



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Divisió de Ciències Experimentals i Matemàtiques  
Facultat de Biologia  
Departament de Bioquímica i Fisiologia

# **Balanç energètic i nitrogenat en l'obesitat genètica i nutricional de la rata**

Treball que presenta

**Montserrat Esteve Ràfols**

per optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques.

Barcelona, juny de 1992



La interessada:



Montserrat Esteve Ràfols

Vist i Plau,

El Director de la Tesi:



Dr. Francisco Javier Remesar Betloch  
Professor Titular de Bioquímica i Biologia Molecular  
de la Universitat de Barcelona



**Al Joan LLuís i al Bernat**



En acabar aquest treball voldria manifestar el meu agraïment a totes aquelles persones que d'una manera o altra m'han ajudat i animat durant tot aquest temps.

En primer lloc he d'agrair al Dr. Xavier Remesar la seva direcció, amb consells i crítiques que han estat sempre un estímul al llarg d'aquest projecte. Vull agrair la disposició i ajut que sempre he rebut d'ell, i sobretot gràcies per la seva amistat.

Al Dr. Marià Alemany pel seu ajut, per les estones que hem passat comentant diferents aspectes del treball, i per aquelles que hem rigut, que Déu n'hi do!.

A l'Imma, amb qui he compartit la realització d'aquest treball, vull agrair la paciència que ha tingut amb mi, ja que durant tot aquest temps hi han hagut moments de tot tipus, i reconec que a vegades soc una mica pesada. Gràcies sobretot per la teva amistat que espero no acabarà aquí.

Al Dr. José Antonio Fernández, amb qui aquest últim temps he compartit forces hores de treball, gràcies per les seves dosis d'optimisme, perquè quan et semblava que ja no podies, ell sempre treia importància a la cosa i et donava ànims per seguir.

Als companys de laboratori, tots ells, els d'un primer temps i els recentment incorporats, a tots gràcies per les bones i no tant bones estones compartides, heu estat uns grans companys. Així també fer esment de la resta de companys d'altres grups amb qui he compartit forces moments, entre les que recordo molts esmorzars força divertits.

També vull recordar a la Teresa Domènech amb qui vaig tenir la sort de compartir el primer temps de la realització d'aquest treball.

Durant aquest temps també he pogut conèixer i fer amistat amb gent de fora del departament, en aquest sentit recordo la Pilar, la Maria i l'Isidre del Servei Científico-Tècnic, als qui tants cops he atabalat amb el gran nombre de mostres que els hi he portat.

Sobretot vull agrair la realització d'aquest treball als meus pares, ja que sense el seu esforç constant, mai hauria estat possible. Als meus germans agraeixo el seu suport.

Al Joan Lluís, que durant tot aquest temps ha estat al meu costat, a qui possiblement s'ha li ha fet més llarg que a mi, i amb qui espero compartir molts altres projectes de la meva vida. Així també, a la seva família l'ajut rebut sobretot aquests últims dies.

I al Bernat per...el seu somriure!





## INDEX

1	Introducció	1
1.1	Presentació	3
1.2	Objectius	3
1.3	Plantejament experimental	4
2	Obesitat	9
2.1	Definició d'obesitat	11
2.2	Classificació de les obesitats	12
2.2.1	Segons la morfologia del teixit adipós	12
2.2.2	Segons la localització anatòmica del greix	12
2.2.3	Segons l'edat d'aparició.	13
2.2.4	Segons l'etiologia de l'obesitat	13
2.3	Models animals d'obesitat	15
2.3.1	Obesitat genètica	15
2.3.1.1	El nostre model: Rata Zucker (fa/fa)	15
2.3.1.2	Altres models	18
2.3.1.2.1	Ratolí groc	18
2.3.1.2.2	Ratolí obès (ob/ob)	18
2.3.1.2.3	Ratolí adipós (ad/ad)	18
2.3.1.2.4	Ratolí diabètic (db/db)	18
2.3.1.2.5	Ratolí obès de Nova Zelanda (NZO)	18
2.3.1.2.6	Ratolí japonès (KK)	19
2.3.2	Obesitat hipotalàmica	19
2.3.3	Obesitat dietètica	20
2.3.3.1	El nostre model: Dieta de <i>cafeteria</i>	20
2.3.3.2	Altres models	21
2.3.3.2.1	Intubació gàstrica	21
2.3.3.2.2	Dietes riques en greixos	21
2.4	Regulació hormonal	22
2.4.1	Insulina	22
2.4.2	Glucocorticoïdes	22
2.4.3	Hormona del creixement	23
2.4.4	Hormones tiroïdees	23
2.4.5	Hormones sexuals	23
2.5	Metabolisme: alteracions	24
2.5.1	Metabolisme glucídic	24
2.5.2	Metabolisme lipídic	24
2.5.3	Metabolisme proteic	25
3	Control del pes corporal	27
3.1	Definició i evidències	29
3.2	Plantejaments teòrics del balanç energètic	29
3.3	Mesura del balanç energètic	30
3.3.1	Mesura de l'energia ingerida	30
3.3.1.1	Energia ingerida bruta	31
3.3.1.2	Energia ingerida digerible	31
3.3.1.3	Energia metabolitzable	31
3.3.2	Mesura de l'energia emmagatzemada	32
3.3.3	Mesura de la despesa energètica	32
3.4	Control de la ingesta	34
3.4.1	Senyals sensorials	35

