

Agonista β -adrenergiko desberdinei emandako erantzun lipolitikoa txerrien adipozitoetan

E. Simón¹, M. Urdangarin¹, J.A. Martínez², A.S. Del Barrio¹
eta M.P. Portillo¹

¹Elikadura eta Bromatologia. Farmazia Fakultatea. EHU. Gasteiz

²Fisiologia eta Elikadura Saila. Nafarroako Unibertsitatea. Iruñea

Abstract

It has been widely reported the “repartitioning” effect of β -adrenergic agonists in different livestock animals. However, the possible mechanisms involved are still unclear. Thus, the lipolytic effect of various β -agonists, dobutamine, clenbuterol, metaproterenol and BRL 37344, was studied in pig adipocytes in order to clarify their action on lipid metabolism. Dobutamine and metaproterenol produced a high lipid mobilization, whereas BRL 37344 showed a lower lipolytic activity. In contrast, clenbuterol failed to induce glycerol release. The presence of Adenosine deaminase 0.04 U/mL, (a non lipolytic concentration) was needed as a permissive agent for these lipolytic effects. These data showed that pig adipose tissue presents particular characteristics for lipid mobilization with different regulation of the three β -adrenoceptors subtypes.

Laburpena

Abere-mota ezberdinetan β -agonista adrenergikoen eragin “banatzailea” sakonki adierazi da. Hala ere, gertatutako mekanismoak ez dira erabat ezagutzen oraindik. Hau dela eta, dobutamina, klenbuterola, metaproterenola eta BRL 37344 β -agonisten efektu lipolitikoa ikertu zen txerrien adipozitoetan, lipidoen metabolismoan duten eragina azaltzeko asmoz. Dobutamina eta metaproterenolak sortzen zuten lipidoen mobilizazioa nabarmena izan arren, BRL 37344-ren aktibitate lipolitikoa apalagoa izan zen. Klenbuterola, berriz, ez zen glizerola sortarazteko gai izan. Eragin lipolitiko hauek gertatzeko, Adenosina deaminasaren 0,04 U/mL (lipolitikoa ez den kontzentrazioa) erabiltzea beharrezkoa zen, agente permisibo gisa. Lortutako emaitzek txerrien ehun adiposoak berezko ezaugarriak dituela lipidoen mobilizazioan erakusten dute hiru β -adrenorrezeptore ezberdinentzat erregulazio-mota berezi bat izanik.

SARRERA

Katekolaminek ehun adiposoan lipolisi-prozesua sortarazten dute, bi motako subtipotan (β_1 , β_2) klasifikaturik dauden errezeptore espezifikoekin elkartzen direnean (Lands *et al*, 1967). Honek, zelula-barneko AMPc-aren maila igotakoan hormonen eraginpean dagoen lipasa aktibatzen du. Lipolisiaren ondorioz, gantzak eratzen dituzten triglizeridoak gantz-azido eta glizerolera hidrolizatzen dira (Galitzky *et al*, 1993).

Agonista β -adrenergikoak katekolaminen gisako eraginak dituzten substantzien taldearen barnean daude. Bestalde, produktu hauek proteinen metabolismoa eraldatzeko gaitasuna dutela baieztatu da gihar-masa handituz (Pascual *et al*, 1993; Del Barrio *et al*, 1994; Sota *et al*, 1994; Martínez *et al*, 1994).

Hori dela eta, animalia ekoizpenean izan dezaketen erabilera ikertzen ari dira. Horregatik, "banatzaile" ezaugarria duten agenteak erabiliz, gorputzaren konposizioa aldatzea lortuko litzateke eduki proteikoaren igoera eta gantzen pilaketaren beherakadaren bidez (Schiavetta *et al*, 1990; Spurlock *et al*, 1994; Nash *et al*, 1994; Cai *et al*, 1994).

