

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

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

FRANCISCO JAVIER LOPEZ SORIANO

5. DISCUSSION

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

5.1.1. PESO Y COMPOSICION DEL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR.

El peso y la composición del TAMI mostró variaciones en función de la situación fisiológica a la que se encontraba sometido el animal. De esta manera el ayuno de 24 horas indujo en los animales una disminución del peso corporal de un 10,7% y un descenso similar en el peso del TAMI, por lo que en proporción al peso corporal el peso de este tejido no se modificó, tal como ya habían señalado otros autores para un ayuno de esta duración (Tulp, 1983). Aunque la cantidad relativa de proteínas aumentaba, la cantidad total de proteínas del tejido no se afectaba ($30,5 \pm 3,3$ mg en los controles y $29,4 \pm 2,3$ mg en los animales ayunados), a diferencia de lo que se observa en situaciones de ayuno más prolongadas en las que hay una disminución tanto de las proteínas totales como de las mitocondriales, coincidiendo con una disminución de la capacidad termogénica del tejido (Rothwell et al., 1984).

Los efectos de una exposición aguda al frío sobre el peso del TAMI son similares a las del ayuno, con una disminución del peso absoluto del tejido pero no del relativo. Esta disminución es atribuible a la desaparición activa de los lípidos, que son utilizados como substrato termogénico, con la correspondiente disminución de este componente tisular; por otra parte hay un aumento relativo en la proporción de proteínas que no afecta a su cantidad absoluta ($30,5 \pm 2,3$ mg en los controles y $33,6 \pm 1,3$ mg en los animales sometidos a frío agudo). Más acusado es el efecto de la exposición crónica, en la que se observa un claro aumento del peso del tejido, atribuible a la hiperplasia del TAMI como respuesta a la aclimatación al frío relacionada con una mayor capacidad de respuesta calorígenica a las catecolaminas (Bukowiecki et al., 1982).

La exposición crónica al frío determina un incremento notable en la ingestión de alimento, tal como han descrito otros autores en la rata (Trayhurn, 1979; Portet, 1981; Kühn et al., 1983) y en el ratón (Trayhurn, 1979), y que puede explicarse en función del incremento de la tasa metabólica en estos animales (Himms-Hagen, 1986); sin embargo, a pesar de ello el crecimiento de estos animales es menor al de los aclimatados a 22°C. Esto es debido a que la energía extra ingerida es utilizada preferentemente como combustible para satisfacer las mayores necesidades termogénicas de estos animales, con una mayor producción de calor. De esta manera, tras un período de 15 días de aclimatación al frío se observaron notables diferencias entre este grupo y el control:

	CONTROL	FRIO CRONICO
Peso corporal (g): inicio	200,2	200,6
final	287,3	249,3
incremento	87,1	48,7
Tasa de crecimiento (g/día)	5,81	3,25
Pienso ingerido (g)	343,6	452,7
Energía ingerida (kJ)	4157,6	5477,7
(kJ/W ^{0.72} /día)	680,4	992,8
Energía depositada (kJ)	1498,1	837,3

El valor correspondiente a la energía depositada se ha calculado asumiendo un valor medio de 17,2 kJ (Rothwell y Stock, 1979) como coste energético

por gramo de peso corporal incrementado. Calculando la eficiencia como el cociente entre la energía depositada y la ingerida se obtienen los valores del 36,0% para los animales del grupo control y del 15,3% para los aclimatados al frío, es decir una eficiencia inferior a la mitad de la de aquéllos.

5.1.2. ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y COMPOSICION DEL ACERVO DE AMINOACIDOS LIBRES EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR.

El TAMI presenta actividades detectables para las distintas actividades enzimáticas estudiadas, y que en líneas generales son similares a las observadas en el hígado y el músculo esquelético, que son los principales tejidos implicados en el metabolismo de los aminoácidos. Únicamente no se han detectado actividades correspondientes a los enzimas arginasa y serina deshidratasa, enzimas que en la rata se encuentran principalmente confinados en el hígado (Remesar et al., 1980a; Palou et al., 1980b). La ausencia de arginasa, uno de los enzimas clave en el ciclo de la urea, indica que dicho ciclo no es funcional en el TAMI. Por otro lado, la serina deshidratasa es un enzima clave en la utilización gluconeogénica de la serina por parte del hígado del animal adulto (Sandoval y Sols, 1974), siendo nula en la mayor parte de los restantes tejidos (Palou et al., 1980b), lo que sugiere que el TAMI es incapaz de utilizar metabólicamente la serina, al menos a través de su desaminación directa.

Para los restantes enzimas estudiados, el TAMI muestra actividades comparables a las halladas en el músculo esquelético e incluso a las del hígado. Las actividades halladas en el hígado, músculo y tejido adiposo blanco son similares a las descritas en otros estudios llevados a cabo anteriormente en nuestro Departamento, especialmente en lo que se refiere a la alanina (Palou et al., 1980a) y aspartato transaminasas (Remesar et al., 1980c) y la glutamato deshidrogenasa (Remesar et al., 1980b). Las principales diferencias con relación a estos estudios se observan en la glutamina sintetasa (Arola et al., 1981a) y en la adenilato desaminasa (Arola et al., 1981b) del músculo esquelético; estas diferencias pueden atribuirse principalmente a razones metodológicas, especialmente a la composición del medio de homogenización utilizado (García-Palmer et al., 1985). Por otra parte, las actividades halladas para la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada son similares a las descritas para estos tejidos por Ichihara (1975) y Kadowaki y Knox (1982).

Con relación al tejido adiposo blanco, el TAMI presenta actividades más altas y por lo tanto una mayor capacidad potencial de metabolización de los aminoácidos, si bien al efectuar la corrección en función del contenido en proteínas aparece una clara similaridad entre ambos, aunque se mantienen las diferencias en la aspartato transaminasa, glutamina sintetasa y adenilato desaminasa en las hembras y la aspartato transaminasa, transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, glutamato deshidrogenasa y adenilato desaminasa en los machos. Esta mayor actividad viene determinada también por el mayor flujo sanguíneo a través del TAMI.

No se aprecian en ningún caso diferencias debidas al sexo de los animales en las actividades enzimáticas en el TAMI, si bien en todos los casos (salvo para la glutamina sintetasa) la tendencia observada es hacia una mayor actividad en las hembras que en los machos, hecho que quizá este de acuerdo con la mayor capacidad de producción de calor observada en las hembras (Castellà y Alemany, 1985).

La alanina transaminasa muestra en el TAMI una actividad notable, mayor que la del músculo y aproximadamente la tercera parte de la observada en el hígado. Este hecho se relaciona con la capacidad del TAMI de utilizar la alanina, de acuerdo con los estudios realizados *in vivo*, en los que se ha observado la incorporación de los carbonos de este aminoácido preferentemente en los lípidos del tejido (Prats, 1985; Monfar et al., 1987). En tal caso, el papel de este enzima en el TAMI estaría más próximo al del hígado (como tejido que utiliza la alanina) que al del músculo (como tejido productor de alanina), si se hace referencia a estos dos tejidos paradigmáticos implicados en el ciclo de la glucosa-alanina (Felig, 1973).

La actividad de la aspartato transaminasa parece estar más relacionada con el intercambio de sustratos entre el citoplasma y la mitocondria que con la utilización del aspartato (Dennis y Clark, 1978); también interviene activamente en la vía de suministro de nitrógeno 2-amínico procedente del glutamato hacia los ciclos de la urea y del purín-nucleótido. El TAMI, como tejido que oxida el exceso de sustratos, no parece necesitar tales intercambios intracelulares a gran escala, y es posiblemente por esto por lo que la actividad de este enzima es comparativamente baja con relación a la que presentan el hígado y el músculo esquelético.

La transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada es un enzima importante implicado en la primera etapa del catabolismo de estos aminoácidos, cuya utilización como sustratos energéticos es característica del músculo (Odessey y Goldberg, 1972), si bien es un enzima ampliamente distribuido en los tejidos de la rata (Kadowaki y Knox, 1982). La presencia de una actividad leucina aminotransferasa en el TAMI del ratón fue señalada por Rous et al. (1980), quienes indicaron que este tejido era capaz tanto de transaminar activamente este aminoácido como de descarboxilarlo. La elevada actividad hallada en el músculo esquelético está de acuerdo con esta observación, aunque de todas formas las actividades del TAMI y del tejido adiposo blanco, cuando se expresan en función del contenido en proteínas, son comparables a las de aquél, mientras que la del hígado es considerablemente inferior, tal como se señala en la bibliografía (Ichihara, 1975; Kadowaki y Knox, 1982). Esta elevada actividad hallada en el TAMI sugiere una cierta capacidad metabolizadora de los aminoácidos de cadena ramificada, lo que se relaciona con la elevada capacidad lipolítica del tejido, ya que la degradación final de los 2-cetoácidos de cadena ramificada sigue esencialmente las vías de degradación de los ácidos grasos (Bender, 1975); esto sugiere la posibilidad de que estos aminoácidos puedan ser utilizados como sustratos energéticos para el mantenimiento de la termogénesis del tejido.

La adenilato desaminasa es un enzima clave del ciclo del purín-nucleótido (Tornheim y Lowenstein, 1972), al que se le ha propuesto un papel significativo en el hígado en la conversión del exceso de nitrógeno 2-amínico en amonio, a través del ciclo del purín-nucleótido (Moss y McGivan, 1975). La actividad hallada en el TAMI es mayor que la del hígado, aunque muy inferior a la del músculo esquelético, que es el tejido en el que la actividad de este enzima es mayor (Arola et al., 1981b). La actividad presente en el TAMI probablemente no está acoplada con el proceso glucolítico, a diferencia de lo que sucede en el músculo (Tornheim y Lowenstein, 1972; Tornheim, 1979), sino que el alto potencial de producción de amonio parece relacionarse con una capacidad metabolizadora de aminoácidos por parte del tejido. Recientemente se ha sugerido que el fumarato formado en el ciclo del purín-nucleótido puede tener una función anaplerótica, proporcionando intermediarios del ciclo de Krebs, lo que

permitiría un incremento de la respiración mitocondrial durante la contracción muscular (Flanagan et al., 1986), por lo que no puede descartarse que en el TAMI pudiese también tener en parte un papel similar. La actividad hallada en estos experimentos es mayor que la descrita por Cooney et al. (1986), pudiéndose atribuir las diferencias a las distintas metodologías empleadas en cada caso, en especial por lo que se refiere a la temperatura de valoración, la cual afecta notablemente a la actividad de este enzima (Kaletha, 1976).

El elevado potencial de producción de amonio del TAMI a través de la adenilato desaminasa es parcialmente compensado por las altas actividades de dos enzimas que pueden actuar teóricamente como receptores de dicho amonio, la glutamato deshidrogenasa (McGivan y Chappell, 1975) y la glutamina sintetasa (Takagaki et al., 1961); cabe recordar que la glutamina es una forma no tóxica de transporte de nitrógeno hacia los tejidos del lecho espláncnico, donde se verifica su eliminación en forma de urea (Aikawa et al., 1973). Para ambas enzimas la actividad presentada por el TAMI es mayor que la del músculo esquelético y menor que la del hígado.

Todos estos datos parecen sugerir un activo potencial metabolizador de aminoácidos por parte del TAMI, de forma que esta maquinaria enzimática, unida a la elevada capacidad metabólica del tejido y al elevado flujo sanguíneo que recibe, parecen sugerir que los aminoácidos pueden representar una parte importante de los substratos que el tejido utiliza como combustible termogénico; al menos existe una capacidad enzimática suficiente para ellos. Por las actividades halladas para los enzimas estudiados, el TAMI ocuparía una posición intermedia entre el hígado y el músculo, principales tejidos implicados en el metabolismo de los aminoácidos y que representan los dos extremos del sistema de transporte de nitrógeno 2-amínico por la sangre (Felig, 1973); así pues, el TAMI se diferencia en lo referente al metabolismo de los aminoácidos de lo que sucede con los enzimas del metabolismo de los glúcidos y de los cuerpos cetónicos, en los que el TAMI está más próximo al tejido adiposo blanco que al hígado (Cooney et al., 1986).

Por lo que se refiere a la composición del acervo de aminoácidos libres del TAMI, se observa que cuando se expresa dicho contenido en función del peso del tejido, la concentración total de aminoácidos es menor a la de otros tejidos de la rata como el hígado y el músculo, si bien notablemente superior a la presente en la sangre o el plasma (Soley et al., 1982). El aminoácido predominante es la taurina, hecho que ha sido repetidamente observado en diferentes tejidos de la rata (Hayes y Sturman, 1981; Soley et al., 1982; López-Tejero et al., 1987), aunque no se ha podido concretar definitivamente el papel que juega en el metabolismo del animal. También son particularmente abundantes los aminoácidos gluconeogénicos, especialmente alanina, glutamato, glutamina y glicina, hecho que se repite en otros tejidos de la rata (Soley y Alemany, 1980b; Soley et al., 1982; Pastor-Anglada et al., 1986) y también en otras especies (Buttery y Rowsell, 1974; Hosaki et al., 1985). Por otra parte, la concentración de los aminoácidos esenciales respecto al total es pequeña ya que apenas representan el 7,5% del total, de modo similar a lo que ocurre en hígado y músculo (Soley et al., 1982).

TABLA 5.1.- RELACIONES DE CONCENTRACION TEJIDO/SANGRE Y TEJIDO/PLASMA.

	CONTROL		AYUNO		FRIO AGUDO		FRIO CRONICO	
	S	P	S	P	S	P	S	P
Ala	6,9	7,6	3,6 *	4,6 *	4,9 *	6,8	3,9 *	3,9
Glu	6,7	18,9	6,8	20,7	4,9 *	15,7	16,5 *	46,8 *
Gln	4,1	2,7	1,9 *	1,8 *	8,1 *	2,9	2,8 *	3,0
Asp	20,7	20,8	12,8 *	20,5	16,7	23,4	27,3 *	23,6
Asn	2,6	3,4	1,7 *	2,7	1,3 *	1,9 *	0,8 *	1,2 *
Ser	2,2	2,8	1,0 *	1,5 *	2,4	3,2	1,9	2,3 *
Thr	2,7	3,0	1,5 *	1,7 *	3,3 *	3,6 *	1,6 *	1,9 *
Gly	4,3	4,8	2,8 *	3,0 *	2,6 *	3,3 *	3,4 *	3,8 *
Pro	2,3	3,0	2,1	3,0	2,4	3,2	1,4 *	2,3
Lys	1,1	1,3	0,8 *	0,9 *	1,5 *	1,7 *	0,7 *	0,8 *
Arg	1,2	2,1	1,0 *	1,7 *	1,2	2,0	0,7 *	1,1 *
His	1,9	2,1	1,6 *	1,9	1,7	1,9	1,4 *	1,4 *
Cit	3,3	3,8	2,8	2,5 *	3,4	3,2 *	1,7 *	2,0 *
Orn	3,0	3,4	2,4	2,3 *	5,0 *	4,8	1,2 *	1,3 *
Leu	1,3	1,9	1,2	1,5 *	1,2 *	1,4 *	1,0 *	1,0 *
Ile	1,7	2,0	1,5	1,8	1,3 *	1,5 *	1,0 *	0,9 *
Val	1,9	2,1	1,4 *	1,5 *	1,2 *	1,3 *	1,3 *	1,3 *
Tau	50,1	49,9	25,5 *	39,5 *	24,7 *	25,5 *	32,5 *	47,5
Cys#	10,8	6,3	9,4	6,2	5,7 *	---	4,3 *	1,9 *
Met	2,1	2,0	1,6	1,6	1,4 *	1,0 *	0,8 *	0,5 *
Phe	1,3	1,5	1,2	1,3	1,3	1,6	0,9 *	0,9 *
Tyr	1,5	1,7	1,3	1,5	1,5	1,7	1,0 *	1,1 *
Trp	3,1	0,6	3,5	0,6	2,8	0,7	0,8 *	0,3 *
Total	5,9	6,2	3,6 *	4,7 *	4,9 *	5,0 *	5,6	6,5 *

Relaciones: S = (μ moles/l agua tisular)/(μ moles/l sangre)

P = (μ moles/l agua tisular)/(μ moles/l plasma)

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

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

5.1.3. EFECTO DEL AYUNO Y DEL FRIO SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS Y LA COMPOSICION DEL ACERVO DE AMINOACIDOS LIBRES DEL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

Se discuten a continuación las variaciones observadas en las actividades de los distintos enzimas estudiados, así como en el acervo de aminoácidos libres del TAMI como consecuencia del ayuno o de la exposición aguda o crónica al frío. Para ello se han considerado las relaciones de concentración de los distintos aminoácidos entre el TAMI y la presente en sangre y plasma (tabla 5.1), debido al reconocido papel que juegan las células sanguíneas en el transporte de aminoácidos entre los distintos órganos del animal (Elwyn, 1966; Felig et al., 1973; Viñas, 1986), así como por las diferencias en la composición del acervo de aminoácidos entre el plasma y la sangre total.

5.1.3.1. EFECTO DEL AYUNO.

Es un hecho bien conocido que el metabolismo y el transporte inter-órganos de los aminoácidos está aumentado durante el ayuno, incrementándose el flujo de alanina y de glutamina desde los tejidos periféricos hacia los órganos del lecho espláncnico (Aikawa et al., 1973; Felig, 1973; Ruderman, 1975), incrementándose la utilización hepática de alanina como parte del ciclo de la glucosa-alanina (Felig, 1973). En parte este flujo es utilizado para la gluconeogénesis hepática así como para el transporte del nitrógeno amínico hacia el hígado, para facilitar su eliminación principalmente a través del ciclo de la urea.

El TAMI de los animales sometidos a ayuno muestra un notable descenso en los niveles de aminoácidos tanto si se expresa por peso de tejido como por peso de agua tisular; los aminoácidos más afectados son la taurina, alanina, glutamina, serina y treonina. Por otra parte el ayuno de 24 horas provoca también una disminución de los niveles plasmáticos de aminoácidos totales mientras que aumenta la concentración a nivel de la sangre total, hecho ya descrito en la rata (Soley et al., 1982), con el consiguiente incremento en la relación células/plasma que se asocia con el importante papel que juegan los eritrocitos en el transporte interorgano de aminoácidos (Elwyn et al., 1972; Viñas, 1986). El incremento en los niveles sanguíneos puede relacionarse con la mencionada movilización de aminoácidos desde los tejidos periféricos y hacia los órganos del lecho espláncnico (Aikawa et al., 1973; Felig, 1973; Ruderman, 1975). También se produce un descenso en la concentración de glucosa y un aumento en los niveles de ácidos grasos plasmáticos (Palou et al., 1981), este último relacionado con el incremento de la lipólisis en el tejido adiposo blanco.

Las tasas de extracción de aminoácidos circulantes pueden verse afectadas por el descenso en el flujo sanguíneo como consecuencia del ayuno; de la misma forma que se ven afectadas la capacidad termogénica del tejido y su actividad metabólica global disminuyen en las situaciones de privación de alimento (Rothwell et al., 1984). A pesar de la disminución de la utilización energética de substratos, los cambios observados en el aminograma tisular con relación a los de los enzimas estudiados, sugieren una posible contribución de los aminoácidos como combustible del metabolismo energético del tejido. Los principales descensos en las concentraciones de aminoácidos se observan a nivel de los no esenciales, situación que está de acuerdo con lo observado en otros órganos de la rata durante el ayuno (Soley et al., 1982), y corresponde a la aplicación de una

estrategia de conservación del nitrógeno amínico en general, y de los aminoácidos esenciales en particular, durante las situaciones de ayuno (Cahill, 1970).

El descenso de los niveles de alanina en el TAMI, asociado a la disminución observada en su relación de concentración tisular con respecto a la circulante, sugiere la utilización de este aminoácido por parte del tejido, probablemente con finalidad energética, de acuerdo con lo observado en estudios realizados *in vivo* (Monfar et al., 1987). La falta de cambios en la alanina transaminasa, hecho similar al observado en el hígado (Palou et al., 1980a) sugiere que este enzima se encuentra presente en el tejido en una cantidad suficiente como para satisfacer el incremento de la utilización de alanina, al igual de lo que acontece en hígado y músculo.

No se han observado cambios en la concentración de glutamato del TAMI, ni tampoco en las relaciones de concentraciones tejido/sangre ni tejido/plasma, lo que está de acuerdo con el papel central que este aminoácido juega en el metabolismo global de los aminoácidos y en la economía del nitrógeno. El descenso observado en la actividad glutamato deshidrogenasa puede asociarse a la conservación de los niveles tisulares de glutamato, cuya proporción respecto al porcentaje total de aminoácidos sube del 9 al 15% como consecuencia del ayuno. Por otra parte, la relación de concentración glutamato/aspartato (3,3 en los controles y 3,7 en los animales ayunados) se mantiene prácticamente constante, de acuerdo con el papel equilibrador que desempeña la aspartato transaminasa, cuya actividad en el TAMI parece ser suficiente como para mantener el equilibrio entre ambos aminoácidos.