3.4.2	Senyals gastro-intestinals	35
3.4.3	Composició de nutrients	36
3.4.4	Senyals hormonals	37
3.4.5	Temperatura ambient	38
3.4.6	Activitat física	38
3.5	Control de la despesa energètica	38
3.5.1	Factors que afecten la despesa energètica	38
3.5.1.1	Mida del cos	38
3.5.1.2	Temperatura ambient	39
3.5.1.3	Activitat física	39
3.5.1.4	Manteniment, creixement i menjar	39
3.5.2	Formes de pèrdua de calor o termogènesi	39
3.5.2.1	Producció obligatòria de calor o taxa metabòlica basal (TMB)	39
3.5.2.2	Termogènesi adaptativa	40
3.5.2.2.1	Termogènesi induïda pel fred	40
3.5.2.2.1.1	Termogènesi tremolosa	40
3.5.2.2.1.2	Termogènesi no tremolosa	40
3.5.2.2.2	Termogènesi induïda per la dieta	41
3.5.3	Teixits implicats en la producció de calor	42
3.5.3.1	Teixit adipós marró (TAM): proteïna desacopladora	42
3.5.3.2	Altres mecanismes implicats en la termogènesi en d'altres òrgans	46
3.5.3.2.1	ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$	46
3.5.3.2.2	Cicles entre substrats	46
3.6	Control hormonal del balanç energètic	47
3.6.1	Insulina	48
3.6.2	Hormones tiroïdees	48
3.6.3	Hormones sexuals	48
3.6.4	Glucocorticoïdes	49
3.6.5	Hormona del creixement	49
3.7	Control neural del balanç energètic	49
3.7.1	Paper del sistema nerviós central	50
3.7.2	Paper del sistema nerviós autònom (SNA)	52
3.7.2.1	El sistema nerviós simpàtic (SNS)	52
3.7.2.1	El sistema nerviós parasimpàtic (SNP)	53
4	Balanç nitrogenat	55
4.1	Breu visió històrica	57
4.2	Significat del balanç de nitrogen	57
4.3	El N com a senyal proteica	58
4.4	Paràmetres a tenir en compte en un balanç nitrogenat	59
4.4.1	La ingesta	59
4.4.1.1	Índexs de qualitat de proteïna	60
4.4.1.1.1	Valor biològic (BV)	60
4.4.1.1.2	Utilització neta de proteïna (NPU)	60
4.4.1.1.3	Índex de creixement	61
4.4.1.1.4	Taxa d'eficiència proteica (PER)	61
4.4.1.1.5	Taxa neta de proteïna (NPR)	61
4.4.1.1.6	Índex químic	61
4.4.2	La femta	62
4.4.3	L'orina	62
4.5	Altres aspectes i problemes del balanç de nitrogen	62
4.5.1	Duració del experiment	62
4.5.2	Pèrdues no controlades	63
4.6	Balanç d'aminoàcids	64

5. Resultats	67
- The effect of cafeteria-feeding on energy balance in Wistar and in lean and obese Zucker rats	69
- Nitrogen balance discrepancy in Wistar rats fed a cafeteria diet	83
- Nitrogen balances of lean and obese Zucker rats subjected to a cafeteria diet	91
- Dietary amino acid balances in young Wistar rats fed a cafeteria diet	99
- Individual amino acid balances in young lean and obese Zucker rats fed a cafeteria diet	117
- Plasma amino acids of lean and obese Zucker rats subjected to a cafeteria diet after weaning	135
- Urinary loss of amino acids in obese Zucker rats	145
6. Discussió	153
7. Conclusions	159
8. Bibliografia	163



# 1 INTRODUCCIÓ





## 1.1 Presentació

El present treball s'ha realitzat en el Departament de Bioquímica i Fisiologia de la Universitat de Barcelona, dins del grup de treball nomenat Nitrogen i Obesitat, que dirigeixen el Professor Dr. Marià Alemany i el Dr. Xavier Remesar. Tal i com indica el nom del grup d'investigació, els temes bàsics de treball són els relatius al metabolisme nitrogenat, especialment pel que fa als aminoàcids, i els relacionats amb la caracterització dels possibles mecanismes implicats en el control del pes corporal. De l'interès en conèixer alguns aspectes bàsics del metabolisme nitrogenat en situacions d'obesitat s'ha pogut generar el present treball. Un aspecte important d'aquest treball que s'ha de destacar abans de passar a comentar els antecedents sobre els que s'ha basat, ha estat la forma de realitzar-lo, doncs forma part d'un projecte global que formalment ha estat dividit en dues parts, i que ha implicat el treballar en equip amb Na Immaculada Rafecas. Aquest aspecte és important, doncs ens ha permès assolir fites de tot punt irrealitzables en el cas d'haver treballat individualment.

