

49  
21



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

## “Catabolismo de proteínas en músculo”

Trabajo monográfico de actualización  
que para obtener el título de  
Química Farmacéutica Bióloga  
p r e s e n t a:  
Elena Kostoglodova Ustinova



México, D.F.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

**Presidente:** Prof. HOMERO HERNANDEZ MONTES  
**Vocal:** Prof. REBECCA E. FRANCO Y BOURLAND  
**Secretario:** Prof. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ  
**1er suplente:** Prof. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMIREZ  
**2do suplente:** Prof. CARMEN GIRAL BARNES

**Sitio donde se desarrolló el tema:** diferentes bibliotecas

**Asesor:** HOMERO HERNANDEZ MONTES



---

**Sustentante:** ELENA KOSTOGLODOVA USTINOVA



---

*Посвящаю эту работу:*

*Моим дорогим бабушке Фене, дедушке Славе,  
бабушке Вере и дедушке Вени.*

*Спасибо вам, мои любимые, за мудрые советы и  
поддержку, за варенья и соленья, которые в совокупности  
помогли мне вырасти, поумнеть, выучиться и написать  
этот диплом.*

***Agradecimientos:***

***A mi asesor Dr. Homero Hernández Montes por su  
paciencia, apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.***

***A mis padres.***

***A mis maestros.***

***A mis amigos.***

***A mi Chibuyin por su amor, comprensión y apoyo.***

## Índice.

### 1. Introducción.

### 2. Catabolismo de proteínas.

#### 2.1. Enzimas que participan en el catabolismo de las proteínas

2.1.1. Proteasas lisosomales.

2.1.2. Proteasas citoplasmáticas

2.1.3. Proteasas plasmáticas membranales.

2.2. Significado de la vida media de la degradación de proteínas.

2.3. Características de las proteínas "destinadas para la degradación".

2.4. "Marcaje" de proteínas para su degradación.

### 3. Particularidades del catabolismo de las proteínas en el músculo.

3.1. Proteólisis lisosomal.

3.2. Proteólisis no lisosomal dependiente de  $Ca^{2+}$ .

3.3. Proteólisis no lisosomal.

3.4. Proteólisis en el músculo

### 4. Regulación del intercambio proteico en el músculo.

4.1. Influencia de la insulina.

4.2. Influencia de combinación insulina-triyodotironina.

4.3. Influencia de los glucocorticoides.

4.4. Influencia de los aminoácidos.

4.5. Influencia del glucagón.

4.6. Influencia de las catecolaminas.

4.7. Participación del  $Ca^{2+}$ .

4.8. Participación de otras sustancias.

### 5. Efecto de diversos factores sobre el intercambio proteico en el músculo.

5.1. Efecto de los factores físicos, el ejercicio.

5.2. Efecto de la diabetes y el ayuno.

5.3. Efecto de la dieta deficiente en proteínas.

5.4. Efecto del embarazo y la lactancia.

5.5. Efecto de otros factores.

### 6. Conclusiones.

### 7. Apéndice. Generalidades sobre los métodos utilizados para la medición de las velocidades de la degradación proteica.

## 1. Introducción.

El músculo es la mayor reserva proteica del organismo por el hecho de representar el 40% del peso corporal. Los músculos pueden ser una fuente muy importante de aminoácidos en caso de la falta de estos, debido a los procesos catabólicos.

Los músculos se dividen generalmente en tres tipos: esquelético, cardiaco y liso, a pesar de que el último grupo no representa una categoría uniforme.

El músculo esquelético representa el mayor porcentaje de la masa de la musculatura somática, tiene estrías transversales bien desarrolladas, se contrae normalmente solo en presencia de estímulos nerviosos que obedecen a voluntad y carece de conexiones anatómicas y funcionales entre las fibras individuales. A diferencia del músculo esquelético, el músculo cardiaco se contrae rítmicamente debido a la presencia en el miocardio de células marcapaso. El músculo liso carece de estrías transversales, se encuentra en la mayor parte en el tracto gastrointestinal y contiene marcapasos que se descargan irregularmente. (7)

Debido a que el músculo esquelético representa aproximadamente un 40% de la masa corporal y que puede constituir la mayor reserva de proteínas del organismo, es el tejido de mayor interés para el presente trabajo.

La mayoría de los músculos esqueléticos comienzan y terminan en tendones. Las fibras musculares están dispuestas en paralelo entre los extremos tendinosos. Cada fibra muscular esta constituida por una sola célula con varios núcleos, es cilíndrica, alargada y está rodeada por una membrana celular llamada sarcolema.(48)

Las fibras musculares están construidas por fibrillas y se dividen en filamentos individuales constituidos por proteínas. Las miofibrillas están divididas en sarcómeros por las zonas oscuras, las líneas Z. Cada sarcómero está constituido por filamentos gruesos y delgados, espaciados regularmente. (47, 48)

Los filamentos gruesos que pueden deslizarse a lo largo de los filamentos delgados están constituidos por haces de una proteína, la miosina. Cada molécula de miosina posee dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$ -helicoidales, retorcidas entre sí. Uno de los extremos adopta una estructura globular, la cabeza, que puede hidrolizar el ATP. (47, 48)

Los filamentos delgados contienen actina, tropomiosina y troponina. Cada filamento delgado está constituido por dos hebras de actina F enrolladas una alrededor de otra y cada hebra es un rosario de moléculas de actina G globular. El proceso de contracción está controlado por la troponina, que se halla unida al filamento de actina a ciertos intervalos. (47, 48)

Por lo dicho anteriormente, el mecanismo contráctil del músculo esquelético depende principalmente de las siguientes proteínas: la miosina (peso molecular 460,000), la actina (peso molecular 43,000), la tropomiosina (peso molecular 70,000) y la troponina, que está formada por tres subunidades: la troponina I, la troponina T, la troponina C ( de pesos moleculares de 18,000 a 35,000). (7, 41, 47, 48)

Las proteínas del músculo (cuya mayor parte constituyen las proteínas contráctiles) tienen que ser renovadas periódicamente para mantener su funcionalidad y la funcionalidad adecuada del músculo.(8)

En condiciones fisiológicas normales el metabolismo de proteínas en el músculo contribuye a la homeostasis y por tanto la velocidad del catabolismo de proteínas del músculo es igual a la de la síntesis (8)

Existen casos cuando la ingesta de aminoácidos al organismo es inadecuada (ayuno, dietas deficientes en proteínas, etc.) o cuando el organismo requiere un exceso de aminoácidos para desempeñar algunas funciones (embarazo y lactancia), que el metabolismo de las proteínas se puede modificar. Ya que el músculo puede ser una reserva importante de proteínas corporales, un aumento en el catabolismo de proteínas musculares podría proporcionar la cantidad necesaria de aminoácidos para cubrir las demandas en los casos antes mencionados (14). Este ejemplo muestra la importancia del equilibrio que debe conservar el catabolismo y la síntesis de las proteínas.

Los siguientes ejemplos destacan la participación del catabolismo de las proteínas en el organismo:

La remoción de proteínas anormales que se producen como resultado de mutaciones, errores en la expresión de genes, la desnaturalización o su modificación química se vuelve de suma importancia en caso de que se trate de células en el crecimiento (por ejemplo en los tejidos de mamíferos) (9, 22).

El intercambio proteico continuo puede incrementar considerablemente la capacidad del organismo para su adaptación a los cambios del medio ambiente. Tomando en cuenta que estos intercambios suceden tanto en toda la población, como en un organismo, las características de la población tienden a evolucionar. Schunke y

colaboradores confirman que conforme más rápido es degradada una enzima, más fuertemente puede cambiar su concentración intracelular como respuesta al estímulo hormonal, a la influencia nutricional, etc. (9, 22)

La degradación proteica tiene también otra función importante para ayudar al organismo a sobrevivir en los tiempos desfavorables para este. En todos los organismos las proteínas celulares constituyen el mayor reservorio de energía, el cual puede movilizarse en el momento de una ingesta deficiente de calorías. De esa manera en los mamíferos las reservas proteicas del hígado y del músculo proveen de los aminoácidos, que son oxidados directamente para obtener energía o pueden ser convertidos en glucosa. (9, 22)

Debido a la importancia del catabolismo de proteínas en el organismo en general, como en el músculo en particular, este tema será tratado en el presente trabajo, cuyo propósito además de la investigación detallada acerca de las enzimas y factores que participan en el catabolismo proteico, será señalar la influencia del ejercicio, el ayuno, el tipo de dieta, el embarazo, la lactancia y otros factores fisiológicos sobre el catabolismo de las proteínas en el músculo.

En este tipo de situaciones el metabolismo normal en el músculo se ve afectado y en la mayoría de los casos el catabolismo de las proteínas musculares está aumentado. Por ejemplo, en los estudios en ratas lactantes parece ser necesario un aumento en la degradación proteica del músculo como aporte de aminoácidos, ya que el contenido de aminoácidos en el organismo, aun con una alimentación adecuada, es insuficiente para el desarrollo correcto de la lactancia.(14, 19)

Algunos de estos resultados se pueden extrapolar a los humanos para entender la importancia del catabolismo de proteínas en el músculo. Otras situaciones estudiadas en la rata como son el efecto del ayuno, la influencia de dietas deficientes en proteínas, etc. vistas en función de influencia al catabolismo proteico, toman otro enfoque e importancia aplicando a los humanos.(27, 28)

## 2. Catabolismo de proteínas.

### 2.1. Enzimas que participan en el catabolismo de las proteínas.

Las enzimas proteolíticas se clasifican de acuerdo al aminoácido funcional de sus sitios activos en: serina-, cisteína-, aspartato-, o bien si requiere un metal, metaloproteasas. En general las proteasas lisosomales son del grupo de la cisteína- y del aspartato-; las proteasas citoplasmáticas (calpains y proteasas dependientes de ATP) son del grupo de la cisteína; las proteasas unidas a la membrana son frecuentemente metalo- o serina-proteasas. en el grupo de proteasas de acción extracelular predominan las proteasas de serina (tripsina, proteasas sanguíneas), sin embargo también existen en este grupo metaloproteasas (colagenasas) y aspartoproteasas (pepsina).(2)

#### 2.1.1. Proteasas lisosomales.

Las proteasas lisosomales son bioquímicamente las mejor caracterizadas de las proteasas de las células de los mamíferos. Son enzimas relativamente pequeñas (P.M. 24,000 - 30,000) que están presentes prácticamente en todas las células de los mamíferos, excepto en los glóbulos rojos. Se han aislado de las células de los mamíferos algunos inhibidores de proteasas lisosomales de cisteína. Estos inhibidores denominados cistatinas, son una familia de proteínas de peso molecular entre 11,000 y 13,000 daltones que tienen como función el control de la proteólisis por las catepsinas. (2, 11)

La catepsina B ha sido aislada de algunas especies y tejidos. Es una cistein-proteasa con peso molecular de 25,000; su pH óptimo es de 5. Esta enzima es frecuentemente ensayada con benzoil-Arg-2-naftilamida y mas recientemente con benziloxycarbonil-Arg-Arg-metilcumarina como sustrato. La catepsina B puede actuar como endopeptidasa o como exopeptidasa (peptidildipeptidasa) y su acción parece depender del sustrato. Por ejemplo, el glucagon y la fructosa 1,6-difostato aldolasa son buenos sustratos para la acción peptidil-dipeptidasa (los dipeptidos son removidos a partir del carboxilo terminal del sustrato) de la enzima, mientras que la hemoglobina desnaturalizada, la protefna miofibrilar y la insulina B pueden ser degradadas por la acción endoproteolítica de la catepsina B. (2, 46, 54)

La catepsina H (también una cistein-proteasa) es una glucoproteína con actividades de endo- y exopeptidasa (frecuentemente se refiere como endoaminopeptidasa), de peso molecular 24,000 y pH óptimo de 5. La catepsina H hidroliza benzoil-Arg-2-naftilamida así como la Leu- o Arg-metilcumarilamida. Es inhibida por la leupeptina en concentraciones muy altas (que es fuera de lo común para proteasas lisosomales), mientras que otras cisteinproteasas lisosomales conocidas son inhibidas por las concentraciones muy bajas de leupeptina. (2, 54)

La catepsina L es una cistein-proteasa de peso molecular de 28,000 y pH óptimo de 5, actúa como una endopeptidasa y es una de las mas activas enzimas lisosomales. La glucosilación de esta enzima es indispensable para su actividad. La catepsina L hidroliza protefnas como caseína o caseínas modificadas como la azocaseína y algunos sustratos

sintéticos como la carbobenzoxi-Phe-Arg-metilumarina. Se ha dificultado su purificación a partir de diferentes tejidos, pero hay métodos descritos para el aislamiento de esta enzima a partir de diferentes tejidos de varias especies. Esta proteasa está implicada en algunas patologías como glomerulonefritis, artritis, enfisema, metástasis. (36, 54, 55)

La catepsina D es una aspartoproteasa de peso molecular de 44,000 que también presenta altas concentraciones en lisosomas y tiene un pH óptimo entre 3.5-5.0. Es una glucoproteína y, por purificación, se puede obtener en varias formas de peso molecular semejante y con diferentes puntos isoeléctricos. La enzima tiene una actividad limitada contra las proteínas nativas, pero muestra una mayor actividad contra las proteínas desnaturalizadas. Igual que otras proteasas de la familia del aspartato, la catepsina D es inhibida por la pepstatina, el éster metílico de la diazoacetil norleucina y el epoxi-nitrofenoxipropano. Es similar a otras aspartoproteasas como la renina y la pepsina en la secuencia de aminoácidos que rodean al Aspartico en el sitio activo, Ile-Val-Asp-Thr-Gly-Thr-Ser. Adicionalmente esta familia de proteasas ataca preferentemente los enlaces peptídicos que contienen aminoácidos hidrofóbicos tales como Phe-Phe, Phe-Tyr, Leu-Tyr. (2, 37)

Las catepsinas C, N, M, S y T pertenecen al grupo de las cisteinproteasas y difieren mucho de las otras catepsinas B, H, y L, por lo que se justifica la asignación de nombres diferentes.