Aipatu diren bi subtipoetako errezeptore β -adrenergikoen existentzia adierazi da txerrien ehun adiposoan. Bestalde, azken urte hauetan beta-errezeptore mota berria azaldu da, β_3 edo β -"atipiko" delakoa, animalia espezie desberdinen ehun eta organo batzuetan; batez ere, ehun adiposo zurian (Lafontan *et al*, 1990).

Beraz, lan honetako helburua β_1 -agonista espezifiko baten, beste β_2 -agonista espezifiko baten eta β_1/β_2 agonista mistoaren aktibitate lipolitikoa txerrien ehun adiposoan *in vitro* neurtzea izan da. Era berean, β_3 -agonista espezifikoren batek sortarazten

duen efektu lipolitikoa ikertu da. Agertzekotan, agonista β_3 -adrenergikoek edo β -"atipikoek" animalia ekoizpenean aplikatzeko bide berria zabalduko lukete, β -adrenergiko klasikoek (β_1 , β_2) bihotzean sortzen dituzten kalteak agertuko ez lirатеkeelako, bihotz-ehunean β_3 -errezeptoreak ez daude eta (Krief *et al*, 1993).

MATERIALA ETA METODOAK

Osansutsuak eta 70 kilo inguru zituzten sei txerri eme erabili ziren lan honetan. Animaliak hil eta galdarraztatu ondoren, azalazpiko ehun adiposoaren laginak lortu ziren eta 37 °C-ra Krebs-Ringer-Bikarbonate-Albumina (KRBA) tanpoian gorde ziren laborategira heldu arte eta analisi guztiak berehalaxe egin ziren.

Adipozitoen isolamendua Rodbellen metodoari (1964) aldaketa batzuk eginez (Langin *et al*, 1991) burutu zen. Horretarako, ehuna kolagenasa entzimaz (1 mg/ml; 37 °C) liseritu zen KRBA bufferrean, eta 7,4 pH-ra 100 mL tanpoitan behien seroko albumina (BSA V)-ren 3,5 g eta glukosaren 0,6 mmol daudelarik.

Aktibitate lipolitikoa neurtzeko asmoz, adipozitoak 37 °C-ra 90 minutuz KRBA ingurunean inkubatu ziren. Inkubazio-inguruak saiatutako β -agonista desberdinen 10 μ L, 10⁻⁸ M-tik 5·10⁻⁵ M-tarako kontzentrazio-mailan eta 0,04 U/ml Adenosina Deaminasa (ADA)-ren 10 μ L zituen.

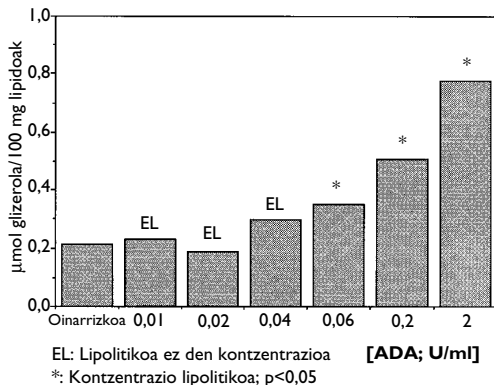
Eratutako glizerola espektrofotometrikoki neurtu zen Wieland metodoa (1957) aldaketa txiki batzuekin (Langin *et al*, 1991) erabiliz. Emaitzek lipido guztien 100 mg-tik sortutako glizerola erakusten zuten. Lipidoen kopurua grabimetri teknika bidez determinatu zen hauek erauzki ostean, Dole eta Meinertzen metodoa (1960) erabiliz.

Lilly Laborategiko dobutamina (Dobutrex®) eta SIGMAko klenbuterola erabili ziren; metaproterenola eta BRL 37344, Boehringer-Ingelheim-ren (Bartzelona, Espainia) eta Smithkline Beecham-ren (Madril, Espainia) doako emariak izan ziren, hain zuzen. Ikertutako ehun adiposoa Gasteizko Udal-hiltegian hildako txerrietatik lortu zen.