El nostre grup de treball disposava d'una àmplia experiència en aspectes del metabolisme dels aminoàcids en diverses situacions metabòliques, així com en la caracterització de la resposta metabòlica i termogènica a dietes hipercalòriques del tipus denominat de *cafeteria*, dieta emprada per a produir, en animals d'experimentació situacions d'obesitat. Aquest model d'obesitat produïa unes respostes metabòliques prou diferents a d'altres model d'obesitat com podia ser l'obesitat de base genètica, representada per rates de la soca Zucker. Com que a nivell bibliogràfic hi havia una gran quantitat d'informació, sovint contradictòria, sobre els efectes metabòlics i el control del pes corporal produït pels diversos models d'obesitat, va ésser quan el nostre grup, interessat en esbrinar quin o quins són els *senyals* metabòlics implicats en el procés del control del pes corporal, va iniciar l'estudi comparatiu del desenvolupament de l'obesitat genètica i de l'obesitat de base dietètica, abordant els aspectes bàsics relatius a l'acreció de proteïnes i lípids en l'animal sencer. En aquest punt és on s'inicia el treball que conforma la present memòria. Així, s'han estudiat els aspectes relatius a la deposició de materials en l'animal sencer, perspectiva innovadora, doncs la major part dels treballs realitzats prenen com a base la carcassa de l'animal, fet que habitualment no té en compte la presència de la pell, que en el cas de les rates pot representar fins al 16% del pes corporal (Remesar et al., 1981). Així doncs, nosaltres hem utilitzat l'homogenat d'animal sencer per a fer totes les determinacions referents al balanç global d'energia. Amb la caracterització del model d'obesitat genètica i del model d'obesitat per efecte de la dieta vam tenir les bases per a començar l'estudi, en el mateix model experimental, dels aspectes relatius al metabolisme nitrogenat, tan pel que fa al balanç de nitrogen com pel que fa a l'estudi del balanç d'aminoàcids, que ha representat una forma innovadora d'estudiar la deposició de proteïnes en l'animal.

Alguns dels resultats obtinguts en aquest projecte, ja s'han pogut utilitzar com a referència per a estudiar altres aspectes del metabolisme dels aminoàcids, per altres membres de l'equip. Així, com a exemple podem citar, que l'augment de l'eficiència d'absorció d'aminoàcids en rates tractades amb dieta de *cafeteria*, ha servit de punt de partida per l'estudi dels mecanismes que poden modular aquesta resposta a nivell intestinal.

## 1.2 Objectius

Un primer objectiu a assolir va ser establir els ritmes de deposició dels diferents

components energètics en la rata jove, que presenta obesitat de tipus genètic i comparar-la amb l'obesitat desenvolupada per efecte de la dieta.

En segon lloc, ens interessava comprovar l'eficiència de deposició de nitrogen, en els mateixos models d'obesitat, utilitzant un enfoc totalment nou, per a comprovar si realment la diferència entre l'entrada i la sortida de nitrogen es corresponia amb el nitrogen dipositat en l'animal sencer.

Un altre objectiu va ser comprovar l'eficiència d'utilització d'aminoàcids en l'obesitat genètica i nutricional, de manera que poguéssim copsar, especialment en el cas dels aminoàcids essencials, si el desenvolupament de l'obesitat condicionava la deposició dels diferents aminoàcids en les proteïnes corporals.

Finalment, el darrer objectiu va ser determinar la disponibilitat dels aminoàcids per els diferents teixits, en els diferents models, mitjançant la valoració dels aminoàcids plasmàtics i relacionant aquests valors amb les pèrdues per orina.

### 1.3 Plantejament experimental

S'han utilitzat dos tipus de soques de rates, la soca Wistar i la soca Zucker. Aquesta última es caracteritza perquè presenta dos fenotips diferents, el fenotip obès i el prim. La soca Zucker ens interessava per estudiar la obesitat de tipus genètic i comparar-la amb el seu control, però a més hem utilitzat la soca Wistar com a referència, que està ampliament estudiada, per tal poder corregir problemes d'especificitat de soca. Així doncs, hem treballat amb tres grups de rates fenotípicament diferents, la rata Wistar, la Zucker prima i la Zucker obesa. Aquests grups han estat sotmesos a dos tipus diferents de tractament dietètics, com són alimentació amb el pinso estàndard per rata, que anomenarem dieta control o de referència i alimentació amb una dieta de *cafeteria*, que estava formada per plàtan, paté de fetge de porc, cansalada fumada, galetes, llet ensucrada i enriquida amb un suplement vitamínic i mineral, a més de pinso i d'aigua.

La durada total dels tractaments va ser de trenta dies, estudiats en dos períodes de quinze dies. El plantejament experimental detallat a continuació va ser realitzat sempre en els tres tipus de rates definits anteriorment, és a dir, la rata Wistar, la rata Zucker prima i la Zucker obesa. Cal dir que les rates eren deslletades als 22 dies d'edat i que eren mantingudes en condicions estàndard de temperatura de 21-22 °C, humitat del 70-80 % i un període de llum de 8 a 20 hores.

L'experiment s'iniciava als trenta dies d'edat, de manera que un primer grup d'animals era sacrificat per tal de conèixer la composició corporal i altres paràmetres sanguinis a l'inici de l'experiment. Un altre grup d'animals s'utilitzava per fer el seguiment durant trenta dies, de manera que els animals es col·locaven individualment en gàbies metabòliques (Tecniplast Gazzada, Italy) i cada dia se'ls hi mesurava la ingesta i es recollien les excretes (femta i orina). Aquests animals es sacrificaven als seixanta dies d'edat i se'ls analitzava. Un altre grup d'animals se'ls sotmetia a ambdós tipus de tractaments dietètics, però no se'n controlava ni la ingesta ni les excretes, aquests animals es sacrificaven als quinze dies de tractament, és a dir als quaranta cinc dies d'edat, per tal de conèixer la composició corporal dels animals en un punt intermig del període d'experiment.

Els animals eren sacrificats per decapitació, es recollia la sang i es buidava el contingut



intestinal, aleshores s'homogenava el cos de l'animal amb molta cura d'obtenir una pasta ben homogènia. De la sang, prèviament heparinitzada, es guardava una alíquota i la resta es centrifugava i es recollia el plasma.

De l'homogenat de l'animal es determinava el seu contingut en: d'aigua, de glúcids, de lípids, de proteïnes, d'aminoàcids (prèvia hidròlisi de les proteïnes) i de nitrogen.

