en les reserves energètiques durant el creixement compensatori .

En orada es va observar una disminució significativa en el percentatge de les reserves glucídiques i lipídiques tant musculars com hepàtiques en funció de la durada del temps de dejuni. El percentatge d'aigua en fetge no va variar significativament després dels diferents temps de dejuni, contràriament al descrit en la mateixa espècie per Power i col. (2000). Els citats autors, van observar que els increments en el percentatge d'aigua en el fetge després de 3 setmanes de dejuni eren indicadors de dany hepàtic. La disminució en el contingut de glicògen hepàtic durant els diferents períodes de dejuni coincideix amb el descrit recentment per altres autors en orada (Power i col., 2000; Metón i col., 2003; Sangiao-Alvarellos i col., 2005). En el present treball, s'observa una disminució en el percentatge lipídic muscular després de 3 setmanes de dejuni, tal i com havien descrit prèviament Grigorakis i col. (2005) en la mateixa espècie.

Pel que fa a la disminució en el percentatge de glicogen muscular durant els diferents períodes de dejuni, trobem que les dades són comparables a les descrites en el bacallà (*Gadus morhua*) i en un la guerxa de l'Amazona (*Brycon cephalus*) per altres autors (Martínez i col., 2002; Figueredo-Garutti i col., 2002).

Els efectes de la realimentació sobre les reserves energètiques són efectius després d'un període de dos mesos. No obstant, durant el segon mes de realimentació no es va observar un increment significatiu ni en el pes ni en les SGRs en els grups d'animals que havien assolit una compensació parcial en el creixement durant el primer mes de realimentació. Jobling i Miglavs (1993), en el salmó àrtic (*Salvelinus alpinus*), van descriure que un cop les reserves lipídiques es restablien després de la realimentació, existia un mecanisme d'inhibició en la ingesta i en les taxes de consum alimentari. Aquest fet explicaria doncs, perquè durant el segon mes de realimentació en orada, no trobem guanys en el paràmetres morfològics analitzats. De la mateixa manera, les dades obtingudes, mostren que després d'una primera fase de creixement accelerat, les SGRs i els pesos tendeixen a declinar cap als valors del grup control (revisat per Ali i col., 2003).

Es van mesurar els nivells circulants d' àcids grassos lliures (FFA) en orada com a indicadors de la mobilització lipídica al llarg de l'experiment. Els resultats indiquen

que durant el dejuni es dona un increment en la utilització dels lípids dels diferents teixits, essent més elevada després de 4 setmanes; aquestes dades són similars a les descrites per Albalat i col. (2005) en la mateixa espècie.

D'aquesta manera, a partir d'1 mes de dejuni, a part de mobilitzar glúcids, també es dona un increment en la lipòlisi dels teixits (Machado i col., 1988; Shimeno i col., 1990; Albalat i col., 2005). Durant la realimentació hi ha una recuperació en els nivells circulants de FFA, fet descrit anteriorment per Pottinger i col. (1998) en estudis similars a truita.

Paper de la insulina en el metabolisme glucídic en el creixement compensatori

La insulina és una hormona anabòlica que indueix la captació de glucosa i d'aminoàcids en la musculatura esquelètica i en el fetge, promovent la lipogènesi i la síntesi proteica en ambdós teixits, però especialment en el fetge (Machado i col., 1988; Wenderlaar Bonga, 1993). Estudis realitzats en truita irisada i llobarro (Navarro i col., 1992; Pérez-Sánchez i col., 1988), han demostrat que la insulina juntament amb el glucagó, juguen un paper fonamental en la regulació i entrada dels metabolits circulants en teixits diana perifèrics. Tant en truita com en orada, a partir d'una setmana de dejuni, es produeix una depressió en els nivells en plasma d'insulina. En orada, els nivells en plasma d'insulina es mantenen significativament baixos durant tot el període de dejuni. En la truita irisada, la caiguda en els valors plasmàtics d'insulina esdevé dràstica en els animals dejunats durant 4 setmanes. Aquestes dades són comparables amb les descrites prèviament en ambdues espècies per altres autors (Revisat per Navarro i Gutiérrez, 1995; Albalat i col., 2005).

La depressió en els nivells plasmàtics d'insulina en orada, explicaria la caiguda en els nivells de glicogen tissular, ja que la insulina exerceix una acció directa sobre la glicogen sintasa tant en el múscul com en el fetge en mamífers (Cross i col., 1995). De la mateixa manera, la disminució en els nivells circulants de glucosa durant el dejuni en truita irisada i en orada, sembla ser una conseqüència dels diferents enzims hepàtics implicats en la utilització del glicogen durant el dejuni (Sangiao-Alvarellos i col., 2005), afavorint d'aquesta manera, la mobilització de glucosa a teixits perifèrics per a la seva utilització durant les primeres fases del dejuni (Revisat per Navarro i col., 1995; Company i col., 1999; Power i col., 2000; Pottinger i col., 2003). Posteriorment, a mesura que incrementa el temps de dejuni, les reserves glucídiques són esgotades i es comencen a utilitzar els lípids (Revisat per Pliesestakaya i Mommsem, 1996).

Després d'un mes de realimentació, tant en truita irisada com en orada, es va observar una recuperació en els nivells plasmàtics d'insulina circulants en tots els grups prèviament dejunats. Mentre que el pes final i les SGRs dels animals dejunats durant 1 i 3 setmanes són comparables als valors del grup control després d'un mes de realimentació, les reserves hepàtiques i musculars lipídiques i glicogèniques en orada assoleixen valors comparatius al grup control en tots el grups dejunats després de 2 mesos de realimentació. Aquests resultats suggereixen, que en l'orada, durant el creixement compensatori provocat per realimentació, la insulina afavoreix el creixement somàtic i mitjançant la seva acció anabolitzant, podria afavorir la deposició de reserves energètiques. Així doncs, durant la realimentació sembla que hi ha una recuperació més ràpida dels paràmetres morfològics que de les reserves energètiques.