La falta de cambios en la glutamina sintetasa contrasta con el descenso que para este enzima se ha observado en el ayuno y el incremento en esta misma situación en el del músculo (Arola et al., 1981a). Las relaciones de concentración para el par glutamina/glutamato (0,87 en los controles y 1,45 en los ayunados) se incrementan considerablemente con el ayuno, sugiriendo un cambio en la captación de este aminoácido, dado que la relación entre la concentración tisular y la presente en sangre o plasma puede relacionarse tanto con una menor captación o una menor producción, si bien esta última posibilidad es poco probable pues la actividad de la glutamina sintetasa no varía, mientras que la disponibilidad de glutamato en el tejido se mantiene o incluso aumenta ligeramente.

Por otro lado, el descenso observado en el enzima productor de amonio adenilato desaminasa, al igual que sucede en el hígado de los animales ayunados (Arola et al., 1981b) sugiere una menor producción de amonio, el otro substrato de la glutamina sintetasa. La baja actividad del ciclo del purín nucleótido, unida al mantenimiento de la actividad de la transaminasa de los aminoácidos de cadena ramificada, se inscribe dentro de un esquema general de conservación del nitrógeno amínico que caracteriza al ayuno en los mamíferos (Cahill, 1970).

En líneas generales puede considerarse a partir de los resultados obtenidos que en una situación de ayuno de 24 horas el TAMI puede presentar una cierta capacidad de utilización de los aminoácidos, que afectaría principalmente a los no esenciales mientras que habría una tendencia hacia la conservación de los esenciales. En este sentido, el menor potencial generador de amonio que se observa en el tejido en esta situación está de acuerdo con la conservación de nitrógeno a nivel de todo el organismo que caracteriza el ayuno. Por otra parte, las menores relaciones de concentración entre el tejido y sangre o plasma sugieren unas menores tasas

de extracción, hecho al que debe unirse el menor efecto del flujo sanguíneo a través del tejido.

5.1.3.2. EFECTO DEL FRIO.

La exposición aguda al frío afecta a la actividad termogénica del TAM, principalmente por estimulación adrenérgica. Como resultado de esta estimulación se incrementa la oxidación de lípidos (Portet, 1981) y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Nedergaard y Cannon, 1985), mientras que durante la aclimatación al frío estas respuestas son progresivamente moduladas por la adaptación del tejido, lo que comporta cambios en el contenido de proteínas mitocondriales y de termogenina (Sundin y Cannon, 1980), así como un incremento en el flujo sanguíneo a través del tejido (Foster y Frydman, 1978b). El resultado conjunto de todos estos cambios es un incremento en la producción de calor que tiene por finalidad el mantenimiento de la temperatura corporal.

La exposición aguda al frío provoca sólo pequeños cambios en las actividades de los enzimas implicados en el metabolismo de los aminoácidos, así como cambios en la composición en el acervo aminoacídico del TAM menores de los que induce la aclimatación al frío. En este sentido las diferencias entre los dos grupos de animales expuestos al frío son más marcadas que las existentes entre el grupo control y el de frío agudo.

Algunos aminoácidos son probablemente más accesibles en el tejido de los animales expuestos de forma aguda al frío que en los controles, como puede observarse a partir de las concentraciones tisulares de los mismos. La exposición aguda al frío no modifica la concentración de aminoácidos totales del tejido cuando se efectúa la corrección en función del contenido de agua tisular, aunque sí se observan cambios en la mayor parte de dichos aminoácidos. La pérdida global de aminoácidos tisulares de estos animales es principalmente atribuible a los descensos en las concentraciones de taurina y de alanina, pudiendo estar relacionado este último con la utilización de este sustrato por parte del tejido (Prats, 1985; Monfar et al., 1987). Otras concentraciones tisulares varían también aunque en menor proporción absoluta con relación a los controles.

La aclimatación al frío provoca un aumento de los aminoácidos libres del tejido cuando los resultados se expresan corregidos por el contenido de agua tisular. Dicha exposición crónica al frío da lugar a una considerable disminución en la concentración de la mayor parte de los aminoácidos esenciales, así como en las de alanina y glutamina, la cual es compensada por los elevados incrementos producidos en los niveles de glutamato. Este hecho parece sugerir un flujo de nitrógeno amínico hacia glutamato, si bien esta tendencia aparece ligeramente modificada cuando las concentraciones tisulares se comparan en función de las presentes en sangre o en plasma, que pueden llegar a dar interpretaciones muy diferentes.

El frío induce un incremento de la concentración sanguínea de aminoácidos, lo que puede relacionarse con una activación del metabolismo de estos compuestos por parte del hígado (Whitten et al., 1970), unida a un incremento de la movilización de las proteínas musculares (Smith, 1976); el resultado es un balance nitrogenado negativo y una mayor excreción de urea (Bodansky y Duff, 1936; Young y Cook, 1955), lo que se refleja en un incremento de los niveles de urea plasmática. También se produce un incremento de los niveles de ácidos grasos plasmáticos como consecuencia de la movilización de las reservas lipídicas para satisfacer la mayor demanda termogénica en estos animales (Portet, 1981)

Los cambios en las concentraciones de aminoácidos circulantes son en parte paralelos a los observados en el TAMI, lo que permite hacer más comparables las situaciones de exposición aguda y crónica al frío. En ambos casos la mayor parte de las relaciones de concentración de aminoácidos muestran una tendencia comparable, como ocurre en los casos de la alanina, asparraguina, glicina, aminoácidos de cadena ramificada, taurina, metionina, "cisteína" y citrulina, así como para el conjunto de los aminoácidos totales. Ello sugiere la existencia de un proceso relativamente uniforme en la adaptación del metabolismo de los aminoácidos en el TAMI como consecuencia de la exposición al frío, lo que está de acuerdo con la uniformidad que se observa en la tendencia al cambio de algunas de las actividades enzimáticas estudiadas, como son la glutamato deshidrogenasa, la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada y la adenilato desaminasa, incrementándose la actividad de las dos primeras en función de la duración de la influencia del frío y disminuyendo la de la adenilato desaminasa.

Los cambios en las relaciones de concentración de los distintos aminoácidos tisulares con respecto a los circulantes pueden ser atribuidos a variaciones en la captación o liberación de los mismos por parte del tejido, o bien a cambio de su producción y utilización. Sin embargo, a partir de los cambios observados en las proteínas totales en ambas situaciones de exposición al frío, puede asumirse que el tejido no genera un flujo significativo de aminoácidos desde sus propias proteínas, por lo que los cambios en dichas relaciones de concentración sólo pueden ser la consecuencia de alteraciones en el intercambio de aminoácidos con la sangre o de cambios debidos a interconversiones entre diferentes aminoácidos. Estos datos, unidos a los que nos proporcionan las actividades de los diferentes enzimas estudiados, parecen sugerir que el TAMI acumula glutamato a expensas de otros aminoácidos, hecho que está de acuerdo con el incremento que paralelamente se observa en el caso del aspartato, y que es debido al equilibrio existente entre ambos aminoácidos por la presencia en el tejido de niveles suficientes de aspartato transaminasa. Por otra parte, los niveles de glutamina disminuyen sensiblemente como consecuencia de la aclimatación al frío a pesar de los altos niveles de glutamato, mientras que la relación de concentraciones con respecto a la sangre también disminuye con la duración de la exposición al frío; este hecho coincide con un descenso significativo de la actividad de la glutamina sintetasa en las ratas aclimatadas al frío cuando ésta se expresa en relación al contenido de proteínas del tejido. Estos datos sugieren una menor captación de glutamina por parte del tejido o, más probablemente, una menor síntesis de este aminoácido por parte del tejido.

Por otro lado, el incremento de la actividad de la glutamato deshidrogenasa no puede correlacionarse directamente con los datos disponibles debido a la reversibilidad del enzima, de modo que la actividad dirigida hacia la síntesis de glutamato, como en el caso del hígado (McGivan y Chappell, 1975) puede ayudar a explicar el origen del glutamato, mientras que su actividad en sentido contrario puede explicarse como una consecuencia del incremento en los niveles tisulares de este aminoácido y la necesidad de metabolizarlo, dado que la actividad del ciclo del purín-nucleótido parece considerablemente disminuída a la vista de los resultados obtenidos para la adenilato desaminasa. Esta posible incapacidad para convertir el nitrógeno amínico en amonio podría contribuir al mantenimiento de los altos niveles de aspartato, y al mismo tiempo está de acuerdo con el descenso observado de los niveles de actividad de la glutamina sintetasa, ya que ambos enzimas son respectivamente el principal productor (Moss y

McGivan, 1975) y el principal destoxicador (Takagaki et al., 1961) del amonio en los tejidos periféricos. La glutamina sintetasa puede también estar relacionada con la síntesis de las purinas, función especialmente importante en un tejido que muestra una clara hiperplasia como es el caso del TAMI como consecuencia de la aclimatación al frío (Bukowiecki et al., 1982).

Las concentraciones sanguínea y plasmática de los aminoácidos de cadena ramificada presentan un incremento progresivo con la duración de la exposición al frío, hecho que ya había sido mencionado por otros autores (Kuroshima, 1979). Por contra, la concentración de estos aminoácidos se mantuvo en el tejido en condiciones en las que sus relaciones con respecto a la sangre o al plasma descendieron progresivamente con la influencia del frío. Este hecho parece estar de acuerdo con una mayor captación de estos aminoácidos por parte del TAMI, que resulta tanto mayor cuando se comparan con los controles en función del flujo sanguíneo, que es mucho mayor en los animales aclimatados al frío (Foster y Frydman, 1978b). El aumento considerable de la actividad de la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada en este tejido como consecuencia del frío está de acuerdo con una activa utilización de estos aminoácidos en estos animales. Los grupos amino procedentes de dicha transaminación podrían ser transferidos al glutamato, mientras que sus cadenas hidrocarbonadas podrían ser utilizadas como substrato energético, del mismo modo que lo son en el músculo (Odessey y Goldberg, 1972). La posible utilización de los aminoácidos de cadena ramificada como substrato energético durante la aclimatación al frío ya había sido propuesta por otros autores (Goodenough et al., 1982), aunque no se había indicado que dicha función pudiera tener lugar en el TAM.

En el caso de la alanina, el descenso que se observa con la influencia del frío sugiere una menor captación de este aminoácido, cuya utilización por parte de este tejido ya ha sido puesta de manifiesto (Monfar et al., 1987), mientras que la ausencia de cambios significativos en la actividad de la alanina transaminasa sugiere, de la misma manera que la señalada en el caso de la aspartato transaminasa, que la actividad presente en el tejido es suficiente para cubrir sus necesidades metabólicas en este sentido.

Por lo tanto, a partir de los resultados proporcionados por las actividades enzimáticas y las concentraciones tisulares de los distintos aminoácidos, puede sugerirse que se dan efectivamente unos cambios significativos en el metabolismo de los estos substratos en el TAMI inducidos por la exposición al frío. La naturaleza de estos cambios muestra un considerable grado de uniformidad progresiva, por lo que probablemente sean los mismos mecanismos los que determinan los cambios en la exposición a corto o a largo plazo. En este sentido la exposición al frío o respuesta aguda es comparable a la adaptación al frío o respuesta crónica, representando dos grados diferentes de una misma respuesta uniforme de adaptación al frío.

5.1.4. RECAMBIO PROTEICO EN EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR.

Se han propuesto diferentes métodos para determinar la velocidad de recambio proteico, si bien ninguno de ellos está exento de problemas a la hora de interpretar los resultados obtenidos (Everett y Zak, 1980). El método que se ha utilizado en el presente estudio consiste en la administración de una única dosis de un trazador, que presenta la ventaja de su simplicidad aunque con el inconveniente de la posible reutilización de los aminoácidos procedentes de la degradación de las proteínas marcadas

(Alemany, 1976); este problema se ha resuelto mediante la utilización de la L-(guanidino-¹⁴C)-arginina como aminoácido trazador, ya que este aminoácido es degradado por la arginasa con lo que se reduce considerablemente, aunque no totalmente, dicha reutilización.

Los resultados correspondientes a la velocidad de recambio proteico en el TAMI indican una elevada capacidad de degradación de las proteínas por parte de este tejido, hecho que puede relacionarse de alguna manera con una alta capacidad de metabolización de los aminoácidos. Esta elevada capacidad de degradación de las proteínas se relaciona con la disminución del contenido de proteínas del TAMI observado en animales sometidos a ayuno, tal como se ha descrito tanto en el caso de la rata (Rothwell et al., 1984) como en el ratón (Desautels, 1985), que afecta también a las proteínas mitocondriales y a la capacidad termogénica del tejido. Por contra, la activación del tejido, tanto por administración de noradrenalina como por exposición al frío, determina un incremento en las proteínas tisulares, sobre todo de las mitocondriales (Desautels y Himms-Hagen, 1979). Este último dato se contradice en cierta manera con los resultados obtenidos por Yousef y Chaffee (1970), quienes determinaron a través de la administración de ⁷⁵Se-seleniometionina una baja capacidad de síntesis de proteínas en el TAM, a diferencia de lo que observaban en los casos del hígado y del riñón, y que dicha síntesis no se incrementaba como resultado de la aclimatación al frío.

Los valores de vida media de las proteínas obtenidos para los restantes tejido estudiados son comparables a los descritos normalmente en la bibliografía (Garlick et al., 1975; Millward y Garlick, 1972). Las diferencias observadas entre los distintos tejidos son atribuibles en parte al tipo de proteínas predominante en cada caso, con valores de recambio más lento para aquellos tejidos con un importante componente estructural como es el caso del músculo esquelético y del corazón (Millward, 1970; Swick y Song, 1974), mientras que el del hígado es notablemente inferior como corresponde a un tejido con una importante cantidad de enzimas, proteínas que presentan un recambio más rápido (Millward, 1970). Por otra parte, la situación del riñón y del tejido adiposo blanco son intermedias a las anteriores.

La vida media hallada para las proteínas plasmáticas es similar a la descrito por Steinbock y Tarber (1954), pudiéndose atribuir la pequeña diferencia existente a factores de tipo metodológico y también al menor contenido proteico del pienso utilizado en los presentes experimentos.

Dado que los resultados para la mayoría de los tejidos estudiados se encuentran entre los generalmente aceptados, cabe suponer que también los datos para el TAMI correspondan al mismo grado de realidad, estableciendo la fiabilidad de los datos presentados. Por ello cabe constatar que el TAMI presenta un muy activo recambio proteico, comparable al del hígado, que está de acuerdo con la plasticidad adaptativa de su síntesis de proteínas mitocondriales evaluada en estudios de adaptación al frío.

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

5.2.1. JUSTIFICACION DE LA METODOLOGIA UTILIZADA

Las dos técnicas más frecuentemente empleadas en los estudios *in vitro* sobre el metabolismo del TAM comportan la utilización de adipocitos aislados mediante incubación del tejido con colagenasa o la utilización de fragmentos pequeños de TAMI.

En los últimos años se ha utilizado, en un gran número de estudios, la técnica de incubaciones de adipocitos aislados mediante la incubación del tejido con colagenasa. Esta técnica presenta como principal ventaja el que el oxígeno no es un factor limitante, hecho importante dada la gran capacidad respiratoria de estas células. Otra ventaja de este tipo de preparaciones es que solamente se estudia un tipo de células, dado que en el tejido también aparecen otros tipos celulares (Bukowiecki et al., 1982), los cuales podrían interferir en determinados estudios, principalmente las terminales nerviosas.

Sin embargo, esta técnica presenta diferentes inconvenientes, como son el bajo rendimiento en la recuperación de células viables, la selección de células en función de su índice de flotabilidad, y también los posibles cambios que pueden producirse a nivel de distintos receptores hormonales (Feldman, 1978), debido a la presencia en algunas preparaciones comerciales de colagenasa de enzimas proteolíticos de acción similar a la de la tripsina. Otra crítica que puede hacerse a esta técnica es la pérdida durante el proceso de aislamiento de las zonas de comunicación intercelular (*gap junction*), las cuales probablemente están implicadas en la transmisión de substratos y de señales hormonales entre células, de manera que se pierde un posible sistema de regulación al tiempo que pueden quedar expuestas zonas de permeabilidad no fisiológica (Nedergaard y Lindberg, 1982).

La utilización de fragmentos de tejido en los estudios metabólicos del TAM es una técnica esencialmente similar a la empleada con el tejido adiposo blanco para el estudio de distintos aspectos metabólicos, entre ellos los relacionados con el metabolismo de los aminoácidos y más concretamente de la leucina (Goodman, 1964; Rous et al., 1980; Tischler y Goldberg, 1980; Yeh, 1984) y de la alanina (Snell y Duff, 1977).

Diferentes autores han utilizado esta técnica para dilucidar distintos aspectos del metabolismo del TAM de animales sometidos a diferentes situaciones fisiológicas, así como el efecto de distintas hormonas o agentes diversos (Shackney y Joel, 1966; Joel, 1966, 1970; Williamson y Matthews, 1974; Bégin-Heick et al., 1979; Agius y Williamson, 1981; Kasser y Martin, 1982; Assimacopoulos-Jeannet et al., 1982; Luboshitzky et al., 1983; Laury et al., 1984; Williamson e Ilic, 1985; Villarroya y Mampel, 1985; Zamora et al., 1987). A pesar de ser una técnica muy utilizada algunos autores la han criticado por considerar que las células están insuficientemente oxigenadas - con lo que la difusión de oxígeno puede limitar la tasa respiratoria (Friedli et al., 1978) - así como por el rápido descenso en los niveles tisulares de ATP observados por algunos autores incluso para tiempos de incubación cortos (McCormack, 1982).

Como puede comprobarse, cualquier aproximación al estudio *in vitro* del metabolismo del TAM presenta sus propias ventajas e inconvenientes, que determinan que ninguna de ellas sea plenamente preferible. En el presente

estudio se optó por la elección de la técnica de incubación de pequeños fragmentos de tejido, entre otras razones por haber sido utilizada con anterioridad en nuestro Departamento en el estudio del metabolismo de la glucosa por el TAMI (Villarroya, 1986).

Para verificar la validez de la técnica y establecer las condiciones óptimas a utilizar en estos estudios, se procedió a la realización de varias pruebas experimentales que comportaban la comprobación del efecto de la concentración de alanina a utilizar, así como si la utilización de este sustrato en las condiciones de incubación se mantenía lineal con respecto al tiempo. Estos estudios se hicieron extensivos al caso de la glucosa debido al interés en comprobar las posibles interrelaciones existentes entre ambos sustratos.

A partir de los resultados de la gráfica 4.2 se optó por escoger como concentración de trabajo la de $0,75 \mu\text{M}$, dado que para concentraciones mayores no se incrementaban significativamente ni la oxidación ni la incorporación de alanina al tejido; esta concentración es algo mayor que la concentración sanguínea de este aminoácido en la rata, de acuerdo con los resultados presentados en la tabla 4.7. Por contra, la oxidación de la glucosa sigue incrementándose para concentraciones superiores al rango fisiológico, hecho que otros autores han verificado mediante la determinación de la captación de 2-desoxiglucosa, demostrándose la elevada capacidad de captación de glucosa por parte de este tejido a altas concentraciones de este sustrato (Zamora et al., 1987). Pese a todo, se decidió adoptar como concentración de trabajo la de 5 mM , que también han utilizado otros autores en incubaciones del mismo tipo (Kasser y Martín, 1982; Villarroya y Mampel, 1985).

Se comprobó también la linealidad respecto al tiempo de incubación de la oxidación y la incorporación de ambos sustratos, con el fin de determinar si las velocidades de ambos procesos se mantenían constantes en incubaciones de hasta una hora de duración. Los resultados obtenidos (gráfica 4.3) confirman la constancia de las velocidades de oxidación e incorporación, tanto para la alanina como para la glucosa, lo que supone el poder calcular dichas velocidades con un solo tiempo de incubación. De hecho la linealidad de la utilización de la glucosa por el TAM con este modelo experimental ya había sido puesta de manifiesto incluso para incubaciones de hasta dos horas (Kasser y Martín, 1982; Villarroya, 1986).

Finalmente se determinaron las relaciones de concentraciones ATP/ADP y lactato/piruvato a diferentes tiempos de incubación, para caracterizar la situación metabólica del tejido a lo largo del proceso de incubación. De especial importancia resulta ser la constancia de la relación ATP/ADP, que se mantiene ligeramente por encima de la unidad durante la primera hora de incubación. Esta observación contradice una de las principales críticas a la técnica de incubación de fragmentos de tejido, según la cual los niveles de ATP del TAM disminuyen brusca e irreversiblemente en los primeros minutos de incubación (McCormack, 1982), con el correspondiente descenso de la relación ATP/ADP. De todas formas, a los 60 minutos de incubación se produce un descenso significativo tanto de los niveles de ATP como de los de ADP, y por ello se seleccionó como tiempo de incubación el de 20 minutos para todos los casos. Por otra parte, la relación lactato/piruvato desciende considerablemente durante la primera hora de incubación a partir de unos valores iniciales altos, que probablemente son el resultado de la inevitable anoxia que se produce durante el proceso de extracción y de preparación del tejido.

