

---

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

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

Tesi Doctoral

Núria Montserrat Pulido

---





UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

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

Tesi Doctoral

NúriaMontserratPulido

---



---

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

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

Memòria presentada per  
Núria Montserrat Pulido  
Per optar al grau en  
Doctor en Biologia

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Joaquim Gutiérrez Fruitós  
i la Dra. Isabel Navarro Álvarez del Departament de Fisiologia, Facultat de  
Biologia. Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de  
Barcelona, programa de Fisiologia (bienni 2001-2003).

Dr. Joaquim Gutiérrez

Dra. Isabel Navarro

Núria Montserrat

Barcelona Juny 2006

---



---

*A la meva mare*

---





---

Finalment ha arribat el moment tan esperat per tots els que comencem una tesi: ACABAR-LA!. Tot aquest camí l'he realitzat amb tots vosaltres, i tot i que és impossible agrair l'esforç de tothom, intentaré no deixar-me a ningú. Així que per començar, GRÀCIES A TOTS!

Bé Guti, que t'he de dir que no sàpigues? de fet, i ho saps, gràcies per l'oportunitat que em vas donar ara fa tants anys, oferint-me un lloc en el teu laboratori, i més que això, un lloc en el teu grup!!...Fins l'últim dia, sempre, has estat donant-me suport i també molta canya!!!, i sé que ho has fet perquè vols treure el millor de tothom que passa pel teu grup!!! Moltes gràcies Guti!!!!!!!!!!!!!!

Isabel, in The Navi, Navarrets! Muchas gracias por todo, tus consejos siempre tan acertados y por las horas de coche que nos hemos pegado en busca de peces y de charlas infinitas. Muchas gracias Isabel!!!!

Josep!! finalment ha arribat aquest moment, moltes gràcies per tot, perquè sempre has tingut deu minuts per mirar-te les coses, i per donar-me la teva opinió. També et vull agrair tot el que m'has ensenyat al laboratori!!! Moltes gràcies Joseph!

Jean Charles, je voudrais te remercier en premier lieu pour ton amabilité, disponibilité et ton aide avec la thèse et des experiments! Je voudrais te remercier que tu est toujours super gentil avec moi!!!! Merci Jean Charles!!!

Manfred, thanks a lot for the time I spent in your laboratoty, I want to thank you for the techniques I have learnt, they are going to help me a lot in the next future. Thanks a lot!

Gràcies al Doctor Jaume Pérez pels dies tan profitosos a Torre de la Sal, i també pels seus suggeriments, sempre tant adients i necessaris.Gràcies!.

També vull agrair a Joan Baró de 'Truites del Segre' per deixar-nos treballar amb les truites i ajudar-nos amb el manteniment dels animals. També vull agrair al Dr.Castelló per deixar-nos les seves instal·lacions de la Universitat, on he pogut mantenir les orades que m'han donat mitja tesis!!!!!! . També vull agrair a la Doctora Carmen Benito, perquè sempre has estat tant cordial i tan amable amb tot el nostre grup i la nostra feina, moltíssimes gràcies Carmen!!! Igualment, vull agrair a tots els membres dels Cliesa, SOCLESA i sobretot als GUASOS!! . També vull fer especial atenció a les encarregades de la neteja, que tan amablement, han deixat sempre el laboratori "como una patena", sobretot a la Carmen, sempre amb tant bon humor!, gràcies!

Però en especial, vull agrair als meus companys de laboratori tot el temps que hem passat junts, de veritat!!!! Pablo, Señorito Pablingo, Blino, hasta el ÚLTIMO DIA, ayudándome, y lo mejor de todo y más admirable, siempre de buen humor!!! Encarni, Nationet, siempre ahí, desde las distancias transatlánticas, dándome tus consejos. Jalia, Liamsona!! Nena, muchísimas gracias por todo, y nos vemos ya en Glasgow!. Cadira, ja hem acabat!!!! Al fin nena!! t'enrecordes? Crec que ens enrecordarem sempre, totes les hores que ens hem tirat cara-

---

---

a-cara a l'antic laboratori, suant la gota gorda quan no hi havia l'aire acondicionat, i sempre amb la música que ens ha animat i acompanyat tant!!! Cadi, Cadirot... now let's dance!!! Però la feina ja l'hem feta!!!. També vull agrair i donar molts ànims als que comenceu ara, Joanet! Moltes gràcies per tot, i sobretot per ser tan canyero i no callar-te mai les coses! Gràcies pels teus super cops de mà amb les oradetes!!! Lamia, mucha suerte con todo, ha sido un placer conocerte!!! (je suis majbula!!). Marta, molta sort amb la tesis!! i moltes gràcies per la teva ajuda!! Dani, et dic el mateix, moltíssima sort amb la tesis!!! Lourdes, quan tu has començat, jo ja estava amb un peu fora del laboratori, però molta sort!!!!.Jordai, ninu, Midoreti, moltes gràcies per tot, sé que ens veurem en històries encara més gordes que aquesta, però fins aquí, per tot el que hem passat, moltes gràcies!. BAOBABS! Nena, molta canya!!! Ánimo en todo y no curre tanto!! Eres una campeona!. Juan!Volviste de Turquía.. y cuantos cambios, eh? De verdad!! gracias por tu buen humor y por tus consejos!! GRACIAS!.

També m'agradaria agrair a tots els altres membres del departament: Lauzus!!! Sou els millors moltes gràcies per les hores tant bones que hem passat junts, de veritat!! Eli!!, Bertoluchi!!, Xavi!!, Jordi!!! Esplugot!!!, Bego!! i a la nou-vinguda Juanita!!!! Gràcies a tots perquè sou una canya!!! També a la Pilar, per la part que li toca com a cap del grup!!! David y Arnau, sois una pasada, gracias por todo!! Concepció moltes gràcies pels teus consells!!! També vull agrair a les eNOS team!!! KellyTabascoCasos, Bego, Nuri, Cleo, muchas gracias por todos los momentos hemos pasado juntas y vuestras risas!!! Tampoc no em puc deixar als altres peixos!! Santi, Marta molta sort també amb les vostres tesis, al Toni, moltes gràcies per tenir sempre un moment!!!! També vull agrair al Pere i al Ramon per ajudar-me sempre que els hi demanat alguna cosa.!També vull agrair al Lloberas i a tot el grup del Celada perquè sempre m'heu ajudat!No puc deixar-me a tots els membres que han passat pel laboratori, Ina, Giovanni, Oxanna,Pabble...i als que m'han acollit tant bé!!! PEDRO!!!

També vull agrair a TOTS els professors del departament que sempre m'heu ajudat..Ginés, Jaume, Jose, Espel, Tereses (les 2!), Joana, Maria del Puy, Espel... sou molts!!!en fin, a tots!! Perquè sempre heu tingut temps per les meves preguntes i m'ho heu explicat tot molt bé. També a les secres, especialment a la Dolors pel seu bon humor i la seva empenta!!També als micros, Carla i Placa!!! sempre donant ànims i ajudant a tope amb autoclaus d'última hora!!!..

Als meus amics, a tots!!! A Butrén (Árbol), Antonioni, Thai, Zander, Tània, Raquel, Cesc,...a tots!!! I sobretot a David!!! que sempre m'has ajudat, però més que això, perquè has fet molt fàcil allò que semblava un infern!!!!

Finalment, gràcies a la meva mare, per donar-m'ho tot!!! gràcies als meus germans, a la meva família "al completo"! Que sempre heu estat aquí per treure ferro a les coses i fer-me veure que no hi ha res pel que mereixi la pena agobiar-se!!! Gràcies!!!

Gràcies!!!

---

---

# ÍNDEX

---



---

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<i>1. SISTEMA D'INSULINA I FACTORS DE CREIXEMENT TIPUS INSULINA</i> .....	5
<b>1.1.-Insulina</b> .....	6
<b>1.1.1.- Funcions de la insulina</b> .....	7
<b>1.2.-Eix somatotròpic</b> .....	8
<b>1.2.1.- Els factors de creixement tipus insulina: IGF-I, IGF-II</b>	
10	
<b>1.2.1.1.- Funcions dels IGFs</b> .....	11
<b>1.3.-Receptors d' insulina i dels IGFs</b> .....	13
<b>1.3.1.-Vies de transducció de la senyal de la insulina i els</b>	
<b>IGFs.</b> .....	16
<i>2. CREIXEMENT SOMÀTIC</i> .....	19
<b>2.1 El múscul esquelètic</b> .....	19
<b>2.2 Cèl·lules satèl·lit.</b> .....	20
<b>2.2.2 Control gènic de l'activació, proliferació i diferenciació de les</b>	
<b>cèl·lules satèl·lit musculars.</b> .....	22
<i>3. CREIXEMENT COMPENSATORI</i> .....	26
<b>3.1 El dejuni</b> .....	26
<b>3.1.1 Mobilització de les reserves energètiques.</b> .....	26
<b>3.1.2 Creixement compensatori</b> .....	27
<b>OBJECTIUS</b> .....	29

---

<b>RESULTATS</b> .....	33
<b>Paper de la insulina, els factors de creixement tipus insulina i factors reguladors de la musculatura en el creixement compensatori de la truita irisada (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</b> .....	37
<b>Role of insulin, insulin like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</b> .	39
<b>1. Introduction</b> .....	43
<b>2. Materials and methods</b> .....	44
<b>3. Results</b> .....	48
<b>4. Discussion</b> .....	56
<b>References</b> .....	62
<b>Regulació coordinada dels gens dels sistema GH/IGF durant la realimentació de la truita irisada (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</b> . ....	73
<b>Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)</b> .....	75
<b>1. Introduction</b> .....	79
<b>2. Materials and methods</b> .....	81
<b>3. Results</b> .....	83
<b>4. Discussion</b> .....	91
<b>References</b> .....	95

---

**El paper de la insulina i de l' IGF-I en el creixement compensatori de l' orada (*Sparus aurata*).** .....103

**The role of insulin and IGF-I in the compensatory growth of the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*)** .....105

**1. Introduction** .....109

**2. Materials and methods**.....111

**3. Results**.....113

**4. Discussion** .....118

**References** .....122

**L'estimulació dels IGFs en cèl·lules musculars d' orada (*Sparus aurata*) en cultiu té lloc degut a l'acció específica del receptor d' IGF-I i de les vies MAPK i PI3K.** .....131

**IGFs stimulate Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) muscle cultured cells through its specific type I receptor by MAPK and PI3K-kinase-signaling pathways** .....133