La catepsina S, aislada del bazo de res, es muy similar a la catepsina L en sus características físicas y su alta actividad catalítica contra la azocaseína, pero difiere de ella

en su capacidad de hidrolizar los sustratos sintéticos y su sensibilidad a algunos inhibidores como el carbobenzoil-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>. (56)

La catepsina T del hígado de la rata también tiene muchas similitudes con otras cisteinoproteasas lisosomales, pero se distingue en su capacidad de transformar a la tirosina aminotransferasa en otras isoformas. (2)

La catepsina C, aislada de los riñones, está constituida por cuatro subunidades iguales y a diferencia de otras cistein-proteasas lisosomales tiene el peso molecular muy grande (200,000 daltones) y tiene el pI de 6.0.(58)

La catepsina M (peso molecular 30,000 daltones) aislada del hígado de conejo se distingue de las otras catepsinas por tener una porción que le permite asociarse con la membrana, lo que representa un 50% de la actividad de la enzima. Se ha detectado que la enzima asociada a la membrana tiene actividad a pH neutro, mientras que la enzima soluble es más activa a pH de 5.0.(57)

La catepsina N, a veces llamada "catepsina colagenolítica" es similar a la catepsina L, excepto que tiene una baja actividad en relación a la azocaseína. (2)

Las catepsinas lisosomales se sintetizan como zimógenos de alto peso molecular, sufren la glicosilación seguida por el procesamiento proteolítico, que es iniciado en el compartimiento prelisosomal y es completado en las lisosomas. Este procesamiento proteolítico es necesario para alcanzar la actividad completa de las catepsinas. Se conoce, ciertamente, que las catepsinas B, C, D, H, L requieren activación. (3, 36)

Por ejemplo, la procatepsina D es una proenzima inactiva y glicosilada, que es procesada para remover los últimos 44 aminoácidos de N-terminal, lo cual genera una enzima activa

con un peso molecular de 44kDa ó una isoforma de doble cadena de 15kDa y 30kDa. Parece ser que la catepsina D puede activarse a si misma y a otras catepsinas (como L y B). (3, 37) La catepsina L, por ejemplo, se sintetiza como precursor de 39 kDa y es procesada por medio de la misma catepsina L hacia la forma activa de 29kDa ó 20kDa+5kDa. Las dos isoformas de la catepsina L son proteolíticamente activas. (36, 55) La catepsina B también se sintetiza como precursor inactivo de 44kDa que es convertido primeramente a una protefna de 33kDa y después a una enzima activa de 25kDa.(46)

También se ha reportado que algunos de los precursores de las enzimas lisosomales como son porcatepsinas C y L pueden asociarse con la membrana durante su transferencia a lisosoma. (13, 35)

Para los estudios de las cistein- proteasas se emplean varios inhibidores reversibles e irreversibles de estas enzimas: aldehídos, halometilcetonas, aciloximetilcetonas, diazometilcetonas. Recientemente fue encontrado un nuevo grupo de inhibidores de cistein-proteasas: las sales de peptidilsulfonio, que a diferencia de los compuestos antes mencionados, son inhibidores extremadamente potentes y específicos, ya que reaccionan con el tiol de la cisteína localizada en el sitio activo de las enzimas. (4)

### 2.1.2. Proteasas citoplasmáticas.

Las proteasas citoplasmáticas han sido aisladas y caracterizadas en varios tipos de células. Estas proteasas son muy importantes en la activación, las modificaciones en las proteínas ya sintetizadas (postraduccionales) y en el inicio de una degradación masiva de

proteínas. Por lo general, estas proteasas son aisladas del citoplasma de varios tipos de células, varias son cisteinproteasas y muchas de ellas requieren de ligandos para su activación, por ejemplo, el  $\text{Ca}^{2+}$  para las calpafnas, el ATP para las proteasas de ubiquitina, etc. Estas enzimas tienen pesos moleculares en el intervalo de 80,000 a 750,000 daltones, lo que muestra un marcado contraste si se comparan con las cistein proteasas lisosomales. El gran tamaño de estas proteasas es muy importante para su regulación y selectividad. (2)

El sistema proteolítico dependiente de la ubiquitina y del ATP es un complejo de varias proteínas que ha sido descrito en reticulocitos, músculo, riñones, hígado, etc. Este sistema proteolítico también ha sido llamado proteasa multicatalítica (una de las variedades es el proteasoma 26S ) que contiene 5 componentes catalíticos principales. 1) el similar a tripsina, 2) el similar a quimotripsina, 3) la peptidilglutamilpeptido-hidrolasa, 4) el que "prefiere" aminoácidos de cadena ramificada y 5) el que "prefiere" aminoácidos neutros pequeños. Este sistema presenta una gran actividad contra sustratos proteicos como son la caseína y la proteína miofibrilar. Es el responsable de la degradación de los conjugados de la ubiquitina. En estos casos, el ATP es requerido para modificar a las proteínas y hacerlas susceptibles al sistema proteolítico activo así como para la conjugación covalente del sustrato con la ubiquitina, pequeña proteína de 76 aminoácidos (peso molecular 8 500) presente en la mayoría de la células. El propósito de la conjugación de la ubiquitina con la proteína es asegurar o facilitar la degradación. Las proteasas en este sistema degradan casi exclusivamente los sustratos conjugados con la ubiquitina, y ocasionalmente algunos sustratos no conjugados, sin embargo la conjugación con la ubiquitina parece ser un paso obligatorio para la degradación de la mayoría de proteínas. (2, 5, 24, 20, 31, 32, 39, 40).

Se han reportado proteasomas con diferente número de subunidades (5 - 24) y por lo tanto con diferente peso molecular (40,000 - 800,000), esto parece depender del tejido de origen, pero la mayoría de las proteasomas parecen tener las subunidades antes mencionadas. (31, 34, 40, 49) Aparentemente el ATP no es hidrolizado durante la activación de la proteasa, algunos otros nucleótidos (ADP, GTP, GDP, CTP) pueden activar la proteólisis. Se sugiere que estos compuestos pueden actuar como activadores alostéricos.

Se han descrito otros tipos de proteasas, unas de pII alcalino que dependen de ATP pero no requieren ubiquitina y otra de gran tamaño (625-825 kDa) localizada en el músculo, también independiente de ubiquitina cuyas características no están bien definidas (2).

El grupo de proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , conocidas como calpaínas (proteasas dependientes de calcio semejantes a la papaína), son cisteinproteasas relacionadas con la familia de la papaína. Las calpaínas son inhibidas por agentes específicos que reaccionan con grupos sulfhidrilo (iodoacetato, E-64), por leupeptina, peptidil acetoximetilcetonas y EDTA (por requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Las calpaínas difieren de las proteasas lisosomales por su requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , por su tamaño (las calpaínas son heterodímeros con P.M. aprox. 110,000), y el tipo de compuestos específicos que inhiben a la enzima (p.ej. las cistatinas inhiben las catepsinas, pero no las calpaínas). (2, 6, 44)

Existen dos formas de calpaínas, las cuales difieren por su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  (unas se activan con concentraciones micromolares y otras por concentraciones milimolares del catión). Las dos formas de la enzima tienen una subunidad catalítica de 80,000 y una subunidad pequeña de 30,000 Da de función desconocida. La subunidad

catalítica es aparentemente producto de dos genes separados mientras que la subunidad pequeña es la misma para los dos tipos de enzimas. (2, 6, 33, 50)

El calcio induce la autoproteólisis limitada de las calpains, la cual juega un papel importante en la activación y regulación de esas enzimas. (6, 42, 50)

Se han identificado a los inhibidores endógenos específicos de las calpains, el calpastatin; también se ha descrito un activador, lo que indica que la actividad de esta enzima es altamente controlada. Se han preparado anticuerpos monoclonales de las calpains los cuales han sido utilizados para estudiar la distribución subcelular de estas enzimas empleando técnicas de inmunofluorescencia. Los datos indican que las enzimas son citoplasmáticas y demuestran una amplia distribución en las células. Las calpains no están involucradas en la hidrólisis de grandes volúmenes de proteínas celulares, sin embargo parecen participar en las etapas iniciales de la degradación de las proteínas miofibrilares y del citoesqueleto. (2, 33, 42, 45)

Se han identificado y parcialmente purificado algunas otras cisteinproteasas solubles (P.M. 80,000-750,000), entre estas la enzima del hígado del ratón, que hidroliza la cadena  $\beta$  de la insulina (también esta propiedad es atribuida al proteasoma 26S) (20) y del glucagon. (2)

### 2.1.3. Proteasas plasmáticas membranales.

Las metaloendoproteasas (las proteasas que contienen metales como parte integral de su estructura) se encuentran asociadas a las membranas en las células de los mamíferos o son secretadas por las células y actúan extracelularmente (colagenasas, elastasas).

La metaloendopeptidasa membranal mejor caracterizada (meprina) es una enzima plasmática membranal con alta actividad especialmente en los riñones, pero se encuentra en bajas concentraciones en las membranas de otras células como son las células intestinales y cerebrales. Las metaloendopeptidasas son glucoproteínas que tienen una subunidad grande (P.M 90,000) que durante la purificación tiende a agregarse en complejos de mayor peso molecular (la meprina es activa como dímero, tetrámero, y posiblemente como octámero bajo ciertas condiciones). Es probable que estas endoproteasas de los riñones de ratón con P.M. de 213,000-800,000 sean también oligoméricas. Las metalopeptidasas usualmente son activas a pH neutros o alcalinos y contienen  $Zn^{2+}$ . Parece que estas proteasas unidas a la membrana participan en la degradación de péptidos pequeños (encefalinas) y polipéptidos (hormonas peptídicas) tanto en la superficie celular como durante la endocitosis, pueden modificar proteínas membranales ó proteínas asociadas a las membranas y participan también, en algunos eventos asociados con la fusión celular y la liberación de neurotransmisores. (1, 2)

Las proteasas mitocondriales son serinoproteasas dependientes de ATP, están mejor caracterizadas en células de mamíferos. Estas proteasas se han detectado en tejido hepático y adrenal y son similares a la proteasa encontrada en E.coli. Estas enzimas no

requieren de ubiquitina y son inhibidas por el vanadato, degradan preferentemente protefnas anormales en procariotes y en mitocondria. (2)

Se han descrito otras proteasas parcialmente asociadas a la membrana en las fracciones subcelulares como núcleo, gránulos y algunas otras partículas subcelulares. Sin embargo, sus funciones y propiedades no han sido bien definidas. (2)

## 2.2. Significado de la vida media en la degradación de protefnas.

La mayoría de las determinaciones de la degradación de proteínas se restringe a la medición de la pérdida de las propiedades biológicas o de la reactividad inmunológica lo que lleva a la determinación de la velocidad del catabolismo. La vida media se define como el tiempo necesario para que se degrade la mitad de la concentración existente de una protefna. La vida media se expresa en términos de la constante de la velocidad de degradación y puede referirse a la pérdida de la actividad biológica, de la reactividad inmunológica o bien a la pérdida de las marcas radiactivas de las proteínas marcadas. Esos procesos no necesariamente ocurren al mismo tiempo, por ejemplo la desnaturalización que puede llevar a la pérdida total de la actividad biológica o a la pérdida parcial de la reactividad inmunológica, puede no tener efecto en la actividad específica de los aminoácidos marcados en la molécula proteica. (2)

Para la mayoría de las proteínas intracelulares, el promedio de la vida media en la célula es considerablemente mayor que el tiempo requerido para la biosíntesis y la maduración.

La vida media de una proteína *in vivo*, parece relatar en parte su función. Por ejemplo, las enzimas que tienen un papel directo en la regulación de las vías metabólicas se intercambian menos frecuentemente que las enzimas "regulatorias". Generalmente las enzimas regulatorias se intercambian rápidamente y están presentes en bajas concentraciones en células, además sus concentraciones fluctúan rápidamente como respuesta al incremento o disminución de la velocidad de síntesis o degradación proteica. (2, 22)

La heterogeneidad observada en la vida media de diferentes proteínas dentro de la célula sugiere que los procesos de la degradación intracelular tienen que ser selectivos por lo tanto es fundamental comprender las bases moleculares de esa heterogeneidad. No hay evidencia de que los procesos catabólicos tengan un reconocimiento específico del sustrato para escoger para su degradación a las proteínas altamente recambiables. Parece que el componente de la selectividad radica en la estructura de la misma proteína la que aumenta o disminuye su susceptibilidad para ser degradada. (9, 10, 22)

Se han sugerido algunas generalidades sobre la vida media y las propiedades de las proteínas. Por ejemplo, se ha reportado que las proteínas citoplasmáticas grandes son degradadas más rápidamente que las proteínas pequeñas. La carga de la superficie de una proteína se correlaciona también con la vida media. Las proteínas ácidas son más susceptibles a la degradación que las proteínas con los valores básicos de pI. Las proteínas rápidamente intercambiables tienden a ser más hidrofóbicas que las de vida más larga.