Variacions en la resposta dels receptors musculars d'insulina i d'IGF-I durant el creixement compensatori.

Tant en truita irisada com en orada, es va mesurar la quantitat de receptors d'insulina i d'IGF-I en la musculatura blanca durant els períodes de dejuni i de realimentació dels experiments de creixement compensatori.. En truita irisada, no es van observar variacions en el número de receptors (Ro) d'insulina ni en el percentatge d'unió de l'hormona al receptor (percentatge de "binding") en cap dels períodes estudiats. Contràriament, Párrizas i col. (1994), van descriure una disminució en aquests paràmetres en truita bruna (*Salmo trutta fario*) durant el dejuni. La discrepància de resultats pot ser explicada per diferències en l'edat dels animals, així com per la possible influència de l'estacionalitat, ambdós factors semblen afectar a l'hora de mesurar els paràmetres abans citats (Baños i col., 1998).

En orada, el Ro i el percentatge de binding d'insulina van disminuir durant el dejuni, tanmateix es va observar una disminució en els nivells plasmàtics del pèptid. Aquests resultats es van observar en carpa (*Cyprinus carpio*) i en truita bruna per Párrizas i col. (1994). Com s'havia descrit anteriorment en peixos, el Ro i el percentatge de binding per a la insulina en orada és major que el trobat en truita irisada (Rojas i col., 2005).

Durant els experiments de creixement compensatori en la truita irisada i en orada es va trobar la mateixa resposta dels receptors d'IGF-I en les dues espècies. El Ro i el binding van incrementar durant el dejuni. Aquesta *up-regulació* s'havia descrit prèviament a mamífers i aus durant el dejuni (Lowe i col., 1991; Bayol i col., 2004; Matsumura i col., 1996; Tomita i col., 2001). L'increment en el número de receptors

d'IGF-I suggereix una acció protectora en el múscul esquelètic enfront a estats catabòlics com el dejuni i això està d'acord amb el paper anti-apoptòtic de l'IGF-I en cèl·lules musculars de mamífer en cultiu (Wu i col., 2004).

Així, aquesta *up-regulació* del receptor durant el dejuni, comporta que els teixits diana al pèptid siguin més sensibles i responguin d'una manera més eficient, als canvis plasmàtics d'IGF-I (Picha i col., 2006). Durant la realimentació en truita irisada i en orada, tant el Ro com el binding dels receptors d'IGF-I, van ser comparables als valors obtinguts en els grups control, suggerint que tant els nivells plasmàtics d'IGF-I així com els seus receptors, poden tenir un paper fonamental promovent l'acceleració del creixement en aquestes espècies.

Variacions en els nivells d'expressió i els nivells plasmàtics dels IGFs durant el creixement compensatori i la realimentació.

Diferents estudis en espècies de salmònids, espàrids i serrànids, han mostrat que el dejuni disminueix els valors plasmàtics d'IGF-I (Niu i col., 1993; Duan i Pliesetskaya, 1996; Revisat per Pérez-Sánchez, 1999; Baños i col., 1999; Larsen i col., 2001; Small i Peterson, 2004; Uchida i col., 2003; Gómez-Requeni i col., 2004; Picha i col., 2006) i els d'IGF-II (Gentil i col., 1996; Shimizu i col., 1999; Sumpter i col., 1991). En el present treball hem observat que en l'orada, els nivells plasmàtics d'IGF-I disminueixen significativament en tots el temps de dejuni (1, 3 i 4 setmanes) durant l'experiment de creixement compensatori.

Els protocols experimentals utilitzats en els experiments de creixement compensatori i de realimentació contenen períodes de dejuni. En els dos experiments realitzats en la truita irisada, el dejuni ha provocat una disminució en els nivells d'expressió de l'ARNm d'IGF-I hepàtic. Aquests resultats també s'havien descrit en estudis similars en aquesta mateixa espècie (Gabillard i col., 2003, Chauvigné i col., 2003).

No obstant, els nivells d'expressió d'IGF-II hepàtics no es veuen afectats durant els períodes de dejuni de l'experiment del creixement compensatori, però sí van disminuir després de 4 setmanes de dejuni en l'experiment de realimentació. Aquesta discrepància en els resultats, podria ser deguda a la diferència en l'edat dels animals, o per les diferències en la temperatura i en el fotoperíode en els que es van realitzar aquests dos experiments. Els factors esmentats afecten clarament el patró d'expressió dels IGFs (Gabillard i col., 2003).

Durant l'experiment de realimentació realitzat en la truita irisada, així com en la fase de realimentació de l'experiment de creixement compensatori realitzat en l'orada, s'han observat increments significatius en els nivells plasmàtics d'IGF-I en totes dues espècies. Igualment, en la truita irisada, s'han observat increments en els nivells d'expressió de l'ARNm d'IGF-I hepàtic tant en l'experiment de realimentació, com en el de creixement compensatori.

De fet, després de la fase de realimentació en l'experiment de creixement compensatori en orada, existeix un paral·lisme entre les SGRs i els nivells plasmàtics d'IGF-I, tal i com s'ha descrit anteriorment per altres autors durant fases de creixement en els peixos teleostis (Revisat per Pérez-Sánchez, 1999; Mingarro i col., 2002). L'increment més dramàtic en els nivells plasmàtics d'IGF-I es dona en els grups d'animals que presenten majors SGRs durant la fase de creixement compensatori (animals que havien dejunat prèviament 1 i 3 setmanes). Les dades suggereixen, que la compensació en el creixement en aquests grups és facilitada per increments relatius en IGF-I plasmàtic, tal i com s'ha descrit recentment en el creixement compensatori de la perca híbrida (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) (Picha i col., 2006).