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

Una vez establecidas las condiciones óptimas del sistema de incubaciones *in vitro*, se estudió el efecto la glucosa sobre la utilización de la alanina por el TAMI, así como el efecto recíproco. Los resultados indican que la presencia de glucosa en el medio de incubación determina una tendencia hacia una mayor utilización de la alanina, especialmente por lo que se refiere a la incorporación a los distintos componentes tisulares, tendencia que se pone de manifiesto en la gráfica 4.5. Esta interacción de la glucosa sobre la utilización de la alanina podría estar relacionada con la disponibilidad de potencial reductor (NADPH) necesario para la síntesis de ácidos grasos a partir del acetyl-CoA formado por acción de la piruvato deshidrogenasa sobre el piruvato procedente tanto de la alanina como de la glucosa. De alguna manera, la presencia de alanina determinaría que parte de la glucosa fuese utilizada a través de la vía de las pentosas-fosfato, la cual es bastante activa en este tejido (Beloff-Chain et al., 1962; Mampel, 1981), generándose el NADPH necesario para la lipogénesis.

Cuando se estudia el efecto de la alanina sobre la utilización de la glucosa se aprecia una situación opuesta a la anterior, de tal forma que para una determinada concentración de glucosa el incremento de la concentración de alanina en el medio provoca una disminución de su utilización, afectando de forma más marcada a su oxidación que a la incorporación en componentes tisulares. Una posible explicación de este comportamiento podría estar basada en que haya una utilización de 2-cetoglutarato que actúa como receptor del grupo 2-amino de la alanina, lo que representaría una disminución en los niveles de uno de los principales intermediarios del ciclo de Krebs, con la consiguiente pérdida de la capacidad oxidativa global del mismo.

Para una mejor comprensión de estos resultados, se calcularon a partir de los valores de captación global de alanina o de glucosa los valores correspondientes a las K_M y a las V_{MAX} , obteniéndose los siguientes resultados:

		K_M (mM)	V_{MAX} ($\mu\text{moles.hora}^{-1}.\text{g}^{-1}$)
Alanina [Glucosa]:	1 mM	0,157	2,23
	3 mM	0,799	4,53
	7,5 mM	0,545	3,94
	10 mM	0,069	2,51
Glucosa [Alanina]:	0,3 mM	1,424	12,97
	0,75 mM	0,718	10,25
	1,0 mM	0,610	8,40
	1,5 mM	0,303	6,78

En el caso de la alanina se observa que al aumentar la concentración de glucosa en el medio de incubación aparece un comportamiento bifásico, de forma que para concentraciones entre 1 y 3 mM aumentan los valores tanto de K_M como de V_{MAX} , mientras que para concentraciones mayores se produce una clara disminución de ambos parámetros. Por contra, en el caso de la glucosa hay una clara disminución de la K_M y de la V_{MAX} conforme aumenta la concentración de alanina, o lo que es lo mismo, al aumentar la concentración de alanina disminuye la velocidad a la que puede ser utilizada

la glucosa por el TAMI al tiempo que aumenta la afinidad del tejido hacia ese sustrato. De todas formas estos resultados tan sólo son aproximativos, por cuanto se han obtenido a partir de cuatro puntos y con un margen de concentraciones reducido. Cabe señalar, sin embargo, que la alineación de los puntos en una representación de Lineweaver y Burk dió en todos los casos coeficientes de correlación lineal superiores a 0,95.

Estos datos parecen indicar la existencia de un alto grado de interrelación entre ambos sustratos del TAM, que favorece la utilización de alanina cuando hay poca glucosa disponible y que no disminuye sensiblemente la utilización de ésta aún cuando haya suficiente alanina disponible.

5.2.3. EFECTO DE LA INSULINA, NORADRENALINA Y GLUCAGON SOBRE LA UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSEO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".

También se estudió el efecto de diferentes concentraciones de la insulina, noradrenalina y glucagón sobre la incorporación de los carbonos de la alanina al tejido, así como la oxidación hasta CO_2 , viéndose simultáneamente el efecto de la glucosa. En la tabla 5.2 se indican los porcentajes de alanina oxidada hasta CO_2 o incorporada al tejido en cada una de las situaciones hormonales estudiadas, así como el efecto de las distintas hormonas sobre el destino final de dicha alanina.

INSULINA

La insulina presenta un claro efecto estimulador sobre la utilización de la alanina por el TAMI, tanto de su oxidación como sobre su incorporación a componentes tisulares, si bien dicho efecto estimulador se verifica tan sólo en aquellos casos en los que la glucosa está presente en el medio de incubación, dado que no se aprecia ninguna diferencia estadísticamente significativa cuando este sustrato está ausente.

Es un hecho conocido la capacidad de la insulina de incrementar la utilización de la glucosa por el TAM, incrementando tanto su oxidación como su incorporación a lípidos (Shackney y Joel, 1966), que tiene lugar inicialmente a través del incremento de su captación por el tejido (Czech et al., 1974), así como su incorporación en los componentes tisulares y muy especialmente en los ácidos grasos como consecuencia de la estimulación de la lipogénesis (McCormack, 1982). Dado que el metabolismo de la alanina comporta como primera etapa su transaminación y conversión en piruvato, una explicación de la mayor utilización del aminoácido en presencia de insulina se podría relacionar con una activación de la piruvato deshidrogenasa inducida por la insulina (McCormack y Denton, 1977), mientras que la activación de la acetil-CoA carboxilasa también inducida por la insulina (McCormack y Denton, 1977) potenciaría su incorporación en la fracción de ácidos grasos. En este sentido debe mencionarse que en el tejido adiposo blanco *in vitro* la insulina también tiene un efecto activador de la piruvato deshidrogenasa (Taylor et al., 1973) que requiere la presencia de una fuente exógena de glúcidos para poder tener lugar (Farese et al., 1984). Por otra parte, el efecto estimulador de la glucosa sobre la utilización de alanina podría estar relacionado en parte con el hecho de que la glucólisis genera ATP a nivel citoplasmático, el cual podría favorecer la captación de este aminoácido.

No se dispone de información en la bibliografía sobre los efectos de la insulina o de otras hormonas sobre la utilización de alanina y otros

Tabla 5.2.- EFECTO DE LA INSULINA, NORADRENALINA Y GLUCAGON SOBRE LA PROPORCION DE ALANINA OXIDADA E INCORPORADA AL TEJIDO.

		Porcentaje de alanina		Porcentaje respecto a basal		
		Oxidada	Incorporada	Oxidada	Incorporada	Captada
INSULINA (μ U/ml)						
Basal	+	62,5	37,5			
	-	78,7	21,3			
50	+	63,0	37,0	+20,2	+17,5	+19,2
	-	80,8	19,2	+36,0	+19,5	+32,5
200	+	58,5	41,5	+35,8	+60,4	+45,0
	-	79,2	20,8	+28,8	+24,4	+27,8
1000	+	59,9	40,1	+34,8	+50,3	+40,6
	-	80,6	19,4	+40,9	+24,8	+37,5
NORADRENALINA (μ g/ml)						
Basal	+	64,4	35,5			
	-	78,7	21,3			
0,1	+	84,2	15,8	+8,9	-63,0	-16,7
	-	93,0	7,0	+0,1	-72,3	-15,4
0,5	+	90,5	9,5	+0,1	-81,0	-28,7
	-	94,9	5,1	-0,2	-80,4	-17,3
1,0	+	89,5	10,5	+3,3	-78,0	-25,6
	-	94,6	5,4	-10,5	-81,2	-25,6
GLUCAGON (ng/ml)						
Basal	+	64,0	36,0			
	-	79,9	20,1			
0,5	+	70,1	29,9	-10,1	-31,6	-17,8
	-	76,8	23,2	-22,9	-7,5	-19,8
5	+	70,1	29,9	-8,0	-30,4	-16,1
	-	82,6	17,4	-17,3	-30,7	-19,9
20	+	72,8	27,2	-20,8	-48,7	-30,8
	-	87,8	12,2	-37,4	-65,3	-43,0

+ = medio de incubación con glucosa 5 mM.
 - = medio de incubación sin glucosa.

aminoácidos por parte del TAM, aunque sí en otros tejidos. De este modo, es un hecho conocido que la insulina estimula el transporte de la alanina y de otros aminoácidos en el músculo (Kipnis y Noall, 1958; Elias et al., 1968; Riggs y McKirahan, 1973; Zorzano et al., 1986) y en otros tejidos (Guidotti et al., 1978; Shotwell et al., 1983), y también que promueve la incorporación de dichos aminoácidos en las proteínas (Manchester y Young, 1958; Fulks et al., 1975), por lo que es probable que se den efectos similares en el TAM, con lo que se podrían explicar los resultados obtenidos. En este sentido debe señalarse que no se ha realizado ningún estudio dirigido a la caracterización de los transportadores implicados en la captación de aminoácidos por parte del TAM; de todas formas, estudios muy recientes han señalado que el transporte del 2-amino-isobutirato por este tejido *in vitro* disminuye por acción de la uabaina y es estimulado por acción de la insulina, así como que es dependiente de la concentración de Na^+ y K^+ presentes en el medio de incubación (Zamora et al., 1987).

Como puede apreciarse en la tabla 5.2, la proporción de alanina oxidada o incorporada al tejido se mantiene, independientemente de la concentración de insulina presente en el medio, si bien la oxidación es más importante en aquellos casos en los que la glucosa está ausente del medio de incubación; también se observa que el porcentaje de incorporación de los carbonos del aminoácido al tejido con relación a la situación basal es más marcada en las incubaciones realizadas en presencia de glucosa.

NORADRENALINA

La noradrenalina provoca una considerable disminución en la incorporación de la alanina al tejido, aunque la oxidación del aminoácido permanece inalterada. La presencia de glucosa en el medio de incubación determina una disminución de la incorporación de la alanina, afectando en menor grado a su oxidación. Por su parte, en la tabla 5.2 se observa que la presencia de la noradrenalina determina un incremento en la proporción de alanina oxidada, como resultado de la disminución de la incorporación de la alanina al tejido; este descenso se relaciona con la activación de la lipólisis inducida por la noradrenalina, con el consiguiente acúmulo de acetil-CoA, que actúa inhibiendo a la piruvato deshidrogenasa.

Aunque tampoco en este caso se dispone en la bibliografía de información referente a la acción de la noradrenalina sobre la utilización de la alanina en este tejido, sí se sabe que esta hormona inhibe la oxidación de la glucosa (Kasser y Martin, 1982), mientras que la administración de β -agonistas provoca un aumento en la captación del análogo 2-desoxiglucosa por el TAM (Young et al., 1984a). Por otra parte, se ha comprobado que la administración de noradrenalina disminuye la utilización de la glucosa para la síntesis de lípidos, afectando concretamente a la capacidad de síntesis de ácidos grasos; este hecho se ha comprobado también *in vivo*, observándose que la noradrenalina ejerce una acción estimuladora de la piruvato deshidrogenasa, mientras que disminuye la actividad de la acetil-CoA carboxilasa (Gibbins et al., 1985); además, dado que el TAM es muy sensible a la acción lipolítica de la noradrenalina (Bukowiecki et al., 1981; Kasser y Martin, 1982), la presencia de esta hormona promueve una mayor disponibilidad de acetil-CoA procedente de la degradación de los ácidos grasos endógenos, lo que explica una menor utilización del acetil-CoA procedente de la alanina. De este modo Kasser y Martin (1982) comprobaron en un modelo de incubaciones *in vitro* que al aumentar la concentración de noradrenalina en el medio de incubación se

incrementaba la oxidación de los ácidos grasos y disminuía la utilización de la glucosa, situación que en nuestro caso puede hacerse fácilmente extensible a la alanina.

En la tabla 5.2 se observa que la presencia de la noradrenalina determina un incremento en la proporción de alanina oxidada, como resultado de la disminución de la incorporación de alanina al tejido; este descenso se relaciona con la activación de la lipólisis inducida por la noradrenalina, con la consiguiente acumulación de acetil-CoA, que actuaría inhibiendo a la piruvato deshidrogenasa. Por otra parte, la noradrenalina puede actuar inhibiendo la captación de glucosa por el tejido, lo que puede conducir a una disminución de los niveles de ATP citoplasmáticos, que es posible que afecten a la captación de alanina por ser este proceso dependiente de energía.

GLUCAGON

Los efectos del glucagón son similares a los de la noradrenalina y opuestos a los de la insulina, con una disminución en la incorporación de los carbonos de la alanina a los componentes tisulares y un efecto - menos marcado que en el caso de la noradrenalina - en su oxidación. Al igual que en los casos anteriores la presencia de glucosa determina un incremento significativo sobre la incorporación de alanina. En la tabla 5.2 se puede observar que la disminución de la oxidación con relación a las condiciones basales es más marcada en las incubaciones efectuadas sin la presencia de glucosa en el medio, mientras que este efecto no es tan claro en el caso de la incorporación a los componentes tisulares. La respuesta observada entra de lleno dentro de lo que puede esperarse de la acción de una hormona lipolítica, relacionándose con los efectos sobre otros aspectos metabólicos descritos para el glucagón sobre el TAM (Joel, 1966).

5.2.4. EFECTO DEL AYUNO Y DEL FRIO SOBRE LA UTILIZACION DE LA ALANINA POR EL TEJIDO ADIPOSO MARRON INTERESCAPULAR "IN VITRO".

Como primera etapa en el estudio de la utilización de la alanina por el TAMI de animales sometidos a ayuno o expuestos al frío se determinó la linealidad de la incorporación de los carbonos del aminoácido a las distintas fracciones del tejido. En todos los casos estudiados se observó una buena linealidad, si bien en el caso de la fracción hidrosoluble se apreció que la velocidad de incorporación no se mantenía constante sino que era mayor durante los primeros minutos de incubación. La explicación a este hecho debe buscarse en que la fracción hidrosoluble está constituida por alanina y otros aminoácidos, lactato, piruvato, glicerol y otros metabolitos intermediarios, que no se acumulan en el tejido a diferencia de los triacilglicérols, sino que presentan un recambio interno elevado. Por otra parte se observó que la mayor parte de la radiactividad incorporada en el tejido correspondía a lípidos, y más concretamente a ácidos grasos, mientras que la incorporación a las restantes fracciones era considerablemente inferior. De esta manera, el porcentaje de incorporación de los carbonos de la alanina a las distintas fracciones estudiadas, en condiciones basales fue el siguiente (expresado en porcentaje sobre el total de la radiactividad del tejido):

	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
Oxidación a CO ₂	65,1	86,5	75,8	79,7
Acidos grasos	28,1	6,9	18,0	9,3
Glicerol de glicéridos	3,0	1,0	1,7	1,6
Fracción hidrosoluble	1,7	2,9	2,4	6,8
Residuo seco deslipidado	2,1	2,7	2,1	2,6

El hecho de que la mayor parte de la alanina incorporada al tejido lo hiciera en forma de lípidos está de acuerdo con los resultados observados *in vivo* (Monfar et al., 1987).

En los animales del grupo control la insulina y la noradrenalina presentan por separado los efectos anteriormente señalados con respecto a la utilización global de la alanina. De este modo, la insulina estimula la síntesis de ácidos grasos al favorecer la lipogénesis (McCormack, 1982), mientras que la disminución de la actividad de esta vía metabólica en presencia de noradrenalina está de acuerdo con el carácter lipolítico de esta hormona (Bukowiecki et al., 1981; Kasser y Martin, 1982), y afecta de un modo paralelo a la síntesis de glicerol de glicéridos. Por otra parte, la acción combinada de ambas hormonas presenta un efecto compensador aunque más próxima a la acción de la noradrenalina, lo que se pone de manifiesto principalmente en la incorporación de los carbonos de la alanina a los lípidos y al residuo seco deslipidado, de un modo análogo al descrito para la glucosa (Villarroya, 1986).

EFEECTO DEL AYUNO.

La utilización global de la alanina por el TAMI es menor en los animales sometidos a ayuno que en los del grupo control, hecho que se inscribe dentro de la estrategia de disminución del metabolismo en el tejido de los animales ayunados (Rothwell et al., 1984). Esta disminución es esencialmente manifiesta en la incorporación de los carbonos del aminoácido a la fracción de ácidos grasos, que llega a ser apenas el 10% de la observada en los animales del grupo control en condiciones basales; este hecho está de acuerdo con la menor incorporación de la alanina a los lípidos del TAMI observada en estudios *in vivo* (Monfar et al., 1987). También es considerablemente inferior la incorporación al glicerol de glicéridos, mientras que proporcionalmente el tejido oxida más alanina hasta CO₂ con independencia de la situación hormonal estudiada.

El efecto estimulador de la insulina sobre la utilización de la alanina, y la disminución que sufre dicha utilización por acción de la noradrenalina que se observaba en los animales del grupo control, no se ponen de manifiesto de forma estadísticamente significativa en los animales sometidos a ayuno, indicando una menor sensibilidad hacia esas dos hormonas, si bien las tendencias en este sentido se mantienen. De todas formas, la insulina sí que estimula la oxidación de la alanina, mientras que la noradrenalina disminuye la síntesis de ácidos grasos, de acuerdo con el carácter lipolítico de esta hormona (Kasser y Martin, 1982), al tiempo que provoca una disminución en la incorporación al residuo seco deslipidado. Como este residuo está constituido esencialmente por proteínas, este descenso de la ya escasa incorporación del aminoácido a la proteína está de acuerdo con el significado también proteolítico de la acción tisular de las catecolaminas. Por otra parte, la acción combinada de las dos hormonas

tampoco provoca cambios importantes, si bien los resultados parecen indicar que la noradrenalina revierte hasta cierto punto los efectos de la insulina, en el sentido de disminuir la utilización de la alanina en estas condiciones.

EFECTO DEL FRIO

El frío provoca cambios importantes en la utilización de alanina por el TAMI, cambios que están en función de la duración de la exposición al frío. De este modo, el TAMI de los animales expuestos de forma aguda al frío muestra una mayor utilización de alanina, mientras que ésta es menor en el de los aclimatados al frío. Estos resultados muestran un claro paralelismo con los observados en los estudios *in vivo*, que son comentados en el apartado 5.3.

Desde el punto de vista de la utilización global, el principal destino de la alanina es la oxidación, al igual que en los otros grupos estudiados, mientras que la síntesis de ácidos grasos cuando se representa en proporción a la utilización total es prácticamente el doble en el tejido de los animales expuestos de forma aguda al frío que en los aclimatados al frío. En los animales expuestos de forma aguda al frío la insulina no parece mostrar un efecto claro de estimulación sobre la utilización de la alanina, mientras que sí hay una clara acción de la noradrenalina sobre la síntesis de ácidos grasos; de todas formas, al considerar la acción conjunta de ambas hormonas, los resultados parecen señalar que los efectos de la insulina predominan sobre los de la noradrenalina en la oxidación, pero no en la síntesis de ácidos grasos. Por contra, en el tejido de los animales expuestos crónicamente al frío la insulina y la noradrenalina no presentan una acción tan contrapuesta. Debe tenerse en cuenta que en estas condiciones se observa una elevada captación de glucosa *in vivo*, de modo que la amplia disponibilidad de ATP, acetil-CoA, NADPH y otros intermediarios pueden enmascarar el efecto *puro* de las hormonas sobre un sistema ya alterado con respecto a las condiciones basales.

Los resultados obtenidos en estos experimentos *in vitro* parecen sugerir que el TAMI de la rata puede modular su capacidad de utilizar la alanina en función de la situación fisiológica a la que se encuentre sometido el animal, al mismo tiempo, la respuesta hormonal puede variar según esas mismas condiciones, siguiendo en todo momento las mismas pautas generales ya enunciadas anteriormente.

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

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

Para cuantificar la captación o liberación de aminoácidos y glucosa por el TAMI *in vivo* de animales sometidos distintas situaciones experimentales por la técnica de la determinación de diferencias arteriovenosas, es preciso conocer los valores del flujo sanguíneo a través del tejido en dichas situaciones. El método empleado para la determinación del flujo sanguíneo en estos estudios está basado en la utilización de microesferas marcadas radiactivamente, técnica que ha sido utilizada por diversos autores (Foster y Frydman, 1978a, 1978b, 1979; Rothwell y Stock, 1981, 1984; Yahata et al., 1983; Ma y Foster, 1984), habiéndose verificado una buena correlación entre los resultados obtenidos con este método con los obtenidos con otros como la técnica del aclaramiento del ^{133}Xe (Astrup et al., 1984). Otras técnicas tales como el método electromagnético son de difícil aplicación en este caso, dado el pequeño diámetro de la vena de Sulzer, que drena la sangre del TAMI.

Los resultados obtenidos para los distintos grupos experimentales son comparables a los descritos en la bibliografía, a pesar de la existencia de una considerable dispersión entre los resultados obtenidos por diferentes autores. De este modo, la exposición aguda o crónica al frío induce un notable incremento del flujo sanguíneo a través del TAMI, hecho que ya se puso de manifiesto desde los estudios de Foster y Frydman (1978a, 1978b), incremento que se relaciona con el aumento en la capacidad termogénica del tejido en estos animales (Desautels y Himms-Hagen, 1979; Nedergard y Cannon, 1985), con la consiguiente necesidad de aporte de substratos y de oxígeno, así como de la exportación del calor producido hacia otros órganos del animal (Smith, 1964).