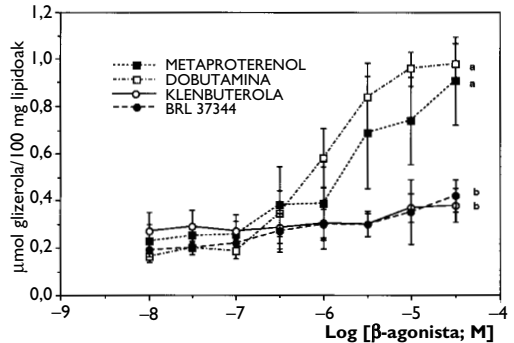
Agonista β -adrenergiko bakoitzaren gutxienezko kontzentrazio lipolitikoa zehazteko emaitzen tratamendu estadistikoa Student-en “t” testa erabiliz egin zen, eta estatistikoki ontzat hartu ziren kontzentrazio-taldeen arteko ezberdintasunak; $p < 0,05$ zutenak.

EMAITZAK

ADA kontzentrazio desberdinez saiakuntzak egin ziren, “onargari” eta beharrezkoa zen efektua lortzeko egokiena zen kontzentrazioa berezko efektu lipolitikoa sortarazi gabe finka zedin. Beraz, 0,04 U/mL-ko ADA-kopurua aukeratu zen (1. irudia).



1. irudia. Txerri-adipozitoetan saiaturako Adenosina Deaminasa (ADA)-ren kontzentrazio bakoitzaren *in vitro* efektu lipolitikoa.



a,b: Letra desberdinez idatzita dauden gehienezko efektuaren batezbesteko balioak estatistikoki ontzat hartu ziren.

2. irudia. Erabilitako β -agonista adrenergikoen efektu lipolitikoei dagokien kontzentrazioa/erantzuna kurba.

Erabili ziren kontzentrazioetan aztertutako lau agonista β -adrenergikoei erantzun lipolitiko ezberdinak eman zituzten (2. irudia). Dobutamina potentzia handieneko bezala azaldu zen metaproterenola eta BRL 37344-ren aurretik. Bestalde, klenbuterolak ez zuen efektu lipolitikorik erakutsi (Taula).

β -agonista adrenergikoa	M	%
Dobutamina	10^{-6}	286,2
Klenbuterola	—	100,0
Metaproterenol	$5 \cdot 10^{-6}$	301,3
BRL 37344	$5 \cdot 10^{-6}$	223,4

Produktu hauek, eraginkortasuna ere desberdina erakutsi zuten, $5 \cdot 10^{-5}$ M-ra neurtutako haien gehienezko efektuetan balio desberdinak aurkitu zirelako. Bide honetan, dobutamina eta metaproterenolak sortarazi zuten glizerolaren kopurua klenbuterolak eta BRL 37344ak eragindakoa baino handiagoa izan zen, estatistikoki adierazgarriak ziren diferentziak egon zirelarik. Dena den, β_1 -agonista espezifikoaren eraginkortasuna agonista mistoak zuenaren parekoa izan zen; bien artean ezberdintasun nabarmenik ez baitzen agertu (2. irudia eta Taula).

EZTABAIDA

Lipidoen metabolismoaren erregulazio β -adrenergikoa zabal aztertu da. Honela, erantzun lipolitikoetan finkatu diren ezberdintasunen zergatien artean erabilitako β -agonista mota, espeziea, adina, sexua, ehun-kokapena, etab. daude (Rule *et al*, 1987; Langin *et al*, 1992; Pascual *et al*, 1993).

Baina, diferentzia hauen barne-mekanismoak ez dira argiro azaldu; emaitza kontrasesankorrak argitaratu baitira (Peterla & Scanes, 1990; Liu *et al*, 1994).

Animali ekoizpenerako erabiltzen diren espezieen artean, β -adrenergikoei erantzun lipolitikorik urriena ematen diena txerri-azienda da. Efektua indartzeko, ADA edo Teofilina erabili beharra dago, agente onartzaile gisa, substantzia hauek erabili gabe eginiko aurreko saiakuntza batek egiaztatu zuenez (datuak ez dira erakusten).