Estudi de l'expressió dels receptors de GH durant la realimentació.

El dejuni en peixos provoca increments en els nivells plasmàtics de l'hormona de creixement (GH) que afavoreixen la mobilització lipídica (Gómez-Requeni i col., 2004). Estudis en peixos mostren que els increments en plasma de GH coincideixen amb la caiguda dels nivells plasmàtics i d'ARNm d'IGF-I (Duan i Plisetskaya, 1993; Moriyama i col., 1999; Gómez-Requeni i col., 2004) i amb una disminució en el número de receptors de GH en el fetge (Pérez-Sánchez i col., 1994; Revisat per Pérez-Sánchez i LeBail, 1999). En el present treball, després de 30 dies de dejuni en la truita irisada, les dues isoformes del receptor de GH hepàtic, GHR1 i GHR2, van mostrar perfils d'expressió diferents. Com a resposta al dejuni, trobem un increment en l'expressió de l'isoforma GHR1. Aquestes dades contrasten amb les descrites en treballs recents realitzats en altres espècies, on el dejuni provocava una disminució en l'expressió de l'ARNm de GHR en fetge (Deng i col., 2004; Fukada i col., 2004). En aquests treballs, però, es mesurava l'expressió total de l'ARNm GHR, sense tenir en compte que podia existir una regulació diferencial entre GHR1 i GHR2, fet que podria explicar la dificultat a l'hora d'interpretar i comparar els resultats.

Els increments en l'expressió de l'ARNm de GHR1 en el fetge, suggereixen una major sensibilitat del teixit als nivells circulants de GH, probablement, per facilitar la mobilització lipídica en aquest teixit després d'un mes de dejuni. Per contra, el fet de no trobar canvis en l'expressió de l'ARNm de l'isoforma GHR2 durant el dejuni indica que són necessaris més estudis per entendre la regulació transcripcional de les dues isoformes durant el dejuni. La realimentació va recuperar els nivells d'expressió de la isoforma GHR1.

Canvis en l'expressió gènica dels IGFs, el receptor d'IGF-I, els receptors de GH, miogenina, MyoD , factors de creixement tipus fibroblast (FGFs) i miostatina en el múscul blanc durant el creixement compensatori i la realimentació.

Tant en l'experiment de creixement compensatori com en el de realimentació en truita irisada, l'expressió de l'ARNm dels IGFs en múscul blanc va ser menor que l'observada en el fetge, tal i com s'havia descrit anteriorment en experiments similars (Chauvingé i col., 2003; Gabillard i col., 2003).

Els períodes de dejuni de l'experiment de creixement compensatori i de l'experiment de realimentació en truita irisada, van provocar disminucions en l'expressió de l'ARNm d'IGF-I muscular, que es van recuperar després de la realimentació.

L'expressió de l'ARNm muscular d'IGF-II no es va veure afectada durant el transcurs dels experiments realitzats en truita irisada, tal i com han descrit anteriorment altres estudis similars en la mateixa espècie (Chauvigné i col., 2003).

S'ha estudiat l'expressió de l'ARNm de les isoformes a i b del receptor d'IGF-I durant el creixement compensatori de la truita irisada. L'expressió de l'ARNm de la isoforma IGFIb incrementa durant el dejuni, coincidint amb els resultats que hem trobat en els estudis de binding del receptor. Resultats similars als descrits en el present treball, s'han observat també en mamífer per altres autors (Bayol i col., 2004). Per contra, després de 30 dies de realimentació, l'expressió de la isoforma IGFIa incrementa en el grup que havia experimentat un dejuni més llarg (de 4 setmanes), mentre que l'expressió de la isoforma b es recupera. Aquesta resposta diferencial en l'expressió d'ambdues isoformes suggereix una funció específica per a cadascuna d'elles en resposta a l'estat nutricional.

L'expressió de l'ARNm de les isoformes musculars de GHR1 i GHR2, mostren perfils d'expressió similars durant el dejuni i la realimentació. El dejuni va provocar un increment significatiu en l'expressió de l'ARNm de les dues isoformes. Aquest

paral·lelisme entre els nivells circulants de GH i l'expressió de l'ARNm del seus receptors en múscul, suggereix una major sensibilitat en aquest teixit als canvis plasmàtics de GH. Així doncs, el perfil d'expressió de les dues isoformes musculars és similar al que hem descrit per a la isoforma GHR1 en fetge. Es coneix, que la GH, durant els estats catabòlics, té una acció lipolítica que és independent de l'acció dels IGFs, facilitant així la utilització de greixos com a font d'energia (Mingarro, 2004). Les nostres dades suggereixen que els increments en l'expressió de l'ARNm de les dues isoformes en el múscul, podrien facilitar la mobilització de greixos musculars com a font d'energia després d'1 mes de dejuni.

En relació als factors miogènics estudiats en el present treball, hem observat que durant l'experiment de creixement compensatori, no s'han observat canvis significatius en l'expressió de l'ARNm de MyoD1 ni de MyoD2. Aquests gens, tal i com s'ha descrit anteriorment en la bibliografia, resulten essencials en el desenvolupament del llinatge muscular en peixos (Rescan, 2001; Johansen i Overturf, 2005). Tot i això, coincidint amb les dades descrites en el present treball, estudis similars en mamífers, han observat que l'expressió d'aquests gens no varia durant períodes de desnutrició (Bayol i col., 2004).