No existen, en cambio, referencias al efecto del ayuno sobre el flujo sanguíneo a través del TAM. El descenso observado, aunque no es estadísticamente significativo, está de acuerdo con la disminución de la actividad termogénica del tejido en esta situación, descrita tanto en la rata (Rothwell et al., 1984) como en el ratón (Desautels, 1985).

5.3.2. CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS Y GLUCOSA EN SANGRE Y PLASMA ARTERIALES.

Las concentraciones de los distintos aminoácidos presentes en sangre y plasma arteriales no coinciden plenamente con los resultados indicados en las tablas 4.7 y 4.8. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la distinta forma de obtención de las muestras (Milakofsky et al., 1984), que en un caso fueron obtenidas por decapitación del animal, con la correspondiente mezcla de sangre arterial y venosa, mientras que las correspondientes a los experimentos *in vivo* se han obtenido por punción directa de la arteria aorta previa anestesia del animal; este factor de la anestesia también debe ser tenido en cuenta, ya que afecta sensiblemente la composición del plasma (Arola et al., 1980). Por otra parte las características de los animales de los distintos grupos experimentales utilizados en cada caso eran algo diferentes, en especial en lo referente a la duración de los periodos de ayuno y de exposición al frío.

Las concentraciones de los distintos aminoácidos en la sangre arterial de los animales del grupo control son algo mayores que las descritas habitualmente en la bibliografía (Schröck et al., 1980; Révész et al., 1983; Goldstein et al., 1983; Brosnan et al., 1983). Con el ayuno se produce una disminución de los niveles arteriales de glucosa y de algunos aminoácidos, especialmente de la alanina, tal como se ha descrito en otras situaciones similares (MacDonald et al., 1976; Révész et al., 1983; Révész y Demigné, 1983). No se dispone de referencias bibliográficas sobre las concentraciones arteriales de aminoácidos en animales expuestos al frío que permitan contrastar los resultados obtenidos; en cualquier caso las diferencias observadas tanto para la sangre como para el plasma son muy pequeñas con respecto al grupo control. Por lo tanto, la similitud en las concentraciones de aminoácidos en los distintos grupo experimentales parece indicar que la asequibilidad de estos substratos está determinada principalmente por las diferencias en el flujo sanguíneo a través del TAMI, siendo especialmente importante este hecho en el caso de los animales expuestos al frío en los que se aprecia un notable incremento de este parámetro.

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

En los animales del grupo control se observa una liberación significativa de taurina y prolina, mientras que se mantiene una tendencia a la liberación de todos los aminoácidos salvo en los casos de glutamato, glutamina, valina y metionina. Sin embargo, si se estudia por separado la contribución de la fracción corpuscular y de la plasmática, se observa que la captación de aminoácidos se verifica preferentemente a partir de la fracción plasmática mientras que la liberación se produce a nivel de la fracción celular, salvo para el caso de la asparraguina; esta situación, en cambio, no se repite en ninguno de los restantes grupos experimentales. En todos los casos, para determinar la contribución de las fracciones celular y plasmática, se han utilizado las concentraciones presentes en sangre total y en plasma, efectuando la corrección por el valor del hematocrito, dado que la utilización con este fin de las células sanguíneas aisladas puede dar lugar a una importante pérdida de distintos aminoácidos, principalmente los esenciales (Hagenfeldt y Arvidsson, 1980).

En los animales ayunados también se observa una tendencia hacia la liberación de aminoácidos, la cual afecta principalmente a los no esenciales y entre ellos a la alanina, glutamina y glicina, así como a la citrulina. En este caso no se manifiestan las diferencias entre las fracciones celular y plasmática, a diferencia de lo acontecido en el grupo control. El comportamiento del TAMI en estos animales es similar al descrito en el caso del tejido adiposo blanco *in vitro*, en el que se ha observado una exportación tanto de alanina como de glutamina (Snell y Duff, 1977; Tischler y Goldberg, 1980). En este sentido, el TAMI de los animales sometidos a ayuno se comporta de modo semejante al músculo en esta situación, ya que también exporta estos dos aminoácidos (Ruderman, 1975), si bien la contribución del TAMI al aporte de substratos gluconeogénicos para el hígado es despreciable si se compara con la del músculo; del mismo modo el TAMI presenta una tendencia hacia una captación de aminoácidos de cadena ramificada mayor que en los animales del grupo control, al igual que lo que se observa en el caso del músculo (Goldberg y Odessey, 1972). Por otra parte, la exportación de glicina puede estar relacionada con las de alanina

y glutamina, dado que este aminoácido también puede jugar un papel como substrato gluconeogénico importante en determinadas situaciones (Rémesy et al., 1983).

La exposición aguda al frío provoca una clara tendencia hacia la captación de los distintos aminoácidos, especialmente del grupo de los esenciales y es estadísticamente significativa en el caso de la isoleucina, aunque también se produce una liberación neta de prolina al igual que en el caso de los animales del grupo control. La captación de aminoácidos esenciales posiblemente esté relacionada con la hiperplasia del tejido y con el incremento de proteínas del tejido por efecto del frío. Por contra, la exposición prolongada al frío determina una tendencia a la exportación de aminoácidos, especialmente de alanina, taurina y arginina, si bien capta isoleucina y glutamina, tendencias que ya se presentaban en el grupo control aunque de forma mucho menos acusada.

La alanina es liberada de forma significativa en los animales ayunados y, sobre todo, en los expuestos crónicamente al frío. En este último caso sus carbonos podrían proceder en parte del piruvato derivado de la glucólisis, dado que en esta situación la captación de glucosa por el tejido es muy importante, y por otra parte la actividad de la alanina transaminasa es suficiente. En este sentido, de los distintos grupos estudiados el que presenta una máxima captación de alanina es el de los animales expuestos al frío de forma aguda, mientras que la liberación máxima corresponde a los animales expuestos crónicamente al frío, y la misma tendencia se observa para el conjunto de los aminoácidos; este hecho presenta una clara similitud a los resultados observados en los estudios *in vitro*, con una mayor utilización de alanina en los expuestos de forma aguda al frío, y menor en el de los aclimatados al frío.

La tendencia a la captación de glutamina se presenta en los dos grupos de animales expuestos al frío, así como en los controles, siendo más importante la contribución de la fracción celular que la de la plasmática. El hecho que se produzca una captación de glutamina es un tanto sorprendente, dado que el tejido presenta una activa glutamina sintetasa. Posiblemente parte de la glutamina captada sea convertida en glutamato a través de la glutaminasa, que también es muy activa en este tejido (Cooney et al., 1986), y a su vez este glutamato podría ser convertido en parte en prolina, explicándose así la liberación de este aminoácido en los animales expuestos al frío. También es posible que parte de esta glutamina sea utilizada en la síntesis de purinas y pirimidinas, necesarias en un tejido que muestra una marcada hiperplasia en esta situación. Por su parte, el glutamato ocupa una posición central en el metabolismo de los aminoácidos, observándose una relación relativamente constante entre la concentración tisular de este aminoácido y las de alanina, glutamina o prolina.

La glicina es un aminoácido que muestra en todos los casos una tendencia a ser liberado, aunque únicamente sea estadísticamente significativa esta liberación en los animales ayunados. Es posible que esta glicina proceda del metabolismo de la serina, dado que este aminoácido no puede ser metabolizado a través de la serina deshidratasa, puesto que este enzima no está presente en este tejido.

Para una mejor discusión de los resultados obtenidos, se ha procedido a calcular el balance de nitrógeno para el TAMI en las distintas situaciones estudiadas, que se presentan en la tabla 5.3. Para ello se han agrupado los distintos aminoácidos en cuatro grupos de la siguiente forma:

- aminoácidos no esenciales, que incluye a la alanina, glutamato, glutamina, aspartato, asparraguina, serina, glicina y prolina; también

se ha incluido a la treonina pues aunque es un aminoácido esencial presenta un comportamiento similar a los otros aminoácidos de este grupo y, como ellos, es un importante precursor gluconeogénico.

- aminoácidos básicos, que incluye a la lisina, arginina, histidina, citrulina y ornitina.
- aminoácidos ramificados, que incluye a la leucina, isoleucina y valina.
- otros aminoácidos esenciales, que incluye a la metionina, triptófano, fenilalanina y tirosina, si bien éste no es estrictamente esencial.

Para el cálculo del balance de nitrógeno se ha excluido a la taurina. Este compuesto es el aminoácido más abundante en el TAMI en todas las situaciones estudiadas, y pese a ser liberado de forma significativa por el tejido de los animales del grupo control y por el de los expuestos crónicamente al frío dicha exportación es muy pequeña con relación a dicha concentración tisular; este hecho, unido a que su papel fisiológico no ha sido aún determinado con claridad, ha recomendado su exclusión en estos cálculos.

Tabla 5.3. Balance de nitrógeno.

AMINOACIDOS	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
No esenciales	-15	-136	+1397	+101
Básicos	-118	-38	+4558	-2346
Ramificados	+1	+2	+323	+574
Otros esenciales	-8	-3	-16	-185
Total	-140	-175	+6262	-1856

Los resultados están expresados en pmoles de N.s⁻¹.g⁻¹

También se ha procedido al cálculo del balance de energía, considerando para cada aminoácido y para la glucosa el valor energético correspondiente a los moles de ATP que se generarían en la degradación metabólica completa de un mol de cada uno de estos substratos. Al igual que en el caso del cálculo del balance de nitrógeno, los aminoácidos han sido clasificados siguiendo los mismos criterios, estando expresados los resultados en la tabla 5.4. Para su conversión en energía, los moles de ATP se han expresado a su vez en J, aplicando como factor de conversión el de la energía libre tipo del ATP (30,5 kJ.mol⁻¹).

Tabla 5.4. Balance de energía.

AMINOACIDOS	CONTROL	AYUNO	FRIO AGUDO	FRIO CRONICO
No esenciales	-35	-55	+480	-190
Básicos	-31	-10	+1460	-2120
Ramificados	0	+3	+370	+630
Otros esenciales	-13	-3	-30	-210
Total	-80	-65	+2290	-1900
Glucosa	+154	+78	+6400	+32250
Aminoácidos + glucosa	+74	+13	+8690	+30350

Los resultados están expresados en $\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$.

De los resultados obtenidos en el cálculo del balance de nitrógeno se puede considerar que en el grupo control el balance para los aminoácidos no esenciales es prácticamente nulo, siendo las variaciones muy pequeñas para todos los grupos así como para el total, lo que parece señalar que en esta situación se están produciendo una serie de interconversiones entre los distintos aminoácidos, como podría ser la liberación de glutamato a expensas del glutamato del acervo tisular, el cual podría proceder, a su vez, tanto del glutamato captado como del generado por transaminación como de la glutamina, dado que se ha descrito en este tejido la presencia de una activa glutaminasa (Cooney et al., 1986). El valor más alto corresponde a los aminoácidos básicos, que puede atribuirse al mayor contenido de nitrógeno por molécula de los aminoácidos de este grupo.

En los animales ayunados el balance de nitrógeno es también ligeramente negativo, si bien en este caso el grupo que es afectado de forma principal es el correspondiente a los aminoácidos no esenciales, con cambio muy pequeños en los restantes grupos. Este hecho se relaciona con la ya comentada liberación de alanina, glutamina y glicina por parte del tejido en esta situación.

La situación cambia drásticamente en el momento que el animal es expuesto al frío de forma aguda, ya que se produce una elevada captación de aminoácidos, que se refleja en un balance positivo para todos los grupos salvo para el de otros aminoácidos esenciales. La exposición prolongada al frío vuelve a provocar cambios importantes en la situación, pasando a dar un balance negativo de nitrógeno debido principalmente a los aminoácidos básicos ya que es incluso positivo para los no esenciales y ramificados. El comportamiento del grupo de aminoácidos básicos es difícil de explicar en estas dos situaciones de exposición al frío, y es debido principalmente a cambios en la lisina y la arginina. Por una parte la lisina es un

aminoácido esencial que es utilizado principalmente en la síntesis de proteínas; la liberación del mismo en los animales expuestos crónicamente al frío no se puede atribuir exclusivamente a la degradación proteica, dado que no se producen cambios parecidos en otros aminoácidos esenciales. Por otra parte, la arginina es metabolizada en los mamíferos principalmente a través de la arginasa, enzima que como ya se ha señalado no está presente en el TAMI. Por lo tanto la interpretación de los datos correspondientes a este grupo de aminoácidos es bastante confusa y hace pensar en la posible incidencia de algún factor artefactual no detectado.

Un grupo de aminoácidos que parece revestir un especial interés es el de los ramificados. Como puede apreciarse en la tabla 5.3, el balance de nitrógeno para este grupo es virtualmente nulo tanto para el grupo control como para los animales sometidos a ayuno, mientras que es positivo en los animales expuestos de forma aguda o crónica al frío, especialmente en estos últimos. Individualmente hay una captación significativa de la isoleucina en estos dos grupos, siendo los resultados correspondientes al conjunto de dichos aminoácidos los siguientes:

Control	+0,5 ± 8,8 nmol/min.g TAMI
Ayuno	+2,3 ± 1,9 nmol/min.g TAMI
Frío agudo	+51,5 ± 47,0 nmol/min.g TAMI
Frío crónico	+45,9 ± 31,6 nmol/min.g TAMI

En todos los casos la captación tuvo lugar a partir de los aminoácidos de cadena ramificada de la fracción plasmática, siendo estadísticamente significativa en los casos del grupo control y de los animales expuestos al frío. Todos estos resultados parecen indicar que los aminoácidos de cadena ramificada son especialmente importantes en los animales expuestos al frío, mientras que no se utilizan por este tejido en los animales controles o ayunados. Este hecho coincide con los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis con relación a la actividad de la transaminasa de aminoácidos de cadena ramificada, que muestran un progresivo incremento con la duración de la exposición al frío, todo lo cual posiblemente se relacione con la utilización de estos compuestos como substratos termogénicos, tal como había sido propuesto en un sentido más general por Goodenough *et al.* (1982). Algunos autores ya habían señalado la capacidad del TAMI del ratón de transaminar activamente la leucina y de descarboxilar el 2-ceto-isocaproato formado, así como que dicha capacidad descarboxilativa disminuía con el ayuno (Rous *et al.*, 1980). La utilización de la leucina por parte del TAM podría verificarse a través de su vía degradativa cetogénica, dado que se ha comprobado que en este tejido está presente una elevada actividad HMG-CoA liasa, mientras que está ausente la HMG-CoA sintetasa (Cooney *et al.*, 1986), lo que permite sugerir que este tejido no puede sintetizar cuerpos cetónicos a partir de los ácidos grasos por esta vía, pero que sí puede hacerlo a partir de la leucina, si bien otros autores indican que esta síntesis es reducida, por lo menos *in vitro* (Yeh, 1984).

Los resultados obtenidos en el cálculo del balance de energía, si bien son únicamente valores teóricos, señalan que los aminoácidos tienen en cualquier caso importancia cuantitativa significativa únicamente en el caso de la exposición aguda al frío, en el que pueden representar sobre el 35% de la energía correspondiente a la oxidación de glucosa. Cabe pensar que en esta situación los aminoácidos pueden tener importancia como substratos energéticos, lo que podría corresponder a una situación de emergencia en la que la producción de calor se convierte en una necesidad vital. Por contra,

el balance energético es negativo en los animales expuestos al frío de forma crónica, indicando que en esta situación no juegan un papel termogénico, con la única excepción de los de cadena ramificada, cuya contribución es incluso mayor que en los animales expuestos al frío de forma aguda.

El distinto comportamiento del tejido con relación al metabolismo de los aminoácidos puede ser un reflejo de la estrategia seguida por el animal en cada caso. De esta forma, en el ayuno, el TAMI parece comportarse como un tejido periférico típico, exportando alanina y glutamina, aunque sea una liberación muy pequeña con una tendencia hacia la conservación del nitrógeno amínico típica de esta situación. En los animales expuestos de forma aguda al frío la producción de calor se convierte en una necesidad urgente, para lo cual se utilizan distintos substratos, entre los que podrían incluirse los aminoácidos. Por contra, la exposición crónica representa una fase más avanzada de la adaptación del animal, en la que éste deja de utilizar los aminoácidos salvo los de cadena ramificada, empleando con fines termogénicos otros substratos -tal vez más adecuados- como los ácidos grasos y la glucosa.

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

La utilización de glucosa por el TAMI *in vivo* ha sido puesta de manifiesto por distintos autores en el curso de los últimos años, utilizando tanto el método de las diferencias arteriovenosas (Hardman y Hull, 1970; Ma y Foster, 1986) como el de la captación de la 2-desoxi(³H)glucosa (Ferré et al., 1986; Smith et al., 1986; James et al., 1986). De hecho, la glucosa puede ser considerada como un posible substrato termogénico para el TAM dada la elevada capacidad glucolítica que muestra este tejido (Cooney y Newsholme, 1982) así como la elevada tasa de lipogénesis (McCormack, 1982), de manera que la glucosa puede ser un importante combustible para el TAM cuando está disponible en la sangre, ya sea utilizada por vía glucolítica o bien indirectamente previa transformación en ácidos grasos. De este modo, en el conejo se ha observado una activa captación de glucosa y de ácidos grasos cuando en el tejido se han agotado las reservas lipídicas (Hardman y Hull, 1970). También se ha verificado que esta captación de glucosa es sensible a la insulina (Ferré et al., 1986; Smith et al., 1986; James et al., 1986), y que puede ser modulada por el estado fisiológico o patológico del animal (Ferré et al., 1986).

Los valores de captación de glucosa por el TAMI *in vivo* (0,06 μ moles/min/g) son similares a los obtenidos en condiciones basales por Ferré et al. (1986) (0,033 μ moles/min/g) y por Smith et al. (1986) (0,021 μ moles/min/g). Con el ayuno los valores de captación de glucosa se mantienen, a pesar del descenso en la asequibilidad de este substrato por su menor concentración arterial y por la disminución en el flujo sanguíneo. Más marcados son los efectos de la exposición aguda o crónica al frío, en las que la captación aumenta considerablemente. La aclimatación al frío da un valor de captación de glucosa mayor que la determinada con el método de la 2-desoxiglucosa (Smith et al., 1986); esta elevada captación se relaciona con el incremento en el flujo sanguíneo a través del tejido (Foster y Frydman, 1978b), así como un aumento en las actividades de los enzimas glucolíticos hexoquinasa y fosfofructoquinasa (Conney y Newsholme, 1982), al tiempo que el TAMI muestra una mayor sensibilidad hacia la insulina (Smith et al., 1986). El valor obtenido de 2,35 μ moles/min/g TAMI, considerando que

la tasa de utilización de glucosa para estos animales es de 18,5 μ moles/min para todo el animal, nos permite calcular que aproximadamente el 8% del recambio de glucosa es atribuible al TAM, valor que se eleva hasta el 32% si consideramos que la masa del depósito interescapular representa prácticamente la cuarta parte del TAM de todo el animal (Foster y Frydman, 1978b). En todos los grupos experimentales estudiados, la captación de glucosa se verifica a partir del plasma y no de la fracción transportada por las células.

Estos resultados parecen apoyar la idea de que la glucosa puede ser un importante sustrato termogénico para el TAM, si bien los resultados obtenidos corresponden a captación por parte del tejido y no indican el destino final que tiene esta glucosa.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) El tejido adiposo marrón interescapular de la rata presenta unos niveles de actividad enzimática que le proporcionan una elevada capacidad potencial para utilizar los aminoácidos como substratos metabólicos.
- 2) El tejido adiposo marrón interescapular capta y utiliza activamente alanina y glucosa *in vitro*. La utilización de alanina se ve favorecida por la disponibilidad de glucosa; este efecto cooperativo no se manifiesta en la utilización de glucosa en presencia de alanina.
- 3) Los resultados obtenidos tanto en los experimentos *in vivo* como *in vitro* sugieren que el tejido adiposo marrón interescapular utiliza algunos aminoácidos, como la alanina, como substratos energéticos en situaciones de emergencia, como puede ser la exposición aguda al frío, aunque no en condiciones de frío crónico o ayuno.
- 4) Los aminoácidos de cadena ramificada desempeñan un importante papel como substrato energético del tejido adiposo marrón en condiciones de estimulación del tejido, como son la exposición aguda y especialmente la exposición crónica al frío.
- 5) El tejido adiposo marrón capta del torrente circulatorio varios aminoácidos, como la glutamina, cediendo a cambio glicina y prolina, para mantener el balance nitrogenado del tejido en todas las situaciones estudiadas.
- 6) En líneas generales los aminoácidos no parecen desempeñar en conjunto un papel decisivo en la capacidad termogénica del tejido adiposo marrón en situaciones de estimulación, en comparación con la glucosa, substrato energético cuantitativamente más importante.

7. BIBLIOGRAFIA

Adibi, S.A.; Modesto, T.A.; Morse, E.J.; Amin, P.M.: Amino acid levels in plasma, liver, and skeletal muscle during protein deprivation, Amer. J. Physiol., 225: 408-414 (1973).

Afzelius, B.A.: Brown adipose tissue; its gross anatomy, histology and cytology. En "Brown Adipose Tissue" (ed. O. Lindberg), pags. 1-31, Elsevier, New York-London (1970).