Así, las proteínas de vida corta tendrían que ser 1) de mayor peso molecular; 2) ácidas; 3) hidrofóbicas. Sin embargo, aunque estas tres propiedades no son determinantes para regular la degradación, sí tienen un papel importante para determinar la vida media de las proteínas. (2, 9, 10, 22)

### 2.3. Características de las proteínas “destinadas para la degradación”.

La conversión de las proteínas nativas, funcionalmente competentes en sus aminoácidos constituyentes, es un proceso que implica una secuencia de eventos. Se puede argumentar que una etapa importante en el catabolismo intracelular es la etapa en la que se pierde la actividad biológica. Esta etapa necesita involucrar varios ataques proteolíticos, y de esta manera los procesos de “catabolismo funcional” y “catabolismo proteolítico” pueden ser distinguidos en cuanto a sus efectos en la célula. Además se puede argumentar que la etapa que determina la velocidad en el catabolismo de las proteínas intracelulares es solo una, ya que en la célula no se presentan los intermediarios acumulables.(9, 18)

La evidencia de que las propiedades intrínsecas de las proteínas determinan su estabilidad *in vivo* proviene de los estudios que demuestran que las proteínas que son rápidamente intercambiables son inestables *in vitro*. Así con pH bajos y altas temperaturas las proteínas de vida corta se inactivan más rápidamente que las proteínas de vida más larga.(9, 10) Esta sensibilidad a la desnaturalización puede ser interpretada como la manifestación de la inestabilidad termodinámica de la estructura proteica. De esta manera

la velocidad de degradación de una enzima es proporcional a la cantidad de proteína que esté desdoblada. Por ejemplo, la hidrofobicidad se ha relacionado con el desdoblamiento proteico; por ejemplo, algunas enzimas del hígado de la rata (fructosa-1,6-difosfatasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, piruvato cinasa) muestran una buena correlación entre el contenido de hidrofobicidad, velocidad de degradación, y su susceptibilidad a la inactivación provocada por causas mecánicas (agitación). (59)

Parece ser que las proteínas de vida media corta *in vivo* son marcadamente más sensibles al ataque proteolítico *in vitro*. Generalmente la mayor susceptibilidad a la proteólisis es una propiedad que se manifiesta más en las moléculas de mayor tamaño que en las proteínas pequeñas. La evidencia acumulada muestra que los sitios sensibles a la proteólisis hacen más flexible a una proteína, y esta flexibilidad se relaciona con el desdoblamiento (o inestabilidad termodinámica) de las proteínas. Las observaciones que correlacionan la termolabilidad de proteínas con la sensibilidad a la proteólisis, confirman esta idea. (2, 18)

Se sabe que las proteínas anormales son rápidamente degradadas por la célula, se entiende por una proteína subnormal aquella proteína que difiere de las proteínas nativas en su estructura o conformación. Por ejemplo los polipéptidos en los que han sido incorporados los análogos de algunos aminoácidos (fluorotriptofano y canavanina, análogo de la arginina) o polipéptidos que han sido terminados prematuramente se enrollan de forma subnormal. Es difícil de aplicar este criterio en caso de las proteínas que requieren de un cofactor o están formadas por más de una subunidad. Por ejemplo todas las proteínas ribosomales son degradadas al mismo tiempo lo que indica el catabolismo del organelo

como una unidad, pero la disminución en sus RNA ribosomal produce una degradación acelerada de las subunidades disociadas.(61) Los trabajos con los organismos transgénicos reportan la precipitación como un fenómeno común cuando una proteína extraña es expresada en gran cantidad en una célula. Estas proteínas precipitan, ya que probablemente su accesibilidad a las enzimas degradativas es menor, de esta manera se forman los cuerpos de inclusión proteicos en algunas células. (66)

Factores como el enlace con el ligando, la modificación covalente y otros eventos reversibles pueden modificar la velocidad de entrada de las proteínas a la ruta catabólica. Los sustratos o activadores alostéricos pueden estabilizar la proteína *in vivo*. Una alta concentración de los ligandos puede generar una señal de que se incremente la concentración intracelular de los "sitios activos". Por el contrario, la acumulación de los productos de inhibición alostérica puede ser una señal para acelerar la proteólisis. Esto es, la concentración intracelular de los metabolitos regula la velocidad de degradación. (2, 9, 10)

Los siguientes son algunos ejemplos en los cuales se sugiere que los ligandos tengan una función estabilizadora *in vivo*. Los estudios clásicos de Schimke y colaboradores con triptófano-oxigenasa en los que demuestran claramente el poder estabilizador del metiltriptófano *in vitro* y el aumento aparente en la vida media de la enzima *in vivo*. En este caso, es poco probable que la disociación del cofactor sea siempre una señal para incrementar la degradación ya que la pérdida del grupo hemo por el citocromo P-450 no lleva a la degradación del apocitocromo. (22, 23)

La mayoría de los trabajos publicados correlacionan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas con la vida media de las proteínas citoplasmáticas solubles

y parece poco probable que una correlación similar sea aplicable a las proteínas unidas a membranas. Las proteínas membranales pueden ser degradadas como la asociación macromolecular o bien podría ser que la disociación de una proteína de su membrana podría exponerla a la maquinaria degradativa. Las proteínas del retículo endoplásmico difieren considerablemente en sus velocidades de degradación y se ha observado una mayor estabilidad de las enzimas cuando se asocian con la membrana. Esta observación puede apoyar la propuesta de que la hidrólisis de las proteínas de la membrana puede proceder por mecanismos independientes del resto de los constituyentes de la membrana. (2, 9, 10, 22)

#### 2.4. "Marcaje" de las proteínas para su degradación.

Las enzimas que catalizan las modificaciones covalentes de las proteínas son esenciales para la fase inicial de la degradación proteica. Es posible que la modificación covalente inicial sea el ataque proteolítico que desestabiliza la proteína para llevarla a la degradación extensa. De acuerdo a la heterogeneidad de la vida media de las proteínas, las proteasas pueden reconocer las "marcas específicas" localizadas en las proteínas destinadas a la proteólisis. Ejemplos de los eventos que requieren "marcas" son la conjugación con la ubiquitina, la formación de disulfuros mixtos de glutatión y proteína, algunas formas de oxidación, la desamidación, y los sistemas de fosforilación / desfosforilación. (2)

Hershko y sus colegas (53) han propuesto la existencia de un sistema celular soluble compuesto por varias proteínas, que son las responsables de la conjugación covalente de la ubiquitina con los grupos amino del sustrato proteico. Esta reacción de conjugación requiere de ATP y es una de las causas del requerimiento de ese nucleótido en la degradación proteica intracelular. Las enzimas responsables de la conjugación de la ubiquitina y denominadas E2s fueron caracterizadas recientemente por Wing y Poonam (30). La conjugación covalente de la ubiquitina ocurre por la unión de su extremo carboxilo con el grupo amino de una lisina de la proteína destinada a la degradación. Generalmente estas proteínas se conjugan con varias moléculas de ubiquitina. La ubiquitinación es un proceso que sucede en varios pasos. Primeramente la ubiquitina es activada por la enzima activadora (E1), la cual utiliza ATP y forma un tioéster entre la ubiquitina y E1. La ubiquitina así activada es transferida al radical de una cisteína de la proteína acarreadora de la ubiquitina (E2s). Después, la ubiquitina se conjuga con una proteína-sustrato, esta unión puede ser directa o por medio de una tercera proteína la ubiquitina-proteína ligasa (E3). Esta última enzima parece ser importante en el reconocimiento y la conjugación con el sustrato proteico mientras que la participación de las enzimas E2 es fundamental en la conjugación tanto de las proteínas anormales como de vida corta con la ubiquitina. (30).

La conjugación con la ubiquitina sirve como señal para la proteólisis de las proteínas normales y subnormales de vida corta, la proteasa multicatalítica encargada de la hidrólisis, reconoce las proteínas "marcadas" con la ubiquitina. (2, 5, 20, 24) Está comprobado que estos conjugados tienen vida media muy corta y que la ubiquitina misma es inactivada por las proteasas de los tejidos. (2)

La oxidación de algunos aminoácidos específicos en las proteínas puede ser también un evento inicial para la degradación proteica enzimática en algunos tipos de células. En las bacterias, por ejemplo, la glutamina sintetasa es modificada por oxidación, como primer paso, para su degradación posterior.(67) Algunas histidinas son oxidadas específicamente por varios mecanismos y esto pasa a ser una "marca" para la degradación posterior. En las células eucariotas la oxidación de los residuos de cisteína inicia la degradación de algunas proteínas, por ejemplo, algunas enzimas citoplasmáticas son inactivadas por la reducción de los enlaces disulfuro. (24)

Las interacciones de enzimas con disulfuros biológicos (glutatión, cisteína, cistamina) pueden regular la actividad de algunas enzimas y tener importancia en las velocidades de degradación. La aldolasa del músculo de conejo se ha usado como enzima modelo para el estudio de la oxidación de grupos tiol a disulfuros. Los disulfuros como el glutatión pueden inactivar, desestabilizar y aumentar la susceptibilidad de las enzimas hacia las proteasas. La oxidación de algunos grupos tiol específicos es catalizada por las enzimas. (68)

También como eventos previos a la proteólisis, pueden ocurrir otras reacciones de oxidación no enzimática que genera radicales libres dentro de la célula. Este tipo de oxidaciones es llamado "estrés celular" y lleva a la acumulación de proteínas oxidadas. Este tipo de proteínas anormales es una de las causas importantes de los numerosos daños en el organismo: disfunciones cerebrales, oculares, etc. En células normales el sistema proteolítico (proteólisis dependiente de ubiquitina) degrada las proteínas anormales y previene la acumulación de proteínas dañinas.(24)

La oxidación de los grupos tiol de las enzimas responsables de la conjugación de las proteínas con la ubiquitina influye en la cataractogénesis, y por tanto marca la relación de la edad avanzada con la actividad de conjugación con la ubiquitina. (24)

Se ha demostrado *in vitro* que la fenilhidrazina oxida las proteínas intracelulares de los glóbulos rojos, lo que induce la agregación de esas proteínas y como consecuencia aumenta su degradación. Cuando se han incubado células epiteliales con peróxido de hidrógeno se ha observado una disminución en la concentración de conjugados de la ubiquitina y por tanto una disminución de la proteólisis. (2, 24)

La fosforilación, glucosilación, acetilación y metilación de las proteínas como modificaciones posteriores a la síntesis, se llevan a cabo por medio de las reacciones catalizadas por las enzimas y pueden también alterar *in vivo* la estabilidad estructural de las proteínas. (2)

Existe la hipótesis de que la desamidación de algunos aminoácidos en la proteína puede ser un factor que determine la desestabilización de la estructura y la velocidad de degradación de las proteínas. La desamidación de la asparagina ocurre espontáneamente y se ha relacionado con la vida media de la proteína. La desamidación de estos aminoácidos actúa como "reloj biológico".(69)

A pesar de que la célula tiene varios modos de "marcar" las proteínas para su posterior degradación, diferentes tipos de células y diferentes proteínas tendrán su propia "marca" para ser degradadas. Es posible que una misma proteína puede ser susceptible a diferentes tipos de "marcación" y por tanto puede ser hidrolizada por varios sistemas proteolíticos. (2)

### 3. Particularidades del catabolismo de las proteínas en el músculo.

La velocidad de la degradación proteínica en el músculo es, en general, más baja que en otros tejidos, sin embargo esa velocidad varía considerablemente dependiendo de cada músculo en particular, lo que refleja las diferencias reales entre células contráctiles. (18)

El catabolismo proteínico en el músculo parece cambiar como respuesta a diferentes estímulos, y es reconocida como un factor de regulación importante para mantener el balance de las proteínas musculares. Los estudios del intercambio de las proteínas musculares durante la hipertrofia, sugieren un decremento de la degradación proteica durante el crecimiento del músculo. También se ha reportado una disminución de la velocidad del catabolismo proteínico en los casos de deficiencia proteica prolongada, en adultos durante el ayuno prolongado y en infantes malnutridos; por el contrario, un aumento en la degradación proteica en el músculo se ha observado en animales jóvenes, durante la hipertrofia inducida, después de una inanición prolongada y en el caso de ratas hipofisectomizadas con la administración posterior de triyodotironina. (18, 29)

Las incógnitas sobre la degradación del sistema contráctil del músculo a nivel de miofilamentos individuales o miofibrillas se puede resolver examinando las velocidades relativas de intercambio de las proteínas contráctiles individuales. Los resultados de varios estudios indican que las velocidades de intercambio de las proteínas de las miofibrillas no son idénticas: por ejemplo, la actina se intercambia más lentamente que la tropomiosina o troponina; la miosina de cadena pesada tiene un intercambio más lento que la miosina de cadena ligera. (18, 21)