En l'orina es determinava: el contingut de nitrogen total, el nitrogen  $\alpha$ -amínic, els aminoàcids i la urea. Mentre que de la femta es valoraven: el nitrogen, els aminoàcids (prèvia hidròlisi de les proteïnes) i també el grau d'humitat.

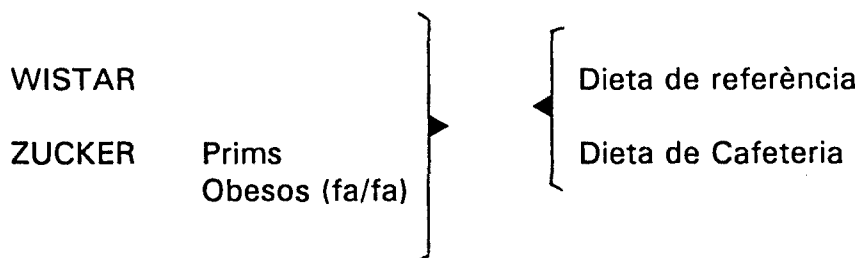
En plasma també es van valorar diversos paràmetres, com: glucosa, urea, proteïnes, nitrogen  $\alpha$ -amínic i aminoàcids. Mentre que en sang total s'analitzava la quantitat d'aigua, les proteïnes, els aminoàcids i els greixos).

Pel que fa als aliments, s'agafava una alíquota representativa de cada sèrie, s'homogenava i s'analitzava el contingut d'aigua, de glúcids, de lípids, de proteïnes, d'aminoàcids (prèvia hidròlisi de les proteïnes) i també de nitrogen.

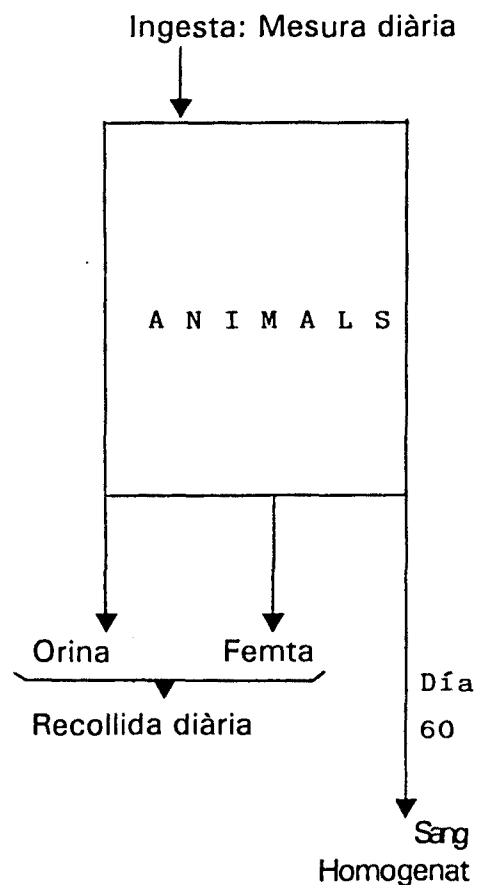
Cal dir també, que en tots els casos s'han realitzat mesures de minerals, però que en aquest treball no es presenten els resultats obtinguts.

## GRUP BALANÇ

Animals en gàbies metabòliques durant 30 dies



Gàbies  
Metabòliques  
(Dies 30-60)



## GRUPS COMPLEMENTARIS:

1. Animals utilitzats en el dia 30 sense cap tractament  
Utilitzats per recollir sang i fer l'homogenat total
2. Animals utilitzats en el dia 45. Gàbies normals i sotmesos a la mateixa dieta que el grup balanç.  
Utilitzats per recollir sang i fer l'homogenat total

## PARÀMETRES MESURATS

<b>INGESTA</b>	Dies 30-60	Mesura diària Anàlisi de:	N total Lípids Proteïnes Aigua Glúcids Aminoàcids (hidròlisi proteica) (Minerals)
<b>FEMTA</b>	Dies 30-60	Recollida diària. Mesura del pes. Anàlisi de:	N total Aminoàcids Aigua (Minerals)
<b>ORINA</b>	Dies 30-60	Recollida diària. Mesura del volum Anàlisi de:	N total N $\alpha$ -amínic Aminoàcids Urea (Minerals)
<b>SANG Total</b>	Dies 30,45 i 60	Anàlisi de:	Lípids Proteïnes Aigua N total (Minerals)
<b>Plasma</b>	Dies 30,45 i 60	Anàlisi de:	Aminoàcids Glucosa Urea Proteïnes
<b>HOMOGENAT TOTAL D'ANIMAL</b>			
	Dies 30, 45 i 60	Anàlisi de:	N total Lípids Glúcids Proteïnes Aigua Aminoàcids (hidròlisi proteica) (Minerals)



## **2 OBESITAT**



## 2.1 Definició d'obesitat

Fer una definició d'obesitat no es tant senzill com hom podria esperar, ja que no hi ha un criteri unitari entre els estudiosos del tema. Així en la pràctica mèdica, es molt emprat el criteri de que l'obesitat es una situació en la qual el pes corporal es més alt del que caldria esperar per l'alçada i constitució de l'individu en qüestió (Salans , 1981). Clàssicament, es considera que un individu es obès quan el seu pes supera en un 20% la mitjana desitjada segons la seva alçada elevada al quadrat (Vasselli et al, 1983). Aquesta definició però no es del tot encertada ja que no te en compte d'altres situacions on també es produeix un augment de pes sense que aquest estigui relacionat amb l'estat obès, situacions com l'embaraç i la presència d'edemes.