**1. Introduction** .....137

**2. Materials and methods**.....138

**3. Results**.....142

**4. Discussion** .....147

**References** .....151

---

<b>Efectes metabòlics de la insulina i dels IGFs en cèl·lules musculars en cultiu de l'orada (<i>Sparus aurata</i>).</b> .....	159
<b>Metabolic effects of insulin and IGFs on Gilthead Sea Bream (<i>Sparus aurata</i>) muscle cells.</b> .....	161
<b>1. Introduction</b> .....	165
<b>2. Materials and methods</b> .....	167
<b>3. Results</b> .....	170
<b>4. Discussion</b> .....	174
<b>References</b> .....	178
<b>RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> .....	185
<b>I. RESPOSTA AL CREIXEMENT COMPENSATORI UTILITZANT PROTOCOLS DE DEJUNI I REALIMENTACIÓ EN TRUITA IRISADA I ORADA.</b>	
<b>RESPOSTA A LA REALIMENTACIÓ EN TRUITA IRISADA</b> .....	187
<b>II. FUNCIONS DELS IGFS SOBRE CÈL·LULES EN CULTIU MUSCULARS</b> .....	197
<b>CONCLUSIONS</b> .....	205
<b>REFERÈNCIES</b> .....	211

---



---

# **INTRODUCCIÓ**



Entre tots els vertebrats, els peixos ocupen una posició única en quant a estratègies i perfils de creixement. Així doncs, la majoria dels peixos presenten patrons indeterminats de creixement, fet que implica que en moltes espècies la mida final de l'animal no estigui fixada (Rowerlson i col., 1999). De la mateixa manera, aquest fenomen en peixos és flexible, i depèn entre altres factors, de la temperatura, el fotoperíode i de la disponibilitat de l'aliment (Revisat per Navarro i Gutiérrez, 1995; Gabillard i col., 2003). Totes aquestes condicions s'han de tenir en compte quan es planteja el cultiu d'espècies d'una manera rendible i sostenible.

Degut a que la producció en Aqüicultura ha incrementat dramàticament en les últimes dècades, i que la previsió establerta per l'Organització de les Nacions Unides per a la Agricultura i l'Alimentació (FAO) a l'any 2004, va determinar que abans del 2030 més de la meitat del peix de consum seria produït per l'Aqüicultura, sembla de gran necessitat la millora dels protocols alimentaris i l'optimització dels mètodes de cultiu. Estudis en aquesta línia de recerca ajudaran a entendre i relacionar quins són els paràmetres que afecten al creixement en peixos. Un dels principals problemes a l'hora d'evaluar els efectes d'un paràmetre en particular en Aqüicultura, és l'elevat cost econòmic i el llarg temps requerit a l'hora d'observar canvis en el creixement dels animals (Brown i col., 2000). En aquest context, resulta de gran interès l'estudi i millora de diferents manipulacions utilitzades rutinàriament en Aqüicultura, tals com el dejuni, la realimentació o el creixement compensatori.

El creixement somàtic en peixos és degut als increments en la massa muscular com a conseqüència de la deposició proteïca (Revisat a Mommsem, 2001). Els mecanismes fisiològics subjacents, mitjançant els quals la ingesta de l'aliment activa i incrementa el creixement somàtic en peixos són desconeguts, no obstant, molts dels factors endocrins involucrats en la regulació del metabolisme glucídic, lipídic i proteic, estan fortament relacionats amb la utilització dels nutrients, el sistema immune i el creixement somàtic (Revisat per Pérez-Sánchez i Le Bail, 1999).

Així, el creixement somàtic en peixos, al igual que en altres vertebrats, està regulat per una varietat de factors de creixement/hormones que actuen de manera endocrina, paracrina i/o autocrina. Un component central en la xarxa hormonal és l'eix hormona de creixement (GH)-factor de creixement tipus insulina I (IGF-I) (Duan, 1997; 1998). Dins d'aquest eix endocrí, el sistema IGF té un paper molt important en el creixement.

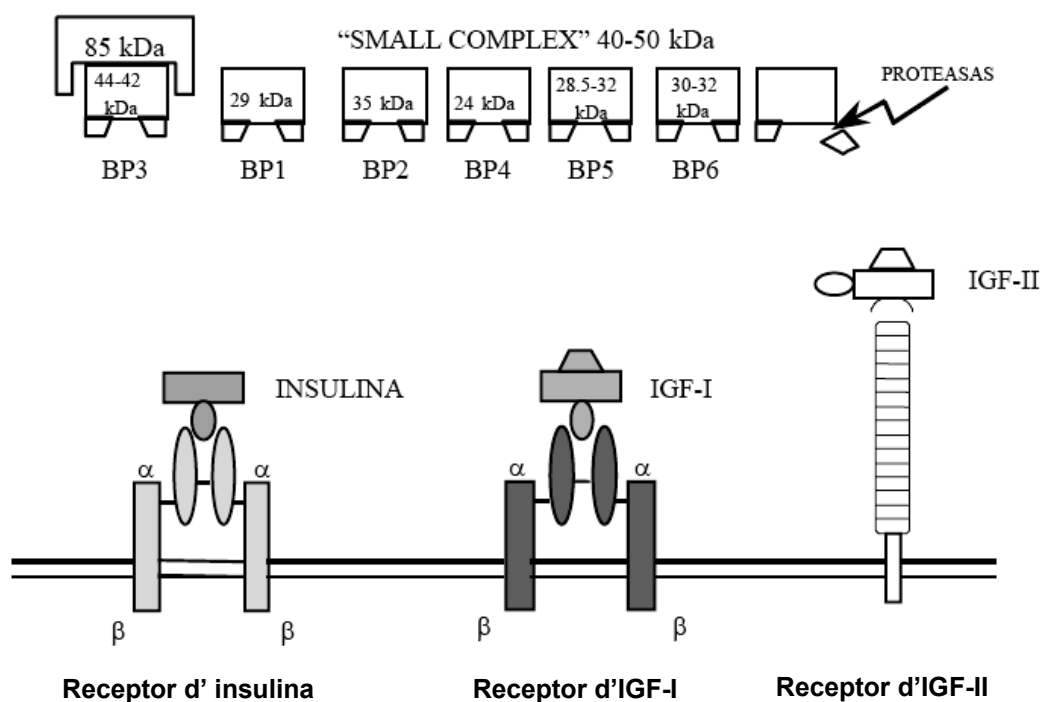
El sistema IGF està format per lligands (IGF-I i IGF-II), receptors i proteïnes d'unió a IGF (IGFBPs) (Plisetskaya i col., 1994; Duan, 1997; Kelley col., 2000). Molt relacionat amb el sistema IGF es troba la insulina, que comparteix característiques estructurals i funcionals amb els IGFs.

En peixos, els increments en el creixement muscular post-embrionari depenen de la proliferació i posterior diferenciació d'una població progenitora de cèl·lules miogèniques, anomenades cèl·lules satèl·lit (Brodeur i col., 2002). Els estudis realitzats en el nostre grup utilitzant el model *in vitro* de cèl·lules miosatèl·lit de truita irisada (*Onchorynchus mykiss*) en cultiu, va permetre investigar els efectes metabòlics i mitogènics de la insulina i de l'IGF-I utilitzant aquest model per primera vegada en peixos (Castillo i col., 2002; 2004; 2006). En aquest marc, ha estat prioritari establir un model de cultiu de cèl·lules miosatèl·lit d'orada (*Sparus aurata*) amb l'objectiu d'estudiar els efectes de la insulina, de l'IGF-I i de l'IGF-II en el metabolisme glucídic i proteic del múscul blanc d'aquesta espècie, que és de gran interès comercial en el Mediterrani.

A més, tenint en compte que hi ha tota una sèrie de factors i de gens específics de la musculatura involucrats en la proliferació i determinació de les cèl·lules satèl·lit en mamífers, sembla necessari analitzar els canvis en la seva expressió, així com la seva possible interacció degut a manipulacions tals com el dejuni, la realimentació o el creixement compensatori, amb la intenció d'entendre la seva funció i de buscar gens "candidats" a l'hora d'optimitzar aquests protocols d'ús freqüent en Aqüicultura.

## 1. SISTEMA D'INSULINA I FACTORS DE CREIXEMENT TIPUS INSULINA

En peixos, igual que en mamífers, el sistema d'insulina i IGFs està format per la insulina, l'IGF-I i l'IGF-II, i els seus receptors de membrana específics. A més a més, inclou les proteïnes transportadores dels IGFs en plasma o IGFbps i proteïnes amb activitat proteasa (Binoux, 1995; Duan, 1997; Monget i col., 1996). Addicionalment, s'han descrit membres nous en aquesta família que inclouen el receptor similar al receptor d'insulina (IRR) (Dandekar i col., 1998) i el receptor híbrid d'IGF-I i d'insulina (IGF-IR/IR) (Frattali i col., 1992), tot i que els mecanismes de la seva activació i funcions són encara desconeguts. La Figura 1 ens mostra esquemàticament cadascun d'aquests elements, que seran descrits a continuació, fent especial menció en les característiques d'aquest sistema en peixos.



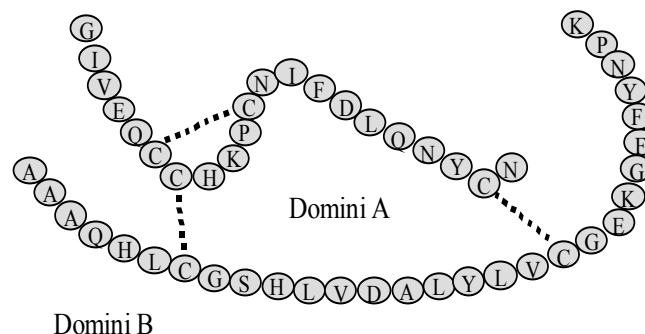
**Fig 1.1.-** Representació esquemàtica dels sistemes d'insulina i IGFs, format pels pèptids, els receptors, les proteïnes d'unió als IGFs i les proteases. (Segons Monget et al., 1996).

### 1.1.- Insulina

La insulina és una hormona secretada com a precursor de cadena única per les cèl·lules  $\beta$  del pàncrees endocrí en períodes post-pandrials. En peixos, s'ha descrit que la seva secreció ve estimulada pels nivells circulants de glucosa i d'aminoàcids (Murat i col., 1981). Tanmateix s'ha suggerit la possibilitat d'una estimulació neural de la seva secreció durant la fase cefàlica de la digestió (Papatryphon et al., 2001), tal i com succeeix en mamífers. Les insulines van ser de les primeres hormones en ser purificades en peix (Jensen et al., 1929; McCormick i Noble, 1924) i també seqüenciades (Reid et al., 1968), així com de les primeres en les que es va determinar l'estructura terciària de la molècula (Cutfield et al., 1979). Tot i que aquesta hormona es troba altament conservada al llarg de l'evolució, s'han descrit dues isoformes d'insulina en dues espècies de peixos diferents, de les quals s'en desconeix la funció (Conlon, 2001; Mommsen et al., 2001).