Agius, L.; Williamson, D.H.: Lipogenesis in interscapular brown adipose tissue of virgin, pregnant and lactating rats. The effects of intragastric feeding, Biochem. J., 190: 477-480 (1980).

Agius, L.; Williamson, D.H.: The utilization of ketone bodies by the interscapular brown adipose tissue of the rat, Biochim. Biophys. Acta, 666: 127-132 (1981).

Ahlabo, I.; Barnard, T.: Observation on peroxisomes in brown adipose tissue of the rat, J. Histochem. Cytochem., 19: 670-675 (1971).

Aikawa, T.; Matsutaka, H.; Yamamoto, H.; Okuda, T.; Ishikawa, E.; Kawano, T.; Matsumura, E.: Gluconeogenesis and amino acid metabolism, II. Inter-organal relations and roles of glutamine and alanine in the amino acid metabolism of fasted rats, J. Biochem. (Tokyo), 74: 1003-1017 (1973).

Alemany, M.: Effect of amino acid reutilization in the determination of protein turnover in mice, Horm. Metab. Res., 8: 70-73 (1976).

Alemany, M.: Amino acids and lactate efflux from in vitro incubated soleus muscles of suckling rats, Rev. Esp. Fisiol., 35: 13-20 (1979).

Alexander, G.; Bell, A.W.: Quantity and calculated oxygen consumption during summit metabolism of brown adipose tissue in newborn lambs, Biol. Neonata, 26: 214-220 (1975).

Alpers, D.H.: Uptake and fate of absorbed amino acids and peptides in the mammalian intestine, Federation Proc., 45: 2261-2267 (1986).

Aoki, T.T.; Brennan, M.F.; Muller, W.A.; Moore, F.D.; Cahill, G.F.: Effect of insulin on muscle glutamate uptake, Whole blood versus plasma glutamate uptake, J. Clin. Invest., 51: 2889-2894 (1972).

Aoki, T.T.; Muller, W.A.; Brennan, M.F.; Cahill, G.F.: Blood cell and plasma amino acid levels across forearm muscle during a protein meal, Diabetes, 22: 768-775 (1973).

Aquila, H.; Link, T.A.; Klingenberg, M.: The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane, EMBO J., 4: 2369-2376 (1985).

Arch, J.R.S.; Ainsworth, A.T.; Cawthorne, M.A.; Piercy, V.; Sennitt, M.V.; Thody, V.E.; Wilson, C.; Wilson, S.: Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs, Nature, 309: 163-165 (1984).

Arola, Ll.; Palou, A.; Remesar, X.; Alemany, M.: NADH and NADPH dependent glutamate dehydrogenase activities in the organs of the rat, IRCS Med. Sci., 7: 364 (1979a).

Arola, Ll.; Herrera, E.; Alemany, M.: A method for the estimation of striated muscle mass in small laboratory animals, Rev. Esp. Fisiol., 35: 215-218 (1979b).

Arola, Ll.; Palou, A.; Remesar, X.; Alemany, M.: Glutamine synthetase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats, Horm. Metab. Res., 13: 199-202 (1981a).

Arola, Ll.; Palou, A.; Remesar, X.; Alemany, M.; Adenylate deaminase activity in the rat. Effect of 24 hours of fasting, Horm. Metab. Res., 13: 264-266 (1981b),

Arola, Ll.; Palou, A.; Remesar, X.; Herrera, E.; Alemany, M.; Effect of stress and sampling site on metabolic concentration in rat plasma, Arch. Internat. Physiol. Biochim., 88: 99-105 (1980),

Assinacopoulos-Jeannat, F.; Giacobino, J.P.; Seydoux, J.; Girardier, L.; Jeanrenaud, B.; Alterations of brown adipose tissue in genetically obese (ob/ob) mice. II. Studies of β -adrenergic receptors and fatty acid degradation, Endocrinology, 110: 439-443 (1982),

Astrup, A.; Bülow, J.; Christensen, N.J.; Madsen, J.; Quuade, F.; Facultative thermogenesis induced by carbohydrate: a skeletal muscle component mediated by epinephrine, Amer. J. Physiol., 250: E226-E229 (1986),

Astrup, A.; Bülow, J.; Madsen, J.; Interscapular brown adipose tissue blood flow in the rat. Determination with ^{133}Xe on clearance compared to the microsphere method, Pflügers Arch., 401: 414-417 (1984)

Babineau, L.; Page, E.; On body fat and body water in rats, Can. J. Biochem. Physiol., 33: 970-979 (1955),

Barnard, T.; Mory, G.; Néchad, N.; Biogenic amines and the trophic response of brown adipose tissue, En "Biogenic Amines in Development" (eds. H. Parvez y S. Parvez), pags. 391-439, Elsevier, Amsterdam (1980),

Barr, H.G.; McCracken, K.J.; High efficiency of energy utilization in "cafeteria"- and force-fed rats, Brit. J. Nutr., 51: 379-387 (1984),

Beaton, J.R.; The relation of dietary protein level to liver enzymes activities in cold-exposed rats, Can. J. Biochem. Physiol., 41: 1871-1877 (1963),

Beauvallet, M.; Portet, R.; Solier, M.; Variation des triglycérides et des acides gras libres plasmatiques chez le rat en fonction de la durée de maintien au froid, Compt. Rend. Soc. Biol., 170: 300-303 (1976),

Beck, L.V.; Zaharko, D.S.; Kalsner, S.C. ; Variations in serum insulin and glucose of rats with chronic cold exposure, Life Sci., 6: 1501-1506 (1967),

Bégin-Heick, N.; Noland, I.; Dalpe, M.; Heick, H.M.C.; Altered effect of insulin and catecholamines in brown adipose tissue of cold-acclimated rats, Can. J. Physiol. Pharmacol., 57: 320-324 (1979),

Beloff-Chain, A.; Cantanzaro, R.; Chain, E.B.; Longinotti, L.; Masi, I.; Pocchiari, F.; The stimulation of the phosphogluconate pathway by pyruvate under anaerobic conditions in diaphragm muscle and rat brown adipose tissue, Biochim. Biophys. Acta, 56: 153-155 (1962),

Bender, D.A.; Amino acids synthesized from aspartate: lysine, methionine (and cysteine), threonine and isoleucine (and leucine and valine), En "Amino Acid Metabolism", pags. 112-142, John Wiley & Sons, London (1975),

Bergman, E.N.; Heitmann, R.N.; Metabolism of amino acids by the gut, liver, kidneys, and peripheral tissues, Federation. Proc., 37: 1228-1232 (1978),

Bergmeyer, H.U.; New values for the molar extinction coefficients of NADH and NADPH for the use in routine laboratories, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 13: 507-508 (1975),

Bergmeyer, H.U.; Bernt, E.: Glutamate-oxaloacetate transaminase, UV-assay, manual method. En "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. H.U. Bergmeyer), vol. 2, pags. 727-733, Academic Press, New York (1974a).

Bergmeyer, H.U.; Bernt, E.: Glutamate-pyruvate transaminase, UV-assay, manual method. En "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. H.U. Bergmeyer), vol. 2, pags. 752-758, Academic Press, New York (1974b).

Bernson, V.S.M.: Acetyl-CoA hydrolase; activity, regulation and physiological significance of the enzyme in brown adipose tissue from hamster, Eur. J. Biochem., 67: 403-410 (1976).

Bernson, V.S.M.; Nicholls, D.G.: Acetate, a major end product of fatty-acid oxidation in hamster brown-adipose tissue mitochondria, Eur. J. Biochem., 47: 517-525 (1974).

Berry, M.N.; Clark, D.G.; Grivell, A.R.; Wallace, P.G.: The contribution of hepatic metabolism to diet-induced thermogenesis, Metabolism, 34: 141-147 (1985).

Berthelot, M.: Correspondence: "violet d'aniline". Répertoire de chimie appliqué, Société Chimique de Paris, 1: 284 (1859).

Bertin, R.; Andriamihaja, M.; Portet, R.: Glycerokinase activity in brown and white adipose tissues of cold-adapted obese Zucker rats, Biochimie, 66: 569-572 (1984).

Bieber, L.L.; B. Pettersson, B.; Lindberg, O.: Studies on norepinephrine-induced efflux of free fatty acid from hamster brown-adipose-tissue cells, Eur. J. Biochem., 58: 375-381 (1975).

Blanchette-Mackie, E.J.; Scow, R.O.: Continuity of intracellular channels with extracellular space in adipose tissue and liver, Anat. Rec., 203: 205-219 (1982).

Bodansky, M.; Duff, V.B.: Nitrogen and creatine metabolism in relation to environmental temperature and thyroid function, Endocrinology, 20: 822-830 (1936).

Bohley, P.; Riemann, S.; Koelsch, R.; Lasch, J.: Protein degradation in rat liver cells, Acta Biol. Med. Germ., 36: 1821-1822 (1977).

Bouillaud, F.; Weissenbach, J.; Ricquier, D.: Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein, J. Biol. Chem., 261: 1487-1490 (1986).

Brosnan, J.T.; Man, K.C.; Hall, D.E.; Colbourne, S.A.; Brosnan, M.E.: Interorgan metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rats, Amer. J. Physiol., 244: E151-E158 (1983).

Bryant, K.R.; Rothwell, N.J.; Stock, M.J.; Stirling, D.: Identification of two mitochondrial GDP binding sites in rat brown adipose tissue, Biosci. Rep., 3: 589-598 (1983).

Bukowiecki, L.J.: Mechanisms of stimulus-calorigenesis coupling in brown adipose tissue, Can. J. Biochem. Cell Biol., 62: 623-630 (1984).

Bukowiecki, L.J.: Lipid metabolism in rat brown adipose tissue. En "Brown Adipose Tissue" (eds. P. Trayhurn y D.G. Nicholls), pags. 105-121, E. Arnold Ltd., London (1986).

Bukowiecki, L.J.; Collet, A.J.: Regulation of brown adipose tissue metabolism, J. Obesity Weight Regul., 2: 29-53 (1983).

Bukowiecki, L.J.; Collet, A.J.; Folléa, N.; Guay, G.; Jahjah, L.: Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia, Amer. J. Physiol., 242: E353-E359 (1982).

- Bukowiecki, L.J.; Folléa, N.; Lupien, J.; Paradis, A.: Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown adipocytes. J. Biol. Chem., 256: 12840-12848 (1981).
- Bukowiecki, L.J.; Folléa, N.; Vallieres, J.; Leblanc, J.: β -adrenergic receptors in brown adipose tissue. Characterization and alteration during acclimation of rats to cold. Eur. J. Biochem., 92: 189-196 (1978).
- Buse, M.G.; Reid, S.S.: Leucine as a possible modulator of protein turnover in muscle. J. Clin. Invest., 56: 1250-1261 (1975).
- Buttery, P.J.; Rowsell, E.V.: Liver amino acid levels in mammals and body size dependent enzyme activities. Comp. Biochem. Physiol., 47B: 473-483 (1974).
- Cahill, G.F.: Starvation in man. N. Engl. J. Med., 282: 668-675 (1970).
- Cahill, G.F., Jr.; Herrera, M.G.; Morgan, A.P.; Soeldner, J.S.; Steinke, J.; Levy, P.L.; Reichard, G.A.; Jr.; Kipnis, D.M.: Hormone-fuel interrelationships during fasting. J. Clin. Invest., 45: 1751-1769 (1966).
- Cameron, I.; Smith, R.E.: Cytological responses of brown fat tissue in cold-exposed rats. J. Cell Biol., 23: 89-100 (1964).
- Cannon, B.; Alexson, S.; Nedergaard, J.: Peroxisomal β -oxidation in brown fat. Ann. N.Y. Acad. Sci., 386: 40-58 (1982a).
- Cannon, B.; Hadin, A.; Nedergaard, J.: Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. FEBS Lett., 150: 129-132 (1982b).
- Cannon, B.; Nedergaard, J.: The physiological role of pyruvate carboxylation in hamster brown adipose tissue. Eur. J. Biochem., 94: 419-426 (1979).
- Cannon, B.; Nedergaard, J.: The function and properties of brown adipose tissue in the newborn. En "Biochemical Development of the Fetus and Neonate" (ed. C.T. Jones), pages, 697-730. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982).
- Cannon, B.; Nedergaard, J.: The biochemistry of an inefficient tissue; brown adipose tissue. Essays Biochem., 20: 110-164 (1985).
- Cannon, B.; Nedergaard, J.; Rowert, L.; Sundin, U.; Svartengren, J.: The biochemical mechanisms of thermogenesis in brown adipose tissue. En "Strategies in Cold: Natural Torpidity and Thermogenesis" (eds. L.L. Wang y J. Hudson), pages, 567-594. Academic Press, New York (1978).
- Cannon, B.; Nicholls, D.G.; Lindberg, O.: Purine nucleotides and fatty acids in energy coupling of mitochondria from brown adipose tissue. En "Mechanisms in Bioenergetics" (eds. G.F. Azzone, L. Ernster, S. Papa, E. Quagliariello y N. Siliprandi), pages, 357-364. Academic Press, New York (1973).
- Cannon, B.; Sundin, U.; Rowert, L.: Palmitoyl coenzyme A; a possible physiological regulator of nucleotide binding to brown adipose tissue mitochondria. FEBS Lett., 74: 43-46 (1977).
- Carneheim, C.; Nedergaard, J.; Cannon, B.: Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. Amer. J. Physiol., 246: E327-E333 (1984).
- Castellà, J.; Alemany, M.: Sex differences in the thermogenic response of the rat to a "cafeteria" diet. IRCS Med. Sci., 13: 586-587 (1985).

Castellà, J.; Alemany, M.: Thermogenic effects of a "cafeteria" diet on the rat during its reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol., 85A: 203-206 (1986).

Castellà, J.; Iglesias, R.; Alemany, M.: Influence of a "cafeteria" diet on heat production during postnatal development of the rat. Comp. Biochem. Physiol., 85A: 693-696 (1986).

Chakrabarty, K.; Chaudhuri, B.; Jeffay, H.: Glycerokinase activity in human brown adipose tissue. J. Lipid Res., 24: 381-390 (1983).

Chan, T.W.; Goldberg, A.L.: The origin of alanine produced by skeletal muscle. J. Biol. Chem., 253: 3677-3684 (1977).

Cherqui, G.; Cadot, M.; Senault, C.; Portet, R.: Cellularity and composition of epididymal adipose tissue from cold acclimatized rats. Experientia, 35: 1353-1354 (1979).

Chinet, A.; Friedli, C.; Seydoux, J.; Girardier, L.: Does cytoplasmic alkalinization trigger mitochondrial energy dissipation in the brown adipocyte?, En "Effectors of Thermogenesis" (eds. L. Girardier y J. Seydoux), Experientia Suppl., 32: 25-32 (1978).

Connolly, E.; Nanberg, E.; Nedergaard, J.: Na⁺-dependent, α -adrenergic mobilization of intracellular (mitochondrial) Ca²⁺ in brown adipocytes. Eur. J. Biochem., 141: 187-193 (1984).

Cooney, G.; Curi, R.; Mitchelson, A.; Newsholme, P.; Simpson, M.; Newsholme, E.A.: Activities of some enzymes of carbohydrate, ketone body, adenosine and glutamine metabolism in liver, and brown and white adipose tissues of the rat. Biochem. Biophys. Res. Commun., 138: 687-692 (1986).

Cooney, G.J.; Newsholme, E.A.: The maximum capacity of glycolysis in brown adipose tissue and its relationship to control of the blood glucose concentration. FEBS Lett., 148: 198-200 (1982).

Cooney, G.J.; Newsholme, E.A.: Does brown adipose tissue have a metabolic role in the rat? Trends Biochem. Sci., 9: 303-305 (1984).

Cori, C.F.: Mammalian carbohydrate metabolism. Physiol. Rev., 11: 143-275 (1931).

Cottle, M.; Carlson, L.D.: Regulation of heat-production in cold-adapted rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92: 845-849 (1956).

Cunningham, J.; Callis, J.; Eisikowitz, L.; Zawalich, W.; Felig, P.: Increased efficiency of weight gain and altered cellularity of brown adipose tissue in rats with impaired glucose tolerance during diet-induced overfeeding. Diabetes, 32: 1023-1027 (1983).

Czech, M.P.; Lawrence, J.C., Jr.; Lynn, W.S.: Hexose transport in isolated brown fat cells: a model system for investigating insulin action of membrane transport. J. Biol. Chem., 249: 5421-5427 (1974).

Dawkins, M.J.R.; Hull, D.: The production of heat by fat. Sci. Amer., 213: 62-67 (1965).

Dennis, S.C.; Clark, J.B.: The regulation of glutamate metabolism by tricarboxylic acid-cycle activity in rat brain mitochondria. Biochem. J., 172: 155-162 (1978).

Depocas, F.: The calorogenic response of cold-acclimated rats to infused noradrenalina. Can. J. Biochem. Physiol., 38: 107-114 (1960).

Depocas, F.; Masironi, R.: Body glucose as a fuel for thermogenesis in the white rat exposed to cold. Amer. J. Physiol., 199: 1051-1055 (1960).

- Desautels, M.; Mitochondrial thermogenin content is unchanged during atrophy of BAT of fasting mice, Amer. J. Physiol., 249: E99-E106 (1985).
- Desautels, M.; Himms-Hagen, J.; Roles of noradrenaline and protein synthesis in the cold-induced increase in purine nucleotide binding by rat brown adipose tissue mitochondria, Can. J. Biochem., 57: 968-976 (1979).
- Desautels, M.; Zaror-Behrens, G.; Himms-Hagen, J.; Increased purine nucleotide binding, altered polypeptide composition, and thermogenesis in brown adipose tissue mitochondria of cold-acclimated rats, Can. J. Biochem., 56: 378-383 (1978).
- Orahota, Z.; Honova, E.; Hahn, P.; The effect of ATP and carnitine on the endogenous respiration of mitochondria from brown adipose tissue, Experientia, 24: 431-432 (1968).
- Duloo, A.G.; Miller, D.S.; Unimpaired thermogenic response to noradrenaline in genetic (ob/ob) and hypothalamic (MSG) obese mice, Biosci. Rep., 4: 343-349 (1984).
- Elias, L.J.; Albrecht, I.; Rosenberg, L.E.; Insulin stimulation of amino acid uptake in rat diaphragm. Relationship to protein synthesis, J. Biol. Chem., 243: 1846-1853 (1968).
- Elliot, W.H.; Studies on the enzyme synthesis of glutamine, Biochem. J., 49: 106-112 (1951).
- Elwyn, D.H.; Distribution of amino acids between plasma and red blood cells in the dog, Federation Proc., 25: 854-861 (1966).
- Elwyn, D.H.; The role of the liver in regulation of amino acid and protein metabolism, En "Mammalian Protein Metabolism" (ed. H.N. Munro), vol. 4, pags. 523-557, Academic Press, New York (1970).
- Elwyn, D.H.; Launder, W.J.; Parikh, H.C.; Wise, E.M., Jr.; Roles of plasma and erythrocytes in interorgan transport of amino acids in dogs, Amer. J. Physiol., 222: 1333-1342 (1972).
- Everett, A.W.; Zak, R.; Problems and interpretations of techniques used in studies of protein turnover, En "Degradative processes in heart and skeletal muscle" (ed. K. Wildenthal), pags. 31-47, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1980).
- Exton, J.H.; Gluconeogenesis, Metabolism, 21: 945-990 (1972).
- Fain, J.N.; Reed, N.; Saperstein, R.; The isolation and metabolism of brown fat cells, J. Biol. Chem., 242: 1887-1894 (1967).
- Falholt, K.; Lund, B.; Falholt, B.; An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma, Clin. Chim. Acta, 46: 105-111 (1973).
- Farese, R.V.; Farese, R.V., Jr.; Sabir, M.A.; Larson, R.E.; Trudeau, W.L., III; Barnes, D.; The mechanism of action of insulin and phospholipid metabolism in rat adipose tissue. Requirement for protein synthesis and a carbohydrate source, and relationship to activation of pyruvate dehydrogenase, Diabetes, 33: 648-655 (1984).
- Fawcett, J.K.; Scott, J.E.; A rapid and precise method for the determination of urea, J. Clin. Pathol., 13: 156-163 (1960).
- Featherston, W.R.; Rogers, Q.R.; Freedland, R.A.; Relative importance of kidneys and liver in synthesis of arginine by rat, Amer. J. Physiol., 224: 127-129 (1973).

Feldman, D.: Evidence that brown adipose tissue is a glucocorticoid target organ. Endocrinology, 103: 2091-2097 (1978).

Felig, P.: The glucose-alanine cycle. Metabolism, 22: 179-207 (1973).

Felig, P.: Insulin is the mediator of feeding-related thermogenesis; insulin resistance and/or deficiency results in a thermogenic defect which contributes to the pathogenesis of obesity. Clin. Physiol., 4: 267-273 (1984).

Felig, P.; Marliss, E.; Owen, D.E.; Cahill, G.F., Jr.: Blood glucose and gluconeogenesis in fasting man. Arch. Intern. Med., 123: 293 (1969a).