Durant l'experiment de creixement compensatori tampoc es van observar canvis en l'expressió de l'ARNm de FGF6, coincidint amb les observacions realitzades per Terova i col., (2005) en un experiment similar a llobarro (*Dicentrarchus labrax L.*). L'expressió de l'ARNm de FGF2, tampoc no va variar en el nostre estudi, tot i que Chauvigné i col.(2003), van observar increments en la seva expressió durant els primers dies de realimentació en un experiment similar en la mateixa espècie. Aquesta discrepància podria ser explicada pels diferents protocols experimentals utilitzats en els dos experiments. En l'estudi de Chauvigné i col. (2003), es va analitzar l'expressió d'aquest factor durant diferents dies de realimentació, mentre que en el present treball s'analitzen aquests paràmetres després d'un mes de dejuni i després d'1,2 i 4 setmanes de realimentació. A més, s'ha descrit que FGF2 juga un paper clau en la recuperació de la integritat de la musculatura en peix zebra (*Danio rerio*) quan es provoca dany tissular (Santos-Ruíz i col., 2001). Així doncs, les dades obtingudes en el present treball podrien indicar que el dejuni no ha provocat canvis significatius en l'estructura muscular d'aquests animals.

Durant l'experiment de creixement compensatori realitzat en truita irisada, l'expressió de l'ARNm de miogenina disminueix significativament després d'una i de dues setmanes de dejuni, mentre que després de quatre setmanes, s'observa un increment significatiu en la seva expressió. En mamífers s'ha descrit que l'expressió de miogenina depèn de l'acció dels IGFs (Florini i col., 1996). Tot i que el dejuni, ha provocat disminucions significatives en l'expressió de l'ARNm d'IGF-I en múscul i fetge, hem observat que no es donen variacions en l'expressió de l'ARNm d'IGF-II durant aquest període ni en el fetge ni en el múscul. Així doncs, podria ser que l'increment observat en l'expressió de miogenina després de quatre setmanes de dejuni, respongués al manteniment en l'expressió d'IGF-II, que podria actuar de manera autocrina o paracrina afavorint l'expressió muscular d'IGF-II. De fet, en cèl·lules musculars de mamífer en cultiu, Florini i col. (1991) van descriure increments en l'expressió de miogenina deguts a l'acció autocrina de l'IGF-II.

L'expressió de l'ARNm de miostatina no va variar durant el dejuni, tal i com ja s'havia descrit prèviament en estudis de dejuni mamífers (Ji i col., 1998). En el present treball, i per primer cop en truita irisada, s'ha observat que l'expressió de l'ARNm de miostatina disminueix durant la realimentació en aquells grups que presenten SGRs elevades i una compensació en el creixement. D'aquesta manera, es confirma la funció negativa de la miostatina durant el creixement muscular en la truita irisada, tal i com s'havia descrit prèviament en llobarro per altres autors (Terova i col., 2005). Tenint en compte, que tractaments amb GH inhibeixen l'expressió de miostatina en truita (Biga i col., 2004), i que les accions anabòliques de la GH són mitjançant els IGFs, podríem apuntar a que la recuperació en els nivells d'expressió de l'ARNm d'IGF-I durant la realimentació, poden ser els responsables de la inhibició de l'expressió de la miostatina, i com a conseqüència, es donaria una acceleració en el creixement d'aquests animals.

II. FUNCIONS DELS IGFs SOBRE CÈL·LULES MUSCULARS D'ORADA EN CULTIU.

Aïllament de cèl·lules satèl·lit del múscul blanc d'orada.

Els processos que donen lloc a la hipertròfia i a la hiperplàsia muscular, depenen estretament de l'aportació d'una població de cèl·lules “mare” mononuclears que estan localitzades sota la làmina basal de les fibres musculars, o bé dispersades entre elles. Aquestes cèl·lules, per la seva localització van ser anomenades “satèl·lit” (Mauro, 1961). Es troben particularment en estadis primerencs en la vida dels peixos (Vegetti i col., 1990; Johnston i col., 1993). El creixement post-embrionari del teixit muscular, involucra conjuntament: la hipertròfia, la hiperplàsia i la remodelació del teixit connectiu associat a la fibra, així com de les terminals nervioses i sanguínies.

En el present treball, a partir del protocol descrit per Rescan i col. (1995) i més tard millorat per Faconneau i Paboeuf (2000), s'han establert les condicions adequades de concentracions de col·lagenasa i tripsina, temps i temperatures d'incubació així com l'osmolaritat en els medis de cultiu, per l'obtenció de cèl·lules satèl·lit a partir de la musculatura blanca de l'orada (*Sparus aurata*). La morfologia d'aquestes cèl·lules en cultiu va resultar similar a la descrita en el nostre grup per Castillo i col. (2002) en cèl·lules miosatèl·lit de truita irisada. Per microscopia de contrast de fase es va realitzar un seguiment de les cèl·lules d'orada en cultiu. Es va observar que les cèl·lules aïllades del múscul blanc d'orada es van proliferar i es van desenvolupar durant 15 dies en cultiu, passant de cèl·lules mononucleades (*dies 1-3* en el transcurs del cultiu), a mioblasts (*dia 5-9* en el cultiu) i a llargs miotubs (fins el *dia 15* en el cultiu). Aquestes observacions coincideixen amb les descrites per Al-Khalili i col. (2003) en cèl·lules musculars humanes en cultiu.