Durant la seva síntesi, el fragment N-terminal de 24 aminoàcids (Fig. 1.2) és eliminat enzimàticament en el seu pas pel reticle endoplasmàtic donant lloc a la proinsulina; aquesta molècula està formada per les cadenes A i B de la futura insulina madura i unides mitjançant el pèptid C. L'eliminació proteolítica del pèptid C originarà la insulina madura, que té un pes molecular de 5600 Da (Hazelwood, 1993; Mommsen y Plisetskaya, 1991).

Les insulines de peixos presenten característiques comunes amb la resta dels vertebrats. En el seu estat madur, la insulina conté de 51 a 58 aminoàcids formats per una cadena A de 21 i una cadena B de 29 (Fig. 1.2). La unió per ponts disulfur d'ambdues cadenes determina l'estructura terciària de la proteïna (Plisetskaya et al., 1994). La zona més important per a la seva activitat biològica es troba en la posició aminoacídica 22-26 de la cadena B (Bornfeldt et al., 1991; Simon, 1989).



**Figura 1.2.-** Estructura de la insulina de salmó. Les línies de punts indiquen els ponts disulfur (Modificat de Plisetskaya et al., 1994).

### 1.1.1.- Funcions de la insulina.

L'acció de la insulina és principalment anabolitzant, estimulant la captació de glucosa i d'aminoàcids en el fetge i en el múscul esquelètic. També promou la lipogènesis, la síntesi proteica i la glicogènesi en ambdós òrgans (Machado i col., 1988; Wenderlaar Bonga, 1993 i Mommsen i Plisetskaya, 1991). Molts dels efectes de la insulina en mamífers es donen a través de l'estimulació de la taxa de transcripció de determinats gens, així com per l'activació de determinades proteïnes, moltes d'elles, són enzims implicats en la regulació del metabolisme (Lloyd et al., 1987; Miller, 1989; Standaert i Pollet, 1988).

En peixos, s'ha descrit una reducció significativa dels nivells plasmàtics d'insulina durant els períodes de dejuni en diferents espècies (Patent i col., 1971; Plisetskaya i col., 1986; Sheridan i Mommsen, 1991; Blasco i col., 1992; Navarro i col., 1992; Navarro i col., 1995; Silverstein i Plisetskaya, 2001; Larsen i col., 2001), que són totalment revertits durant els períodes de realimentació (Thorpe i Ince 1976; Blasco i col., 1992; Navarro i col., 1995; Larsen i col., 2001; Figueredo-Garutti i col., 2002). En peixos, la concentració plasmàtica d'insulina oscil·la entre 1-30 ng/mL (Revisat per Navarro i Gutiérrez, 1995). La glucosa és, en general, un important estimulador de la secreció d'insulina. No obstant, en peixos, els aminoàcids, especialment la lisina i l'arginina, semblen ser secretagogs (estimuladors de la secreció d'insulina) més potents que la pròpia glucosa (Carneiro et al., 1993). Estudis *in vivo* realitzant injeccions intraperitoneals d'insulina o d'arginina, han descrit els seus efectes hipoglucèmics tant en la truita irisada (*Onchorynchus mykiss*) com en l'orada (*Sparus aurata*), respectivament (Navarro et al., 2002; Vega-Rubín i col., 2004).

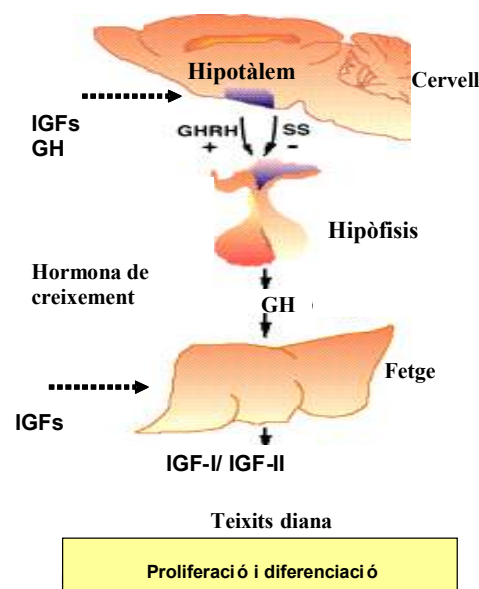
Per una altra banda, estudis *in vitro*, mostren que la insulina estimula la captació de glucosa i d'alanina en cèl·lules musculars de truita irisada (*Onchorynchus mykiss*) i que inhibeix la lipòlisis en adipòcits aïllats de la mateixa espècie (Castillo i col., 2004; Albalat i col., 2005). Igualment, també s'ha descrit que la insulina estimula la deposició de glicògen i que inhibeix la glicogenolisis en diferents tipus cel·lulars en peixos (Foster i Moon, 1989; Foster i Moon, 1990).

La insulina pertany a una gran família d'hormones peptídiques relacionades, que inclou els factors de creixement semblants a la insulina o IGFs (IGF-I i IGF-II), el factor de creixement nerviós o NGF i els pèptids d'invertebrats similars a la insulina (Blundell i Humbel, 1980; Mommsen i Plisetskaya, 1991; Smit et al., 1988).

## 1.2.-Eix somatotròpic.

La GH en peixos, al igual que en vertebrats, és sintetitzada a la glàndula hipofisària i secretada al rec sanguini sota control neural, hormonal i nutricional (Revisat per Reinecke i col., 2005). En mamífers, l'hipotàlem produeix l'hormona estimuladora de l'hormona del creixement (GHRH) i la inhibidora, la somatostatina (SS). Ambdues, actuen controlant la secreció de l'hormona de creixement (GH) a la glàndula hipofisària, mitjançant accions estimuladores o inhibidores, respectivament (Arvat i col., 2002). En peixos, la situació és més complexa, la regulació de la secreció de la GH té lloc mitjançant l'acció de GHRH i de la SS, però també de les hormones estimuladores de gonadotropines (GnRH), de l'hormona alliberadora de tirotròpina (TRH) i del polipèptid de la hipòfisis estimulador de l'adenilat ciclasi (PACAP) (Riley i col., 2002). Altres autors han descrit una producció extrahipofisària de la GH en el ronyó anterior de l'orada (Calduch-Giner i Pérez-Sánchez, 1999).

De la mateixa manera que en tots els vertebrats, la majoria de les accions de la GH sobre el creixement són a través dels factors de creixement tipus insulina: IGF-I i IGF-II. Aquests, es sintetitzen principalment al fetge, tot i que altres teixits com el múscul, l'intestí, les gònades o les brànquies són productors locals d'IGF-I en peixos (Donaldson et al., 1979; McLean i Donaldson, 1993; Revisat per Duan C., 1998). En la figura 1.3 es mostra un esquema de l'eix somatotròpic.



**Figura 1.3.-** Esquema de l' eix somatotròpic. GHRH: hormona estimuladora de l' alliberació de GH; SS: somatolactina; GH : hormona del creixement; IGFs: factors de creixement tipus insulina. Les línees de punts indiquen efectes inhibitoris.



La GH en peixos és directa o indirectament responsable de diferents funcions tals com l'estimulació del creixement somàtic, l'adaptació a medi salí, regulació del metabolisme, reproducció i desenvolupament (Arsenault i col., 2003; Riley i col., 2002). Tot i això, cal citar que l'acció de la GH sobre el creixement és dual, ja que exerceix tant accions lipolítiques com anabòliques. L'acció lipolítica (independent dels IGFs) està associada a estats catabòlics i de malnutrició, assegurant així la utilització de greixos com a primera font d'energia. L'acció anabòlica es dona a través dels IGFs i afavoreix la síntesi proteica en els teixits diana (Mingarro i col., 2004).

Les accions de la GH són iniciades per la unió al seu receptor (RGH) que es troba a la membrana plasmàtica de nombrosos tipus cel·lulars. La unió de la GH circulat amb el seu receptor induïx la dimerització del mateix mitjançant l'activació del complex (Revisat per Pérez-Sánchez i col., 2002).

El RGH és un membre de Classe I de la superfamília de les citoquines. S'han clonat diferents cDNAs en peixos teleostis que codifiquen per RGH (Lee i col., 2001; Calduch-Giner i col., 2001; Ozaki i col., 2002; Tse i col., 2003; Calduch-Giner i col., 2003; Kajimura i col., 2004; Very i col., 2005). Igualment, també s'ha clonat el RGH en salmó coho (*Onchorynchus kisutch*; NCBI Gen Bank Accession No. AF4033539 i AF403540), en el peix halibut (*Paralichthys olivaceus*; Accession No. AB058418) i en la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*, Accession No. AY283778). Tant el cas del rèmol (*Scophthalmus maximus*) com en el de l'orada s'ha descrit l'existència de isoformes truncades per al RGH (Calduch-Giner i col., 2001; Tse i col., 2003).

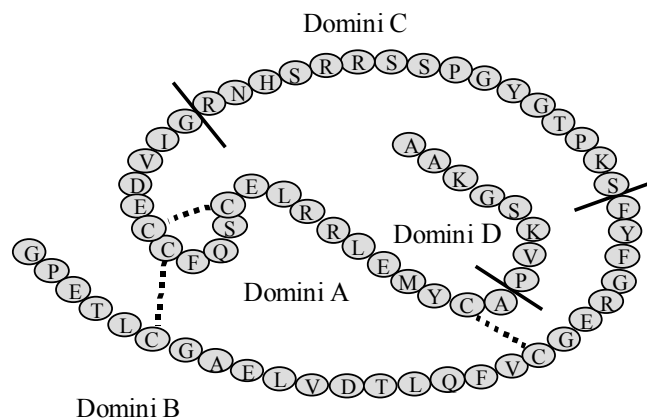
Durant el dejuni, s'ha descrit que els increments en els nivells plasmàtics de GH (Duan i Plisetskaya 1993; Marchelidon i col., 1996; Pérez-Sánchez i col., 1995; Pierce i col., 2005), coincideixen amb la pèrdua de la capacitat d'unió per part dels RGH hepàtics a l'hormona circulat (Gray i col., 1992; Duan i Plisetskaya, 1993; Pérez-Sánchez i col., 1994). Durant molt de temps s'ha cregut que la reducció dels RGHs en el fetge, eren els responsables de la desensibilització a la GH, i que aquest fet resultava en la disminució de la síntesi d'IGF-I en el fetge durant el dejuni. Més recentment, Deng i col. (2004), han relacionat els increments en la GH circulat durant el dejuni, amb altres factors neuroendocrins tals com la SS i el GHRH, que conjuntament amb la disminució de l'IGF-I circulat, afavoreixen els increments en la GH circulat.

Recentment, també s'ha descrit que durant el dejuni hi ha una disminució en l'expressió de l'ARNm del RGH hepàtic en el salmó masou (*Onchorynchus masou*) i en l'orada bruna (*Acanthopagrus schlegeli*), respectivament (Fukada i col., 2004; Deng i col., 2004). De tota manera, són necessaris més estudis per tal d'interpretar la varietat estructural i funcional de les diferents formes solubles de RGH descrites en peixos fins ara.