Intentant concretar més la definició anterior podríem dir que l'obesitat es un excés de pes corporal degut principalment a un acúmulo de reserves grasses (Powers, 1980). En aquest sentit podríem considerar que una dona es obesa quan el seu contingut corporal de greix supera el 30% mentre que en l'home aquest límit es més baix situant-se entre el 20% i 25% (Vasselli et al, 1983). En aquest cas cal fer una distinció entre sexes ja que normalment la dona te un contingut més elevat de greix en la seva composició corporal. El contingut de greix en humans es normalment estimat per una sèrie de mètodes no invasius (plec cutani, contingut de potasi corporal, conductivitat elèctrica del cos, etc.) que ens permeten obtenint uns índexos indirectes de l'adipositat corporal i diagnosticar l'obesitat.

Podem, doncs, adonar-nos que no hi ha un mètode científic totalment vàlid per poder definir l'obesitat en un sentit ampli ja que a vegades pot resultar difícil diferenciar un simple sobrepès d'un cas lleu d'obesitat. A aquesta complexitat cal sumar-hi les diferències antropomòrfiques de les diverses poblacions humanes, que poden presentar un ampli marge de pes corporal clarament influït per components genètics, racials, ambientals i evolutius (Weiner, 1973). En aquest sentit pot ser doncs criticat el caràcter patològic que s'ha atribuït normalment a l'obesitat. Molt freqüentment aquesta està associada a una elevada eficiència metabòlica (Bray, 1969, Deb et al, 1976). Així sembla doncs que els individus obesos estarien més ben preparats per sobreviure en situacions de manca d'aliments, ja que la seva taxa metabòlica basal disminueix molt quan se'ls sotmet a dieta o bé a dejuni comparat amb individus primis (de Boer et al, 1986). Aquesta més elevada eficiència metabòlica associada a una més baixa utilització de reserves podria ser conseqüència d'una selecció evolutiva d'individus que han sobreviscut amb escassa disponibilitat d'aliment (Trayhurn et al, 1983). En aquests casos l'obesitat es fa aparent quan tenen gran disponibilitat d'aliment. Un exemple de l'exposat serien poblacions com la polinèsia , els indis Pima d'Arizona, els aborígens australians i d'altres, que han estat adoptats durant segles a una limitada ingesta i que mostren una gran prevalència d'obesitat i diabetis quan la civilització els hi ha posat a disposició aliment abundant i atraient. Així aquesta màxima eficiència en l'utilització del menjar que s'ha fixat evolutivament en aquestes tribus de zones àrides respón a l'nomenat "genotip econòmic" (Stock i Rothwell, 1982). De fet aquesta situació en que hi ha una adaptació bioquímica i fisiològica a una limitada ingesta que es troba en alguns obesos i que es present en alguns individus primis, la podríem definir com a pre-obesitat i als individus que la mostren com a pre-obesos. Així alguns casos d'obesitat son resultat de la combinació entre la pre-obesitat i una amplia disposició d'aliments (Alemany, 1989). Per tant l'obesitat tan sols podrà ser definida com una entitat patològica en aquells casos en que es pugui demostrar que ocasiona problemes metabòlics i funcionals.

En definitiva podríem dir que l'obesitat té diferents causes metabòliques que es

manifesten d'una mateixa manera (l'excés de reserves en forma de greix) i que en grans trets s'hi pot arribar ja sigui per una elevada ingesta o bé per una reduïda despesa energètica (sedentarisme, clima, disfunció sistema termogènic,...).

A més també cal dir que alguns tipus d'obesitat tenen un fort component genètic (Herberg et al, 1977), com es ben conegut en algunes soques de rosegadors en les quals el caràcter obès està lligat a un únic gen recessiu (rata Zucker, ratolí ob/ob, ratolí db/db, etc.) (Bray et al, 1971). En humans, l'obesitat sembla que segueix una herència multifactorial (Stunkard et al, 1986), que es veu fortament condicionada per components com la dieta, l'ambient i factors culturals (Stunkard et al, 1986).

## 2.2 Classificació de les obesitats

En la bibliografia hom pot trobar nombroses classificacions de les obesitats, atenent en cada cas a diferents paràmetres fisiològics i bioquímics. En aquests apartats exposaré breument algunes de les més conegudes.

### 2.2.1 Segons la morfologia del teixit adipós

Distingim dos grups (Vasselli et al, 1983):

#### a) Obesitat hipertròfica

Es caracteritza perquè les cèl·lules del teixit adipós presenten una mida anormalment gran. Aquesta obesitat es típica en adults.

#### b) Obesitat hiperplàstica-hipertròfica

Es caracteritza perquè hi ha un augment del número de cèl·lules adiposes i també un tamany més gran d'aquestes. Es correlaciona bé amb l'obesitat juvenil ja iniciada en la infància.

### 2.2.2 Segons la localització anatòmica del greix

S'ha descrit que l'obesitat en l'home es heterogènia, ja que s'observa que el greix pot acumular-se en diferents llocs del cos en els diferents individus. Així podem distingir (Vasselli et al, 1983):

#### a) Obesitat generalitzada o difusa

El greix està distribuït per tot el cos incloent extremitats i sense destacar unes zones preferencials amb acumulacions de greix.

#### b) Obesitat de la part baixa del cos o ginoidea

Es típica del sexe femení i es caracteritza per una prevalència d'acumulacions de greix en la zona de la cadera i cuixes.