Per tal de mesurar la viabilitat del cultiu, com a primera aproximació, es van realitzar tincions de blau tripà i comptatges cel·lulars durant els diferents dies del cultiu. Un cop es va confirmar que els comptatges cel·lulars eren homogenis al llarg dels diferents dies del cultiu, es va mesurar la viabilitat dels mateixos, utilitzant l'assaig del MTT [Bromur de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoil]. L'assaig, determina la viabilitat de les cèl·lules, en funció de la capacitat reductora que posseeixen els enzims mitocondrials en transformar el compost MTT a formazan. Aquest assaig, s'ha utilitzat com a mesura de la taxa de proliferació en diferents tipus cel·lulars, però estudis en línees musculars estables, com H9C2 o en cultius primaris de cardiomiòcits (Yamako i

col., 2000; Gómez i col., 1997; Green i col., 2002), han descrit l'eficàcia d'aquest assaig per mesurar la viabilitat cel·lular. D'aquesta manera, en el cultiu primari de cèl·lules miosatèl·lit d'orada, es va observar que hi havia un increment en la reducció del MTT al compost formazan al llarg del cultiu, indicant que les condicions establertes pel desenvolupament del cultiu primari de cèl·lules miosatèl·lit d'orada eren òptimes.

Igualment es va observar un increment en l'activitat MTT reductasa a mesura que les cèl·lules es diferenciaven al llarg del cultiu, suggerint que la fusió de les cèl·lules musculars incrementa la seva pròpia supervivència, tal i com s'havia descrit prèviament en cèl·lules cardiomusculars de mamífers (Klein i col., 1981).

De manera complementària es va mesurar la viabilitat en el cultiu mitjançant la tècnica del FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Aquesta tècnica va permetre establir un comptatge cel·lular acurat (10.000 cèl·lules per cada condició estudiada) i determinar la viabilitat de la població després de discriminar entre les cèl·lules marcades amb iodur de propidi (cèl·lules mortes) i les cèl·lules que no emetien fluorescència de la longitud d'ona de les cèl·lules mortes (cèl·lules vives). Les dades obtingudes amb aquest últim mètode van mostrar que la supervivència cel·lular incrementava al llarg del cultiu, tal i com s'havia observat mitjançant l'assaig del MTT.

Estudi del receptor d'IGF-I en el cultiu de cèl·lules miosatèl·lit d'orada.

Mitjançant estudis de *binding* (estudis de unió de l'hormona al receptor) vam observar per primer cop que les cèl·lules miosatèl·lit d'orada presentaven receptors específics per a IGF-I. Les condicions utilitzades en els estudis de binding van ser similars a les descrites anteriorment en estudis *in vivo* en el nostre grup (Párrizas i col., 1995), tot i que es va realitzar alguna modificació en quant al temps d'incubació, essent de 12 hores a 4°C. De la mateixa manera, els estudis de binding, es van realitzar utilitzant 1,5 milions de cèl·lules per condició estudiada, tal i com s'havia descrit anteriorment en estudis en cèl·lules musculars de ratolí (Rosenthal i col., 1991). Es va observar, que tant el número de receptors per a IGF-I com el binding específic incrementaven al llarg del cultiu amb la diferenciació cel·lular.

Els increments en el binding al llarg del cultiu, coincideixen amb resultats resultats descrits anteriorment per altres autors en cultius primaris de cèl·lules musculars de pollastre i ratolí (Duclos i col., 1991; Rosenthal i col., 1991), així com en cèl·lules miosatèl·lit de truita i cèl·lules embrionàries de peix zebra (Castillo i col., 2002; Pozios i col., 2001). L'afinitat del binding, no va variar al llarg del cultiu, d'acord amb les observacions descrites per Castillo i col. (2002) en cèl·lules miosatèl·lit de truita i per Méndez i col. (2000) al llarg del desenvolupament de la truita comú (*Salmo trutta*).

Per complementar l'estudi, es van realitzar experiments de binding en semipurificacions de glicoproteïnes musculars dels mateixos animals que eren sacrificats en els cultius cel·lulars. Els resultats, van mostrar que les dades obtingudes *in vivo* eren reproduïbles *in vitro*, ja que tant el binding específic com el número de receptors, eren comparables a les dades descrites en les cèl·lules musculars d'orada en cultiu. Els resultats suggereixen que el model *in vitro*, utilitzant cèl·lules miosatèl·lit d'orada, representa una eina adequada per a l'estudi del receptor d'IGF-I.

Efectes de l'IGF-I, IGF-II i de la insulina sobre les vies de la MAPK i de PI3K/Akt en el cultiu de cèl·lules miosatèl·lit d'orada.

L'activació del receptor d'IGF-I està associada majoritàriament a dues vies de transducció intracel·lulars: la via Ras/Raf/p44p42 MAPK (proteïna quinasa activada per mitogen o MAPK) i la via de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K/Akt) (Jacques i col., 1997). També s'ha descrit que tant l'IGF-I com l'IGF-II, exerceixen a través del receptor d'IGF-I, les seves accions mitogèniques, metabòliques i diferenciadores en mamífer (revisat per Yakar i col., 2005).

En el present estudi, durant els estadis de mioblast (dia 5) i de miotub (dia 8), es va observar un increment en l'estimulació de la fosforilació de MAPK en presència dels IGFs i en menor proporció en presència de la insulina. En mamífers, la via de la MAPK ha estat àmpliament relacionada amb estadis proliferatius en cèl·lules musculars (Coolican i col., 1997). Les nostres dades suggerien doncs, que els IGFs estimulen la proliferació de les cèl·lules miosatèl·lit d'orada per la via de la MAPK. Resultats similars s'havien observat prèviament en la línia muscular L6A1 per Coolican i col. (1997) i per Al-Khalili i col. (2004) en cèl·lules musculars humanes, on els IGFs i la insulina, estimulaven la fosforilació de la p44-42MAPK. En peixos, els efectes proliferatius dels IGFs mitjançant la via-MAPK, s'havien descrit en la línia embrionària

ZF-4 de peix zebra per Pozios i col. (2001) i més recentment en el nostre grup per Castillo i col. (2004), en cèl·lules miosatèl·lit de truita irisada.