### 1.2.1.- Els factors de creixement tipus insulina: IGF-I , IGF-II.

Tant l'IGF-I com l'IGF-II, són polipèptids monocadena amb homologia estructural a la proinsulina (Revisat per Duan, C., 1998). Ambdós pèptids són necessaris pel creixement fetal i post-fetal en mamífers (Jones i Clemmons, 1995). Aquests estan constituïts per quatre dominis (A, B, C i D) (Figura 1.4). Els IGFs, contràriament a la molècula de la proinsulina, presenten un domini D carboxi-terminal (Humble i col., 1984) i són sintetitzats a partir de seqüències iniciadores a l'extrem amino-terminal. D'altra banda, també presenten un domini E a l'extrem carboxi, identificat a salmònids com a resultat del fenomen de "splicing" alternatiu (Kavsan i col., 1993, 1994).

L'estructura terciària dels IGFs es manté per tres ponts disulfur situats a les mateixes posicions que a la insulina madura (Figura 1.4).



---

**Figura 1.4.-** Estructura del factor de creixement tipus insulina de salmó. Les línies de punts indiquen la posició dels ponts disulfur. Modificat per Plisetskaya i col. (1994).

---

Durant les últimes dues dècades s'han identificat les seqüències de cDNA per a IGF-I en nombroses espècies de peixos que inclouen el salmó coho (*Onchorynchus kisutch*), truita irisada (*Onchorynchus mykiss*), el peix gat (*Ictalurus punctatus*) i orada (*Sparus aurata*) entre d'altres (Cao i col., 1989; Shambloott i Chen, 1992; Duguay i col., 1992; 1996), totes les seqüències mantenen aproximadament una homologia del 80 % amb l'humana.

El cDNA d'IGF-II també ha estat clonat a diferents espècies que inclouen el tauró (Shablott i Chen, 1992), el salmó (Dugay i col., 1995), l'orada (Duguay i cols., 1996), la truita irisada (Shablott i cols., 1998), la tilàpia (Chen i col., 1998), i en el "puffer fish" (Edwards y cols., 1998), trobant-se una alta homologia amb les seqüències descrites en vertebrats.

### **1.2.1.1.- Funcions dels IGFs.**

Els IGFs són potents mitògens que estimulen el creixement post-natal dels animals. Les seves accions poden ser endocrines, paracrines o autocrines actuant sobre diferents tipus cel·lulars (Vong, P., i col. 2003). En peixos, com en mamífers, l'IGF-I juga un paper molt important mediatitzant els efectes promotors de la GH sobre el creixement. El primer efecte de l'IGF-I descrit en peixos, va ser l'estimulació de la captació de sulfat i la posterior síntesi de proteoglicans en el cartílag branquial de diferents espècies (Duan i Hirano, 1990; McCormick et al., 1992), així com l'estimulació de la síntesi d'ADN en condriòcits (Duan i Hirano, 1992). També s'ha demostrat en mamífers, que la injecció intravenosa d'IGF-I pot induir hipoglucèmia tant ràpidament com la insulina, però amb un poder 10 vegades inferior (Zapf et al., 1986). Les accions de l'IGF-I i de l'IGF-II semblen bastant similars, i més si tenim en compte que l'homologia gènica entre tots dos pèptids és del 70 % (Stewart i Rotwein, 1996).

Ha estat àmpliament demostrat que la GH és un potent regulador de l'expressió d'IGF-I (Duan i col., 1994) i alguns autors han descrit que l'expressió d'IGF-II podria ser deguda a l'acció de la GH en la truita irisada (*Onchorynchus mykiss*) (Shablott i col., 1995; Le Bail i col., 1998; Greene i col., 1999).

En els diversos estudis realitzats en peixos, s'ha descrit una correlació positiva entre els nivells plasmàtics d'IGF-I o en l'expressió del seu ARNm, amb la ració d'aliment i el contingut de proteïna en la dieta en orada (*Sparus aurata*) (Pérez-Sánchez i col., 1994; 1995; Metón i col., 2003).

De la mateixa manera, estudis en orada mostren una forta correlació entre els nivells plasmàtics d'IGF-I amb períodes estacionals on es dona una acceleració en el creixement (Mingarro i col., 2002). També s'ha descrit una estimulació en la producció d'IGF-I en salmó coho (*Onchorynchus kisutch*), degut als increments en la temperatura i en la durada del dia (Beckman i col., 1998; McCormick i col., 1992). A més a més, en diferents espècies s'ha descrit que la restricció de l'aliment disminueix el nivells plasmàtics de l'IGF-I (Baños i col.,

1999; Niu i col., 1993; Pérez-Sánchez i col., 1994) i de l'IGF-II (Gentil i col., 1996) així com l'expressió de l'ARNm de IGF-I en el fetge (Duan i Plisetskaya, 1993; Matthews i col., 1997; Metón i col., 2000). Chauvigné i col. (2003) van descriure que el dejuni provoca disminucions en l'expressió de l'ARNm de l'IGF-I muscular en la truita irisada, suggerint que l'acció autocrina/paracrina participa conjuntament amb el sistema endocrí en la regulació del creixement tissular.

Dels components del sistema IGF, l'IGF-I és el candidat més adequat com a indicador de creixement (Uchida i col., 2003). D'aquesta manera, són nombrosos els estudis en peixos que mostren una correlació positiva entre els nivells plasmàtics d'IGF-I i períodes de creixement (Revisat per Pérez-Sánchez i Le Bail, 1999; Beckman i col., 2004; Fukada i col., 2004; Picha i col., 2006).

Recentment en el nostre grup, s'ha descrit que incubacions d'IGF-I en cèl·lules satèl·lit musculars de truita irisada en cultiu resulten en l'estimulació de la captació d'aminoàcids i de glucosa (Castillo i col., 2004). Tanmateix, Pozios i col. (2001) van descriure l'activació de la síntesis d'ADN en cèl·lules embrionàries de peix zebra (*Danio rerio*), quan aquestes eren incubades amb IGF-I. Albalat i col. (2005) han descrit l'acció de l'IGF-I sobre la captació de glucosa en cultius primaris d'adipòcits d'orada i truita irisada.

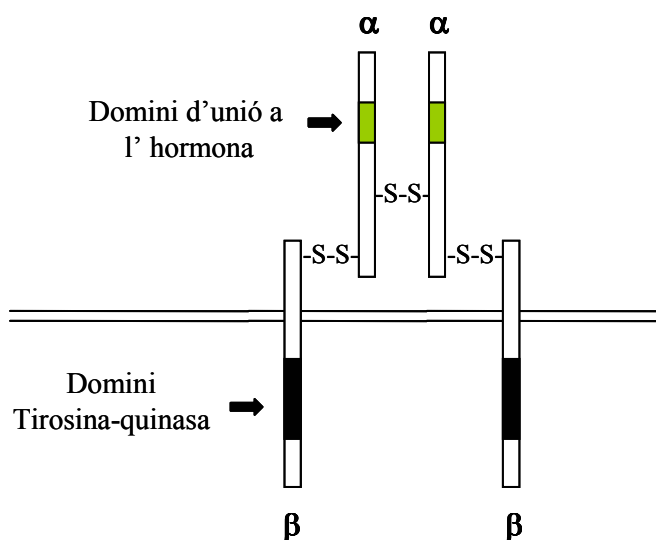
Estudis *in vivo* han posat de manifest les funcions de l'IGF-II en peixos en els últims anys. Chauvigné i col. (2003) van observar que els nivells d'expressió de l'ARNm d'IGF-II en la musculatura blanca de la truita irisada no variaven ni durant el dejuni ni durant la realimentació. Per contra, en el mateix estudi, es va observar una disminució significativa en l'expressió de l'ARNm hepàtic d'IGF-II durant el dejuni i una recuperació en els nivells d'expressió durant la realimentació, indicant l'acció paracrina/autocrina de l'IGF-II en el múscul blanc de la truita irisada.

S'ha descrit que l'IGF-II promou la proliferació cel·lular i la captació de glucosa en cèl·lules satèl·lit musculars de truita irisada en cultiu (Codina i col., 2004). Darrerament, alguns estudis han descrit una àmplia distribució tissular en l'expressió del RNA missatger (RNAm) d'IGF-II en diferents espècies de peixos (Ayson i col., 2002; Caelers i col., 2004; Vong i col., 2003).

En mamífers l'expressió del RNAm d'IGF-II és detectable en diversos teixits fetals, però els nivells decauen durant el desenvolupament postnatal. Aquest fet contrasta amb la situació descrita als peixos teleostis, que expressen majors quantitats d'IGF-II en teixits extrahepàtics que d'IGF-I al llarg de la seva vida (Vong i col., 2003; Caelers i col., 2004).

### 1.3. - Receptors d'insulina i dels IGFs.

Els receptors de la insulina (IR) i de l'IGF-I (IGFR-I) són glicoproteïnes amb un pes molecular de 350 kDa i amb 50 % d'homologia en la seqüència aminoacídica. Tots dos formen part de la família de receptors tirosina quinasa; així doncs, contenen dues subunitats  $\alpha$  i dues subunitats  $\beta$  unides per ponts disulfur que conformen l'heterotretàmer  $\alpha\beta$ - $\alpha\beta$  (Fig 1.5). Els llocs d'unió es troben en les subunitats  $\alpha$  (*binding sites*), i a les subunitats  $\beta$  trobem el motiu tirosina quinasa que presenta un 84 % d'homologia entre els dos receptors (Czech, 1989; Ullrich i col., 1986; Stewart i Rotwein, 1996). Degut a la forta homologia entre la insulina i l'IGF-I, s'han trobat unions creuades entre ells i els seus receptors, de totes maneres, la insulina s'uneix amb major afinitat al seu receptor que al receptor IGFR-I, i viceversa (Cohick i Clemmons, 1993; Jones i Clemmons, 1995).



**Figura 1.5.-** Representació esquemàtica del receptor d'insulina o d'IGF-I. S-S indica la posició dels ponts disulfur. (Segons Stewart i Rotwein, 1996).

Fins ara, els estudis d'unió hormona receptor (estudis de *binding*) en peixos han posat de manifest, al contrari que en mamífers (Zorzano i col., 1988), que l'abundància dels receptors d'IGF-I (IGFR1) a la musculatura blanca en totes les espècies estudiades duplica al número dels receptors per a la insulina (Párrizas i col., 1995; Baños i col., 1997). Aquesta

observació es dona també en els estudis de *binding* realitzats a teixit adipós de la truita bruna (*Salmo trutta*) (Planas i col., 2000) i en cèl·lules miosatèl·lit de la truita irisada (Castillo i col., 2002).