Felig, P.; Owen, D.E.; Wahren, J.; Cahill, G.F., Jr.: Amino acid metabolism during prolonged starvation. J. Clin. Invest., 48: 584-594 (1969b).

Felig, P.; Pozefsky, T.; Marliss, E.; Cahill, G.F., Jr.: Alanine: key role in gluconeogenesis. Science, 167: 1003-1004 (1970).

Felig, P.; Wahren, J.; Raf, L.: Evidence of inter-organ amino acid transport by blood cells in humans. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70: 1775-1779 (1973).

Feller, D.D.; Feist, E.J.: Metabolism of alanine, serine and valine in adipose tissue. Metabolism, 11: 448-455 (1962).

Ferré, P.; Burnol, A.F.; Leturque, A.; Terretaz, J.; Penicaud, L.; Jeanrenaud, B.; Girard, J.: Glucose utilization *in vivo* and insulin-sensitivity of rat brown adipose tissue in various physiological and pathological conditions. Biochem. J., 233: 249-252 (1986).

Flanagan, W.F.; Holmes, E.W.; Sabina, R.L.; Swain, J.L.: Importance of purine nucleotide cycle to energy production in skeletal muscle. Amer. J. Physiol., 251: C795-C802 (1986).

Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509 (1957).

Foster, D.O.: Auxiliary role of alpha-adrenoceptors in brown adipose tissue thermogenesis. En "Thermal Physiology" (ed. J.R.S. Hales), pages. 201-204, Raven Press, New York (1984).

Foster, D.O.; Frydman, M.L.: Comparison of microspheres and $^{86}\text{Rb}^+$ as tracers of the distribution of cardiac output in rats indicates invalidity of $^{86}\text{Rb}^+$ based measurements. Can. J. Physiol. Pharmacol., 56: 97-109 (1978a).

Foster, D.O.; Frydman, M.L.: Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. Can. J. Physiol. Pharmacol., 56: 110-122 (1978b).

Foster, D.O.; Frydman, M.L.: Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow. The dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. Can. J. Physiol. Pharmacol., 57: 257-270 (1979).

Freeman, K.B.; Chien, S.M.; Litchfield, D.; Patel, H.V.: Synthesis *in vitro* of rat brown adipose tissue 32,000 Mr. protein. FEBS Lett., 158: 325-330 (1983).

Freeman, K.B.; Patel, H.V.; Biosynthesis of the 32 Kdalton uncoupling protein in brown adipose tissue of developing rabbits, Can. J. Biochem. Cell Biol., 62: 479-485 (1984).

Fried, S.K.; Hill, J.O.; Nickel, M.; DiGirolamo, M.; Novel regulation of lipoprotein lipase activity in rat brown adipose tissue: effects of fasting and caloric restriction during refeeding, J. Nutr., 113: 1870-1874 (1983).

Friedli, C.; Chinet, A.; Girardier, L.; Comparative measurement of the calorogenic response of brown adipose tissue from control and cold-adapted rats, Experientia Suppl., 32: 259-266 (1978).

Friedman, T.E.; Haugen, G.E.; Pyruvic acid, II. The determination of keto acids in blood and urine, J. Biol. Chem., 147: 415-442 (1943).

Fulks, R.M.; Li, J.B.; Goldberg, A.L.; Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm, J. Biol. Chem., 250: 290-298 (1975).

Gale, C.C.; Neuroendocrine aspects of thermoregulation, Annu. Rev. Physiol., 35: 391-430 (1973).

Garber, A.J.; Karl, I.E.; Kipnis, D.M.; Alanine and glutamine synthesis and release from skeletal muscle, II. The precursor role of amino acids in alanine and glutamine synthesis, J. Biol. Chem., 251: 836-843 (1976).

García-Palmer, F.J.; Pons, A.; Alemany, M.; Palou, A.; Patterns of amino acid enzyme in domestic fowl breast and leg muscle during development, Comp. Biochem. Physiol., 82B: 143-146 (1985).

Garlick, P.J.; Millward, D.J.; James, W.P.T.; Waterlow, J.C.; The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat, Biochim. Biophys. Acta, 414: 71-84 (1975).

Gesner, C.; *Medici Tigurini Historiae Animalium Liber II, qui est de Quadrupedibus Oviparis (de Mure Alpino)*, pags. 840-843 (1551).

Gibbins, J.M.; Denton, R.M.; McCormack, J.G.; Evidence that noradrenaline increases pyruvate dehydrogenase activity and decreases acetyl CoA carboxylase activity in rat interscapular brown adipose tissue in vivo, Biochem. J., 228: 751-755 (1985).

Giralt, M.; Villarroya, F.; Mampel, T.; Iglesias, R.; Impaired basal and noradrenaline-induced iodothyronine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue from pregnant and lactating rats, Biochem. Biophys. Res. Commun., 138: 1315-1321 (1986).

Girardier, L.; Schneider-Picard, G.; Alpha- and beta-adrenergic mediation of membrana potential changes and metabolism in rat brown adipose tissue, J. Physiol. (London), 335: 629-641 (1983).

Girardier, L.; Seydoux, J.; Le contrôle de la thermogénèse du tissu adipeux brun, J. Physiol. (Paris), 63: 147-186 (1971).

Girardier, L.; Seydoux, J.; Neural control of brown adipose tissue, En "Brown Adipose Tissue" (eds. P. Trayhurn y D.G. Nicholls), pags. 122-151, E. Arnold Ltd., Londres (1986).

Girardier, L.; Seydoux, J.; Clausen, T.; Membrane potential of brown adipose tissue. A suggested mechanism for the regulation of thermogenesis, J. Gen. Physiol., 52: 925-940 (1968).

Girardier, L.; Stock, M.J.; Mammalian thermogenesis: an introduction, En "Mammalian Thermogenesis" (eds. L. Girardier y M.J. Stock), pags. 1-7, Chapman and Hall Ltd., London (1983).

Glais, R.D.; Doyle, D.: On the measurements of protein turnover in animal cells, J. Biol. Chem., 247: 5234-5242 (1969).

Goldberg, A.L.; Chang, T.W.: Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle, Federation Proc., 37: 2301-2307 (1978).

Goldberg, A.L.; Odessey, R.: Oxidation of amino acids by diaphragm from fed and fasted rats, Amer. J. Physiol., 223: 1384-1391 (1972).

Goldstein, L.; Perleam, D.F.; McLaughlin, P.M.; King, P.A.; Cha, C.J.: Muscle glutamine production in diabetic ketoacidotic rat, Biochem. J., 214: 757-767 (1983).

Goodbody, A.E.; Trayhurn, P.: GDP-binding to brown-adipose-tissue mitochondria of diabetic-obese (db/db) mice. Decreased binding in both the obese and pre-obese states, Biochem. J., 194: 1019-1022 (1981).

Goodenough, R.D.; Royle, G.T.; Nadel, E.R.; Wolfe, M.H.; Wolfe, R.R.: Leucine and urea metabolism in acute human cold exposure, J. Appl. Physiol., 53: 367-372 (1982).

Goodman, H.M.: Stimulatory action of insulin and leucine uptake and metabolism in adipose tissue, Amer. J. Physiol., 206: 129-132 (1964).

Goubern, M.: Effects of various factors on acetyl-CoA carboxylase activity in brown fat of cold acclimated rats, Ann. Nutr. Alim., 34: 471-472 (1980).

Goubern, M.; Cadot, M.: Ketone bodies in cold-acclimated rats, Comp. Biochem. Physiol., 76B: 741-744 (1983).

Goubern, M.; Portet, R.: Circadian rhythm and hormonal sensitivity of lipoprotein lipase in cold-acclimated rats, Horm. Metab. Res., 13: 73-77 (1981a).

Goubern, M.; Portet, R.: Modulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in some tissues of cold-acclimated rats, Comp. Biochem. Physiol., 69B: 237-241 (1981b).

Granneman, J.G.; Wade, G.N.: Effect of sucrose overfeeding on brown adipose tissue lipogenesis and lipoprotein lipase activity in rats, Metabolism, 32: 202-207 (1983).

Grav, H.J.; Blix, A.S.; Pasche, A.: How do seal pups survive birth in arctic winter? Acta Physiol. Scand., 92: 427-429 (1974).

Greenberg, D.M.: Arginase. En "The Enzymes" (eds. P.D. Boyer, H. Lardy y M. Myrbäck), vol. 4, pags. 257-267. Academic Press, New York (1960).

Grein, L.; Pfleiderer, G.: Glutamic-pyruvic transaminase from pig heart, Biochem. Z., 330: 433-445 (1958).

Gribskov, C.L.; Henningfield, M.F.; Swick, A.G.; Swick, R.W.: Evidence for unmasking of rat brown-adipose-tissue mitochondrial GDP-binding sites in response to acute cold exposure. Effects of washing with albumin on GDP-binding, Biochem. J., 233: 743-747 (1986).

Guest, G.M.; Siler, V.E.: A centrifuge method for the determination of the volume of cells in blood, J. Lab. Clin. Med., 19: 757-767 (1934).

Guidotti, G.G.; Borghetti, A.F.; Gazzola, G.C.; The regulation of amino acid transport in animal cells, Biochim. Biophys. Acta, 515: 329-336 (1978).

Guillory, R.J.; Racker, E.; Oxidative phosphorylation in brown adipose tissue mitochondria, Biochim. Biophys. Acta, 153: 490-493 (1968).

Gulick, A.; A study of weight regulation in the adult human body during overnutrition, Amer. J. Physiol., 60: 371-395 (1922).

Gurr, M.I.; Mawson, R.; Rothwell, N.J.; Stock, N.J.; Effects of manipulating dietary protein and energy intake on energy balance and thermogenesis in pigs, J. Nutr., 110: 532-542 (1980).

Hagenfeldt, L.; Arvidsson, A.; The distribution of amino acids between plasma and erythrocytes, Clin. Chim. Acta, 100: 133-141 (1980).

Hahn, P.; Greenberg, R.; Dobiarova, M.; Drahota, Z.; Triglyceride synthesis from various precursors in adipose tissue of the rat during development, Can. J. Biochem., 46: 735-741 (1968).

Hannon, J.P.; Current status of carbohydrate metabolism in the cold acclimatized mammal, Federation Prof., 22: 856-861 (1963).

Hannon, J.P.; Larson, A.M.; Fatty acid metabolism during norepinephrine-induced thermogenesis in cold-acclimated rats, Amer. J. Physiol., 203: 1055-1061 (1962).

Hansen, D.L.; Bush, E.T.; Improved solubilization procedures for liquid scintillation counting of biological materials, Anal. Biochem., 18: 320-322 (1967).

Hardman, M.J.; Hull, D.; Fat metabolism in brown adipose tissue in vivo, J. Physiol. (London), 206: 263-273 (1970).

Hassi, J.; The brown adipose tissue in man, Acta Universit. Ouluensis ser. D, 21: 18-92 (1977).

Hayes, K.C.; Sturman, J.A.; Taurine in metabolism, Annu. Rev. Nutr., 1: 401-425 (1981).

Heaton, G.M.; Wagenvoort, R.J.; Kemp, A.; Nicholls, D.G.; Brown adipose tissue mitochondria. Photoaffinity labelling of the regulatory site for energy dissipation, Eur. J. Biochem., 82: 515-521 (1978).

Heim, T.; Hull, D.; The blood flow and oxygen consumption of brown adipose tissue in the newborn rabbit, J. Physiol. (London), 186: 42-55 (1966).

Heldmaier, G.; Seidl, K.; Plasma free fatty acid levels during cold-induced and noradrenaline-induced nonshivering thermogenesis in the Djungarian hamster, J. Comp. Physiol. B, 155: 679-684 (1985).

Hemingway, A.; Shivering, Physiol. Rev., 43: 397-422 (1963).

Hemon, P.; Ricquier, D.; Mory, G.; The lipoprotein lipase activity of brown adipose tissue during early postnatal development of the normal and hypothyroid rat, Horm. Metab. Res., 7: 481-484 (1975).

Herberg, R.J.; Determination of carbon-14 and tritium in blood and other whole tissues. Liquid scintillation counting of tissues, Anal. Chem., 32: 42-46 (1960).

Herrera, E.; Effect of albumin on glycerol metabolism in rat adipose tissue, Rev. Esp. Fisiol., 29: 155-162 (1973).

- Herrera, E.; Freinkel, N.; Interrelationships between liver composition, plasma glucose and ketone bodies, and hepatic acetyl-CoA and citric acid during prolonged starvation in the male rat, Biochim. Biophys. Acta, 170: 244-253 (1968).
- Hervey, G.R.; Tobin, G.; Brown adipose tissue and diet-induced thermogenesis, Nature, 289: 699 (1981).
- Hey, E.; Thermal neutrality, Brit. Med. Bull., 31: 69-74 (1975).
- Himms-Hagen, J.; Lipid metabolism during cold exposure and during cold acclimation, Lipids, 7: 310-323 (1972).
- Himms-Hagen, J.; Brown adipose tissue thermogenesis in obese animals, Nutr. Rev., 41: 261-267 (1983).
- Himms-Hagen, J.; Nonshivering thermogenesis, Brain Res. Bull., 12: 151-160 (1984).
- Himms-Hagen, J.; Food restriction increases torpor and improves brown adipose tissue thermogenesis in ob/ob mice, Amer. J. Physiol., 248: E531-E539 (1985).
- Himms-Hagen, J.; Brown adipose tissue and cold acclimation, En "Brown Adipose Tissue" (eds, P. Trayhurn y D.G. Nicholls), pags. 214-268, E. Arnold Ltd., London (1986).
- Himms-Hagen, J.; Triandafillou, J.; Gwilliam, C.; Brown adipose tissue of cafeteria-fed rats, Amer. J. Physiol., 241: E116-E120 (1981).
- Hittelman, K.J.; Lindberg, O.; Fatty acid uncoupling in brown fat mitochondria, En "Brown Adipose Tissue" (ed, O. Lindberg), pags. 245-262, Elsevier, New York (1970).
- Hittelman, K.J.; Lindberg, O.; Cannon, B.; Oxidative phosphorylation and compartmentation of fatty acid metabolism in brown fat mitochondria, Eur. J. Biochem., 11: 183-192 (1969).
- Hogan, S.; Coscina, D.V.; Himms-Hagen, J.; Brown adipose tissue of rats with obesity-inducing ventromedial hypothalamic lesions, Amer. J. Physiol., 243: E338-E344 (1982).
- Hogan, S.; Himms-Hagen, J.; Abnormal brown adipose tissue in obese (ob/ob) mice; response to acclimation to cold, Amer. J. Physiol., 239: E301-E309 (1980).
- Hogan, S.; Himms-Hagen, J.; Brown adipose tissue of mice with goldthioglucose-induced obesity; effect of cold and diet, Amer. J. Physiol., 244: E581-E588 (1983).
- Holt, S.; York, D.A.; Fitzsimmons, J.T.R.; The effect of corticosterone, cold-exposure and overfeeding with sucrose on brown adipose tissue of obese Zucker rats (fa/fa), Biochem. J., 214: 215-223 (1983).
- Horwitz, B.A.; Ouabain-sensitive component of brown fat thermogenesis, Amer. J. Physiol., 224: 352-355 (1973).
- Horwitz, B.A.; Eaton, M.; The effect of adrenergic agonists and cyclic AMP on the (Na+K)-ATPase activity of brown adipose tissue, Eur. J. Pharmacol., 34: 241-245 (1975).
- Horwitz, B.A.; Inokuchi, T.; Wickler, S.J.; Stern, J.S.; Lipoprotein lipase activity and cellularity in brown and white adipose tissue in Zucker obese rats, Metabolism, 33: 354-357 (1984).
- Hosaki, Y.; Nishina, H.; Ubuka, T.; Free amino acid contents in guinea pig tissues, Acta Med. Okayama, 39: 425-429 (1985).

Hsieh, A.C.L.; Carlson, L.D.: Role of adrenaline and noradrenaline in chemical regulation of heat production, Amer. J. Physiol., 190: 243-246 (1957).

Hugget, A.S.G.; Nixon, D.A.: Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose, Lancet, ii: 368-370 (1957).

Hull, D.; Segall, M.M.: The contribution of brown adipose tissue to heat production in the newborn rabbit, J. Physiol. (London), 181: 449-457 (1965).

Ichihara, A.: Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase during cellular differentiation and carcinogenesis, Ann. New York Acad. Sci., 259: 347-354 (1975).

Iglesias, R.; Fernández, J.A.; Maapel, T.; Obregón, M.J.; Villarroya, F.: Iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat brown adipose tissue during development, Biochim. Biophys. Acta, 923: 233-240 (1987).

Ingle, D.J.; Meeks, R.C.; Humphrey, L.M.: Effects of exposure to cold upon urinary non protein nitrogen and electrolytes in adrenalectomized and nonadrenalectomized rats, Amer. J. Physiol., 173: 387-389 (1953).

Iqbal, K.; Ottaway, J.H.: Glutamine synthetase in muscle and kidney, Biochem. J., 119: 145-156 (1970).

James, D.E.; Burleigh, K.M.; Storlien, L.H.; Bennet, S.P.; Kraegen, E.W.: Heterogeneity of insulin action in muscle: influence of blood flow, Amer. J. Physiol., 251: E422-E430 (1986).

Jansky, L.: Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance, Biol. Rev., 48: 85-132 (1973).

Jenkins, W.T.; Taylor, R.T.: Branched-chain amino acid aminotransferase, En "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y M.D. Kaplan), vol. 17, pags. 802-807, Academic Press, New York-London (1970).

Joel, C.D.: Stimulation of metabolism of rat brown adipose tissue by addition of lipolytic hormones, J. Biol. Chem., 241: 814-821 (1966).

Joel, C.D.: Effects of insulin and norepinephrine added in vitro on the metabolism of brown adipose tissue in the absence of added glucose, Lipids, 5: 224-230 (1970).

Johansson, B.: Brown fat: a review, Metabolism, 8: 221-239 (1959).

Johnston, D.W.: The absence of brown adipose tissue in birds, Comp. Biochem. Physiol., 40A: 1107-1108 (1971).

Jones, R.G.; Williamson, D.H.: Alterations in mammary-gland blood flow and glucose metabolism in the lactating rat induced by short-term starvation and refeeding, Biosci. Rep., 4: 421-426 (1984).

Kadowaki, H.; Knox, W.E.: Cytosolic and mitochondrial isoenzymes of branched-chain amino acid aminotransferase during development of the rat, Biochem. J., 202: 777-783 (1982).

Kalbhen, D.A.: Problems of chemoluminescence in liquid scintillation counting using the hydroxide hyamine 10-X, Int. J. Appl. Radiat. Isotop., 18: 655-656 (1967).

Kaletha, K.: Effect of temperature on the activity of AMP-deaminase from rat skeletal muscle, J. Thermal Biol., 1: 157-161 (1976).

- Karmen, A.; A note on the spectrophotometric assay of GOT in human blood serum, J. Clin. Invest., 34; 131-133 (1955).
- Kasser, T.R.; Martin, R.J.; Palmitate metabolism and norepinephrine sensitivity in brown adipose, liver and white adipose tissues of Zucker rats, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 169; 320-325 (1982).
- Kates, A.L.; Himms-Hagen, J.; Defective cold-induced stimulation of thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissue of the genetically obese (ob/ob) mouse, Biochem. Biophys. Res. Commun., 130; 188-193 (1985).
- Kerpel, S.; Shafrir, E.; Shapiro, B.; Mechanisms of fatty acid assimilation in adipose tissue, Biochim. Biophys. Acta, 46; 495-504 (1961).
- Kipnis, D.M.; Noall, M.W.; Stimulation of amino acid transport by insulin in the isolated rat diaphragm, Biochim. Biophys. Acta, 28; 226-227 (1958).
- Klain, G.; Hannon, J.P.; Gluconeogenesis in cold-exposed rats, Federation Proc., 28; 965-968 (1969).
- Klingenberg, M.; Characteristics of the uncoupling protein from brown-fat mitochondria, Biochem. Soc. Trans., 12; 390-393 (1984).
- Knehans, A.W.; Romsos, D.R.; Reduced norepinephrine turnover in brown adipose tissue of ob/ob mice, Amer. J. Physiol., 242; E253-E261 (1982).
- Kopecky, J.; Sirgudson, L.; Park, I.R.A.; Himms-Hagen, J.; Thyroxine 5'-deiodinase in hamster and rat brown adipose tissue; effect of cold and diet, Amer. J. Physiol., 251; E1-E7 (1986).
- Krawar, R.; Hüttinger, M.; Gmeiner, B.; Goldenberg, H.; β -oxidation in peroxisomes of brown adipose tissue, Biochim. Biophys. Acta, 531; 353-356 (1978).
- Kühn, E.R.; Bellon, K.; Huybrechts, L.; Heyns, W.; Endocrine differences between the Wistar and Sprague-Dawley laboratory rat; influence of cold adaptation, Horm. Metab. Res., 15; 491-498 (1983).
- Kuroshima, A.; Doi, K.; Ohno, T.; Reduced hyperglycemic action of glucagon in cold-acclimated rats, especially in venous drainage from brown adipose tissue, Can. J. Physiol. Pharmacol., 55; 951-953 (1977a).
- Kuroshima, A.; Doi, K.; Ohno, T.; Role of glucagon in metabolic acclimation to cold and heat, Life Sci., 23; 1405-1414 (1978).
- Kuroshima, A.; Doi, K.; Ohno, T.; Plasma branched-chain amino acids in cold- and heat-acclimated rats, Experientia, 35; 1482-1483 (1979).
- Kuroshima, A.; Doi, K.; Yahata, T.; Ohno, T.; Improved cold tolerance and its mechanism in cold-acclimated rats by high fat diet feeding, Can. J. Physiol. Pharmacol., 55; 943-950 (1977b).
- Kuroshima, A.; Yahata, T.; Thermogenic responses of brown adipocytes to noradrenaline and glucagon in heat-acclimated and cold-acclimated rats, Japan. J. Physiol., 29; 683-690 (1979).
- Kuroshima, A.; Yahata, T.; Habara, Y.; Ohno, T.; Hormonal regulation of brown adipose tissue with special reference to the participation of the endocrine pancreas, J. Thermal Biol., 9; 81-85 (1984).
- Landsberg, L.; Young, J.B.; Autonomic regulation of thermogenesis, En "Mammalian Thermogenesis" (eds. L. Girardier y M.J. Stock), pags. 99-140, Chapman & Hall, Cambridge (1983).