Igualment, es va observar que la insulina i en una major proporció els IGFs, tenien un paper estimulador en la fosforil·lació d'Akt, especialment durant els estadis de mioblast (dia 8) i de miotub (dia 15) del cultiu de cèl·lules miosatèl·lit d'orada. En mamífers, la via de PI3K/Akt s'ha descrit com la via més important en la diferenciació muscular (Kaliman i col., 1996; 1998). Les dades observades suggereixen, que els IGFs, i en menor proporció la insulina, estimulen la diferenciació de les cèl·lules miosatèl·lit d'orada. Els efectes estimuladors de la insulina i dels IGFs en la via de la PI3K/Akt s'havien descrit en la línia muscular C2C12 de ratolí per altres autors (Sumitani i col., 2002; Erbru i col., 2003). De la mateixa manera, en peix zebra es va observar que els IGFs tenien efectes estimuladors en la diferenciació de cèl·lules en cultiu (Pozios i col., 2001).

S'ha descrit que l'activació de la via PI3K/Akt, paral·lelament amb l'expressió de proteïnes musculars específiques, té lloc de manera concomitant amb la inhibició de la via-MAPK en cèl·lules musculars de mamífer (Conejo i col., 2001). Les dades observades en el present treball, mostren una situació similar en cèl·lules miosatèl·lit d'orada. Així doncs, la via MAPK seria la via implicada en la proliferació muscular, mentre que la via PI3K/Akt estaria més lligada a la diferenciació de les cèl·lules miosatèl·lit d'orada.

En el cultiu de cèl·lules miosatèl·lit d'orada, s'observa que els increments en el número de receptors d'IGF-I són paral·lels als increments de la supervivència cel·lular (>95% a partir del dia 5 en el cultiu), així com amb una major activació de la via de senyalització PI3K/Akt a partir del dia 5 del cultiu. Això suggereix, tal i com s'ha descrit a mamífer, el paper antiapoptòtic del receptor d'IGF-I (Wu i col., 2004) i la seva implicació en la diferenciació muscular (Cheng i col., 2003). De la mateixa manera, el present treball, confirma resultats preliminars descrits en el nostre grup en relació als efectes estimuladors de l'IGF-II en les vies de senyalització de MAPK i de PI3K/Akt en cèl·lules musculars en cultiu de truita irisada (Codina i col., 2004).

Efectes dels IGFs i la insulina en la captació de L-alanina en cèl·lules miosatèl·lit d'orada en cultiu.

El creixement somàtic en peixos es defineix com l'increment en la massa muscular degut a la deposició proteica (Mommsem, 2000). Tenint en compte, que la musculatura representa aproximadament un 50 % de l'animal (Millward i col., 1989), i que tant la insulina com els IGFs estimulen el creixement somàtic en peixos (Revisat per Duan 1998; Gabillard i col., 2003; Revisat per Reinecke i col., 2005), es van analitzar els efectes d'aquests pèptids sobre la captació d'alanina en cèl·lules miosatèl·lit d'orada. Cal esmentar que l'alanina, s'utilitza de forma habitual per a la mesura del transport aminoacídic en diferents models cel·lulars (Benguinot i col., 1985; Bevan i col., 1992).

En el present treball, es va observar que la insulina, però amb una major proporció els IGFs, incrementen la taxa d'incorporació de L-alanina en miòcits de dia 4 d'orada. Per una altra banda, la taxa d'incorporació de L-alanina va disminuir al llarg del cultiu cel·lular. El fet de trobar una disminució en la taxa d'incorporació d'aminoàcids al llarg del cultiu, posa de manifest la importància del metabolisme aminoacídic en estadis de proliferació cel·lular, tal i com s'havia descrit anteriorment per Castillo i col. (2004) en cèl·lules miosatèl·lit de la truita irisada.

Els efectes dels IGFs i la insulina sobre la captació d'aminoàcids s'havien descrit a cèl·lules musculars de mamífer per altres autors (Benguinot i col., 1985; Bevan i col., 1992). En peixos, el paper estimulador de la insulina i de l'IGF-I en el metabolisme proteic s'havia descrit *in vivo* (Inui i col., 1983; Negatu i col., 1995). També s'havia trobat una major acció de l'IGF-I que la insulina en la captació de L-alanina en cardimiòcits de truita bruna (*Salmo trutta*) i miòcits de truita irisada (*Onchorynchus mykiss*), respectivament (Gallardo i col., 2001; Castillo i col., 2002).

Efectes dels IGFs i la insulina en la captació de 2-DG en cèl·lules miosatèl·lit d'orada en cultiu.

En peixos, al igual que en mamífers, el teixit muscular és el major responsable de l'eliminació de la glucosa circulant (Revisat per Larsen i col., 2001). Per una altra banda, el fet que en peixos teleostis el número de receptors d'IGF-I dupliqui als d'insulina en totes les espècies estudiades fins ara (Revisat per Navarro i col., 1999), posa de manifest la importància dels IGFs enfront de la insulina en la regulació del metabolisme glucídic en peixos.