En peixos, estudis realitzats durant les últimes dècades han mostrat que la regulació dels receptors IGFR1 o d'insulina (IR), varia en funció de l'estat nutricional de l'animal i els nivells plasmàtics d'hormona. Així doncs, tant injeccions d'arginina com l'administració de dietes que provoquen hiperinsulinèmia, provoquen increments en el número de receptors IR a la musculatura blanca (Gutiérrez i col., 1991; Párrizas i col., 1994) i en teixit adipós de la truita comú (Planas i col., 2000a). Per contra, l'administració de dietes que provocaven hiperinsulinèmia en carpa (*Carassius aurata*) i truita bruna (*Salmo trutta*), van resultar en una disminució en el número de receptors IR a la musculatura vermella (Baños i col., 1997). Baños i col. (1998) van descriure en la truita bruna (*Salmo trutta*), que la disminució en els nivells plasmàtics d'insulina durant el dejuni anava acompanyada d'una disminució en el número d'IRs en la musculatura blanca (*down regulation*).

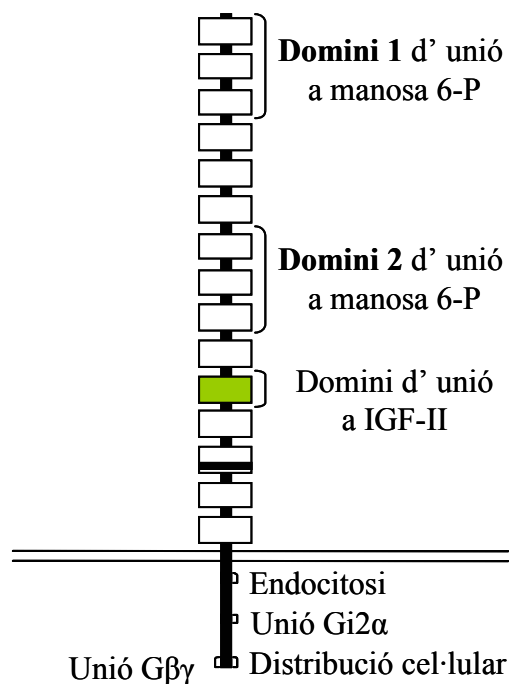
S'han descrit increments en el binding i en l'expressió de l'ARNm d'IGFR1 durant etapes de restricció alimentària en ratolí (Hernández i col., 1997). En peixos, fins ara, s'ha observat que el dejuni provoca disminucions en els nivells plasmàtics d'IGF-I en diverses espècies (Niu i col., 1993; Pérez-Sánchez i col., 1994; Baños i col., 1999; Gabillard i col., 2006, en premsa; Gómez-Requeni i col., 2005), però no hi ha informació disponible en quant a la regulació dels receptors d'IGFR1 durant el dejuni o la realimentació en orada.

Degut a la duplicació en el genoma dels salmònids, s'ha descrit l'existència de dues isoformes per al receptor IGFR1a (IGFR1a i IGR1b) en la truita irisada (*Onchorynchus mykiss*) (Green and Chen, 1999; Gabillard i col., 2003). De la mateixa manera també es va descriure l'existència de dues isoformes en el peix zebra (*Danio rerio*) (Maures et al., 2001).

S'ha descrit una regulació diferencial en l'expressió de les dues isoformes en funció de l'estat nutricional de l'animal. Mentre Chauvigné i col. (2003), van descriure increments en l'expressió de l'ARNm d'IGFR1a durant el dejuni en la truita irisada, altres treballs realitzats en la mateixa espècie no han trobat cap efecte del dejuni ni de la realimentació sobre l'expressió d'ambdues isoformes (Norbeck i col., 2005).

El receptor d'IGF-II o receptor independent de manosa 6 fosfat, consta d'una cadena glicoproteïca de 15 dominis extramembrana (Fig. 1.6). La part extracel·lular del receptor uneix lligands de diferent naturalesa, i la regió intracitoplasmàtica regula el moviment del receptor en els diferents compartiments cel·lulars. La seva funció principal és la de transportar enzims d'origen lisosomal a compartiments endosomals/prelisomals. Una altra funció és

regular el nivell de proteïnes que continguin motius de manosa 6 fosfat (Revisat per Stewart i Rotwein, 1996).



**Figura 1.6.** - Representació esquemàtica del receptor d'insulina o d'IGF-II (Segons Stewart i Rotwein, 1996).

Aquest receptor presenta diferents llocs d'unió clarament identificats i separats, igualment presenta un lloc d'unió per la molècula d'IGF-II en el segment repetit número 11, i dos llocs d'unió entre els segments 1 a 3 i 7 a 9 per la unió de proteïnes que contenen residus manosa-6-fosfat (Braulke et al., 1988; Tong et al., 1988).

El receptor d'IGF-II uneix IGF-II amb gran afinitat, també pot unir IGF-I amb menor afinitat, mentre que no uneix insulina (Massagué i col., 1982; Oshima et al., 1988; Dahms i col., 1989; Roth i col., 1988). Estudis en mamífers descriuen que les funcions del IGFR-II són el reciclatge del pèptid circulant i la regulació del creixement fetal (Kiess et al., 1987; Wang et al., 1994).

En mamífers, s'ha descrit que els efectes mitogènics de l'IGF-II es donen a través del receptor d'IGF-I (Adashi et al., 1990; Kiess et al., 1987; Liu et al., 1993; Hernández i col., 1997) o del receptor d'insulina (Louvi et al., 1997; Morrione et al., 1997). Igualment, diferents treballs han descrit que el receptor per a IGF-II no poseeix activitat tirosina-quinasa (Oshima i col., 1988; Dahms i col., 1989; Roth i col., 1988).

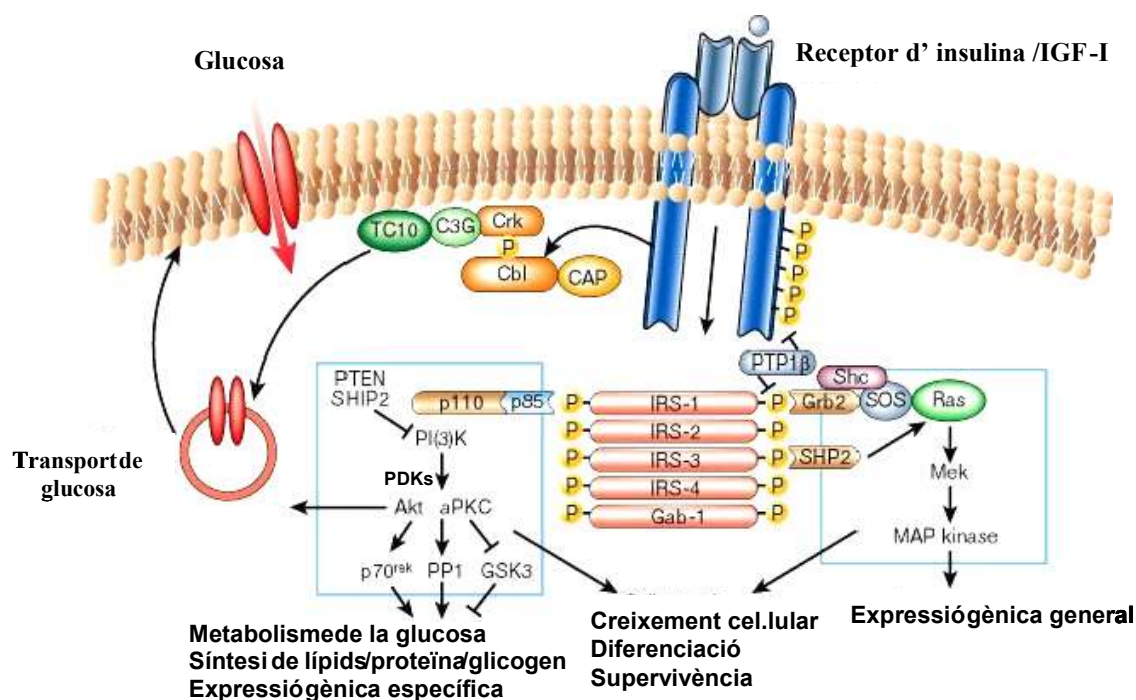
En peixos teleostis, fins ara, només s'ha demostrat l'existència del receptor IGFR-II en larves de truita comú 5 setmanes després de la fertilització (Méndez i col., 2001). En el citat treball, es va descriure la capacitat del receptor d'IGF-II d'unir IGF-II amb gran afinitat. El receptor caracteritzat per aquests autors també unia IGF-I mentre que, com passa en mamífers, no uneix insulina ni posseeix activitat tirosina-quinasa

### **1.3.1. – Vies de transducció de la senyal de la insulina i els IGFs.**

La unió del lligand, insulina o IGFs, al seu receptor dimèric comporta el reordenament de l'estructura quaternària del receptor, que resulta en l'autofosforilació dels residus específics del domini quinasa (Ullrich i Schlessinger, 1990). Després de la autofosforilació del receptor, té lloc la posterior fosforilació d'altres substrats intracel·lulars o segons missatgers (Figura 1.7). Un dels principals missatgers intracel·lulars que seran fosforil·lats per efecte de la insulina o l'IGF-I, és el substrat del receptor d'insulina o IRS (1-4), el qual indueix la formació de diversos complexos intracitoplasmàtics responsables de l'estimulació de diferents vies de senyalització (Baumann i Saltiel, 2001; Butler et al., 1998; Cheatham i Kahn, 1995).

La unió de l'IRS-1-4 al receptor d'insulina o d'IGF-I, es dona gràcies a un motiu conservat anomenat domini SH2 o domini homòleg a *src*, que comprèn una regió d'uns 100 aminoàcids, homòloga en seqüència a una part de l'oncogen cel·lular *c-src* (Butler et al., 1998; Cohen et al., 1995; Myers et al., 1994). S'han identificat i caracteritzat diferents proteïnes o molècules adaptadores en la via de senyalització de la insulina i de l'IGF-I, que contenen el domini SH2 (Myers et al., 1994; White i Kahn, 1994). L'adaptador Grb2, en associació amb la proteïna Sos (proteïna que intercanvia GTP per GDP en Ras), comporta l'activació del proto-oncogen p21 Ras. Ras, causa l'activació de la proteïna quinasa activadora de mitogènesi o MAPK, la qual indueix una gran varietat d'efectes biològics mitjançant la regulació de l'expressió de gens (Davis, 1994).