### c) Obesitat de la part alta del cos, abdominal o androide

Es més típica del sexe masculí i es caracteritza perquè l'acúmul de greix està localitzat en tòrax, abdomen i també braços. Dintre d'aquesta obesitat abdominal podríem distingir dos tipus (Tarui et al, 1988):

c.1) **Obesitat abdominal subcutània:** El greix es localitza en la part alta del cos però ho fa subcutaniament. Es considera que un individu té aquest tipus d'obesitat quan el índex greix visceral/greix subcutani es més petit de 0.4.

c.2) **Obesitat abdominal visceral:** El greix dipositat en la part alta del cos ho amb disposició intra-abdominal. En aquest cas el índex greix visceral/greix subcutani es igual o superior a 0.4. Les alteracions en els metabolisme són més marcades en aquest cas però alhora es més sensible als tractaments actuals amb exercici i dieta.

## 2.2.3 Segons l'edat d'aparició

Distingim dos grans grups:

### a) Obesitat infantil

Es aquella que apareix abans dels 11 anys i que sol caracteritzar-se per una hiperplàsia del teixit adipós. Acostuma a perllongar-se fins l'edat adulta i es caracteritza per una alteració del creixement, hiperfàgia, alteracions endocrines i poca activitat física (Vasselli et al, 1983).

### b) Obesitat en adults

Acostuma a aparèixer passada la pubertat i en alguns casos la seva aparició està associada a situacions de canvis metabòlics de l'organisme, com per exemple l'embarç (Mckeown et al, 1957).

## 2.2.4 Segons l'etiologia de l'obesitat

Atenent a les possibles causes que originen l'obesitat, podríem fer la següent classificació (Alemany, 1989):

### a) Obesitat d'origen hipotalàmic

Produïda per lesions dels centres hipotalàmics que regulen la ingesta i el control del gast energètic (Bray i York, 1979). Experimentalment es produeixen rates obeses per hiperfàgia mitjançant lesió, ja sigui química o quirúrgica, de la regió hipotalàmica ventromedial. En l'home aquesta obesitat pot estar produïda per una inflamació, un trauma o bé a l'aparició d'un tumor que afecti aquesta zona del hipotàlem (Stock i Rothwell, 1982).

### b) Obesitat bulímica

Estaria produïda per un augment exagerat de la ingesta que tindria el seu origen

en una alteració a nivell cortical o psicològic i ajudat per l'ambient (Sclafani i Springer, 1976). Seria el cas de la Bulímia Nervosa que es dona en l'home (Casper, 1986).

c) Obesitat de tipus digestiu

Produïda per una hiperestimulació parasimpàtica en el control de l'intestí que fa que es produeixi una absorció ràpida dels aliments, i com a conseqüència un desequilibri en la capacitat de l'organisme de fer front a la sobrecàrrega energètica que li arriba (Wisén et al, 1987).

d) Obesitat hiperinsulinèmica

Es produïda per una hiperreactivitat de la secreció de insulina davant un estímul nutricional (generalment en combinació amb la causa anterior). L'hiperinsulinisme provoca una més gran captació de nutrients pels teixits i una protecció en front a la seva oxidació, afavorint la lipogènesi. Hi ha una estreta relació entre la hiperinsulinèmia i l'obesitat de manera que moltes obesitats presenten hiperinsulinèmia (Modan et al, 1985) i es desenvolupen resistència a la insulina (Olefsky, 1981) de manera que moltes vegades acaben amb el desenvolupament d'una diabetis de tipus II (Powers, 1980). Així doncs l'estreta relació entre la diabetis de tipus II i l'obesitat tindria el seu sentit amb la implicació de la insulina en la gènesi i manteniment de l'obesitat.

e) Obesitat hipotermogènica

Es conseqüència d'un desajust entre una ingesta normal - o bé elevada - i una incapacitat del sistema termogènic per fer front al excés d'energia que li arriba (Seydoux, 1987). El model experimental que mostra aquest tipus d'obesitat es la rata Zucker fa/fa (Godbole et al, 1978, Triandafillou i Himms-Hagen, 1983), que té una pobre resposta termogènica induïda pel fred i desenvolupa obesitat tant amb una ingesta elevada com normal (Zucker, 1975).

f) Obesitat per desajustament del punt d'equilibri del nivell de reserves grasses

Aquest seria el tipus més comú de causa primera de l'obesitat. Es degut a un desajust del sistema neural de control del nivell de reserves per una apreciació equivocada d'un nivell elevat com a normal (Shimazu, 1984). En teoria podríem definir dos subgrups etiologicament diferents: a) una manca de la capacitat de síntesi del producte senyal, per part del teixit adipós blanc. b) un error en l'interpretació de la senyal (Alemany, 1989).

g) Obesitat per altres causes endocrines i obesitat iatrogènica

Aquests casos l'obesitat seria un símptoma més d'una malaltia subjacent d'altra tipus, per exemple l'hipotiroïdisme (Ingbar i Woeber, 1981). També es pot produir obesitat com a conseqüència del consum en excés d'alguns medicaments, com es el cas dels esteroides, tot i que a vegades el sobrepés originat no es degut a la grasa (Bazin et al, 1987).

De fet però, la incidència de aquestes diferents causes no ha estat estudiada de manera sistemàtica, donat que la major part de la bibliografia atén a causes directes de l'obesitat molt ulteriors en la seva implicació final. Així, es tracte de manera general dos grans grups d'agents responsables de l'obesitat:

#### a) Aspectes genètics.

L'herència de l'obesitat en l'home es descriu com herència parcial multifactorial (Stunkard et al, 1986). Es coneixen situacions heredables en que es dona obesitat, com el cas de la síndrome de Prader-Willi o bé d'Alstrom (Stock i Rothwell, 1982).