Adipozitoek fisiologikoki sortzen duten adenosinak lipolisia eragozten du zelula-barneko AMPc-aren kontzentrazioa txikiagotuz. ADA adenosina hau desaminatzen aritzen da. Hori dela eta, esandako desaminazioak adenosina bere errezeptorera elkartzea ezgaitu egiten du eta horregatik ez du bere eragin antilipolitikoa burutzen.

Bestalde, ADAk kontzentrazio dextentetan erabiltzen denean berezko efektu lipolitikoa du. Dena dela, ikasitako bibliografian datu batzuk izan arren (Mills *et al*, 1990), bere eragin lipolitikoa *in vitro* neurtu zen 0,01 U/mL eta 2 U/mL bitarteko kontzentrazio-mailen saiakuntza eginez. ADA lipolitikoa zen kontzentrazioa 0,06 U/mL zela baieztatu zenez, adipozitoak β -agonistekin inkubatzeko aurreko kontzentrazioa, hau da, 0,04 U/mL erabiltzea erabaki zen.

Lehen aipatu denez, erantzun lipolitikoan ehunen arteko ezberdintasunak daude eta

diferentzia hauek nabarmenagoak dira txerrien ehun adiposoan, ondorio garrantzitsuak azaleko ehunetan bakarrik agertzen dituztelarik (Liu *et al*, 1989; Mills & Liu, 1990). Ikerketa hau larruazpiko ehun adiposoan burutu zen β -agonista ezberdin batzuk erabiliz.

Aztertutako β -adrenergikoez esan beharra dago, dobutamina β_1 -errezeptoretara espezifikoki elkartzen dela, klenbuterola β_2 -errezeptoretara atxikitzen dela eta metaproterenola agonista mistoa dela; bi errezeptoretara elkartzeko gai baita. Bide honetan BRL 37344ak, azken urte hauetan sortu den substantzia berriak, β_3 -errezeptoreengan eragina sortzeko gai dela esan behar da, nahiz eta errezeptore klasikoei erabilitako kontzentrazioetan ez elkartu (Mitchell *et al*, 1994).

Produktu hauen aktibitate lipolitikoa neurtzeko erabili ziren parametroak potentzia (hau da, lortutako efektu handiena $5 \cdot 10^{-5}$ M kontzentrazioan) eta eraginkortasuna (hau da, kontzentrazio lipolitiko txikiena) izan ziren. Saiakuntzan erabilitako kontzentrazio altuena $5 \cdot 10^{-5}$ M zen; balio handiagoak errezeptoreetatik hautakortasuna galarazten baitzuen.

Dobutaminak sorturiko efektuek, β_1 -errezeptoreak lipidoen mobilizazio adrenergikoan inplikaturik zeudela adierazten zuten. Nahiz eta txerrien ehun adiposoan β_2 -errezeptoreak zeudela frogatuta egon (Countinho *et al*, 1991), klenbuterolak ez zuen erantzun lipolitikorik eman. Datu hauek, argitaratutako beste lan batzuekin ados zeudelarik (Liu & Mills, 1989; Mitchell *et al*, 1994), substantzia honek errezeptoreekin kidetasun apala duelako edo β_2 -errezeptoreek AMPc-ak sortzen duen kasakada lipolitikoarekin duten elkartasuna txikia delako azal zitezkeen. Aipatutako hipotesi hauek metaproterenolaren kasua argi

zezaketan, zeinak, dobutamina besteko eraginkortasuna izan arren, potentzia txikiagoa baitzuen, errezeptore mota biek (β_1 eta β_2 k) eragiten zutelako.

Saiakuntzarako animalia espezie anitzengan β_3 edo β -atipiko osagaiek duten garrantzia azaldu da eragin adrenergikoei emandako erantzun lipolitikoan. Hala ere, ekoizpenerako animaliangan ez dira argiro sailkatu. Beraz, β_3 -agonista berrien ikerketak interesgarriak lirateke animalia ekoizpenean eta giza klinikan izango lituzketen aplikazioengatik. Ildo honetan, BRL 37344-a, β_3 -agonista klasikoek adinako potentzia eta eraginkortasuna ez izan arren, agente lipolitiko gisa aritu zen.