**Figura 1.7.-** Esquema de la cascada de senyalització a través dels receptors d'insulina o IGF-I. (Segons Baumann i Saltiel, 2001; Butler et al., 1998)

La proteïna MAPK pertany a la família de les ERK (extracellular signal-regulated kinases), que està formada per ERK1 i ERK2, també denominades p44 i p42 MAPK, amb pesos moleculars de 44 i 42 kDa, respectivament. El paper de la MAPK en la proliferació de cèl·lules musculars en cultiu, ha estat àmpliament descrit en els darrers anys en estudis en mamífers (Al-Kahalili i col., 2003, 2004). De la mateixa manera, Castillo i col. (2006) han descrit els efectes de la insulina i de l'IGF-I sobre l'activació de la p44p42MAPK en cèl·lules musculars de truita irisada durant estadis proliferatius.

Per altra banda, la unió de les subunitats p85 i p110 de la fosfatidilinositol-3-quinasa o PI3K a IRS genera fosfolípids que regulen el creixement cel·lular (Cantley i col., 1991) i també participen en l'activació de la via de les quinases depenents de 3-fosfatidilinositol (PDK1 i PDK2). PDK1 i PDK2 fosforil·len a Akt/PKB, que és una proteïna que un cop activada es transloca a la membrana cel·lular. Les dianes de l'Akt inclouen la glicogen sintasa quinasa 3(GSK), el transportador de glucosa sensible a la insulina GLUT4 (Baumann i Saltiel, 2001; Butler et al., 1998; Cheatham i Kahn, 1995; Kapeller i Cantley, 1994) i l'activació de l'enzim p70S6 quinasa, que ha estat àmpliament involucrat en el procés de la mitogènesi (Cheatham et al., 1995).

Existeixen diferents efectors de PI3K que semblen jugar un paper central en la translocació de GLUT4, estimulat per insulina en mamífers, que són tant l'Akt activa com les isoformes atípiques de la PKC, PKC- $\zeta$  i PKC- $\lambda$  (LeGood i col., 1998). De totes maneres, s'han descrit vies alternatives per a la translocació de GLUT4 per part del receptor IR, com la via iniciada pel proto-oncogen Cbl amb l'adaptador CAP (Baumann i col., 2000). En mamífers, diferents estudis han posat de manifest la implicació de PI3K en la translocació de GLUT4 en cèl·lules musculars (Pessin i Saltiel, 2000). De la mateixa manera, quan cèl·lules de la línia muscular L6 són tractades amb inhibidors específics de la via de la Akt com LY294002 i/o Wortmanina es produeix una disminució en la translocació de GLUT4 (Sonwar i col., 2001).

En peixos, Planas i col. (2000b), van clonar un transportador de glucosa homòleg al transportador GLUT4 de mamífer en el múscul esquelètic de la truita bruna (*Salmo trutta*), que van denominar btGLUT4. Posteriorment, Capilla i col. (2002) van observar que l'expressió de btGLUT4 en múscul vermell era regulada pels nivells plasmàtics d'insulina. Més recentment, Capilla i col. han clonat un transportador de glucosa en teixit adipós de salmó coho que van anomenar okGLUT4. Estudis de funcionalitat mitjançant injeccions de l'okGLUT4 en oòcits de granota (*Xenopus laevis*), han posat de manifest que el transport de glucosa mediatitzat per okGLUT4 és inhibit per citocalasina B, i també, que quan l'okGLUT4 és transfectat en adipòcits 3T3-L1, la insulina estimula la translocació del transportador a la membrana plasmàtica (Capilla, 2004).

En aquest context, en el nostre grup, Castillo i col. (2002) van observar que el transport de glucosa en cèl·lules musculars de truita irisada és estimulat per insulina i en major grau per IGF-I. De la mateixa manera, el transport de glucosa en cèl·lules musculars de truita irisada era inhibit per citocalasina B, wortamina i PD98059, suggerint doncs que en peixos, el transport de glucosa implica l'activació de les vies de la MAPK i de la PI3K, així com l'acció de GLUT4. Igualment, Albalat i col. (2005), van observar que el transport de glucosa en adipòcits aïllats de la truita irisada era estimulat per la insulina i inhibit per la citocalasina B.

Cal citar que en mamífers el receptor IGF-IR presenta una activitat antiapoptòtica, i que els dominis del receptor implicats en aquesta funció de supervivència cel·lular són diferents als implicats en les seves funcions diferenciadores (O'Connor i col. 1997). Aquesta capacitat ha estat demostrada en diferents sistemes cel·lulars com fibroblasts, cèl·lules neuronals i musculars (Rodríguez i col., 1992; Wu i col., 2004). La via de transducció implicada en la protecció contra l'apoptosis, consisteix en l'activació de la Akt/PKB quinasa i

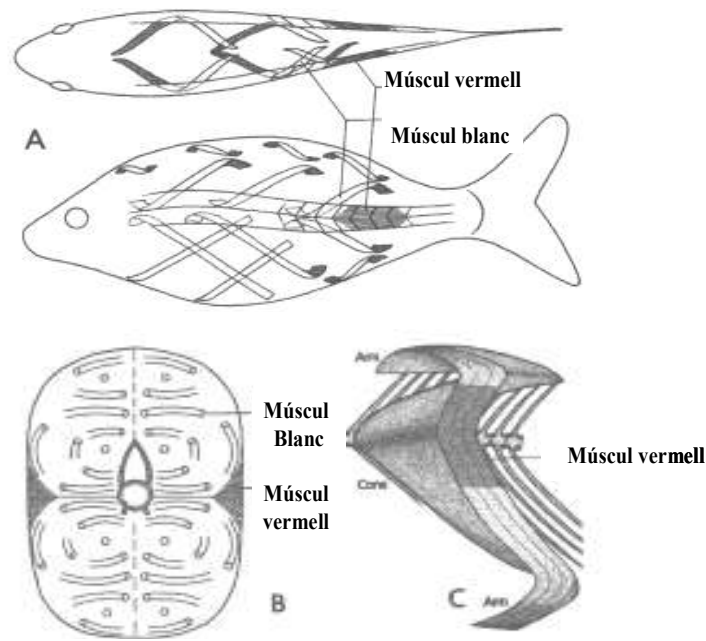
la subseqüent fosforil·lació i inactivació de Bad, un membre de la família de Bcl-2 (Datta i col., 1997). De manera alternativa, Párrizas i col (1997) van descriure que la via de la MAPK tenia un paper antiapoptòtic en la línia cel·lular P2.

## *2. CREIXEMENT SOMÀTIC*

### **2.1 El múscul esquelètic**

El múscul representa aproximadament un 65% de massa corporal en moltes espècies de salmònids (Revisat per Johnston, 2001). En mamífers, el creixement de les fibres musculars té lloc en tres estadis diferents al llarg de la vida de l'animal: durant l'organogènesi, el creixement prenatal i el creixement postnatal fins la maduresa (Revisat per Oksbjerg i col., 2004). En peixos, s'ha descrit que el creixement somàtic es dona com a resultat de la hiperplàsia (increment en el número de cèl·lules) i de la hipertròfia (increment en el tamany de les cèl·lules) (Rowerlson i Vegetti, 2001). En aquest context, s'ha descrit que els nuclis necessaris pel creixement muscular deriven d'un conjunt de cèl·lules biogèniques anomenades cèl·lules satèl·lit (Johnston, 2001). Estudis en mamífers, han posat de manifest que aquestes cèl·lules contribueixen al creixement post-natal, al manteniment del múscul esquelètic madur així com en la reparació de miofibres malmeses Revisat per Hawke i col. (2001).

En peixos, al contrari que en mamífers, el creixement hiperplàsic es continua produint fins arribada l'etapa juvenil, i disminueix amb l'edat i el tamany corporal, de fet, l'alternança dels processos d'hiperplàsia i d'hipertròfia es donen de manera continuada i no excloent durant tota la vida de l'animal (Alfei i col., 1994). Els peixos tenen cèl·lules musculars disposades en paral·lel i separades perpendicularment per tabics de teixit connectiu (mioseptes) que permeten la seva subjecció amb l'esquelet i la pell. Els segments musculars entre els mioseptes es denominen miòtoms. La musculatura blanca representa un 90% dels miòtoms en la majoria de les espècies, la seva contracció ràpida depèn d'un metabolisme anaeròbic, i és aquesta musculatura la que és responsable dels moviments bruscos i súbits. Per contra, la musculatura vermella, està formada per fibres de contracció lenta que contenen un elevat percentatge de mitocondris (20-50%) i capil·lars (Revisat per Johnston, 2001). En la figura 2.1 es mostra l'estructura del miòtom.



---

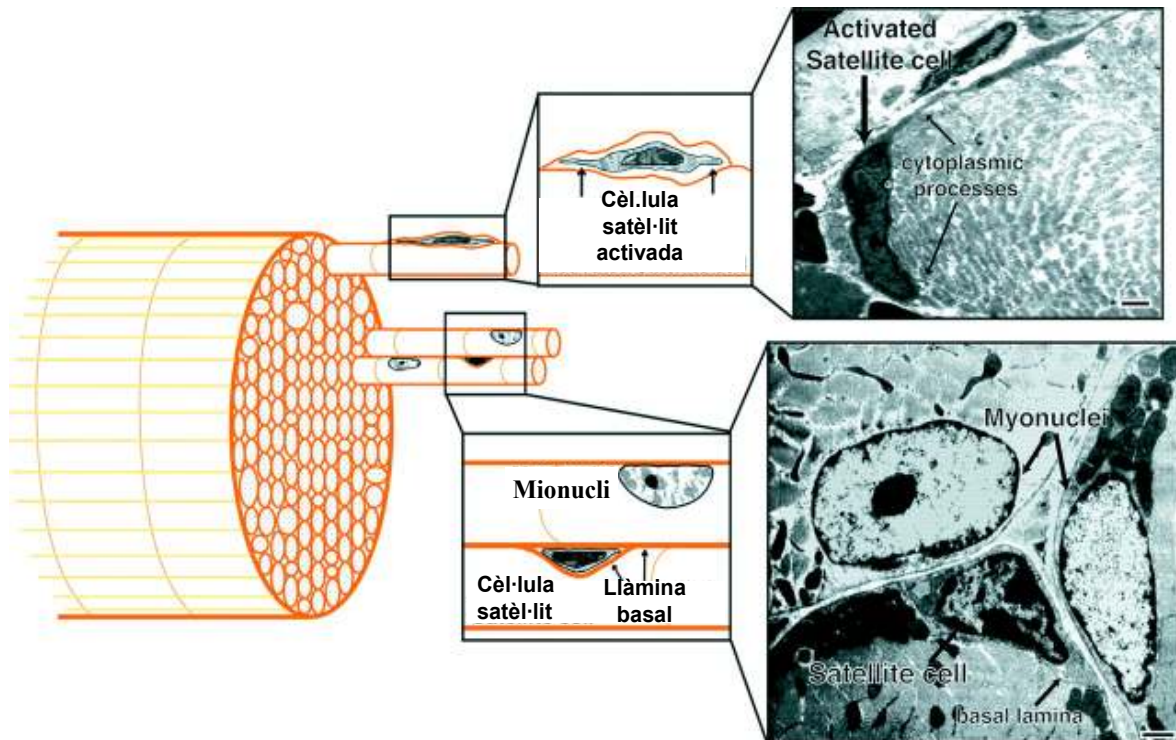
**Figura 2.1.**- Estructura muscular del miòtom d'un peix teleostí. Model d' estructura muscular del miòtom d'un peix teleostí (A) vista dorsal i lateral; (B), vista transversal ( C ) (modificat de Sängner y Stoiber, 2001).