Pel que fa a animals experimentals es coneix que l'obesitat que presenten alguns rossegadors es deguda a herència autosòmica recessiva on un sol gen hi està implicat (rata fa/fa, ratolí ob/ob) (Herberg i Coleman, 1977).

#### b) Aspectes ambientals

L'ambient modifica la predisposició genètica a l'obesitat o bé pot ser la causa única de la seva aparició (Dietz i Gortmaker, 1984). Els factors ambientals a considerar són :

L'hàbit de menjar: El tipus de dieta, la quantitat energètica ingerida, la freqüència de les menjades, així com el moment de la vida del individu en que hi està exposat són factors importants per el desenvolupament de l'obesitat.

El medi ambient: El clima, treball i d'altres factors influeixen considerablement en la despesa energètica del individu i per tant en el seu pes corporal.

L'ambient social: Costums culturals, modes i d'altres factors de la societat en les que es troba inmers l'individu influeixen notoriament en el seu estat psicològic. S'ha trobat una estreta relació entre l'estat anímic i la sensació de gana. Cal també mencionar que les tendències estètiques de la societat actual provoca un rebuig de l'obesitat, de manera que alguns individus obesos manifesten un rebuig a la seva pròpia imatge produint-se un bloqueig de la gana (anorexia nervosa).

## 2.3 Models animals d'obesitat

### 2.3.1 Obesitat genètica

#### 2.3.1.1 El nostre model: Rata Zucker (fa/fa)

L'obesitat de la rata Zucker es transmet per herència autosòmica recessiva i és conseqüència de la mutació d'un únic gen anomenat gen "fa". Aquesta mutació va ser descrita per primera vegada en 1961 per en Zucker i Zucker i recentment ha estat localitzada en el cromosoma 5 (Truet et al, 1991).

La aparició de l'obesitat no es detecta visualment fins les 4-5 setmanes d'edat, quan el seu contingut de greix és aproximadament un 20% del seu pes corporal (Bell i Stern, 1977). Així pel que fa al fenotip les rates fa/fa poden ser considerades preobeses fins el deslletament (Krief i Bazin, 1991). El genotip obès es pot detectar més aviat utilitzant d'altres metodologies com : mesura del consum d'oxigen (Kaplan,1979), mesura de la temperatura corporal (Godbole i York, 1978), mesura de la relació greix inguinal/pes corporal (Lavau i Bazin, 1982) que permeten la detecció del genotip entre els 16-18 dies. D'altres mètodes com la determinació de la mida i del nombre d'adipòcits hipodèrmics o inguinals, permeten la detecció de l'obesitat als 7 dies d'edat (Hausman et al, 1983, Boulangé et al, 1979).

La rata Zucker es caracteritza per presentar una forta hiperinsulinèmia, normoglucèmia i hiperlipidèmia (nivells elevats de triacilglicerols, fosfolípids, colesterol, àcids grassos no esterificats en sang) (Schirardin et al, 1979).

L'obesitat de la rata adulta sembla ser resultat de defectes d'ambdòs components de l'obesitat: increment en l'energia ingerida i emmagatzemada i una disminució de la despesa d'energia. L'hiperfàgia es present ja des d'els segona setmana d'edat (Bell i Stern, 1977), juga un paper important en el desenvolupament de l'obesitat però no es en cap sentit el determinant, ja que en estudis de restricció de menjar no es preveu l'aparició de l'obesitat (Cleary et al, 1980, Bray et al 1973). D'acord amb aquestes dades trobem que els dipòsits de greix comencen a ser més grans ja en la primera setmana de vida una setmana abans de l'aparició de la hiperfàgia (Boulangé et al, 1979).

Quant al metabolisme en el teixit adipós blanc, es troba que l'activitat dels enzims implicats en la lipogènesi (Bazin i Lavau, 1982, Lavau et al, 1985), metabolisme de lipoproteïnes (Gruen et al, 1978) i en la glucòlisi (Dugail et al, 1988) està augmentada ja des de la primera setmana de vida.

Pel que fa referència al teixit adipós marró de les rates fa/fa, comença a acumular greix ja als 2 dies d'edat (Bazin et al, 1984). Al igual que en el teixit adipós blanc, tots els enzims implicats en la síntesi de lípids estan activats ja des de les primeres setmanes de vida (Bazin et al, 1983). A diferència del teixit adipós blanc, en aquest teixit l'activitat de la lipoproteïna lipasa està disminuïda (Boulangé et al 1981). El teixit adipós marró es important per la producció de calor en la termogènesi no tremolosa (induïda per la dieta o pel fred). Les rates Zucker obeses mostren una disminuïda capacitat termogènica molt aviat en el desenvolupament (Godbole et al, 1978) correlacionada en gran part per les alteracions en aquest teixit.

En el múscul esquelètic s'ha descrit una disminució en la síntesi proteica (Reeds et al, 1982) tot i que en estudis de composició corporal això no sembla confirmar-se (Bell i Stern, 1977). També s'ha trobat una més baixa activitat lipoproteïna lipasa en alguns músculs (cor, diafragma i cuixa) (Boulangé et al, 1981).

El paper del fetge es eminentment lipogenètic, essent el responsable dels elevats nivells de triacilglicerols acumulats i de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) en sang (Zucker, 1965). De manera contraria mostra una baixa oxidació

de lípids i una inexistent cetogènesi (Triscari et al, 1982). Pel que es refereix al metabolisme glucídic, trobem uns elevats nivells de glicogen, i una glucòlisi molt activa com ho palesen els elevats nivells de piruvat i lactat (Malewiak et al, 1985).