Las características de la degradación de las proteínas solubles en el músculo parece ser similar a la de otros tejidos. La velocidad de degradación parece tener relación con el peso molecular y con el punto isoelectrico de las proteínas, por ejemplo, las proteínas glucosiladas son degradadas más rápidamente que otras proteínas. (18)

### 3.1. Proteólisis lisosomal.

El músculo contiene una variedad de proteasas y otras enzimas con actividad hidrolítica que tienen pH ácido como óptimo y se parecen a las enzimas lisosomales de otros tejidos. El papel de los lisosomas en la proteólisis intracelular se ha estudiado con inhibidores que bloquean la acidificación lisosomal. Se ha establecido que tanto en el músculo esquelético como en el músculo cardíaco, así como en el hígado y en los fibroblastos una disminución en la circulación de la insulina o de aminoácidos lleva a la activación marcada de la proteólisis lisosomal sin que aumente el contenido de las enzimas lisosomales. Por el contrario, el hipotiroidismo disminuye la proteólisis en el músculo incubado y reduce el contenido de las proteasas lisosomales en el músculo y en otros tejidos. (18, 70)

El sistema lisosomal del músculo se diferencia morfológicamente del de otros tejidos, por lo cual la presencia de lisosomas y de proteasas lisosomales en este tejido fue descrita comparativamente, más tarde que en otros tejidos. Los estudios del grupo de Bird empleando técnicas citoquímicas, permitieron la localización ultraestructural de las endopeptidasas lisosomales catepsina D y catepsina B en las miofibrillas. (70)

La endopeptidasa lisosomal más implicada en la degradación proteica en el músculo esquelético es la catepsina D pero también se ha demostrado la presencia de la catepsina B tanto en el músculo esquelético como en el miocardio. Cada una de esas proteasas degradan las proteínas contráctiles actina y miosina purificadas y la mezcla de enzimas solubilizadas de la fracción lisosomal, degrada tanto la actina como la miosina en forma de miofilamentos o miofibrillas. La actividad se inhibe al adicionar pepstatina (inhibidor de las carboxilproteasas ya que es un inhibidor específico de la catepsina D, y que parece ser la principal responsable de la degradación). La leupeptina (inhibidor de las tiolproteasas) induce una ligera inhibición, que se vuelve completa al adicionar pepstatina. Estos ensayos indican que las catepsinas D y B y algunas otras tiolproteasas como la catepsina L son las proteasas lisosomales capaces de degradar las proteínas contráctiles. (18, 36, 37, 46)

Posteriormente, en estudios utilizando diferentes inhibidores de enzimas lisosomales, se ha descubierto la presencia en el músculo de las catepsinas C, H y L y de las carboxipeptidasas A y C. (9, 10)

Recientemente Goldberg y colaboradores muestran que la proteólisis lisosomal juega un papel poco importante cuando aumenta la proteólisis en el músculo esquelético por el ayuno prolongado ó por la denervación del músculo. (51, 52)

A pesar de esto, es importante destacar que algunos trabajos documentan *in vitro* un aumento importante en la actividad de las catepsinas B y B+L en músculo atrofiado (111% y 92% respectivamente), así como un aumento importante en la concentración del mRNA de estas proteasas (84%). (26)

### 3.2. Proteólisis no lisosomal dependiente de $\text{Ca}^{2+}$ .

El músculo tiene además, una considerable actividad proteolítica en condiciones de pH neutro atribuido a dos proteasas activadas por el calcio, las calpaínas. La rápida estimulación de la degradación proteica inducida por la exposición a los ionóforos del  $\text{Ca}^{2+}$  ó por daño del tejido muscular, parece involucrar a las calpaínas. La inactivación de las catepsinas no bloquea ni reduce la proteólisis acelerada de las proteínas miofibrilares y del citoesqueleto causada por la denervación ó el ayuno. (18, 42, 45)

Las proteasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  degradan algunas de las proteínas miofibrilares purificadas: proteína C, tropomiosina, troponina-T, y troponina-I, así como las cadenas ligeras de la miosina, la  $\alpha$ -actinina, la actina y la troponina-C. (18)

Parece ser que las calpaínas participan principalmente en la etapa inicial de la degradación de las proteínas miofibrilares (45).

En el músculo atrofiado se reporta el incremento de 180% de la actividad de la calpaína-m y un aumento de 210% del mRNA correspondiente, por lo que la contribución de las calpaínas es evidentemente significativa. (26)

Los estudios realizados por Taillandier (26) y Furuno (52) en el músculo esquelético sugieren que la activación coordinada de los tres sistemas proteolíticos mayoritarios (lisosomal, no lisosomal dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y no lisosomal dependiente de ATP y ubiquitina) es la responsable de la degradación proteica en el músculo atrofiado (26) y en el músculo denervado (52).

La inhibición de la proteólisis lisosomal y no lisosomal dependiente de calcio suprime solo parcialmente (32%) el incremento del proceso proteolítico en el músculo

atrofiado, por lo que el sistema dependiente de la ubiquitina y del ATP juega el papel más importante en la degradación proteica en el músculo atrofiado. (26)

### 3.3. Proteólisis no lisosomal.

La mayor parte del catabolismo proteínico en el músculo normal ocurre por medio del proceso no lisosomal independiente de  $Ca^{2+}$ . En el músculo incubado en presencia de insulina y aminoácidos la proteólisis parece ser dependiente de ATP, ya que esta se bloquea cuando el ATP intracelular se agota por el uso de inhibidores de la fosforilación oxidativa y de la glucólisis. Como otras células eucarióticas, el músculo tiene el sistema proteolítico soluble dependiente de ATP, que involucra al factor "ubiquitina". Este camino metabólico sirve para hidrolizar selectivamente a las proteínas anormales o bien a los polipéptidos de vida corta. La activación de este sistema proteolítico no lisosomal es el mecanismo principalmente responsable del aumento observado en la degradación de las proteínas del músculo atrofiado por la denervación o el ayuno. (18, 30, 51)

En diversos estados catabólicos los procesos lisosomales y los no lisosomales dependientes del  $Ca^{2+}$  representan la menor parte del aumento en la actividad proteolítica en el músculo esquelético; la mayor parte de las proteínas miofibrilares (actina y miosina) son degradadas por el proceso dependiente de ATP y la ubiquitina. Este último, además de ser responsable de la degradación de las proteínas anormales y de las proteínas de vida corta, es el responsable de la degradación de las proteínas de vida larga del músculo esquelético, incluyendo los componentes contráctiles. (26, 29)

Se ha observado un aumento en la concentración de la ubiquitina (60-90%) en el músculo durante el ayuno y la denervación, así como en los niveles del mRNA para la ubiquitina y para algunas subunidades del proteasoma (C-2, C-3, C-5, C-8, C-9) (17). También se observa un aumento en los niveles de proteínas conjugadas con ubiquitina (50-250%), que son el sustrato principal del proteasoma 26S (29).

El incremento en los niveles de proteínas mono- y poliubiquitinadas en los casos de ayuno y denervación, se verá reflejado posteriormente en un incremento de la proteólisis por el proteasoma 26S. La acumulación de los conjugados con ubiquitina dos días después de la denervación o el ayuno es un paso determinante en la velocidad del proceso proteolítico en el músculo. (29)

Las proteínas miofibrilares, que representan el 80% del músculo esquelético, son degradadas en primer término en casos de ayuno y denervación y se ha observado un incremento de los conjugados con ubiquitina en la fracción miofibrilar, pero no en la fracción soluble del músculo. (29)

Algunos artículos reportan un grupo de serinoproteasas alcalinas involucradas en la degradación proteica del músculo, estas proteasas tienen un peso molecular de 13000 a 25000 daltones y un pH óptimo alcalino (8.5 a 9.0). Esas enzimas fueron aisladas de varios tejidos : hígado, músculo esquelético, musculatura intestinal, sin embargo su participación en la proteólisis en el músculo son muy variables. (18)

### 3.4. Proteólisis en el músculo.

La degradación proteica tiene características generales para todo tipo de músculo. No existe la degradación o reemplazamiento de un sarcómero o miofibrilla individual. La degradación de una miofibrilla implica la remoción de las subunidades proteicas individuales a diferentes velocidades, produciendo una poza de subunidades de proteínas contráctiles, algunas de las cuales seguirán siendo hidrolizadas por el sistema proteolítico. Algunas de las subunidades serán reemplazadas por nuevas proteínas sintetizadas, mientras que otras serán reutilizadas para formar una nueva miofibrilla. Esta reutilización de las subunidades individuales descarta las reacciones de iniciación que implican una desnaturalización irreversible de las proteínas o una degradación parcial. (18)

Otra característica importante es la aparente adición de las nuevas proteínas miofibrilares sintetizadas en la periferia de las fibrillas existentes, lo que se ha reportado en base a las evidencias autoradiográficas, empleando microscopio electrónico.(71)

## 4. Regulación del intercambio proteico en el músculo.

### 4.1. Influencia de la insulina.

Varios estudios han demostrado que la insulina estimula la síntesis proteica e inhibe la degradación en preparaciones de músculos esquelético y cardíaco incubados bajo condiciones basales en medios que contienen glucosa. En estas condiciones se ha obtenido una estimulación máxima de la síntesis entre 50 y 100% y una inhibición de la degradación de 30-50%.(72) Estas respuestas se han obtenido en presencia de concentraciones fisiológicas de la hormona. Los efectos de la insulina sobre el intercambio de proteínas son similares en cultivos de células musculares y en el músculo incubado, sin embargo la incubación con concentraciones farmacológicas de la hormona puede provocar la respuesta máxima.(73, 74)

La insulina aumenta la velocidad de la síntesis de proteínas y su eficiencia (aumento del nivel de traducción), aumentando la iniciación de la cadena peptídica. Esta estimulación no se afecta por la actinomicina D y es independiente de los efectos de la hormona sobre el transporte de aminoácidos. A pesar de que la insulina estimula la síntesis de la mayoría de las proteínas, no se sabe si esta estimulación es o no uniforme.(75, 76)

El mecanismo por el cual la insulina inhibe la degradación de proteínas aún no es bien conocido y se ha sugerido que en el corazón, este efecto se debe a una disminución en la formación de autofagosomas.(76) Existe desacuerdo sobre la sensibilidad de la hidrólisis de proteínas a la insulina. La aparente insensibilidad de la velocidad de degradación de las

proteínas miofibrilares sugiere que estas proteínas y las proteínas no miofibrilares se catabolizan por vías diferentes. (12)

#### 4.2. Influencia de la combinación insulina - triyodotironina.

La insulina plasmática y las concentraciones de triyodotironina ( $T_3$ ) libre se correlacionan y son interdependientes. Las hormonas tiroideas estimulan la síntesis de las proteínas y este efecto se debe probablemente a una acción previa a la traducción o a una acción postraduccional a nivel de la degradación de RNA.(99, 100) La restauración del estado eutiroides después de la tiroidectomía incrementa la eficiencia de la síntesis de proteínas ( $k_{RNA}$ ) y este efecto puede ser mediado indirectamente por un aumento en la concentración de insulina. En general se está de acuerdo en que las hormonas tiroideas incrementan la velocidad de la hidrólisis proteica ( $k_d$ ) en el músculo y la excreción de 3-metilhistidina. En la hidrólisis de proteínas están involucrados el sistema lisosomal y el sistema dependiente de  $Ca^{2+}$ . (100, 101, 102)

*In vivo*, la hipertrofia del músculo cardíaco inducida por la hormona tiroidea implica el incremento en la capacidad ( $C_s$ ) y la velocidad de la síntesis proteica ( $k_s$ ), así como la  $k_d$  y de la concentración de RNA.(101)

#### 4.3. Influencia de los glucocorticoides.

Las concentraciones de los glucocorticoides se incrementan en condiciones insulino- dependientes. Se acepta que los glucocorticoides disminuyen la síntesis proteica.

sin embargo, los glucocorticoides causan resistencia a la insulina y por tanto son la causa de la deficiencia funcional de esta.(96) El pretratamiento de las ratas normales o adrenalectomizadas con los glucocorticoides disminuye las  $k_a$  y  $k_{RNA}$  en el músculo y también inhibe la iniciación de la cadena peptídica.(103)

Adicionalmente, los reportes acerca de la inhibición aguda de la síntesis proteica por los glucocorticoides en el músculo soleo, sugieren que algunos efectos de los glucocorticoides son directos.(104) Otros investigadores concluyen que los efectos primarios de los glucocorticoides sobre la síntesis de proteínas es reflejo de la disminución en la  $C$ , (105), mientras que otros han demostrado que los glucocorticoides reducen la  $k_{RNA}$  como respuesta a un incremento en la concentración de insulina.(96) La síntesis de la proteína miofibrilar es particularmente sensible a la inhibición por los glucocorticoides. (104)

Existe controversia acerca del efecto de los glucocorticoides sobre la velocidad de hidrólisis de las proteínas. En la literatura existe información de estimulación (106), ausencia de efecto (103) e inhibición de la hidrólisis proteica (104). Aunque los resultados tan variables se pueden explicar, en parte, al diseño de los experimentos, también se han descrito efectos anabólicos de los glucocorticoides bajo ciertas condiciones. El análisis de la información obtenida se complica debido a que los glucocorticoides causan resistencia a la insulina y además de mostrar efectos indirectos, como el aumento en la glicemia, lo que puede indirectamente elevar la secreción de insulina. (107)