---

## 2.1 Cèl·lules satèl·lit.

Les cèl·lules satèl·lit reben el seu nom degut a la disposició anatòmica que ocupen en la perifèria del miotub madur (Dhawan i col., 2005). Es caracteritzen per presentar pocs orgànuls i un tamany nuclear petit amb elevat contingut d'heterocromatina (Schultz i col., 1994). Aquestes característiques morfològiques són degudes a que aquesta població de cèl·lules és relativament quiescent, i metabòlicament i transcripcionalment menys activa. Aquests paràmetres morfològics han estat utilitzats per a la identificació *in situ* d'aquesta població cel·lular en mamífers (Mauro i col., 1961). En peixos s'ha descrit l'existència de cèl·lules satèl·lit *in situ* en diferents espècies (Nag i Nursall, 1972; Krivy i Eide, 1977; Willemsse i Van den Berg, 1978; O' Connell, 1981; Aktser i col., 1983). Estudis en la carpa (*Carassius aurata*) han determinat que el número total de cèl·lules satèl·lit oscil·la entre  $10^3$  i  $10^7$  per gram de múscul (Koumans i col., 1991).

En mamífers, les cèl·lules satèl·lit es situen a prop del nucli de les miofibres (en seccions transversals), mentre que en peixos, aquestes, se situen en els ànguls del polígon format per les fibres musculars en les seccions transversals (Willemse i Van den Berg, 1978; Romanello i col., 1987; Koumans i col., 1991). En la figura 2.2 es mostra la disposició d'aquestes cèl·lules en el múscul esquelètic adult de ratolí (Revisat per Hawke i col., 2001).



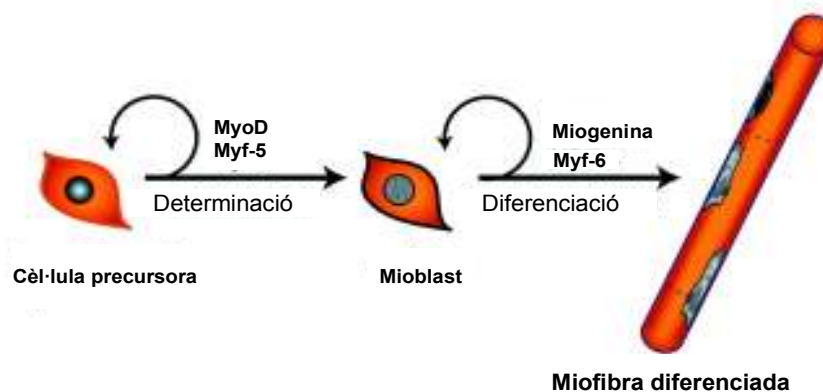
**Figura 2.2.-** Les cèl·lules satèl·lit ocupen una posició sublamina en el múscul esquelètic adult. Es poden distingir degut al seu micronucli i una major quantitat d'heterocromatina. Els processos citoplasmàtics permeten la quimiotaxis de la cèl·lula satèl·lit al llarg de la fibra (Esquema modificat d' Hawke i col., 2001).

### **2.1.2 Control gènic de l'activació, proliferació i diferenciació de les cèl·lules satèl·lit musculars.**

L'activació de les cèl·lules satèl·lit és un procés que depèn de diferents factors. El més important es dona quan les cèl·lules quiescents reben tota una sèrie de senyals activadores que permeten la transició de l'estat G0 a l'estat G1. Un cop les cèl·lules satèl·lit inicien el seu primer cicle, entren en un estat altament proliferatiu que dona lloc posteriorment a l'"estat mioblast". L'estat mioblast, és doncs, un estat indiferenciat de la cèl·lula progenitora que esdevindrà en un futur miogènica degut a la diferenciació i a la fusió final amb altres mioblasts (Dhawan i col., 2005).

Els mioblasts fusionen amb altres mioblasts adjacents per formar miotubs sincitials, que es diferenciaran a miofibres a mesura que expressin un repertori de gens musculars específics (Revisat per Oksbjerg i col., 2004).

Durant el desenvolupament embrionari en peixos, s'ha demostrat que els membres de la família MRF ("myogenic regulatory factors") juguen un paper fonamental en la diferenciació de cèl·lules d'origen mesodèrmic a cèl·lules de llinatge muscular. Els MRFs constitueixen part d'una gran família que inclou entre d'altres factors: MyoD, miogenina, myf5 i MRF4 (Revisat per Rescan, 2001). Aquests factors de transcripció, amb estructura hèlix-volta-hèlix, formen heterodímers amb altres factors de la família gènica E2, unint-se així a seqüències *consensus* de DNA, anomenades caixa E (E-Box), que estan presents en gens específics de la musculatura. De fet, quan aquests factors són expressats ectòpicament, es caracteritzen per convertir un gran varietat de tipus cel·lulars a cèl·lules del llinatge muscular (Edmonson i Olson, 1993). En peixos, com en mamífers, tant myoD com myf-5 són requerits per a la determinació miogènica, mentre que la miogenina i myf-6, estan involucrats en la diferenciació cel·lular (Revisat per Johnston, 2001). A la figura 2.3 es mostren esquemàticament els processos miogènics.



**Figura 2.3.-** Paper dels MRFs en la determinació i diferenciació de cèl·lules satèl·lit (Esquema modificat d' Hawke i col., 2001).

Rescan i Gauvry (1996), van identificar dos gens per a MyoD en la truita irisada, procedents de la duplicació gènica que va tenir lloc durant la tetraploidització dels salmònids. Posteriorment, Delalande i Rescan (1999), van mostrar els patrons diferencials d'expressió per aquests gens durant el desenvolupament muscular de la truita irisada (*Onchorynchus mykiss*). Estudis en peix zebra (*Danio rerio*) i en orada (*Sparus aurata*), han identificat un únic gen per a MyoD (Watabe i col., 2001; Tan i Du, 2002). Per una altra banda, Brodeur i col. (2002), van descriure que la ingesta, el fotoperíode i la temperatura produeixen un increment en l'expressió de MyoD en la musculatura de *Harpagifer bispinis*. Tot i que un gran nombre d'estudis en mamífer, mitjançant l'ús de transgènics, ha demostrat el paper dels MRFs durant el desenvolupament, encara es desconeix el paper funcional d'aquests factors en el creixement post-natal (Revisat per Hawke i col., 2001).

En mamífers s'ha descrit que l'activació de MyoD i de myf-5 indueixen l'expressió de miogenina i factors de transcripció de la família MEF-2 (factors potenciadors específics de miòcits 2). L'expressió de miogenina ha estat estudiada al llarg del desenvolupament de la truita irisada i del peix zebra (*Danio rerio*) (Delalande i Rescan, 1999; Amali i col., 2005).

Més recentment, Johansen i Overturf (2005) han relacionat l'expressió de miogenina i de MEF2 amb la hipertròfia muscular a la truita irisada (*Onchorynchus mykiss*). Tanmateix, Chauvigné i col. (2003), en truita irisada, van descriure que durant la realimentació es produïen increments en l'expressió de l'ARNm de miogenina i de l'ARNm d'IGF-I hepàtic i

muscular, suggerint doncs, tal i com s'ha descrit en mamífers, que els IGFs són potents activadors de la miogènesis (Florini i col., 1991).

Hi ha altres factors extrínsecs que regulen l'activació de les cèl·lules satèl·lit; així doncs, en peixos, Johnston i col. (2001) han demostrat que l'expressió de c-met (receptor del factor de creixement de l'hepatòcit-HGF), és un bon indicador per a la detecció de cèl·lules satèl·lit *in situ*. Altres senyals extrínseques comparables a la via HGF-c-met, és la descrita en mamífers per part dels factors de creixement tipus fibroblast (FGFs). Estudis en mamífers descriuen un paper important per a FGF2 en l'activació de cèl·lules satèl·lit (Watt i col., 1998), tanmateix l'expressió de diferents membres de la família dels FGFs es produeix després de que es produeixi dany tissular (Revisat per Hawke i col., 2001). En peixos, Rescan (1998) va descriure que l'expressió de FGF6 és constitutiva, i que aquest factor de creixement participa en el fenomen de la hiperplàsia muscular al llarg de la vida post-larvària de la truita irisada. De la mateixa manera, Santos-Ruiz i col., (2001), van descriure que els receptors de FGF1, 2, 3 i 4, tenen un paper clau en la regeneració i la diferenciació muscular del peix zebra (*Danio rerio*).

Un altre gen important en el procés de la miogènesis és la miostatina. Aquest gen és un membre de la superfamília dels factors de creixement transformadors tipus  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Les funcions biològiques d'aquests pèptids extracel·lulars són àmplies, ja que poden activar o inhibir el creixement i la diferenciació cel·lular depenent del tipus cel·lular i l'estat de diferenciació. S'ha descrit que la miostatina bloqueja la proliferació dels mioblasts durant la fase G1-G2 iniciant específicament la seva diferenciació (Thomas i col., 2000). En mamífers l'expressió de miostatina és exclusivament muscular (MacPherron i col., 1997), mentre que en peixos s'ha descrit un perfil d'expressió ubíqua per a aquest gen en diferents espècies de teleostis (Rodgers i col., 2001; Roberts i Goetz, 2001; Maccatrozzo i col., 2001, a, b).

En peix zebra (*Danio rerio*), Xu i col. (2001) van observar que animals transgènics per a miostatina mostraven un increment del 10% en el número de miofibres. Altres estudis en la mateixa espècie han observat increments en el creixement muscular mitjançant injeccions de RNA de miostatina en embrions (Amali i col., 2004; Acosta i col., 2005).

Fins ara, la miostatina ha estat clonada en diferents espècies (Rodgeri Weber, 2001; Rodgers i col., 2001; Roberts i Goetz, 2001; Maccatrozzo i col., 2001, a, b; Ostbye i col., 2001; Rescan i col., 2001; Radaelli i col., 2003). En la tilàpia (*Oreochromis mossambicus*) i en peix zebra (*Danio rerio*) l'expressió de miostatina depèn d'un únic al·lel (miostatina 1) (Rodgers i col., 2002). Per contra, en els salmònids i l'orada, s'ha descrit l'expressió més limitada i específica de miostatina 2 (Ostbye i col., 2001; Rescan i col., 2001; Robertz i Goetz,



2001; Maccatrozzo i col., 2001). Els treballs esmentats, però, suggereixen que la miostatina de la tilàpia i salmònids presenta un perfil d'expressió similar al de la miostatina de mamífers (Rodgers i col., 2002). Hi ha poques dades de la seva funció, i fins ara, s'ha descrit que el dejuni a curt termini disminueix l'expressió de miostatina en larves de tilàpia (Rodgers i col., 2001).