LaNoue, K.F.; Koch, C.D.; Meditz, R.B.; Mechanisms of action of norepinephrine in hamster brown adipocytes, J. Biol. Chem., 257; 13740-13748 (1982).

Laury, M.C.; Azma, F.; Zizine, L.; Portet, R.; Brown adipose tissue and thermogenesis in hypophysectomized rats in relation to temperature acclimation, Pflügers Arch., 400; 171-177 (1984).

Lavau, M.; Bazin, R.; Karaoghlianian, Z.; Guichard, C.; Evidence for a high fatty acid synthesis in interscapular brown adipose tissue of genetically obese Zucker rats, Biochem. J., 204; 503-507 (1982).

Lean, M.E.J.; Branch, W.J.; James, W.P.T.; Jennings, G.; Ashwell, M.; Measurement of rat brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein by radioimmunoassay; increased concentration after cold acclimation, Biosci. Rep., 3; 61-71 (1983).

Lean, M.E.J.; James, W.P.T.; Uncoupling protein in human brown adipose tissue mitochondria, FEBS Lett., 163; 235-240 (1983).

LeBlanc, J.; Pouliot, M.; Importance of noradrenaline in cold adaptation, Amer. J. Physiol., 207; 853-856 (1964).

Lee, K.S.; Drescher, D.G.; Fluorimetric amino-acid analysis with o-phthalaldehyde (OPA), Int. J. Biochem., 9; 457-467 (1978).

Leonard, J.L.; Mellen, S.A.; Larsen, P.R.; Thyroxine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue, Endocrinology, 112; 1153-1155 (1983).

Lin, C.S.; Hackenberg, H.; Klingenberg, E.M.; The uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria is a dimer. A hydrodynamic study, FEBS Lett., 113; 304-306 (1980).

Lin, C.S.; Klingenberg, M.; Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria, FEBS Lett., 113; 299-303 (1980).

Lin, C.S.; Klingenberg, M.; Characteristics of isolated purine nucleotide binding protein from brown fat mitochondria, Biochemistry, 21; 2950-2956 (1982).

Lipmann, F.; Tuttle, L.C.; A specific micromethod for the determination of acyl phosphates, J. Biol. Chem., 159; 21-28 (1945).

Locke, R.M.; Nicholls, D.G.; A re-evaluation of the role of fatty acids in the physiological regulation of the proton conductance of brown adipose tissue mitochondria, FEBS Lett., 135; 249-252 (1981).

Locke, R.M.; Rial, E.; Nicholls, D.G.; The acute regulation of mitochondrial proton conductance in cells and mitochondria from the brown fat of cold-adapted and warm-adapted guinea pigs, Eur. J. Biochem., 129; 381-387 (1982).

López-Soriano, F.J.; Alemany, M.; Amino acid metabolism enzyme activities in rat white adipose tissue, Arch. Int. Physiol. Biochim., 94; 121-125 (1986).

López-Tejero, D.; Pastor-Anglada, M.; Remesar, X.; Sulphur amino acid levels in some tissues of the rat during pregnancy and lactation, Ann. Nutr. Metab., 31; 47-54 (1987).

Loriette, C.; Lalous, D.; Raulin, J.; Développement foetal et neo-natal du tissu adipeux brun du cobaye et du rat, J. Physiol. (Paris), 72; 59-81 (1976).

Loudon, A.; Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: Brown fat, thermogenesis and physiological birth in a marsupial. Comp. Biochem. Physiol., 81A: 815-820 (1985).

Lowenstein, J.M.: Ammonia production in muscle and other tissues. The purine nucleotide cycle. Physiol. Rev., 52: 382-414 (1972).

Lowry, D.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951).

Luboshitzky, R.; Bernardis, L.L.; Goldman, J.K.; Kodis, M.: Brown adipose tissue metabolism in hypothalamic-obese rats. Metabolism, 32: 108-113 (1983).

Ma, S.W.Y.; Foster, D.O.: Redox state of brown adipose tissue as a possible determinant of its blood flow. Can. J. Physiol. Pharmacol., 62: 949-956 (1984).

Ma, S.W.Y.; Foster, D.O.: Uptake of glucose and release of fatty acids and glycerol by rat brown adipose tissue in vivo. Can. J. Physiol. Pharmacol., 64: 609-614 (1986).

Macari, M.; Ferro, J.A.; Eizirik, D.L.: Effects of acute cold exposure on rectal temperature, blood glucose and plasma free fatty acids in alloxan-diabetic rats. Comp. Biochem. Physiol., 85A: 63-65 (1986).

MacDonald, M.; Neufeldt, N.; Park, B.N.; Berger, M.; Ruderman, N.: Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat. Amer. J. Physiol., 231: 619-626 (1976).

Mallette, L.E.; Exton, J.H.; Park, C.R.: Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. J. Biol. Chem., 244: 5713-5723 (1969).

Mampel, T.: Metabolisme extrahepàtic de la glucosa i del glicerol. Tesis Doctoral, Facultat de Biologia, Universidad de Barcelona (1981).

Manchester, K.L.; Young, F.G.: The effect of insulin on incorporation of amino acids into protein of normal rat diaphragm. Biochem. J., 70: 353-358 (1958).

Marliss, E.B.; Aoki, T.T.; Unger, R.H.; Soeldner, J.S.; Cahill, G.F., Jr.: Glucagon levels and metabolic effects of fasting. J. Clin. Invest., 49: 2256-2270 (1970).

McCormack, J.G.: The regulation of fatty acids synthesis in brown adipose tissue by insulin. Prog. Lipid Res., 21: 195-223 (1982).

McCormack, J.G.; Denton, R.M.: Evidence that fatty acid synthesis in the interscapular brown adipose tissue of cold adapted rats is increased in vivo by insulin by mechanisms involving parallel activation of pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA carboxylase. Biochem. J., 166: 627-630 (1977).

McGarry, J.D.; Boyd, M.E.; Foster, D.W.: Regulation of hepatic fatty acid oxidation in the rat during feeding and starvation. Biochem. Soc. Trans., 9: 341 (1981).

McGivan J.D.; Chappell, J.B.: On the metabolic function of glutamate dehydrogenase in rat liver. FEBS Lett., 52: 1-7 (1975).

Mecke, D.: L-glutamine. Determination with glutamine synthetase. En "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. H.U. Bergmeyer), vol. 4, pags. 1716-1719. Academic Press, New York (1974).

Mercer, S.W.; Trayhurn, P.: The development of insulin resistance in brown adipose tissue may impair the acute cold-induced activation of thermogenesis in genetically obese (ob/ob) mice. Biosci. Rep., 4: 933-940 (1983).

Nicklewright, L.: Glycogen deposition in the liver and interscapular fat body of the mouse. Federation Proc., 9: 89 (1950).

Milakofsky, L.; Hare, T.A.; Miller, J.M.; Vogel, W.H.: Comparison of amino acid levels in rat blood obtained by catheterization and decapitation. Life Sci., 34: 1330-1340 (1984).

Miller, D.S.; Munford, P.: Gluttony I: an experimental study of overeating on high or low protein diets. Amer. J. Clin. Nutr., 20: 1212-1222 (1967).

Miller, D.S.; Payne, P.R.: Weight-maintenance and food intake. J. Nutr., 78: 255-262 (1962).

Millward, D.J.: Protein turnover in skeletal muscle. II. The effect of starvation and a protein-free diet on the synthesis and catabolism of skeletal muscle proteins in comparison to liver. Clin. Sci., 39: 591-603 (1970).

Millward, D.J.; Garlick, P.J.: The pattern of protein turnover in the whole animal and the effect of dietary variations. Proc. Nutr. Soc., 31: 257-263 (1972).

Milner, R.E.; Wilson, S.; Arch, J.R.S.; Trayhurn, P.: Are there one or two high-affinity binding sites for GDP in brown adipose tissue mitochondria? Biochem. Soc. Trans., 14: 1201-1202 (1986).

Mohell, N.; Nedergaard, J.; Cannon, B.: Quantitative differentiation of α - and β -adrenergic respiratory responses in isolated hamster brown fat cells; evidence for the presence of an α_1 -adrenergic component. Eur. J. Pharmacol., 93: 183-193 (1983).

Mohell, N.; Wallace, M.; Fain, J.N.: Alpha₁-adrenergic stimulation of phosphatidylinositol turnover and respiration of isolated hamster brown fat cells. Molec. Pharmacol., 25: 64-69 (1984).

Mokhova, E.N.; Skulachev, V.P.; Zhigacheva, I.V.: Activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. Biochim. Biophys. Acta, 501: 415-423 (1977).

Monfar, M.: Utilització metabòlica de la glucosa per rates sotmeses a una dieta hipercalòrica. Efecte del dejuni. Tesina de Llicenciatura, Facultat de Biologia, Universidad de Barcelona (1985).

Monfar, M.; Prats, E.; Argilés, J.M.; Alemany, M.: Starvation-induced loss of energetic substrates in the interscapular brown adipose tissue of "cafeteria" rats. Nutr. Res. (1987) (en prensa).

Moore, A.L.; Rich, P.R.: Plant mitochondria. Trends Biochem. Sci., 5: 284-288 (1980).

Moriya, K.; Itoh, S.: Fatty acid composition of brown fat in the rat. Japan. J. Physiol., 19: 775-790 (1969).

Morris, C.J.O.R.; Morris, P.: Ion-exchange chromatography. En "Separation Methods in Biochemistry", pags. 303-308. Pitman Publishing, London (1976).

Mory, G.; Bouillaud, F.; Combes-George, M.; Ricquier, D.: Noradrenaline controls the concentration of the uncoupling protein in brown adipose tissue. FEBS Lett., 166: 393-396 (1984).

Moss, K.M.; McGivan, J.D.: Characteristics of aspartate deamination by the purine nucleotide cycle in the cytosol fraction of rat liver. Biochem. J., 150: 275-283 (1975)

- Munro, H.N.: Free amino acid pools and their role in regulation, En "Mammalian Protein Metabolism" (ed. H.N. Munro), vol. 4, pags. 299-288, Academic Press, New York (1970).
- Nedergaard, J.; Alexson, S.; Cannon, B.: Cold adaptation in the rat; increased brown fat peroxisomal β -oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity, Amer. J. Physiol., 239: C203-C216 (1980).
- Nedergaard, J.; Cannon, B.: [3 H]-GDP binding and thermogenin amount in brown adipose tissue mitochondria from cold-exposed rats, Amer. J. Physiol., 248: C365-C371 (1985).
- Nedergaard, J.; Lindberg, O.: Norepinephrine-stimulated fatty acid release and oxygen consumption in isolated hamster brown-fat cells. Influence of buffers, albumin, insulin and mitochondrial inhibitors, Eur. J. Biochem., 95: 139-145 (1979).
- Nedergaard, J.; Lindberg, O.: The brown fat cell, Int. Rev. Cytol., 74: 187-286 (1982).
- Nedergaard, J.; Raasmaja, A.; Cannon, B.: Parallel increase in amount of 3 H-GDP-binding and thermogenin antigen in brown adipose tissue mitochondria of cafeteria-fed rats, Biochem. Biophys. Res. Commun., 122: 1328-1336 (1984).
- Neumann, R.O.: Experimentelle beitrage zur lehre von dem taglichen nahrungsbedarf des menschen nuter besonderer berucksichtigung der not wendigen, Arch. Hyg., 45: 1-87 (1902).
- Nawsholme, E.A.; Crabtree, B.: Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation, Biochem. Soc. Symp., 41: 61-109 (1976).
- Nicholls, D.G.: Hamster brown adipose tissue mitochondria; the control of respiration and the proton electrochemical potential gradient by possible physiological effectors of the proton conductance in the inner membrane, Eur. J. Biochem., 49: 573-583 (1974).
- Nicholls, D.G.: Hamster brown adipose tissue mitochondria, Purine nucleotide control of the ion conductance of the inner membrane, the nature of the nucleotide binding site, Eur. J. Biochem., 62: 223-228 (1976).
- Nicholls, D.G.; Locke, R.M.: Thermogenic mechanisms in brown fat, Physiol. Rev., 64: 1-64 (1984).
- Normann, P.T.; Flatmark, T.: Long-chain acyl CoA synthetase and "outer" carnitine long-chain acyltransferase activities of intact brown adipose tissue mitochondria, Biochim. Biophys. Acta, 530: 461-473 (1978).
- Odessey, R.; Goldberg, A.L.: Oxidation of leucine by rat skeletal muscle, Amer. J. Physiol., 223: 1376-1383 (1972).
- Odessey, R.; Khairallah, E.A.; Goldberg, A.L.: Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle, J. Biol. Chem., 249: 7623-7629 (1974).
- Ogasawara, N.; Goto, H.; Watanabe, T.: Isozymes of rat AMP deaminase, Biochim. Biophys. Acta, 403: 530-537 (1975).
- Oginsky, E.L.: Isolation and determination of arginine and citrulline, En "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y M.D. Kaplan), vol. 3, pags. 639-643, Academic Press, New York-London (1969).
- Oliphant, L.W.: First observation of brown fat in birds, Condor, 85: 350-354 (1983).

- Owen, D.E.; Felig, P.; Morgan, A.P.; Wahren, J.; Cahill, G.F., Jr.: Liver and kidney metabolism during prolonged starvation, J. Clin. Invest., 48: 574-583 (1969).
- Owen, D.E.; Morgan, A.P.; Kemp, H.G.; Sullivan, J.M.; Herrera, M.G.; Cahill, G.F., Jr.: Brain metabolism during fasting, J. Clin. Invest., 46: 1589-1595 (1967).
- Owen, D.E.; Reichard, G.: Human forearm metabolism during progressive starvation, J. Clin. Invest., 50: 1536-1545 (1971).
- Pagé, E.; Babineau, L.M.: The effect of cold environment on the hibernating gland of the rat, Rev. Can. Biol., 9: 202-206 (1950).
- Palou, A.; Remesar, X.; Arola, Ll.; Alemany, M.: Changes in alanine transaminase activity in several organs of the rat induced by a 24-hour fast, Horm. Metab. Res., 12: 505-508 (1980a).
- Palou, A.; Remesar, X.; Arola, Ll.; Alemany, M.: Serine dehydratase activity in the liver and extrahepatic organs of fed and 24-hour fasted rats, Rev. Esp. Fisiol., 36: 151-154 (1980b).
- Palou, A.; Remesar, X.; Arola, Ll.; Herrera, E.; Alemany, M.: Metabolic effects of short term food deprivation in the rat, Horm. Metab. Res., 13: 326-330 (1981).
- Parker, R.E.: "Estadística para Biólogos". Ed. Omega, Barcelona (1981).
- Pastor-Anglada, M.; López-Tejero, D.; Remesar, X.: Free amino acid pools in some tissues of the pregnant rat, Horm. Metab. Res., 18: 590-594 (1986).
- Patterson, M.S.; Greene, R.C.: Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsions, Anal. Chem., 37: 854-857 (1965).
- Penner, P.E.; Hinms-Hagen, J.: Gluconeogenesis in rats during cold acclimation, Can. J. Biochem., 46: 1205-1213 (1968).
- Pettersson, B.; Vallin, I.: Norepinephrine-induced shift in levels of adenosine 3':5'-monophosphate and ATP parallel to increased respiratory rate and lipolysis in isolated hamster brown-fat cells, Eur. J. Biochem., 62: 383-390 (1976).
- Pitts, R.F.: Renal production and excretion of ammonia, Amer. J. Med., 36: 740-742 (1964).
- Polimanti, D.: Il letargo, Roma (1912).
- Portet, R.: Lipid biochemistry in the cold-acclimated rat, Comp. Biochem. Physiol., 70B: 679-688 (1981).
- Prats, E.: Utilització metabòlica de l'alanina per rates sotmeses a una dieta hipercalòrica. Efecte del dejuni. Tesina de Licenciatura, Facultat de Biologia, Universidad de Barcelona, (1985).
- Prats, E.; Monfar, M.; Argilés, J.; Alemany, M.: Energy homeostasis in cafeteria rats subjected to 24 hours of food deprivation, J. Obesity Weight Regul., 5: 77-88 (1986).
- Pressman, B.C.; Lardy, H.A.: Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria, Biochim. Biophys. Acta, 21: 458-466 (1956).
- Prusiner, S.B.; Cannon, B.; Linberg, D.: Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. I. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration, Eur. J. Biochem., 6: 15-22 (1968).

Radowski, M.W.; Effect of cold exposure on serum lipids and lipoproteins in the rat, Can. J. Physiol. Pharmacol., 44: 711-719 (1966).

Radowski, M.W.; Orna, T.; Response of lipoprotein lipase in various tissues to cold exposure, Amer. J. Physiol., 220: 1852-1856 (1971).

Rafael, J.; Ludolph, H.J.; Hohorst, H.J.; Mitochondrien aus braunen fettgewebe; entkopplung der atemungskettenphosphorylierung durch langkettige fettsauren un rekopplung durch guanosintriphosphat, Hoppa-Seyler's Z. Physiol. Chem., 250: 1121-1131 (1969).

Rath, E.A.; Hens, D.A.; Beloff-Chain, A.; Lipoprotein lipase activities in tissues of normal and genetically obese (ob/ob) mice, Diabetologia, 10: 261-265 (1974).

Remesar, X.; Arola, Ll.; Palou, A.; Alemany, M.; Arginase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats, Horm. Metab. Res., 12: 281-282 (1980a).

Remesar, X.; Arola, Ll.; Palou, A.; Alemany, M.; Distribution of glutamate dehydrogenase activity in the organs of fed and 24-hour fasted rats, IRCS Med. Sci., 8: 146 (1980b).

Remesar, X.; Arola, Ll.; Palou, A.; Alemany, M.; Effect of 24-hours fast on aspartate transaminase activities in the organs of the rat, Rev. Esp. Fisiol., 36: 147-150 (1980c).

Rémésy, C.; Demigné, C.; Changes in availability of glucogenic and ketogenic substrates and liver metabolism in fed and starved rats, Ann. Nutr. Metab., 27: 57-70 (1983).

Rémésy, C.; Fafournoux, P.; Demigné, C.; Control of hepatic utilization of serine, glycine and threonine in fed and starved rats, J. Nutr., 113: 28-39 (1983).

Revel, J.P.; Sheridan, J.D.; Electrophysiological studies of intercellular junctions in brown fat, J. Physiol. (London), 194: 34P-35P (1968).

Rial, E.; Nicholls, D.G.; Regulation of the proton conductance of brown fat mitochondria, Identification of functional and non-functional nucleotide binding sites, FEBS Lett., 161: 284-288 (1983).

Rial, E.; Nicholls, D.G.; The mitochondrial uncoupling protein from guinea-pig brown adipose tissue, Synchronous increase in structural and functional parameters during cold-adaptation, Biochem. J., 222: 685-693 (1984).

Rial, E.; Poustie, A.; Nicholls, D.G.; Brown adipose tissue mitochondria; the regulation of the 32,000 M. uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides, Eur. J. Biochem., 137: 197-203 (1983).

Ricquier, D.; Gervais, C.; Kader, J.C.; Hemon, P.; Partial purification by GDP-agarose affinity chromatography of the 32,000 m.w. polypeptide from mitochondria of brown adipose tissue, FEBS Lett., 101: 35-38 (1979).

Ricquier, D.; Kader, J.C.; Mitochondrial protein alteration in active brown fat; a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study, Biochem. Biophys. Res. Commun., 73: 577-583 (1976).

Ricquier, D.; Mory, G.; Factors affecting brown adipose tissue activity in animals and man, Clin. Endocrinol. Metab., 13: 501-520 (1984).

Ricquier, D.; Mory, G.; Bouillaud, F.; Thibault, J.; Weissenbach, J.: Rapid increase of mitochondrial uncoupling protein and its mRNA in stimulated brown adipose tissue. Use of a cDNA probe, FEBS Lett., 178: 240-244 (1984).