#### 4.4. Influencia de los aminoácidos.

Los aminoácidos también pueden modular el intercambio proteico *in vitro* de los músculos de roedores. No se ha establecido claramente si la infusión de los aminoácidos estimula la síntesis proteica *in vivo*, aunque se ha observado un incremento de  $k_1$  en el músculo esquelético de los humanos, no se ha descrito ningún efecto en el músculo de la rata. Se propone que los aminoácidos tienen un efecto regulador indirecto, estimulando, por ejemplo, la secreción de insulina.(98)

La adición *in vitro* de los aminoácidos disminuye la  $k_1$  en el músculo esquelético de los animales en ayuno, sin embargo en el músculo esquelético del humano no se observan cambios en la  $k_1$  después de la infusión de los aminoácidos.(89)

Dos aminoácidos en particular tienen una función reguladora muy importante, se trata de la glutamina y la leucina (y probablemente algún otro aminoácido de cadena ramificada como la valina ó la isoleucina). En el músculo esquelético *in vitro* las concentraciones crecientes de glutamina incrementan la síntesis proteica e inhiben la  $k_1$ , excepto de la proteína miofibrilar.(108) Los mecanismos moleculares responsables de los efectos de la glutamina no se han definido, sin embargo podría involucrar modificaciones en la actividad de la proteína-fosfatasa y como consecuencia en la fosforilación de los factores proteicos implicados en la traducción. Los trabajos recientes sugieren un efecto sinérgico entre los aminoácidos de cadena ramificada y la insulina.(109, 110)

#### 4.5. Influencia del glucagon.

Durante la fase catabólica se observa un incremento tanto en la concentración de glucagon en el plasma, como en la relación glucagon / insulina. El glucagon inhibe la  $k_4$  *in vivo* e *in vitro* sin embargo, en este último caso se requieren concentraciones hiperfisiológicas.(77, 78)

La hiperglucagonemia puede acelerar todas las  $k_4$  corporales en los estados de deficiencia de insulina *in vivo*. (79)

#### 4.6. Influencia de las catecolaminas.

Las catecolaminas inhiben la liberación de la alanina y de la glutamina del músculo esquelético *in vitro*, lo cual se interpreta como la inhibición de la  $k_4$  por las catecolaminas.(111, 112) La administración en la dieta o inyección de los agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos (clenbuterol) en ratas estimula la acumulación de proteínas del músculo esquelético y del RNA *in vivo* e induce la hipertrofia de las fibras musculares. El lugar de acción de clenbuterol aún es discutido, su efecto de incrementar la  $C_4$  sugiere acción pretraducciona o bien la acción a nivel de la degradación de RNA.(113, 114)

La administración de adrenalina o del  $\beta$ -agonista la isoprenalina causan hipertrofia cardíaca *in vivo*. Es difícil de distinguir si la hipertrofia inducida por las catecolaminas es un efecto directo, y si no está mediado por el incremento en el trabajo cardíaco. Las catecolaminas causan también, el agotamiento *in vivo* de ATP.(115) En el corazón tratado

con tetrodotoxina, para evitar el agotamiento de los nucleótidos de adenina, muestra un aumento en la concentración de AMPc y una estimulación de la  $k_A$ ; y la adición de la isoprenalina estimula la síntesis de la proteínas no contráctiles en los miocitos cultivados. Estos datos muestran una respuesta positiva de la síntesis proteica a la estimulación de los  $\beta$ -adrenorreceptores. (15, 16)

#### 4.7. Participación del $Ca^{2+}$ .

Se acepta que en el músculo esquelético la eliminación de  $Ca^{2+}$  disminuye todas las  $k_A$ , por lo tanto un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  puede producir la pérdida de proteínas del músculo, lo que conduce a un estado de atrofia muscular. Sin embargo, la degradación de la proteína miofibrilar no se afecta por el  $Ca^{2+}$ . (80) Los mecanismos responsables de los efectos del  $Ca^{2+}$  sobre la  $k_A$  no han sido totalmente esclarecidos y es posible que las calpainas tengan una participación muy importante. Algunos autores han sugerido la mediación de la prostaglandina  $PGE_2$  (reportada como promotora de la  $k_A$ ) por medio de la activación de la fosfolipasa  $A_2$  dependiente de calcio. (81)

La influencia del  $Ca^{2+}$  sobre la  $k_A$  en el músculo esquelético es muy controvertida pues se ha reportado desde la estimulación (60) hasta la inhibición de ella (62).

Varios estudios indican la participación de la familia de la proteinocinasa C activada por  $Ca^{2+}$  y los fosfolípidos en la regulación del intercambio de proteínas. A la proteinocinasa C se le atribuye el control del flujo transmembranal de  $Na^+$ , que por su parte ha sido relacionado con la degradación de la proteína miofibrilar, lo que sugiere la influencia de la proteinocinasa C sobre la degradación de la proteína miofibrilar. (82, 83)

#### 4.8. Participación de otras sustancias.

Los "combustibles" derivados de los lípidos como son los ácidos grasos de cadena larga y los cuerpos cetónicos aumentan la síntesis de proteínas en el músculo cardíaco estimulando la iniciación de la cadena peptídica. Otros compuestos como el lactato, el piruvato y el acetato también estimulan *in vitro* la  $k_s$ , pero sus mecanismos de acción todavía no han sido aclarados.(84) Además, algunos de estos compuestos y/o sus metabolitos inhiben la  $k_d$  del músculo cardíaco. En el hombre, la infusión de  $\beta$ -hidroxibutirato disminuye la  $k_d$  del músculo esquelético, y puede incrementar la  $k_s$ . (116)

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF-1 e IGF-2) son reguladores potenciales paracrinicos y autocrinicos, del crecimiento. Sus efectos sobre el intercambio proteico han sido estudiados únicamente en los cultivos celulares del músculo esquelético. Las concentraciones fisiológicas tanto de IGF-1 como de IGF-2 estimulan la  $k_s$  e inhiben la  $k_d$ .(73, 74) Se ha demostrado una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de insulina e IGF-1 en ratas alimentadas con una dieta deficiente en proteínas. Algunos reportes sugieren que IGF-1 estimula la  $k_s$  e inhibe la  $k_d$  en el músculo. Además Sugden y Fuller han demostrado que las concentraciones fisiológicas de IGF-1 estimulan la  $k_s$  en los cardiomiocitos aislados de ratas adultas. (25)

Varios factores anabólicos, así como hormonas (incluyendo insulina) incrementan el pH en ciertas células estimulando el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Estudios realizados en corazón perfundido muestran que el incremento de los valores de pH por arriba del pH

fisiológico (7.4) estimula progresivamente la  $k_1$  e inhibe la  $k_2$  modificando simultáneamente la concentración de los nucleótidos de adenina. (85)

La deficiencia de las hormonas hipofisarias o tiroideas reduce la proteólisis en el músculo. La disminución en la degradación proteica después de la hipofisectomía en la rata semeja la reducción observada al alimentar a los animales con una dieta deficiente en proteínas (DP). Además se ha observado que este tipo de dieta deficiente en proteínas afecta las funciones tiroideas, bajan los niveles de triyodotironina, reduce la respiración dependiente de Na en el músculo, baja la temperatura corporal. El ayuno prolongado y la hibernación en los animales, reduce la función tiroidea lo que produce también una reducción en la proteólisis lo que permite la preservación de las proteínas corporales. (27, 28)

## 5. Efecto de diversos factores sobre el intercambio proteico en el músculo.

### 5.1. Efecto de los factores físicos, el ejercicio.

Se ha encontrado que el intercambio de proteínas en el músculo responde al estiramiento, y que la respuesta involucra modificaciones en los niveles de traducción y postraducción (incluyendo el control a nivel de la degradación de proteínas). (64, 65) La mejor forma de estudiar estos efectos es a través de las células en cultivo. El cultivo de miotubulos de polluelos muestra que la síntesis total de proteínas y la acumulación de estas no dependen de la actividad contráctil, pero la contracción aumenta la acumulación de miosina, que es indispensable para la expresión de la cadena pesada de la miosina neonatal. (63)

En contraste a la contracción espontánea, la tracción mecánica intermitente induce la hipertrofia y la hiperplasia y estimula la  $k_d$  en los cultivos de los miotubulos de los polluelos. (63)

La opinión general aceptada es que el ejercicio agudo no tiene efecto o bien inhibe la  $k_s$ , y sus efectos sobre la  $k_d$  de la proteína miofibrilar son insignificantes. (87) Algunas observaciones acerca del ejercicio y del intercambio proteico en músculo son las siguientes: (88)

5.1.1. El ejercicio puede afectar el intercambio de proteínas únicamente después de algún tiempo de la terminación de ejercicio.

5.1.2. Los ejercicios de resistencia (aeróbicos) así como la carrera prolongada que se usan frecuentemente en los estudios para conocer el intercambio de proteínas, no incrementan significativamente la masa del músculo esquelético.

5.1.3. Por el contrario, los ejercicios anaeróbicos tales como el entrenamiento con pesas incrementan la masa muscular. Los cambios en la masa muscular inducidos por el ejercicio no ocurren rápidamente y por tanto los efectos agudos en el intercambio proteico no son detectables.

5.1.4. El ejercicio, especialmente de resistencia, induce muchos cambios en el ambiente hormonal y en el metabolismo en general. Por lo tanto, las alteraciones producidas son difíciles de interpretar.(86)

## 5.2. Efecto de la diabetes y el ayuno.

Se reconoce que el ayuno y la diabetes causan alteraciones metabólicas complejas.

Los estudios realizados *in vitro* utilizando músculos de animales diabéticos muestran una reducción en la síntesis de proteínas, los valores mejoran al adicionar insulina al medio.(89, 90) La síntesis de la proteína miofibrilar es especialmente sensible. La inhibición ocurre mediante el decremento en la eficiencia de la síntesis proteica y la inhibición de la iniciación de la cadena peptídica en combinación con una disminución de la capacidad para la síntesis proteica ( $C_p$ ).(91)

Las  $k_d$  determinadas *in vitro* en el músculo esquelético de los animales en ayuno muestran valores mayores. Estas se reducen cuando los aminoácidos y la insulina son incluidos en el medio de incubación. de lo contrario, el ayuno puede causar un pequeño decremento en todas las  $k_d$  del corazón perfundido, pero la diabetes puede incrementarlas. (89, 92)

Algunos experimentos sugieren que la diabetes recientemente manifestada incrementa todos los valores de  $k_d$  en el músculo esquelético, mientras que la diabetes crónica disminuye estos valores.(91) Según algunos estudios, la insuficiencia dietaria disminuye la excreción de 3-metilhistidina, lo que sugiere la inhibición de la degradación de la proteína miofibrilar. Por el contrario, otros estudios reportan el incremento de la excreción de 3-metilhistidina. Se desconoce si la  $k_d$  de la proteína miofibrilar es inhibida o no por la insulina *in vivo*. (93)

Algunos autores sugieren que la deficiencia de insulina en el músculo aumenta principalmente la hidrólisis de las proteínas de los ribosomas. Cuando el corazón es perfundido, la insulina estimula de igual manera la síntesis de proteínas totales en las cuales se incluyen las proteínas ribosomales. Con la diabetes se ha descrito la pérdida de los ribosomas tanto en el músculo cardíaco como en el músculo esquelético, lo que es un reflejo de la disminución de  $C_r$  producto del decremento en la síntesis de proteínas totales. Si se administra la insulina, se estimula ligeramente la síntesis de las proteínas ribosomales y de otras proteínas.(94)

La degradación de las proteínas ribosomales representa solamente una pequeña fracción de toda la degradación de proteínas, y aunque un aumento en su velocidad de

degradación no contribuye significativamente para toda la  $k_d$ , la pérdida de los ribosomas tiene un efecto muy significativo sobre la capacidad de la síntesis proteica. (25)

En los experimentos realizados con animales diabéticos la insulina se administra directamente por la infusión, o bien se obtiene una respuesta indirecta en animales en ayuno por la ingestión de alimento. Estos métodos han dado resultados diferentes. Aunque el reemplazamiento directo de insulina en las ratas en ayuno estimuló la síntesis proteica en los músculos esquelético y cardíaco a través de incrementar la  $k_{RNA}$ , esto no sucedió al realimentar a los animales. (95, 96)

En las ratas en ayuno las concentraciones plasmáticas de insulina aumentaron moderadamente y tanto en los animales realimentados como en los que se infundió la insulina, y solamente la realimentación aumentó la  $k_s$ . Aunque estos resultados sugieren que la insulina es importante en la respuesta de la  $k_s$  a la realimentación, otros factores están también involucrados ( $T_3$ , glucocorticoides, etc.) Las evidencias recientes sugieren que la insulina estimula la  $k_s$  en el músculo esquelético de los humanos únicamente si se suministra de los aminoácidos es adecuado. (8, 97)