Per tal de mesurar el transport de glucosa en cèl·lules miosatèl·lit d'orada, es van realitzar mesures de la captació de 2-deoxi-D-glucosa (2-DG) a dia 4 (miòcit) i dia 9 (mioblast). La 2-DG és un anàleg no metabolitzable de la glucosa que s'utilitza de forma habitual per a la mesura del transport de glucosa. En el present treball, es va observar que l'estimulació de la captació de 2-DG incrementa en funció de la diferenciació cel·lular en presència dels pèptids estudiats, sent major l'estimulació induïda pels IGFs que per la insulina al llarg del cultiu. Els resultats del present treball, suggereixen que els increments en la captació de 2-DG en presència dels IGFs al llarg del cultiu, estan relacionats amb l'increment observat en el número de receptors d'IGF-I, així com amb una major demanda metabòlica dels miotubs enfront dels miòcits.

Per una altra banda, els efectes dels IGFs sobre la captació de glucosa s'han descrit prèviament en cèl·lules musculars de mamífer d'origen humà i murí (Yu and Czech 1984; Beguinot i col., 1985; Wang i col., 1987; Bervan i col., 1992; Zierath i col., 1992 ;Niu i col., 2002). En peixos s'ha observat que l'IGF-I té un efecte estimulador major que la insulina en la captació de 2-DG en cèl·lules miosatèl·lit de truita irisada (Castillo i col., 2004).

Així doncs, el present treball, indica que els IGFs estimulen la captació de 2-DG en major proporció que la insulina. Es confirmen així, per primer cop en orada, els efectes metabòlics dels IGFs en el metabolisme glucídic i proteic, tal i com s'havia descrit per altres autors en cèl·lules miosatèl·lit de truita irisada (*Onchorynchus mykiss*) (Castillo i col., 2004; Codina i col., 2004).

Després de determinar els efectes estimuladors dels IGFs en la captació de 2-DG, es van estudiar les vies de senyalització implicades en el metabolisme glucídic en miòcits d'orada (dia 5). Es van utilitzar inhibidors específics de la via de la PI3K/Akt i de la via MAPK i es va determinar la captació de 2-DG. Els resultats van mostrar que

preincubacions de 30 minuts amb wortmanina (inhibidor específic de la via de la PI3K/Akt) i PD 98059 (inhibidor de la via de la MAPK), induïen tant de la inhibició de la captació basal, com la inhibició de la captació de 2-DG estimulada pels pèptids. Per confirmar aquestes dades es van analitzar extractes cel·lulars dels miòcits preincubats amb els inhibidors i posteriorment en presència o no dels pèptids. Els resultats dels “Western blot”, van mostrar que la via de la PI3K/Akt i de la MAPK eren les responsables dels efectes estimuladors dels IGFs sobre la captació de 2-DG en miòcits d’orada, de la mateixa manera que havien descrit Castillo i col. (2006) en miòcits de truita irisada.

Quan els miòcits (dia 5) eren preincubats en presència de citocalasina B, es va observar una inhibició en la captació basal de 2-DG, així com en la captació de 2-DG estimulada per la insulina i els IGFs. Resultats similars es van obtenir en eritròcits d’anguila (*Anguilla rostrata*) (Soengas i Moon, 1995), en enteròcits de peix gat (*Ictalurus melas*) (Soengas i Moon, 1998) i en miòcits de truita irisada (Castillo i col., 2004), on es va veure que el transport de glucosa en aquestes cèl·lules també era inhibible per la citocalasina B. En aquest context, Capilla i col. (2004) van observar que el transport de 2-DG era inhibit per citocalasina B en oòcits de granota (*Xenopus laevis*) que expressaven el transportador de glucosa (GLUT4) de salmó coho (*Onchorynchus kisutch*).

Els antecedents esmentats, conjuntament amb els resultats del present treball i el recent clonatge parcial d’un transportador de glucosa (saGLUT4) en el múscul vermell d’orada (Rojas i col., 2005), suggerien que el transportador GLUT4 seria el responsable de la captació de glucosa estimulada per IGFs i la insulina en miòcits d’orada. Amb el propòsit de confirmar la possible implicació del GLUT4 en el transport de glucosa en aquestes cèl·lules, es van realitzar extractes proteics de miòcits i mioblasts d’orada (dia 4 i dia 9, respectivament) estimulades o no en presència dels pèptids durant una hora. Els resultats van mostrar que es produeix un increment en la traducció proteica del transportador de glucosa GLUT4 en presència dels pèptids al llarg del cultiu. Estudis en cèl·lules L6 han demostrat els efectes de insulina i de l’IGF-I en l’estimulació de la síntesi proteica de GLUT4 (Wilson i col., 1995). De la mateixa manera els mateixos efectes s’han descrit per a l’IGF-II en la línia muscular L6E9 (Kaliman i col., 1999).

L'estimulació de la via de la PI3K/Akt pels IGFs, i en menor grau per la insulina, es dona majoritàriament a partir del dia 8 del cultiu, coincidint amb l'increment en la traducció de GLUT 4 quan les cèl·lules són incubades en presència dels pèptids estudiats. Estudis en mamífer han relacionat la translocació del GLUT4 a la membrana plasmàtica amb l'activació de la via de transducció de la senyal de PI3K/Akt en diferents tipus cel·lulars tals com miòcits, mioblasts i adipòcits (Wilson et al., 1995; Zorzano et al., 2000; Saltiel et al., 2001; Rauch et al., 2005) i calen més estudis per determinar si en el nostre model *in vitro* es pot donar una resposta similar. Tenint en compte, que al llarg del cultiu de cèl·lules miosatèl·lit d'orada es dona un increment en el número de receptors per a IGF-I, sembla doncs, que els efectes estimuladors d'IGF-I i d'IGF-II descrits en el present treball, es donen a través del receptor d'IGF-I, tal i com s'ha descrit en mamífer (revisat per Yakar i col., 2005).