Emaizta hauek β -agonista adrenergikoak txerri-aziendan gantzen edukia behar-kada lortzeko substantzia lagungarriak izan

daitezkeela ondorioztatuko lukete. Dena den, ekintza honetan inplikaturik dauden bitartekoei nahiz mota ezberdineko β -erzeptoreen jokaerari buruzko lan zehatzagoak egitea beharrezkoa da.

ESKERONEZ

CICYT (GAN-91/CO2)ari eta UPV/EHU-101.123-EA142/94ari finantzaketak eta Smithkline Beecham Laborategiei BRL 373444 ematea eskertzen dizkiegu. Gasteizko Udal-hiltegiko Albaitari Zerbitzuari ere eskerrak ematen dizkiogu lagin biologikoak emateagatik. Azkenik, eskerrak Euskara Teknikoan emandako laguntzagatik Maialen Sarasua andereari.

BIBLIOGRAFIA

- CAI, Y., ZIMMERMAN, DR. & EWAN, RC.; "Diurnal variation in concentrations of plasma urea nitrogen and aminoacids in pigs given free access to feed or fed twice daily"; J.Nutr. 124: 1088-1093, (1994).
- COUNTINHO, L.L., BERGEN, W.G., MERKEL, R.A. & SMITH II, C.K.; "Quantitative characterization of beta-adrenergic receptor subtypes in porcine adipocytes"; Comp. Biochem. Physiol. 101C: 481-485, (1992).
- DEL BARRIO, A.S., GARCIA-CALONGE, M.A., PORTILLO, M.P. & MARTINEZ, J.A.; "Muscle and liver cathepsin A activity in lambs given the β -adrenergic agonist salbutamol"; Sci. Aliments. 14: 517-522, (1994).
- DOLE, V.P. & MEINERTZ, H.; "Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues"; J.Biol.Chem. 235: 2595-2599, (1960).
- GALITZKI, J., REVERTE, M., PORTILLO, M.P., CARPENE, C., LAFONTAN, M. & BERLAN, M.; "Coexistence of β_1 -, β_2 and β_3 adrenoceptors in dog fat cell and their differential activation by catecholamines"; Am. J. Physiol. 264: E403-E412, (1993).
- KRIEF, S., LÖNNQUIST, F., RAIMBAULT, S., BAUDE, B., VAN SPRONSEN, A., ARNER, P., DONNY STROSBERG, A., RICQUIER, D. & EMORINE, L.J.; "Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man"; J. Clin. Invest. 91: 344-349, (1993).
- LANDS, A.M., ARNOLD, A., McAULIFF, J.P., LUDUENA, F.P. & BROWN, T.G.; "Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines"; Nature 214: 597-598, (1967).