Aun no son claros los efectos *in vivo* de la insulina sobre la  $k_d$  del músculo. Se ha sugerido que en el hombre la insulina afecta el intercambio de proteínas a través de estimular la síntesis e inhibir la hidrólisis. Sin embargo Millward y sus colegas (98) han sugerido que la insulina incrementa la  $k_d$  en las ratas, contra la opinión de varios grupos que afirman que la hormona inhibe la  $k_d$ . De cualquier manera la insulina es importante en la regulación rápida del intercambio proteico, especialmente estimulando la  $k_s$ , sin embargo existen otros factores también importantes como es la concentración de aminoácidos. (108)

La insulina estimula la iniciación de la cadena peptídica, aumentando la formación del complejo de pre-iniciación 43 S, la cual es inhibida durante la diabetes o el ayuno. Además la fosforilación y la desfosforilación de los componentes que forman parte de la maquinaria de la síntesis de proteínas regula la actividad traduccional y puede ser el lugar de la acción de la insulina. (25)

En el ayuno no prolongado, la degradación de proteínas en el músculo se incrementa y los aminoácidos generados sirven de precursores para la gluconeogénesis. Se sabe que el músculo es muy activo en cuanto al metabolismo de proteínas y que es el tejido más importante de oxidación de los aminoácidos de cadena lateral ramificada. Ambos procesos se incrementan en el músculo de los animales en ayuno, ya que utilizan sus proteínas para obtener la energía necesaria. Los grupos amino generados son utilizados en la síntesis *de novo* de alanina y glutamina, los cuales son liberados del músculo en grandes cantidades. Estas respuestas que son aceptables en ayuno de corto plazo, serían dañinas en el caso de una deficiencia prolongada de proteínas, ya que el equilibrio homeostático trata de conservar los aminoácidos y proteínas esenciales. (8)

### 5.3. Efecto de la dieta deficiente en proteínas.

Debido a que la reducción de la proteólisis parece ser crítica para la preservación de las proteínas tisulares, se han realizado investigaciones donde se han determinado la

velocidad de circulación de las proteínas y el crecimiento de las ratas a diferentes tiempos de ser alimentadas con una dieta deficiente en proteína (DP) (1% de lactalbumina) ó con otra dieta de concentración normal de proteína (NP)(18% de lactalbúmina). En ratas jóvenes (menores de 150g) el crecimiento cesó, cuando el contenido proteico de la dieta es menor de 5-8%. Es evidente que los animales con dieta DP oxidan los aminoácidos más lentamente que los animales alimentados con la dieta normal.(27)

Se ha observado que después de 7 días de que las ratas han sido alimentadas con la dieta DP la velocidad de la degradación de las proteínas en el músculo, disminuye de 20 a 30% cuando el órgano fue incubado en presencia de cicloheximida para prevenir la síntesis proteica. De acuerdo a lo que se ha estudiado *in vivo*, la síntesis de proteínas en las ratas alimentadas con la dieta DP es 40% más lenta que en las ratas alimentadas con la dieta normal. El músculo cardíaco muestra cambios similares a los del músculo esquelético después de que los animales fueron alimentados durante 7 días con la dieta DP un decremento de 30% en la degradación de proteínas y de 42% en la síntesis proteica.(28)

Se sabe que el ingreso de aminoácidos reduce la proteólisis y promueve la síntesis de proteínas en un músculo normal. Aunque las velocidades absolutas de proteólisis son más bajas en los dos grupos de ratas, la degradación proteica es significativamente más bajas en el grupo de ratas con la dieta DP que en el grupo con la dieta normal. Se observó que en los músculos de los animales con la dieta DP el balance proteico neto es negativo, o sea la deficiencia de proteínas en la dieta causa una mayor reducción en la degradación proteica que en la síntesis. Esta observación sugiere que la proteólisis es menor en el músculo de las ratas alimentadas con dieta DP, y además se demostró que el contenido de las proteasas en los músculos de este grupo de ratas es menor. (27, 28)

Algunos estudios han demostrado adaptaciones metabólicas tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco cuando es necesario conservar los aminoácidos y las proteínas corporales durante el período en el que el suministro de proteínas fue insuficiente. Esta adaptación parece ocurrir en dos fases:

La respuesta inicial, que ocurre en las primeras 24 horas de la alimentación con la dieta DP, disminuye la síntesis proteica y el consumo de aminoácidos en el músculo, sin embargo la hidrólisis de las proteínas permanece constante. Los niveles decrecientes de insulina pueden ser una señal importante para la iniciación de estas adaptaciones y todas ellas causan la reducción en el crecimiento del músculo y la disminución de las proteínas musculares. Estas respuestas rápidas y la también rápida pérdida de proteínas del hígado y de otros órganos en la deficiencia de proteínas, probablemente se explican por la notable regulación homeostática de los aminoácidos plasmáticos, cuyas concentraciones se mantienen dentro de los valores normales a pesar de la reducción tan dramática (95%) de la ingesta de proteínas.(27)

Las respuestas lentas a la adaptación a la dieta deficiente en proteínas se hacen evidentes a las 72 h e incluyen la reducción en la hidrólisis de proteínas y la oxidación de aminoácidos en el músculo. Estos cambios llevan a la conservación de las proteínas del músculo a pesar de la disminución en la síntesis proteica. Las observaciones muestran que en las ratas DP también se reduce la excreción urinaria de 3-metilhistidina y en el caso de los humanos esa excreción es alterada por la mala nutrición tanto proteica como calórica y sugiere que la proteólisis miofibrilar, igual que toda la proteólisis, disminuye en esas condiciones.(28)

De esta manera la deficiencia proteica reduce la utilización de los aminoácidos de la sangre por el músculo en algunas vías complementarias como serían la oxidación de los aminoácidos de cadena ramificada y el uso de aminoácidos en la síntesis anaplerótica de intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos. (27, 28)

El músculo esquelético, el hígado y los riñones de las ratas con dieta DP experimentan una acumulación de proteínas cuando a estos animales se les alimenta posteriormente con la dieta normal. En los experimentos realizados por Tawa y colaboradores (27, 28) las ratas con dieta DP que recibieron posteriormente la dieta normal mostraron un crecimiento inusualmente rápido. Este crecimiento llamado "catch-up growth" también se ha observado en los humanos desnutridos. Esos estudios sugieren una rápida estimulación de la síntesis proteica en el músculo después de la renutrición, mientras que la degradación proteica permanece baja por 2 días. Esto puede ayudar a explicar el crecimiento rápido del músculo y de todo el cuerpo. Un mecanismo similar se propone para explicar el crecimiento del hígado y el riñón. Por otro lado la pérdida de peso corporal durante los primeros días de la dieta DP puede explicarse, en parte, por una reducción en la síntesis de proteínas en el músculo, que ocurre antes de que se presente la disminución en la hidrólisis. (27, 28)

En los grupos de ratas alimentadas con las dos dietas el cambio en la proteólisis precede a los cambios en la síntesis de proteínas, lo que sugiere que ambos procesos son regulados por distintos factores endocrinos. Probablemente el factor de mayor importancia en la disminución de la síntesis de proteínas del músculo durante el ayuno sean los bajos

niveles de insulina. La insulina y la leucina estimulan la síntesis de proteínas en el músculo esquelético principalmente facilitando la iniciación polipeptídica. Se sugiere que la reducción en la síntesis de proteínas en el músculo esquelético, el corazón, el hígado y los riñones de los animales alimentados con la dieta deficiente en proteínas se debe a una disminución tanto en el contenido de RNA ribosomal como en la iniciación polipeptídica.(27, 28)

Otras investigaciones han medido los diferentes procesos proteolíticos en el músculo incubado. La proteólisis intralisosomal, que demostró ser sensible a la metilamina y los inhibidores de proteasas lisosomales, disminuyó en 55-75% en el músculo de las ratas con dieta DP. Además los extractos de esos músculos demostraron baja actividad de las proteasas lisosomales, incluyendo las catepsinas B, H y C; carboxipeptidasas A y C, así como otras hidrolasas lisosomales. La disminución de la catepsina B y de la proteólisis se hace evidente a los 3 días de iniciar la alimentación con la dieta DP y ambas actividades vuelven a los valores normales tres días después de administrar la dieta normal.(28)

En el músculo mantenido en condiciones óptimas, del 80 al 90% de la proteólisis ocurre por la vía no lisosomal. En los músculos de las ratas con dieta DP, los procesos dependientes de ATP disminuyeron en un 40-60%. Aún si toda la proteólisis disminuye en el músculo de las ratas con dieta DP, la proteólisis dependiente de  $Ca^{2+}$  aumenta en un 66%, y la actividad de las calpains aumenta de 150 a 250%.(27, 28)

Cuando la ingesta de proteínas en la dieta es inadecuada, el organismo experimenta adaptaciones metabólicas que ayudan a conservar las proteínas y los aminoácidos. Los trabajos revisados en esta sección han demostrado que en el músculo aislado de las ratas

con la dieta DP se disminuye la proteólisis y esto se ve acompañado por una reducción en la oxidación de los aminoácidos esenciales.(27, 28)

#### 5.4. Efecto del embarazo y la lactancia.

En los estudios realizados, para comprobar el efecto del embarazo y la lactancia sobre el catabolismo de las proteínas en músculo generalmente se han utilizado ratas con diferentes niveles de alimentación. Las ratas que fueron alimentadas con dietas de alto porcentaje calórico durante embarazo y/o lactancia mostraron un porcentaje más alto de proteínas corporales. Por el contrario, las ratas que fueron alimentadas durante el embarazo con una dieta deficiente en proteína mostraron una pérdida de proteínas corporales. (14)

Durante la lactancia, la pérdida de proteínas corporales es mayor en las ratas alimentadas con una dieta baja en calorías, sin embargo, esta pérdida se observa también en los animales alimentados con una cantidad adecuada de proteínas. (14, 19)

Se ha observado además que los depósitos de grasa y proteínas acumulados durante el embarazo (reservas corporales) en las ratas alimentadas con una dieta rica en calorías, se catabolizan durante los 21 días de la lactancia. (14, 19)

En las ratas alimentadas con una dieta deficiente en proteínas durante el embarazo y la lactancia, las proteínas y los lípidos de los tejidos maternos se movilizan para satisfacer las necesidades energéticas durante la lactancia: se movilizan aproximadamente 81% de los lípidos y 16% de las proteínas corporales. (14)

## 5.5. Efecto de otros factores.

En pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD), causada por una falla genética, se observa una reducción en las proteínas musculares la cual se debe a un catabolismo excesivo de esas proteínas. Las catepsinas B y H pueden estar involucradas en la degradación de las proteínas dañadas del músculo. Se ha observado que si a ratones normales con actividad de las catepsinas B y H normal en el músculo, se les hace un trasplante del músculo con DMD, se observa un rápido aumento en la actividad de esas catepsinas. (43)

La hipoxia y la isquemia disminuyen  $k_{RNA}$  y  $k_d$  en los músculos cardíaco y esquelético tanto *in vivo* como *in vitro*.(117) Parece ser que la isquemia inhibe el crecimiento y la terminación de la cadena peptídica, mientras que la hipoxia inhibe adicionalmente la iniciación de la cadena peptídica. Estos resultados obtenidos en los estudios en ratas sugieren que el estado de oxidación-reducción tiene una importancia primaria en el control del intercambio de proteínas. El incremento en la relación de  $NADH / NAD^+$  parece estimular la  $k_c$  e inhibir la  $k_d$ .(118, 119)

La falta de peso simulada produce la atrofia muscular, la cual se relaciona con una activación de los tres procesos proteolíticos en el músculo, el sistema lisosomal, el no lisosomal dependiente de  $Ca^{2+}$ , y el no lisosomal dependiente de ATP y de ubiquitina, siendo este último el de mayor importancia. (26)

La adición del factor de necrosis tumoral o el transplante de células tumorales al músculo esquelético de ratas incrementó la proteólisis, que parece depender, como en la mayoría de los casos, del sistema dependiente de ATP y de la ubiquitina. (29)

## 6. Conclusiones:

Como se ha visto el catabolismo de proteínas en general y en el músculo en particular, juega un papel importante en los mamíferos.

En el catabolismo de proteínas en el músculo participan principalmente tres sistemas proteolíticos: el lisosomal, el no lisosomal dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y el no lisosomal dependiente de ATP y de ubiquitina. Este último proceso que es el más importante en diferentes condiciones donde los procesos catabólicos se ven aumentados involucra la participación de enzimas del complejo multicatalítico denominado proteasoma. (26, 29)

Actualmente el sistema proteolítico dependiente de la ubiquitina y el ATP constituye el objeto de la mayoría de las investigaciones, por lo que los resultados obtenidos pueden ser controvertidos, especialmente los datos que corresponden al número de subunidades del proteasoma y su peso molecular. (31, 34) También existen contradicciones en cuanto a la importancia de la proteólisis lisosomal, ya que los resultados en algunos trabajos muestran una participación limitada.

Las proteínas, que son hidrolizadas con mayor rapidez deben cumplir con ciertos "requisitos" como son la hidrofobicidad, su conformación, su tamaño o bien estar "marcadas" por ubiquitinación, oxidación, etc.

El catabolismo de las proteínas es regulado por una amplia gama de factores, entre las cuales la insulina parece ser la de mayor importancia, pero no se pueden descartar participación de la triyodotironina, los glucocorticoides, las catecolaminas y otras sustancias.