Ricquier, D.; Mory, G.; Nèchad, M.; Combes-George, M.; Thibault, J.: Development and activation of brown fat in rats with pheochromocytoma PC 12 tumors, Amer. J. Physiol., 245: C172-C177 (1983).

Riggs, T.R.; McKirahan, K.J.: Action of insulin on transport of L-alanine into rat diaphragm in vitro. Evidence that hormone affects only one neutral amino acid transport system, J. Biol. Chem., 218: 6450-6455 (1973).

Rosenthal, J.; Angel, A.; Farkas, J.: Metabolic fate of leucine: a significant sterol precursor in adipose tissue and muscle, Amer. J. Physiol., 226: 411-418 (1974).

Roth, M.: Fluorescence reaction for amino acids, Anal. Chem., 43: 880-882 (1971).

Rothwell, N.J.; Saville, M.E.; Stock, M.J.: Effects of feeding a "cafeteria" diet on energy balance and diet-induced thermogenesis in four strains of rat, J. Nutr., 112: 1515-1524 (1982c).

Rothwell, N.J.; Saville, E.; Stock, M.J.: Brown fat activity in fasted and refed rats, Biosci. Rep., 4: 351-357 (1984).

Rothwell, N.J.; Saville, M.E.; Stock, M.J.; Wyllie, M.G.: Catecholamine and thyroid hormone influence on brown fat Na⁺,K⁺-ATPase activity and thermogenesis in the rat, Horm. Metab. Res., 14: 261-265 (1982b).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis, Nature, 281: 31-35 (1979).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: Similarities between cold- and diet-induced thermogenesis in the rat, Can. J. Physiol. Pharmacol., 58: 842-848 (1980a).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: Intra-strain difference in the response to overfeeding in the rat, Proc. Nutr. Soc., 39: 20A (1980b).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: Influence of noradrenaline on blood flow to brown adipose tissue in rats exhibiting diet-induced thermogenesis, Pflugers. Arch., 389: 237-242 (1981).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: Neural regulation of thermogenesis, Trends Neurol. Sci., 5: 124-126 (1982a).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: Effect of chronic food restriction on energy balance, thermogenic capacity, and brown adipose tissue activity in the rat, Biosci. Rep., 2: 543-549 (1982b).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.: Tissue blood flow in control and cold-adapted hyperthyroid rats, Can. J. Physiol. Pharmacol., 62: 928-933 (1984).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.; Stribling, D.: Diet-induced thermogenesis, Pharm. Ther., 17: 251-268 (1982a).

Rothwell, N.J.; Stock, M.J.; Trayhurn, P.: Reduced lipogenesis in cafeteria-fed rats exhibiting diet-induced thermogenesis, Biosci. Rep., 3: 217-224 (1983).

- Rous, S.; Bas, S.; Sengupta, S.; Contribution of leucine in the fatty acid synthesis and ketogenesis in mice adipose tissue, Int. J. Biochem., 11; 337-340 (1980).
- Rowe, W.B.; Ronzio, R.A.; Wellner, V.P.; Meister, A.; Glutamine synthetase (sheep brain). En "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y M.D. Kaplan), vol. 17, pags. 900-910, Academic Press, New York (1970).
- Rowlatt, D.; Mrosovsky, M.; English, A.; A comparative survey of brown fat in the neck and axilla of mammals at birth. Biol. Neonata, 17; 53-58 (1971).
- Ruderman, N.B.; Muscle amino acid metabolism and gluconeogenesis. Annu. Rev. Med., 26; 245-258 (1975).
- Ruderman, N.B.; Berger, M.; The formation of glutamine and alanine in skeletal muscle. J. Biol. Chem., 249; 5500-5506 (1974).
- Saggerson, E.D.; Carpenter, C.A.; Sensitivity of brown adipose tissue carnitine palmitoyl transferase to inhibition by malonil CoA. Biochem. J., 204; 373-375 (1982).
- Sandoval, I.V.; Sols, A.; Gluconeogenesis from serine by the serine-dehydratase-dependent pathway in rat liver. Eur. J. Biochem., 43; 609-616 (1974).
- Saudek, C.D.; Felig, P.; The metabolic events of starvation. Amer. J. Med., 60; 117-126 (1976).
- Schinke, R.T.; Arginase (rat liver). En "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y M.D. Kaplan), vol. 17, pags. 313-317, Academic Press, New York-London (1970a).
- Schinke, R.T.; Regulation of protein degradation in mammalian tissues. En "Mammalian Protein Metabolism" (ed. H.N. Munro), vol. 4, pags. 177-228, Academic Press, New York (1970b).
- Schmidt, E.; Glutamate dehydrogenase. UV-assay. En "Methods of Enzymatic Analysis" (ed. H.U. Bergmeyer), vol. 2, pags. 650-656. Academic Press, New York (1974).
- Schröck, H.; Cha, C.J.M.; Goldstein, L.; Glutamine release from hindlimbs and uptake by kidney in the acutely acidotic rat. Biochem. J., 188; 557-560 (1980).
- Sclafani, A.; Springer, D.; Dietary obesity in adult rats; similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. Physiol. Behav., 17; 461-471 (1976).
- Segal, H.L.; Matsuzawa, T.; L-alanine aminotransferase (rat liver). En "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y N.D. Kaplan), vol. 17, pags. 153-159, Academic Press, New York-London (1970).
- Sellers, E.A.; Scott, J.W.; Thomas, N.; Electrical activity of skeletal muscle of normal and acclimatized rats on exposure to cold. Amer. J. Physiol., 177; 372-376 (1954).
- Senault-Bournique, C.; Portet, R.; Chevillard, L.; Lipides totaux de la carcasses chez le rat adapté à différentes températures et soumis a divers régimes alimentaires. Compt. Rend. Soc. Biol., 161; 233-236 (1967).
- Seydoux, J.; Brown adipose tissue; a common effector for thermal and food efficiency regulation in rodents. J. Therm. Biol., 9; 67-71 (1984).
- Seydoux, J.; Chinet, A.; Schneider-Picard, G.; Bas, S.; Imesch, E.; Assimacopoulos-Jeannet, F.; Giacobino, J.P.; Girardier, L.; Brown adipose tissue metabolism in streptozotocin-diabetic rats. Endocrinology, 113; 604-610 (1983).

Seydoux, J.; Giacobino, J.P.; Giradier, L.; Impaired metabolic response to nerve stimulation in brown adipose tissue of hypothyroid rats, Molec. Cell. Endocrinol., 25; 213-226 (1982).

Seydoux, J.; Trimble, E.R.; Bouillaud, F.; Assimacopoulos-Jeannet, F.; Bas, S.; Ricquier, D.; Giacobino, J.P.; Giradier, L.; Modulation of β -oxidation and proton conductance pathway of brown adipose tissue in hypo- and hyperinsulinemic states, FEBS Lett., 166; 141-145 (1984).

Shackney, S.E.; Joel, C.D.; Stimulation of glucose metabolism in brown adipose tissue by addition of insulin in vitro, J. Biol. Chem., 241; 4004-4010 (1966).

Sherwin, R.S.; Hendler, R.G.; Felig, P.; Effect of ketone infusion on amino acid nitrogen metabolism in man, J. Clin. Invest., 55; 1382-1390 (1975).

Shimazu, T.; Takahashi, A.; Stimulation of hypothalamic nuclei has differential effects on lipid synthesis in brown and white adipose tissue, Nature, 284; 62 (1980).

Shiota, M.; Tanaka, T.; Sugano, T.; Effect of norepinephrine on gluconeogenesis in perfused livers of cold-exposed rats, Amer. J. Physiol., 249; E281-E286 (1985).

Shotwell, M.A.; Skilberg, M.; Oxender, D.L.; The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells, Biochim. Biophys. Acta, 737; 267-284 (1983).

Silva, J.E.; Larsen, P.R.; Adrenergic activation of triiodothyronine in brown adipose tissue, Nature, 712-713 (1983).

Silva, J.E.; Larsen, P.R.; Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats, J. Clin. Invest., 76; 2296-2305 (1985).

Skala, J.P.; Knight, B.L.; Protein kinases in brown adipose tissue of developing rats, State of activation of protein kinase during development and cold exposure and its relationship to adenosine 3':5'-monophosphate, lipolysis, and heat production, J. Biol. Chem., 252; 1064-1070 (1977).

Smith, O.K.; Rise in plasma α -amino nitrogen concentration in rats eviscerated after cold exposure, Amer. J. Physiol., 231; 174-178 (1976).

Smith, O.L.K.; Insulin response in rats acutely exposed to cold, Can. J. Physiol. Pharmacol., 62; 924-927 (1984).

Smith, O.L.K.; Davidson, S.B.; Shivering thermogenesis and glucose uptake by muscles of normal or diabetic rats, Amer. J. Physiol., 242; R109-R115 (1982).

Smith, R.E.; Thermoregulatory and adaptative behavior of brown adipose tissue, Science, 146; 1686-1689 (1964).

Smith, R.E.; Hock, R.J.; Brown fat; thermogenic effector of arousal in hibernators, Science, 140; 199-200 (1963).

Smith, R.E.; Horwitz, B.A.; Brown fat and thermogenesis, Physiol. Rev., 49; 330-425 (1969).

Smith, R.J.; Role of skeletal muscle in interorgan amino acid exchange, Federation Proc., 45; 2172-2176 (1986).

Smith, S.A.; Young, P.; Cawthorne, M.A.; Quantification in vivo of the effects of insulin on glucose utilization in individual tissues of warm- and cold-acclimated rats, Biochem. J., 237; 789-795 (1986).

- Smith, T.J.; Edelman, I.S.; The role of Na transport in thyroid thermogenesis, Federation Proc., 38: 2150-2153 (1979).
- Snell, K.; Duff, D.A.; Alanine release by rat adipose tissue *in vitro*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 77: 925-931 (1977).
- Snell, K.; Duff, D.A.; Branched chain amino acid metabolism and alanine formation in rat diaphragm muscle *in vitro*, Effects of dichloroacetate, Biochem. J., 223: 831-835 (1984).
- Soley, M.; Alemany, M.; Amino acid concentrations in the plasma, serum and whole blood of the rat: blood amino acid compartmentation, IRCS Med. Sci., 8: 159-160 (1980a).
- Soley, M.; Alemany, M.; A rapid method for the estimation of amino acid concentration in liver tissue, J. Biochem. Biophys. Meth., 2: 207-211 (1980b).
- Soley, M.; Herrera, E.; Alemany, M.; Effect of a 24-h fast on the amino acid concentrations of rat blood, liver and striated muscle, Molec. Physiol., 2: 89-97 (1982).
- Somogyi, M.; Determination of blood sugar, J. Biol. Chem., 160: 69-73 (1945).
- Steinbock, H.L.; Tarver, H.; Plasma protein. V. The effect of the protein content of the diet on turnover, J. Biol. Chem., 209: 127-132 (1954).
- Stirling, J.L.; Stock, M.J.; Metabolic origins of thermogenesis induced by diet, Nature, 220: 801-802 (1958).
- Strielawan, P.J.; Shrago, E.; Specific interaction of fatty acyl-CoA esters with brown adipose tissue mitochondria, Amer. J. Physiol., 248: E699-E705 (1985).
- Suda, M.; Nakagawa, H.; L-serine dehydratase (rat liver), En "Methods in Enzymology" (eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan), vol. 17, pags. 346-351, Academic Press, New York-London (1970).
- Sundin, U.; GDP-binding to rat brown fat mitochondria; effects of thyroxine at different ambient temperatures, Amer. J. Physiol., 241: C134-C139 (1981).
- Sundin, U.; Cannon, B.; GDP-binding to the brown fat mitochondria of developing and cold-adapted rats, Comp. Biochem. Physiol., 65B: 463-471 (1980).
- Sundin, U.; Fain, J.N.; α_2 -adrenergic inhibition of lipolysis and respiration in rat brown adipocytes, Biochem. Pharmacol., 32: 3117-3120 (1983).
- Svartengren, J.; Svoboda, P.; Cannon, B.; Desensitisation of β -adrenergic responsiveness *in-vivo*. Decreased coupling between receptors and adenylate cyclase in isolated brown fat cells, Eur. J. Biochem., 128: 481-488 (1982).
- Swick, A.G.; Swick, R.W.; Rapid changes in number of GDP binding sites on brown adipose tissue mitochondria, Amer. J. Physiol., 251: E192-E195 (1986).
- Swick, R.W.; Measurement of protein turnover in the rat, J. Biol. Chem., 231: 751-763 (1958).
- Swick, R.W.; Song, H.; Turnover rates of various muscle proteins, J. Anim. Sci., 38: 1150-1157 (1974).
- Szepesi, B.; Avery, E.H.; Freedland, R.A.; Role of kidney in gluconeogenesis and amino acid catabolism, Amer. J. Physiol., 219: 1627-1631 (1970).

Takagaki, G.; Berl, S.; Clarke, D.D.; Purpura, D.P.; Waelisch, H.: Glutamic acid metabolism in brain and liver during infusions with ammonia labelled with nitrogen-15, Nature, 189; 326-334 (1961).

Taylor, S.I.; Mukherjee, C.; Jungas, R.L.: Studies on the mechanism of activation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin, J. Biol. Chem., 248; 73-81 (1973).

Tischler, M.E.; Goldberg, A.L.: Leucine degradation and release of glutamine and alanine by adipose tissue, J. Biol. Chem., 255; 8074-8081 (1980).

Tornheim, K.: Oscillations of the glycolytic pathway and the purine nucleotide cycle, J. Theor. Biol., 79; 491-541 (1979).

Tornheim, K.; Lowenstein, J.M.: The purine nucleotide cycle, The production of ammonia from aspartate by extracts of rat skeletal muscle, J. Biol. Chem., 247; 162-169 (1972).

Trayhurn, P.: Fatty acid synthesis in vivo in brown adipose tissue, liver and white adipose tissue of cold acclimated rats, FEBS Lett., 104; 13-16 (1979).

Trayhurn, P.: Fatty acid synthesis in mouse brown adipose tissue. The influence of environmental temperature on the proportion of whole-body fatty acid synthesis in brown adipose tissue and the liver, Biochim. Biophys. Acta, 664; 549-560 (1981).

Trayhurn, P.; Jones, P.H.; McGuckin, M.H.; Goodbody, A.E.: Effects of overfeeding on energy balance and brown fat thermogenesis in obese (ob/ob) mice, Nature, 295; 323-325 (1982).

Trayhurn, P.; Mercer, S.: Thermogenesis and lipogenesis (in brown adipose tissue), Trends Biochem. Sci., 11; 434 (1984).

Triandafillou, J.; Gwilliam, C.; Hinms-Hagen, J.: Role of thyroid hormone in cold-induced changes in rat brown adipose tissue mitochondria, Can. J. Biochem., 60; 530-537 (1982).

Tulp, O.L.: The development of brown adipose tissue during experimental overnutrition in rats, Int. J. Obesity, 5; 579-591 (1981).

Tulp, O.L.: Effects of acute starvation on brown adipose tissue status in the rat, Nutr. Rep. Int., 28; 227-233 (1983).

Tulp, O.L.; Frink, R.; Sims, E.A.H.; Danforth, E., Jr.: Overnutrition induces hyperplasia of brown fat and diet-induced thermogenesis, Clin. Res., 28; 621A (1980).

Turner, J.C.: "Sample Preparation for Liquid Scintillation Counting", pags. 18-20. Amersham/Searle, Arlington Heights, Ill. (1971).

Umbreit, W.W.; Burris, R.H.; Stauffer, S.F.: En "Manometric Techniques", pag. 132. Burgess Publishing Co., Minneapolis (1964).

Vallerand, A.L.; Lupien, J.; Bukowiecki, L.J.: Interactions of cold exposure and starvation on glucose tolerance and insulin response, Amer. J. Physiol., 245; E575-E581 (1983).

Vander Tuig, J.G.; Kerner, J.; Romsos, D.R.: Hypothalamic obesity, brown adipose tissue and sympathoadrenal activity in rats, Amer. J. Physiol., 248; E607-E617 (1985).

Vander Tuig, J.G.; Romsos, D.R.: Effect of dietary carbohydrate, fat and protein on norepinephrine turnover in rats, Metabolism, 33; 26-33 (1984).

- Villarroya, F.: Contribució a l'estudi del teixit adipós marró durant la gestació i l'alletament en la rata, Tesis Doctoral, Facultat de Biologia, Universidad de Barcelona (1986).
- Villarroya, F.; Mampel, T.: [¹⁴C]glucose utilization in vitro in brown adipose tissue from virgin and pregnant rats, Biochem. Soc. Trans., 13: 869-870 (1985).
- Vinay, P.; Khoury, N.; Soowamber, M.; Gougoux, A.: Renal extraction of glutamine from plasma and whole blood; studies in dogs and rats, Can. J. Physiol. Pharmacol., 63: 886-892 (1985).
- Vinas, O.: Paper dels eritròcits en el flux interòrgans d'aminoàcids en la rata, Estudis "in vivo" i "in vitro", Tesis Doctoral, Facultat de Biologia, Universidad de Barcelona (1986).
- Webb, J.T.; Brown, G.W., Jr.: Some properties and occurrence of glutamine synthetase in fish, Comp. Biochem. Physiol., 54B: 171-175 (1976).
- Whitten, B.K.; Burlington, R.F.; Posiviata, M.A.; Sidel, C.M.; Beecher, G.R.: Amino acid catabolism in environmental extremes; effect of temperature and calories, Amer. J. Physiol., 219: 1046-1049 (1970).
- Williams, J.A.; Matthews, E.K.: Membrane depolarization, cyclic AMP, and glycerol release by brown adipose tissue, Amer. J. Physiol., 227: 987-992 (1974).
- Williamson, D.H.; Ilic, V.: Activities of enzymes of acetoacetate metabolism in rat brown adipose tissue during development, Biochem. J., 231: 773-775 (1985).
- Williamson, J.R.; Coles, H.S.; Herczeg, B.E.; Prusiner, S.; Olson, M.S.; Fukami, M.: Control of metabolism in brown adipose tissue, Lipids, 5: 1-13 (1970).
- Windmueller, H.G.; Spaeth, A.E.: Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine, J. Biol. Chem., 249: 5070-5079 (1974).
- Winter, C.G.; Christensen, H.N.: Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte, J. Biol. Chem., 239: 872-878 (1964).
- Woolfolk, C.A.; Shapiro, B.; Stadtman, E.R.: Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*, Arch. Biochem. Biophys., 116: 177-192 (1966).
- Wroblewski, F.; LaDue, J.S.: Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 91: 569-571 (1956).
- Yahata, T.; Habara, Y.; Kuroshima, A.: Effects of glucagon and noradrenaline on the blood flow through brown adipose tissue in temperature-acclimated rats, Japan. J. Physiol., 33: 367-376 (1983).
- Yeh, Y.Y.: Ketone body synthesis from leucine by adipose tissue from different sites in the rat, Arch. Biochem. Biophys., 233: 10-18 (1984).
- York, D.A.; Holt, S.J.; Marchington, D.: Regulation of brown adipose tissue thermogenesis by corticosterone in obese fa/fa rats, Int. J. Obesity, 9: 89-95 (1985).
- You, S.S.; You, R.W.; Sellers, E.A.: Effect of thyroidectomy, adrenalectomy and burning on the urinary nitrogen excretion of the rat maintained in a cold environment, Endocrinology, 47: 156-161 (1950).
- Young, D.R.; Cook, S.F.: Effect of environmental temperature and dietary protein on urinary nitrogen excretion of rats, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 89: 482-484 (1955).

- Young, J.A.; Freedman, B.S.: Renal tubular transport of amino acids, Clin. Chem., 17: 245-266 (1971),
- Young, J.B.; Saville, E.; Rothwell, N.J.; Stock, M.J.; Landsberg, L.: Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat, J. Clin. Invest., 69: 1061-1071 (1982),
- Young, P.; Cawthorne, M.A.; Levy, A.L.; Wilson, K.: Reduced maximum capacity of glycolysis in brown adipose tissue of genetically obese diabetic (db/db) mice and restoration following treatment with a thermogenic beta-adrenoreceptor agonist, FEBS Lett., 176: 16-20 (1984a),
- Young, P.; Wilson, S.; Arch, J.R.S.: Prolonged β -adrenoreceptor stimulation increases the amount of GDP-binding protein in brown adipose tissue mitochondria, Life Sci., 34: 1111-1117 (1984b),
- Yousef, M.K.; Chaffee, R.R.J.: Studies on protein turnover rates in cold acclimated rats, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 133: 801-804 (1970),
- Zak, B.; Cohen, J.: Automatic analysis of tissue culture proteins with stable Folin reagents, Clin. Chim. Acta, 6: 665-670 (1961),
- Zamora, F.; Arola, Ll.; Alemany, M.: In vitro glucose and 2-aminoisobutyric acid uptake by rat interscapular brown adipose tissue, (Manuscrito no publicado, 1987),
- Zorzano, A.; Balon, T.W.; Goodman, M.N.; Ruderman, N.B.: Insulin and exercise stimulated muscle alpha-aminoisobutyric acid transport by a Na^+, K^+ -ATPase independent pathway, Biochem. Biophys. Res. Commun., 134: 1342-1349 (1986),