Tal i com s'ha descrit en el bloc 1, els IGFs tenen un paper molt important a l'hora de regular el creixement en diferents tipus cel·lulars. En mamífers, s'ha descrit que tant l'IGF-I con l'IGF-II, estimulen la proliferació de les cèl·lules musculars *in vitro* (Allen i col., 1989; LeRoith i col., 1992; Vierck i col., 2000). En peixos la bibliografia en quant als mecanismes d'acció dels IGFs en cèl·lules musculars són escassos. En aquest context, Pitkäen i col. (2000) van observar un increment en la hiperplàsia muscular en salmó àrtic (*Salvelinus alpinus*) transgènic per a GH, indicant que els IGFs estimulaven la proliferació muscular *in vivo*. L'evidència més clara de l'efecte de la insulina i de l'IGF-I sobre la proliferació de cèl·lules musculars, s'ha descrit recentment en el nostre grup per Castillo i col. (2004) en cèl·lules miosatèl·lit de truita irisada.

La desmina és una proteïna específica de la musculatura i una subunitat constitutiva dels filaments intermedis en el múscul esquelètic, cardíac i vascular. També és un marcador de la miogènesis en el múscul esquelètic (Loh i col., 2001). En mamífers, durant la miogènesis, s'ha descrit que la seva síntesis s'inicia un cop els mioblasts comencen a fusionar-se (Gard i col., 1980). Rowerlson i col. (1997), van descriure en l'orada, que la desmina es presentava de forma abundant i amb una distribució difosa durant la diferenciació terminal dels mioblasts, i que després, a mesura que la fibra muscular es constitueix, l'expressió disminueix i la seva localització varia. L'expressió de desmina s'ha detectat en mioblasts post-mitòtics de carpa comú (*Carassius aurata*) i en cèl·lules musculars de la truita irisada, (Koumans i col., 1990; Greenlee i col., 1995, respectivament), així com en el desenvolupament embrionari de peix zebra (*Danio rerio*) (Costa i col., 2002). Aquests estudis doncs, han demostrat que la desmina és un bon indicador de les fases finals de la formació de les fibres musculars en peixos.

### *3. CREIXEMENT COMPENSATORI*

El creixement compensatori és un fenomen mitjançant el qual els organismes creixen més ràpid durant la recuperació d'un període de dejuni que durant exposicions constants a l'aliment (Gurney i col., 2004). Degut a que els peixos presenten patrons de creixement indeterminats (Revisat per Ali i col., 2003), així com una forta supervivència a llargs períodes de dejuni durant el cicles normals de vida (Revisat per Navarro i col., 1995), aquest fenomen ha estat estudiat en diferents espècies de teleostis.

El creixement compensatori també s'ha descrit en mamífers, ocells i fins i tot, en animals invertebrats (Sibly i col., 1986; Wilson i Ousbourn i col., 1960). El creixement compensatori representa grans avantatges econòmiques en Aqüicultura, ja que es poden dissenyar protocols alimentaris específics que assegurin una acceleració en el creixement disminuint considerablement els costos (Hayward i col., 1997).

#### **3.1 El dejuni**

##### **3.1.1 Mobilització de les reserves energètiques**

En moltes espècies de peixos un període de restricció alimentària forma part del seu cicle natural de vida. Els efectes del dejuni sobre el metabolisme depenen de l'espècie, també i de les rutes metabòliques utilitzades per a la mobilització de les reserves acumulades (Revisat per Navarro i Gutiérrez, 1995). Durant el dejuni s'assoleix un metabolisme de manteniment degut a l'increment en la mobilització de glúcids, de lípids i d'aminoàcids presents en les reserves corporals (MacKenzie i col., 1998).

Un gran número d'estudis en peixos han posat de manifest, tal i com s'ha descrit en el bloc I d'aquesta introducció, que el dejuni provoca una disminució en els nivells circulants d'insulina i d'IGF-I. També es produeixen diferents respostes en els seus receptors. Així doncs, les disminucions en els nivells plasmàtics d'insulina, afavoreixen la mobilització de la glucosa mitjançant la mobilització del glicogen hepàtic i muscular. De la mateixa manera, degut a que durant el dejuni hi ha una desensibilització hepàtica als nivells circulants de la GH per la caiguda dràstica en el número de RGHs en el fetge (Pérez-Sánchez i LeBail, 1999), el elevats nivells circulants de GH promouen la lipòlisi (Harmon i Sheriddan, 1992).

Durant períodes curts de dejuni, el manteniment de la glicèmia està directament relacionat amb la capacitat de mobilitzar el glicogen hepàtic, posteriorment, a mesura que incrementa el temps de dejuni, s'activa la gluconeogenesis hepàtica (Higuera i Cardenas,

1984), donant-se una reducció en la utilització de glucosa (Moon i Foster, 1995). En la majoria de les espècies estudiades, el glicogen hepàtic es mobilitza ràpidament durant el dejuni, però el grau de mobilització varia enormement entre espècies (Revisat per Navarro i Gutiérrez, 1995). Fins ara, estudis en diferents espècies han posat de manifest que es produeixen disminucions en el contingut de glicogen hepàtic durant el dejuni (Figueiredo-Garutti i col., 2002; Power i col., 2000; Metón i col., 2003; Grigorakis i col., 2005). Igualment, la disminució en el percentatge de lípids durant el dejuni depèn de l'espècie estudiada i del teixit analitzat (Revisat per Navarro i Gutiérrez, 1995). Diferents estudis en la truita irisada i en l'orada, han posat de manifest aquestes observacions tant en el múscul com en el fetge (Milne i col., 1979; Power i col., 2000; Grigorakis i col., 2005). Més recentment, en el nostre grup, Albalat i col. (2005) han descrit que el dejuni provoca increments en la lipòlisi en adipòcits aïllats de truita irisada i d'orada, i que aquesta activació de la lipòlisi és acompanyada de disminucions en els nivells circulants d'insulina d'aquests animals.

### **3.1.2 Creixement compensatori**

Així doncs, mentre que les respostes endocrines i metabòliques durant el dejuni han estat àmpliament examinades en peixos, la resposta de tots aquests paràmetres durant el creixement compensatori és encara força desconeguda. Fins el moment el fenomen del creixement compensatori ha estat estudiat en espècies d'aigües temperades (13 espècies de ciprínids) i d'aigua freda (6 espècies de salmònids). Aquests estudis han descrit una varietat de respostes fisiològiques, tals com l'increment en la eficiència de conversió de l'aliment i en les taxes de creixement (Jobling i col., 1989; Russell i Wootton, 1992; Hayward i col., 1997; Qian i col., 2000; Gaylord i col., 2001; Maclean i Metcalfe, 2001; Revisat per Ali i col., 2003; Zhu i col., 2001, 2004). En quant a les espècies marines, només s'ha descrit el fenomen del creixement compensatori en espàrids (Rueda i col., 1998; Eroldoğan i col., 2006) i serrànids (Picha i col., 2006).

Tots aquests estudis, en general, han descrit diferents graus de compensació en el creixement en funció del pes i les taxes de creixement, quan es comparaven els grups experimentals (animals dejunats i posteriorment realimentats) amb els grups control (grups contínuament alimentats). Tot i la recerca intensiva durant les últimes dues dècades sobre el creixement compensatori, només trobem un estudi que evalua canvis en el sistema GH-IGF-I durant el procés d'acceleració del creixement en la perca híbrida (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) (Picha i col., 2006).

De la mateixa manera, diferents estudis en peixos, han posat de manifest el paper d'alguns factors musculars i hepàtics durant la realimentació. D'aquesta manera, tal i com hem descrit en el bloc 1 de la introducció, s'ha observat una recuperació en l'expressió de l'ARNm d'IGF-I en fetge després del dejuni en diferents espècies de peixos, així com una recuperació en l'expressió de l'ARNm del IGF-I muscular i en els seus receptors (isoformes a i b). D'altra banda, l'expressió de l'ARNm de la miogenina sembla estar relacionada amb l'expressió d'IGF-I durant la realimentació, afavorint així el creixement després del dejuni (Chauvigné i col., 2003). Altres estudis també han posat de manifest el paper de la miostatina com a regulador negatiu del creixement muscular en peixos (Rodgers i col., 2002; Terova i col., 2005). Així doncs, durant la realimentació sembla ser que l'expressió de la miostatina muscular disminueix en aquells grups d'animals que presenten acceleracions en el creixement.

Tots aquests estudis revelen el paper d'aquests factors durant la realimentació i suggereixen la seva possible implicació en l'acceleració del creixement durant el procés del creixement compensatori. Tenint en compte que l'IGF-I ha estat considerat un bon indicador de creixement instantani en peixos (Uchida i col., 2003), resulta evident apuntar a una funció central del sistema GH-IGF-I en el fenomen del creixement compensatori.

---

# **OBJECTIUS**



## OBJECTIUS

1. Establir els períodes efectius de dejuni i realimentació en truita irisada (*Onchorynchus mykiss*) i orada (*Sparus aurata*) per induir el creixement compensatori.
2. Estudiar i analitzar el paper de la insulina i els factors de creixement tipus insulina (IGFs) i els seus receptors, en el creixement compensatori de truita i d'orada.
3. Estudiar els efectes del creixement compensatori en la mobilització de les reserves principals de lípids i glicògen en l'orada.
4. Estudiar i analitzar el paper dels factors miogènics durant el creixement compensatori en la truita irisada.
5. Analitzar l'expressió dels receptors de GH (GHR1 i GHR2) així com dels IGFs tant en múscul blanc com en el fetge, durant el dejuni i la realimentació en la truita irisada.
6. Posar a punt el cultiu de cèl·lules miosatèl·lit a partir de múscul blanc d'orada com a model d'estudi sobre la regulació del creixement i el metabolisme.
7. Caracteritzar els receptors d' IGF-I en el cultiu primari de les cèl·lules musculars d'orada i estudiar l'evolució del seu número i propietats durant el seu desenvolupament *in vitro*.
8. Determinar la funció de la insulina i dels IGFs en la captació de glucosa i alanina en les cèl·lules musculars d'orada.
9. Determinar i estudiar la presència de substrats intracel·lulars (MAPK, PI3K/Akt), implicats en la transducció de la senyals dels receptors d' insulina i d' IGF-I.





---

# **RESULTATS**