Otros factores fisiológicos como lo son: el ejercicio, el ayuno, la dieta, el embarazo y la lactancia ó enfermedades como el cáncer, la diabetes y otros problemas hormonales muestran un efecto sobre el catabolismo de las proteínas en el músculo. Aunque la mayoría de los experimentos se llevan a cabo en ratas es posible, de acuerdo con los expertos, extrapolar los resultados a los humanos.

## 7. Apéndice. Generalidades sobre los métodos utilizados para la medición de las velocidades de la degradación proteica.

Existen varias técnicas para las mediciones del intercambio proteico. Se dividen en dos grupos: técnicas no isotópicas e isotópicas. Entre los métodos relacionados con la medición de la degradación proteica, los más utilizados son la descomposición de las proteínas marcadas, el reciclamiento de isótopos, la descomposición de las marcas radioactivas en mezclas de proteínas, la determinación indirecta de las velocidades de hidrólisis proteica. (8, 9, 22)

La medición de las constantes de la velocidad de degradación de las proteínas intracelulares frecuentemente se dificulta para la interpretación debido a los problemas inherentes a las técnicas utilizadas. La mayoría de la técnicas dependen de las proteínas marcadas o las proteínas con los compuestos radioactivos (p.ej.  $^3\text{H}$ -leucina), sin embargo, se pueden quedar los compuestos no marcados, lo que afecta al resultado, ya que las técnicas se basan en la medición del tiempo en el cual las proteínas pierden la marca radioactiva. Sin embargo, el problema mayor es la capacidad de las proteínas recién sintetizadas de incorporar la marcación radioactiva, mientras que otras proteínas son degradadas, y por consecuencia al calcular la vida media se subestima. Por tanto, para estimar la vida media de muchas proteínas celulares se usan diferentes tipos de medición, y se han propuesto aproximaciones para minimizar el efecto de reutilización del marcaje. (8, 9)

Para la medición de la velocidad de degradación de proteínas *in vitro* se determinan las velocidades de liberación de la fenilalanina y la tirosina en presencia de cicloheximida o de puomicina (para la prevención de reincorporación de los aminoácidos a las proteínas). Este es uno de los métodos más simples y más utilizados para la determinación de la velocidad de la hidrólisis de proteínas en el músculo *in vitro*. La degradación de proteína miofibrilar se mide por la liberación de 3-metilhistidina, que está presente en la actina y la miosina del músculo esquelético. La 3-metilhistidina no se metaboliza ni se reutiliza para la síntesis proteica en músculo.(25)

Para la medición de la velocidad de degradación proteica *in vivo* se usan principalmente tres métodos. Uno de ellos se basa en la determinación de la diferencia entre la velocidad de síntesis y la de la degradación de proteínas. El segundo método se basa en la medición de la pérdida de la marcación radioactiva por las proteínas premarcadas. El tercer método incluye la infusión de los aminoácidos marcados y se basa en la dilución isotópica de los aminoácidos inyectados por los que se derivan de la degradación proteica. En las ratas y el hombre la 3-metilhistidina o sus derivados acetilados (derivados de la degradación de proteína miofibrilar) se excretan rápidamente y en forma cuantitativa por la orina, por lo que esta propiedad también se usa para la determinación de la velocidad de degradación de proteínas del músculo esquelético *in vivo*. (8, 9, 22)

Para los estudios del intercambio proteico, la regulación del metabolismo y del transporte de los aminoácidos se usan extensamente las preparaciones aisladas de músculo esquelético (tejido perfundido) (38) , últimamente también se usan los cultivos celulares. Pero el usar los tejidos perfundidos *in vitro* no refleja exactamente los procesos que ocurren *in vivo*. El mayor problema con el músculo perfundido es que este tiene el balance

de nitrógeno negativo, lo que no sucede en el músculo *in vivo*, cuya eficiencia de síntesis proteica es generalmente mayor y la velocidad de la degradación proteica es menor que *in vitro*. Estas diferencias pueden ser asociadas con la desaparición de las influencias físicas y humorales presentes *in vivo*. (25)

de nitrógeno negativo, lo que no sucede en el músculo *in vivo*, cuya eficiencia de síntesis proteica es generalmente mayor y la velocidad de la degradación proteica es menor que *in vitro*. Estas diferencias pueden ser asociadas con la desaparición de las influencias físicas y humorales presentes *in vivo*. (25)

## Referencias bibliográficas:

1. Aviles, F.X., Vendrell, J., Guasch, A., Coll, M. y Huber, R., 1993. Advances in metallo-procarboxypeptidases. Emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process. *Eur. J. Biochem.*, **211**: 381-389.
2. Beynon, R.J., Bond, J.S., 1986. Catabolism of intracellular protein: molecular aspects. *Am. J. Physiol.*, **251**: C141-C152.
3. Berg, T., Gjoen, T. y Bakke, O., 1995. Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem. J.*, **307**: 313-326.
4. Bromme, D., Klaus, J.L. y Okamoto, K., 1996. Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors. S<sub>2</sub>P<sub>2</sub> specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. *Biochem. J.*, **315**: 85-89.
5. Dahlmann, B., Kuehn, L. y Reinauer, H., 1995. Studies on the activation by ATP of the 26S proteasome complex from rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, **309**: 195-202.
6. Di Lisa, F., De Tullio, R. y Salamino, F., 1995. Specific degradation of troponin T and I by  $\mu$ -calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem. J.*, **308**: 57-61.
7. Ganong, W. F., 1992. Tejido excitable: músculo. *Fisiología Médica*, p.p. 56-73; México. Manual Moderno. 13 edición.
8. Garlick, P.J., 1980. Protein turnover in the whole animal and specific tissues. *Comprehensive Biochemistry*. Vol. 19B/1. p.p.77-152. (Florkin y Stotz, editores). Amsterdam. Elsevier Science Publishers Co.
9. Goldberg, A.L., Dice, J.F., 1974. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Ann. Rev. Biochem.*, **43/1**: 835-869.
10. Goldberg, A.L., John, A.C.St., 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Ann. Rev. Biochem.*, **45/2**: 747-803.
11. Sánchez, F., Nuñez, I., 1993. Fuentes de aminoácidos: transporte y vías centrales del metabolismo de aminoácidos. Herrera, E., *Elementos de Bioquímica*, p.p. 677-724, México. Interamericana. Mc Graw Hill.
12. Holzer, H., Heinrich, P.C., 1980. Control of proteolysis. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 63-91.

13. McIntyre, G.F., Godbold, G.D. y Erickson, A.H., 1994. The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *J. Biol. Chem.*, **269**: 567-572.
14. Kanto, U., Clawson, A., 1980. Effect of Energy Intake during Pregnancy and Lactation on Body Composition in Rats. *J. Nutr.*, **110**: 1829-1839.
15. Lockwood, T., 1985. Simultaneous response of myocardial contractility and a major proteolytic process to  $\beta$ -adrenergic-receptor occupancy in the Langendorff isolated perfused rat heart. *Biochem. J.*, **231**: 299-308.
16. Lockwood, T., 1988. Distinction between major chloroquine-inhibitable and adrenergic-responsive pathways of protein degradation and their relation to tissue ATP content in the Langendorff isolated perfused rat heart. *Biochem. J.*, **251**: 341-346.
17. Medina, R., Wing, S. y Goldberg, A., 1995. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem. J.*, **307**: 631-637.
18. Millward D.J., 1980. Protein degradation in muscle and liver. *Comprehensive Biochemistry, Vol. 19B/1*. pp. 153-232, (Florkin y Stotz, editores), Amsterdam. Elsevier Science Publishers Co.
19. Moore, B.J., Brasel, J.A., 1984. On cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation or no lactation, and recovery: effects on carcass composition in ad libitum-fed and food-restricted rats. *J. Nutr.*, **114**: 1548-1559.
20. Mykles, D., Haire, M., 1995. Branches - chain - amino - acid - preferring peptidase activity of the lobster multicatalytic proteinase (proteasome) and the degradation of miofibrillar protein. *Biochem. J.*, **306**: 285-291.
21. Roulet, A., Burgar, J. y Cardinaud R., 1993. The proteolytic susceptibility of specific sites in myosin light chains is modulated by the filament conformation. *Eur. J. Biochem.*, **216**: 89-101.
22. Schimke, R., 1970. Regulation of protein degradation in mammalian tissues. *Mammalian protein metabolism, Vol.4* pp. 177-228, (Munro, H.N., editor). New York. Academic Press.
23. Schimke, R., Doyle, D., 1970. Control of enzyme levels in animal tissues. *Ann. Rev. Biochem.*, **39**: 929-976.

24. Shang, F., Taylor, A., 1995. Oxidative stress and recovery from oxidative stress are associated with altered ubiquitin conjugating and proteolytic activities in bovine lens epithelial cells. *Biochem. J.*, **307**: 297-303.
25. Sugden, P.H., Fuller, S.J., 1991. Regulation of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *Biochem. J.*, **273**: 21-37.
26. Taillandier, D., Aurousseau, E. y Meynial-Denis, D., 1996. Coordinate activation of lysosomal,  $Ca^{2+}$ -activated and ATP- ubiquitin- dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem. J.*, **316**: 65-72.
27. Tawa, N.E., Goldberg, A.L., 1992. Suppression of muscle protein turnover and amino acid degradation by dietary protein deficiency. *Am. J. Physiol.*, **263**: E317-E325.
28. Tawa, N.E., Kettelhut, I.C. y Goldberg, A.L., 1992. Dietary protein deficiency reduces lysosomal and nonlysosomal ATP-dependent proteolysis in muscle. *Am. J. Physiol.*, **263**: E326-E334.
29. Wing, S., Haas, A. y Goldberg, A., 1995. Increase in ubiquitin - protein conjugates concomitant with increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem. J.*, **307**: 639-645.
30. Wing, S., Poonam, J., 1995. Molecular cloning, expression and characterization of a ubiquitin conjugation enzyme (E2<sub>17kD</sub>) highly expressed in rat testis. *Biochem. J.*, **305**: 125-132.
31. Hendil, K., Kristensen, P. y Uerkvitz, W., 1995. Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies. *Biochem. J.*, **305**: 245-252.
32. Alexeev, D., Bury, S., Turner, A. y Ogunjobi, O., 1994. Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: chemically synthesized and native ubiquitin fold into identical three-dimensional structures. *Biochem. J.*, **299**: 159-163.
33. Crawford, C., Brown, N. y Willis, A., 1993. Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin. *Biochem. J.*, **296**: 135-142.
34. Rivett, A., Sweeney, S., 1991. Properties of subunits of the multicatalytic proteinase complex revealed by the use of subunit - specific antibodies. *Biochem. J.*, **278**: 171-177.
35. Burge, V., Mainferme, F. y Wattiaux, R., 1991. Transient membrane association of the precursors of cathepsin C during their transfer into lysosomes. *Biochem. J.*, **275**: 797-800.
36. Salminen, A., Gottesman, M., 1990. Inhibitor studies indicate that active cathepsin L is probably essential to its own processing in cultured fibroblasts. *Biochem. J.*, **272**: 39-44.

37. Conner, G., 1989. Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography. *Biochem. J.*, **263**: 601-604.
38. Meynial-Denis, D., Mignon, M. y Foucat, L., 1993. Use of superfused rat skeletal muscle for metabolic studies: assessment of pH by  $^{31}\text{P}$  n.m.r. *Biochem. J.*, **293**: 399-405.
39. Djaballah, H., Rowe, A., Harding, S. y Rivett, A., 1993. The multicatalytic proteinase complex (proteasome): structure and conformational changes associated with changes in proteolytic activity. *Biochem. J.*, **292**: 857-862.
40. Rivett, A., 1993. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.*, **291**: 1-10.
41. Hennessey, E., Drummond, D. y Sparrow, J., 1993. Molecular genetics of actin function. *Biochem. J.*, **282**: 657-671.
42. Aanaghi, J., Hagmann, J. y Shaw, E., 1993. Affinity labelling of the  $\text{Ca}^{2+}$ - activated neutral proteinase (calpain) in intact human platelets. *Biochem. J.*, **289**: 93-99.
43. Takeda, A., Jimi, T. y Wakayama, Y., 1992. Demonstration of cathepsins B, H and L in xenografts of normal and Duchenne- muscular- dystrophy muscles transplanted into nude mice. *Biochem. J.*, **288**: 643-648.
44. Pliura, D., Bonaventura, B. y Smith, R., 1992. Comparative behaviour of calpain and cathepsin B toward peptidyl acyloxymethyl ketones, sulphonium methyl ketones and other potential inhibitors of cysteine proteinases. *Biochem. J.*, **288**: 759-762.
45. Ilian, M., Forsberg, N., 1992. Gene expression of calpains and their specific endogenous inhibitor, calpastatin in skeletal muscle of fed and fasted rabbits. *Biochem. J.*, **287**: 163-171.
46. Mach, L., Stuwe, K y Hagen, A., 1992. Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. *Biochem. J.*, **282**: 577-582.
47. Lehninger, A., 1988. *Bioquímica del músculo y de los sistemas motiles*. Bioquímica., p.p. 757-788, Barcelona. Worth Publishers. Ediciones Omega.
48. Strayer, L., 1990. *Contracción muscular y motilidad celular*. Bioquímica., Vol. 2, p.p. 927-954, Barcelona. Ed. Reverté. 3ª ed.
49. Seelig, A., Klotzel, P. y Kuehn, L., 1991. Molecular interaction of the proteasome (multicatalytic proteinase). *Biochem. J.*, **280**: 225-232.
50. Samis, J., Back, D. y Graham, E., 1991. Constitutive expression of calpain II in the rat uterus during pregnancy and involution. *Biochem. J.*, **276**: 293-299.