CONCLUSIONS

1. S'han establert les condicions per induir creixement compensatori parcial i total en la truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*). Durant la fase del dejuni s'ha observat una disminució en l'expressió de l'ARNm de l'IGF-I i de l'IGF-II hepàtic i de l'IGF-I muscular. El dejuni ha provocat un increment en el número de receptors d'IGF-I i en el seu binding específic en el múscul blanc. Igualment, s'ha observat un augment de l'expressió de l'ARNm de la isoforma **b** del receptor d'IGF-I. En canvi, l'expressió de l'ARNm de la isoforma **a** no s'ha vist afectada durant el dejuni, fet que indica una regulació diferencial en l'expressió de les dues isoformes **a** i **b** del receptor d'IGF-I.
2. En el creixement compensatori en la truita irisada, s'ha vist que l'increment en l'expressió de l'ARNm de la miostatina muscular disminueix en aquells animals que presenten una acceleració en el creixement, posant de manifest el paper negatiu d'aquest factor en el creixement muscular en peixos. En canvi, s'ha observat una recuperació en l'expressió del RNAm de miogenina durant la realimentació, que indica el seu paper en el creixement muscular en aquesta fase.
3. En el creixement compensatori de la truita irisada, no es van trobar canvis en l'expressió de l'ARNm de MyoD1, MyoD2, FGF2, FGF6 ni d'IGF-II en la musculatura esquelètica. De la mateixa manera no es van observar modificacions en el binding ni el número de receptors d'insulina. Aquests resultats suggereixen que són els canvis en els components del sistema de l'IGF-I els que tenen un paper central en el creixement compensatori en aquesta espècie.
4. Un mes de dejuni en truita irisada provoca una regulació diferencial en l'expressió de les isoformes 1 i 2 del receptor de GH del fetge. Per contra, en el múscul blanc, ambdues isoformes van presentar el mateix patró d'increment d'expressió durant el dejuni. La realimentació va resultar en la recuperació en l'expressió dels GHRs, així com en un increment en l'expressió del ARNm d'IGF-I en fetge i múscul.

5. S'han establert les condicions per induir creixement compensatori parcial en l'orada (*Sparus aurata*). Durant la fase de dejuni, s'ha trobat una disminució en els nivells circulants d'IGF-I i una up-regulació en el número de receptors d'IGF-I i el seu binding específic en el múscul blanc. Per contra, la disminució en els nivells circulants d'insulina durant el dejuni, va ser paral·lela a la disminució en el número de receptors d'insulina i el seu binding específic, indicant una down-regulació en el múscul blanc en aquesta fase. Tant la disminució dels nivells circulants d'insulina com d'IGF-I estan d'acord amb la mobilització del glicogen i lípid muscular i hepàtic durant el dejuni de l'orada.
6. Durant la fase del creixement compensatori en l'orada, la recuperació en els nivells circulants d'IGF-I és paral·lela amb la recuperació en el número de receptors i el binding específic del receptor d'IGF-I en el múscul blanc, així com amb l'increment en les taxes de creixement dels animals. Tanmateix, la recuperació dels nivells circulants d'insulina durant el primer mes de realimentació, coincideix amb l'acceleració en el creixement enfront de la deposició de les reserves de glicogen i lípid en múscul i fetge.
7. S'han establert les condicions per l'obtenció de cèl·lules miosatèl·lit d'orada a partir de teixit muscular blanc amb característiques morfològiques i viabilitat adequades, que ha permès l'estudi de les accions de la insulina, de l'IGF-I i de l'IGF-II.
8. S'ha determinat per primera vegada en cèl·lules musculars d'orada el binding específic d'IGF-I. Tanmateix, s'ha observat que al llarg del desenvolupament de les cèl·lules musculars, i en paral·lel a la seva diferenciació, hi ha un increment en el número de receptors i en el binding específic dels receptors d'IGF-I sense canvis en la seva afinitat.

9. L'anàlisi de la supervivència de les cèl·lules musculars en cultiu mitjançant valoracions bioquímiques i morfològiques, ha posat de manifest que la mortalitat de les cèl·lules musculars d'orada en cultiu disminueix amb la diferenciació cel·lular. S'ha observat que els increments en la supervivència cel·lular eren paral·lels amb els increments en el binding i número de receptors d'IGF-I.
10. Tant l'IGF-I com l'IGF-II, i en menor grau la insulina, estimulen la captació de glucosa en cèl·lules musculars d'orada en cultiu. L'estimulació incrementa a mesura que les cèl·lules es diferencien en el cultiu. La captació d'alanina augmenta per l'acció de l'IGF-I i de l'IGF-II, i en menor grau de la insulina. L'acció dels pèptids sobre la captació de l'alanina és menor en cèl·lules diferenciades, indicant que els requeriments d'aminoàcids són majors en la fase de proliferació.
11. La citocalasina B inhibeix tant el transport de glucosa basal com l'estimulat per insulina i els IGFs en cèl·lules musculars d'orada. S'ha detectat un increment en la quantitat de transportador de glucosa de difusió facilitada, GLUT4, en presència de la insulina, d'IGF-I i d'IGF-II en diferents fases del cultiu.
12. La utilització d'inhibidors específics de les vies de transducció de la senyal, ha demostrat que els efectes metabòlics dels IGFs i de la insulina sobre el transport de glucosa, són realitzats mitjançant les vies de la PI3K/Akt i de la MAPK. Tant els IGFs com la insulina activen ambdues vies de senyalització en mioblasts, mentre que en miotubs s'estimula en major grau la via de la PI3K/Akt. La via de la MAPK està més activa en la proliferació i la via PI3K/Akt en la diferenciació de les cèl·lules musculars d'orada en cultiu.