- LAFONTAN, M., LANGIN, PORTILLO, M.P., D., SAULNIER-BLACHE, J.S., QUIDEAU, N. & VALET, P. : "Regulation of lipolysis by catecholamines and neuropeptides"; In: Oomura, Y., Tarui, S., Inoue, S. & Shimazu, T. (Eds), Progress in Obesity Research 1990. John Libbey, Londres, 245-256.orr. (1990).
- LANGIN, D., PORTILO, M.P., DAUZATS, M.& LAFONTAN, M. ; "Drop in the atypical β -adrenergic response and modification of the β/a_2 -adrenoceptor balance in fat cells from aging rabbits"; Endocrinology 130: 307-315, (1992).
- LANGIN, D., PORTILLO, M.P., SAULNIER-BLACHE, J.S. & LAFONTAN, M.; "Coexistence of three b-adrenergic receptor subtypes in white fat cells of various mammalian species"; Eur. J. Pharmacol. 199: 291-301, (1991).
- LIU, C.Y. & MILLS, S.E.; "Determination of the affinity of ractopamine and clenbuterol por the beta-adrenoceptor of the porcine adipocyte"; J. Anim. Sci. 67: 2937-2942, (1989).
- LIU, C.Y., BOYER, J.L. & MILLS, S.E.; "Acute effects of beta-adrenergic agonists on porcine adipocyte metabolism in vitro"; J. Anim. Sci. 67: 2930-2936, (1989).
- LIU, C.Y., GRANT, A.L., KIM, K.H., JI, S.Q., HANCOCK, D.L., ANDERSON, D.B., MILLS, S.E.; "Limitations of ractopamine to affect adipose tissue metabolism in swine"; J. Anim. Sci. 72: 62-67, (1994).
- MARTINEZ, J.A., GARCIA-CALONGE, M.A., SIMON, E., DEL BARRIO, A.S. & PORTILLO, M.P.; "Modification in the lipolytic response to β_1 , β_2 and β_3 -adrenergic agonists after the administration of a non-selective β -agonist"; Proc. Nutr. Soc. 54 (argitaratzeko)
- MILLS, S.E. 7 & LIU, C.G. ; "Sensitivity of lipolysis and lipogenesis to Dibutyryl-cAMP and b-adrenergic agonists in swine adipocytes in vitro"; J. Anim.Sci. 68 : 1017-1023, (1990).
- MITCHELL, A.D., STELE, N.C., SOLOMON, M.B., ALILA, H.W., LINDSEY, T.O. & CRACKNELL, V.; "Influence of dietary background on the response of pigs to the β -adrenergic agonist BRL 47672"; J. Anim. Sci. 72:1516-1521, (1994).
- NASH, J.E., ROCHA, H.J.G., BUCHAN, V., CALDER, G.A., MILNE, E., QUIORKE, J.F., LOBLEY, G.E.; "The effect of acute and chronic administration of the β -agonist, cimaterol, on protein synthesis in ovine skin and muscle"; Br. J. Nutr. 71: 501-513, (1994).
- PASCUAL, M., DEL BARRIO, A.S., PORTILLO, M.P., MARTINEZ, J.A. & LARRALDE, J.; "Tissue protein turnover in animals treated with the mixed b-agonist metaproterenol: influence of dose, route and pattern of administration"; Biochimie 75: 879-883, (1993).
- PETERLA, T.A. & SCANES, C.G. ; "Effect of b-adrenergic agonists on lipolysis and lipogenesis by porcine adipose tissue in vitro"; J. Anim. Sci. 68: 1024-1029, (1990).
- RODBELL, M.; "Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis"; J. Biol. Chem. 239: 375-380, (1964).
- RULE, D.C., SMITH, S.B. & MERSMANN, H.J.; "Effects of adrenergic agonists and Insulin on porcine adipose tissue lipid metabolism in vitro"; J. Anim. Sci. 65 :136-149, (1987).
- SCHIAVETTA, A.M., MILLER M.F., LUNT, D.K., DAVIS, S.K. & SMITH, S.B.; "Adipose tissue cellularity and muscle growth in young steers fed the adrenergic agonist clenbuterol for 50 days and after 78 days of withdrawal "; J. Anim. Sci. 68:3614-3623, (1990).

- SOTA, E., DEL BARRIO, A.S., GARCIA-CALONGE, M.A., PORTILLO, M.P., ASTIASARAN, I. & MARTINEZ, J.A.; "Performance, muscle composition and fatty acid profiles in salbutamol fed lambs: effect of a 5-day whit drawal period"; Meat. Sci. (argitaratzeko).
- SPURLOCK, M.E., CUSUMANO, J.C., JI, Q., ANDERSON, D.B., SMITH II, C.K., HANCOCK, D.L. & MILLS, S.E.; "The effect of ractopamine on β -adrenoceptor density and affinity in porcine adipose and skeletal muscle tissue"; J. Anim. Sci. 72:75-80, (1994).
- WIELAND, O.; "Eine enzymatische Methode zur Bestimmung on Glycerin"; Biochem.Z. 239: 313-319, (1957).