51. Wing, S., Chiang, H., Goldberg, A. y Dice, J., 1990. Proteins containing peptide sequences related to Lis-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle of fasted rat. *Biochem. J.*, **275**: 165-169.
52. Furuno, K., Goodman, M. y Goldberg, A., 1990. Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J. Biol. Chem.*, **265**: 8550-8557.
53. Hershko, A., Ciechanover, A., 1982. Mecanismos of intracellular protein breakdown. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**: 335-364.
54. Barrett, A.J., Kirschke, H., 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.*, **80**: 535-561.
55. Coetzer, T.H., Dennehy, K.M., Pike, R.N. y Dennison, C., 1995. Baboon (*Papio ursinus*) cathepsin L: purification, characterization and comparison with human and sheep cathepsin L. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **112**: 429-439.
56. Kirschke, H., Wiederanders, B., 1994. Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. *Methods Enzymol.*, **244**: 500-511.
57. Pontremoli, S., Melloni, E. y Salamino, F., 1982. Cathepsin M: a lysosomal proteinase with aldolase-inactivating activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**: 376-385.
58. Dolens, I., Turk, B. y Pungercic, G., 1995. Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *J. Biol. Chem.*, **270**: 21626-21631.
59. Mann, D.F., Shah, K., Stein, D. y Snead, G., 1984. Protein hydrophobicity and stability support the thermodynamic theory of protein degradation. *Biochem. Biophys. Acta.*, **788**: 17-22.
60. Kameyama, T., Etlinger, J.D., 1979. Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. *Nature (London)*, **279**: 344-346.
61. Jacobs, F.A., Bird, R.C. y Sells, B.H., 1985. Differentiation of rat myoblasts. Regulation of turnover of ribosomal proteins and their mRNAs. *Eur. J. Biochem.*, **150**: 255-263.
62. Lewis, S.E., Anderson, P. y Goldspink, D.F., 1982. The effects of calcium on protein turnover in skeletal muscles of the rat. *Bioch. J.*, **204**: 257-264.
63. Bandman, E., Strohman, R.C., 1982. Increased  $K^+$  inhibits spontaneous contractions and reduces myosin accumulation in cultured chick myotubes. *J. Cell. Biol.*, **93**: 698-704.

64. Howard, G., Steffen, J.M. y Geodhegan, T.E., 1989. Transcriptional regulation of decreased protein synthesis during skeletal muscle unloading. *J. Appl. Physiol.*, **66**: 1093-1098.
65. Thomason, D.B., Biggs, R.B. y Booth, F.W., 1989. Protein metabolism and  $\beta$ -myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, **257**: R300-R305.
66. Munro, S., Pelham, H.R.B., 1985. Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of *Drosophila* hsp 70. *EMBO J.*, **3**: 3087-3093.
67. Levine, R.L., 1983. Oxidative modification of glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.*, **258**: 6093-6100.
68. Offermann, M.K., McKay, M.J., Marsh, M.W. y Bond, J.S., 1984. Glutathione disulfide inactivates, destabilizes and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6-biphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.*, **259**: 8886-8891.
69. Beynon, R.J., 1980. The role of protein modification in the control of enzyme degradation. The Enzymology of post-translational modifications, p.p. 363-385, (Freedman, R.B. y Hawkins, H., editores), London: Academic.
70. Bird, J.W.C., Schwatz, W.N. y Spanier, A.M., 1978. Cathepsins B and D: proteolytic activity and ultrastructural localization in skeletal muscle. Protein turnover and lysosomal function, p.p. 589-604, (Segal, H.L.; Doyle, D.J., editores), New York: Academic.
71. Morkin, E., 1970. Postnatal muscle fiber assembly localization of newly synthesized myofibrillar proteins. *Science*, **167**: 1499-1501.
72. Fuller, S.J., Sugden, P.H., 1986. Stimulation of protein synthesis, glucose uptake and lactate output by insulin and adenosine deaminase in the rat heart. *FEBS Lett.*, **201**: 246-250.
73. Gulve, E.A., Dice, J.F., 1989. Regulation of protein synthesis and degradation in L8 myotubes. *Biochem. J.*, **260**: 377-387.
74. Janeczko, R.A., Etlinger, J.D., 1984. Inhibition of intracellular proteolysis in muscle cultures by multiplication-stimulating activity. *J. Biol. Chem.*, **259**: 6292-6297.
75. Fuller, S.J., Sugden, P.H., 1989. Protein synthesis in rat cardiac myocytes is stimulated at the level of translation by phorbol esters. *FEBS Lett.*, **247**: 209-212.
76. Rannels, D.E., Kao, R. y Morgan, H.E., 1975. Effect of insulin on protein turnover in heart muscle. *J. Biol. Chem.*, **250**: 1694-1701.

77. Preedy, V.R., Garlick, P.J., 1985. The effect of glucagon administration on protein synthesis in skeletal muscles, heart and liver *in vivo*. *Biochem. J.*, **228**: 575-581.
78. Preedy, V.R., Garlick, P.J., 1988. Inhibition of protein synthesis by glucagon in different rat muscles and protein fractions *in vivo* and in the perfused rat hemi-corpus. *Biochem. J.*, **251**: 727-732.
79. Nair, K.S., Halliday, D. y Matthews, D.E., 1987. Hyperglucagonemia during insulin deficiency accelerates protein catabolism. *Am. J. Physiol.*, **253**: E208-E213.
80. Goodman, M.N., 1987. Differential effects of acute changes in cell  $Ca^{2+}$  concentration on myofibrillar and non-myofibrillar protein breakdown in the rat extensor digitorum longus muscle *in vitro*. *Biochem. J.*, **241**: 121-127.
81. Rodemann, H.P., Waxman, L. y Goldberg, A.L., 1982. The stimulation of protein degradation in muscle by  $Ca^{2+}$  is mediated by prostaglandin  $E_2$  and does not require the calcium-activated protease. *J. Biol. Chem.*, **257**: 8716-8723.
82. Grinstein, S., Rotin, D. y Mason, M.J., 1989.  $Na^+/H^+$  exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta*, **988**: 73-97.
83. Goodman, M.N., 1987. Acute alterations in sodium flux *in vitro* lead to decreased myofibrillar protein breakdown in rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, **247**: 151-156.
84. Smith, D.M., Fuller, S.J. y Sugden, P.H., 1986. The effects of lactate, acetate, glucose, insulin, starvation and alloxan-diabetes on protein synthesis in perfused rat hearts. *Biochem. J.*, **236**: 543-547.
85. Fuller, S.J., Gaitanaki, C.J. y Sugden, P.H., 1989. Effects of increasing extracellular pH on protein synthesis and protein degradation in the perfused working rat heart. *Biochem. J.*, **259**: 173-179.
86. Davis, T.A., Karl, I.E., 1986. Response of muscle protein turnover to insulin after acute exercise and training. *Biochem. J.*, **240**: 651-657.
87. Dohm, G.L., Kasperek, G.J., Tapscott, E.B. y Beecher, G.R., 1980. Effect of exercise on synthesis and degradation of muscle protein. *Biochem. J.*, **188**: 255-262.
88. Kasperek, G.J., Snider, R.D., 1989. Total and miofibrillar protein degradation in isolated soleus muscle after exercise. *Am. J. Physiol.*, **257**: E1-E5.
89. Preedy, V.R., Smith, D.M. y Sugden, P.H., 1986. A comparison, of rates of protein turnover in rat diaphragm *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.*, **233**: 279-282.

90. Flaim, K.E., Copenhaver, M.E. y Jefferson, L.S., 1980. Effects of diabetes on protein synthesis in fast- and slow-twitch rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, **239**: E88-E95.
91. Pain, V.M., Albertse, E.C. y Garlick, P.J., 1983. Protein metabolism in skeletal muscle, diaphragm, and heart of diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, **245**: E604-E610.
92. Curfman, G.D., O'Hara, D.S., Hopkins, B.E. y Smith, T.W., 1980. Suppression of myocardial protein degradation in the rat during fasting. *Circ. Res.*, **46**: 581-589.
93. Haverberg, L.N., Deckelbaum, L., Bilmazes, C., Munro, H.N. y Young, V.R., 1975. Myofibrillar protein turnover and urinary N<sup>15</sup>-methylhistidine output. *Biochem. J.*, **152**: 503-510.
94. Ashford, A.J., Pain, V.M., 1986. Effect of diabetes on the rates of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscle and liver *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **261**: 4059-4066.
95. Pain, V.M., Garlick, P.J., 1974. Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **249**: 4510-4514.
96. Odedra, B.R., Dalal, S.S. y Millward, D.J., 1982. Muscle protein synthesis in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochem. J.*, **202**: 363-368.
97. Bennet, W.M., Connacher, A.A., 1990. Euglycemic hyper insulinemia augments amino acid uptake by human leg tissues during hyperaminoacidemia. *Am. J. Physiol.*, **259**: E185-E194.
98. Jepson, M.M., Bates, P.C. y Millward, D.J., 1988. The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. *Br. J. Nutr.*, **59**: 397-415.
99. Brown, J.G., Bates, P.C., Holliday, M.A. y Millward, D.J., 1981. Thyroid hormones and muscle protein turnover. *Biochem. J.*, **194**: 771-782.
100. Flaim, K.E., Li, J.B. y Jefferson, L.S., 1978. Effects of thyroxine on protein turnover in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, **235**: E231-E236.
101. Parmacek, M.S., Decker, M.L., 1986. Lysosomal changes during thyroxine-induced left ventricular hypertrophy in rabbits. *Am. J. Physiol.*, **251**: C737-C747.
102. Zeman, R.J., Bernstein, P.L., Ludemann, R. y Etlinger, J.D., 1986. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein turnover in skeletal muscle by thyroxine. *Biochem. J.*, **240**: 269-272.
103. Rannels, S.R., Jefferson, L.S., 1980. Effects of glucocorticoids on muscle protein turnover in perfused rat hemi-corpus. *Am. J. Physiol.*, **238**: E564-E572.

104. McGrath, J.A., Goldspink, D.F., 1982. Glucocorticoid action on protein synthesis and protein breakdown in isolated skeletal muscles. *Biochem. J.*, **206**: 641-645.
105. Kelly, F.J., Goldspink, D.F., 1982. The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem. J.*, **208**: 147-151.
106. Tomas, F.M., Young, V.R. y Munro, H.N., 1979. Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown *in vivo* in rats, as measured by urinary excretion of N<sup>15</sup>-methylhistidine. *Biochem. J.*, **178**: 139-146.
107. Oedra, B.R., Millward, D.J., 1982. Effect of corticosterone treatment on muscle protein turnover in adrenalectomized rats and diabetic rats maintained on insulin. *Biochem. J.*, **204**: 663-672.
108. MacLennan, P.A., Brown, R.A. y Rennie, M.J., 1987. A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett.*, **215**: 187-191.
109. Wu, G., Thompson, J.R., 1990. The effect of glutamine on protein turnover in chick skeletal muscle *in vitro*. *Biochem. J.*, **265**: 593-598.
110. MacLennan, P.A., Smith, K., Weryk, B., Watt, P.W. y Rennie, M.J., 1988. Inhibition of protein breakdown by glutamine in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett.*, **237**: 133-136.
111. Ezrailson, E.G., Entman, M.L. y Garber, A.J., 1983. Adrenergic and serotonergic regulation of skeletal muscle metabolism in the rat. *J. Biol. Chem.*, **258**: 12494-12498.
112. Nie, Z.T., Wallberg-Henriksson, H., 1989. Effects of adrenaline and prior exercise on the release of alanine, glutamine and glutamate from incubated rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **136**: 395-401.
113. Yang, Y.T., McElligott, M.A., 1989. Multiple actions of  $\beta$ -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem. J.*, **261**: 1-10.
114. Reeds, P.J., Hay, S.M., Dorwood, P.M. y Palmer, R.M., 1986. Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effects on muscle protein biosynthesis. *Br. J. Nutr.*, **56**: 249-258.
115. Fuller, S.J., Sugden, P.H., 1988. Acute inhibition of rat heart protein synthesis *in vitro* during  $\beta$ -adrenergic stimulation or hypoxia. *Am. J. Physiol.*, **255**: E537-E547.

116. Nair, K.S., Welle, S.L., Hallyday, D y Campbell, R.G., 1988. Effect of  $\beta$ -hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *J. Clin. Invest.*, **82**: 198-205.
117. Bylund-Fellenius, A.C., Ojamaa, K.M. y Flaim, K.E., 1984. Protein synthesis versus energy state in contracting muscles of perfused rat hindlimb. *Am. J. Physiol.*, **246**: E297-E305.
118. Hedden, M.P., Buse, M.G., 1982. Effects of glucose, pyruvate, lactate, and amino acids on muscle protein synthesis. *Am. J. Physiol.*, **242**: E184-E192.
119. Tischler, M.E., 1980. Is regulation of proteolysis associated with redox-state changes in rat skeletal muscle? *Biochem. J.*, **192**: 963-966.