La funció endocrina del pàncreas també mostra alteracions ja abans del deslletement. Una resposta incrementada de la insulina davant l'estímul de la glucosa i arginina que es pot prevenir amb la prèvia administració d'atropina sembla indicar una més gran sensibilitat de les cèl·lules  $\beta$  a l'estimulació parasimpàtica (Rohner-Jeanrenaud i Jeanrenaud, 1985). Com a conseqüència d'aquesta hiperinsulinèmia es desenvolupa una resistència hepàtica i perifèrica a la insulina (Terretaz et al, 1986).

L'adrenalectomia reverteix la capacitat termogènica del teixit adipós marró fins a nivells normals (Holt i York, 1982). Així també, l'efecte d'adrenalectomia redueix algunes de les anomalies de la rata obesa fa/fa, com l'excés de pes, l'acúmulo de greix, l'hiperfàgia, la lipogènesi hepàtica, el contingut de glicogen, la insulinèmia, l'activitat de la lipoproteïna lipasa en el teixit adipós, la trigliceridèmia, així com el recanvi d'adrenalina en el teixit adipós marró (Bazin et al, 1986, Holt i York, 1982, Marchington et al, 1983). Però, l'administració de corticosterona reverteix els efectes de l'adrenalectomia (Yukimura et al, 1978, Castonguay et al, 1986). Això ha fet pensar que els glucocorticoides actuen a nivell de sistema nerviós central inhibint la secreció hipotalàmica de CRF (Corticotropin releasing factor), sent la causa d'aquesta obesitat (Arase et al, 1989, Guillaume-Gentil et al, 1990).

Altres hormones, com l'hormona del creixement i la prolactina presenten nivells disminuïts, mentre que pels corticoesteroïdes, la triiodetironina i la tiroxina s'han descrit nivells elevats o bé disminuïts (Martin i Gahagan, 1977, Postel-Vinay et al, 1990, Durbin-Naltchayan, 1983).

Varies neurohormones (colecistoquinina) i neurotransmisors (noradrenalina, adrenalina, dopamina i serotonina) mostren una concentració anormal en zones del cervell de la rata fa/fa (McLaughlin et al, 1985, Cruce et al, 1976, Levin i Sullivan 1979). Es coneix que aquestes substàncies tenen un paper important en la regulació de la ingesta ja per la quantitat com per el tipus de menjar ingerit (Deutch i Martin, 1983, Coscina i Nobrega, 1984).

S'han fet molts estudis per tal d'identificar quin es el defecte primari ocasionat pel gen "fa" en la rata Zucker. Recents treballs emprant tècniques de Biologia Molecular han permès una localització cromosòmica del gen "fa" (Truet et al, 1991) així com els gens d'altres substàncies que podien estar implicades en la causa. Aquests esforços han fet possible descartar alguns candidats com: insulina, lipoproteïna lipasa, adipsina, calcitonina, proteïnes G i colecistoquinina. Mentre que d'altres encara no han pogut estar eliminats com: neuropèptid Y, hormona del creixement, transportador de glucosa (GLUT-4), receptor de insulina i glicerol-3P-deshidrogenasa. El més probable es que el gen "fa" tingui una funció pleiotròpica en la regulació cel·lular poden afectar a nivell de sistema nerviós i d'altres òrgans directament (Johnson et al, 1991).

## **2.3.1.2 Altres models**

### **2.3.1.2.1 Ratolí groc**

Va ser descrit per primera vegada per en Lacaste en 1883 i posteriorment per en Cuenot en el 1905, coincidint amb la primera descripció d'un ratolí obès. Es un caràcter de tipus dominant i es troba situat en el cromosoma 5 lligat al locus agoutí que codifica pel color del pel (Bateson, 1903). Hi ha tres variants segons el grau de color groc depenent d'al·lel implicat, essent l'homocigot letal (Eaton i Green, 1963). L'obesitat que presenten es moderada i es correlaciona amb l'augment de color groc (Wolff, 1965). La glucosa en sang es normal o una mica elevada en femelles i presenten resistència a insulina (Carpenter, 1958). La fertilitat es veu també reduïda (Weitze, 1940).

### **2.3.1.2.2 Ratolí obès (ob/ob)**

Va ser descrit per primera vegada per Ingalls et al en 1950, es tracta d'un caràcter de tipus recesiu situat en el cromosoma 6 (Coleman, 1978). Es caracteritza per presentar hiperfàgia, hiperinsulinèmia, hiperglucèmia, resistència a insulina, una deficient termogènesi, infertilitat i una hipertròfia i hiperplàsia del teixit adipós. Desenvolupa una obesitat severa que no es detecta visualment fins els 25-28 dies d'edat (Bray i York, 1979).

### **2.3.1.2.3 Ratolí adipós (ad/ad)**

Descrit per Falconer i Issacson en 1959 i es un caràcter recesiu. No es detecta fins 4-5 setmanes d'edat i les femelles resulten estèrils (Batt i Harrison, 1960).

### **2.3.1.2.4 Ratolí diabètic (db/db)**

Es el tipus d'obesitat genètica que s'ha descrit més darrerament, en 1966 Hummel et al descriuen l'obesitat del ratolí diabètic com un tret de herència recesiva, que més tard situen en el cromosoma 4 i que presenta nombrosos al·lells (Coleman, 1978). El ratolí diabètic esdevé obès a les 3-4 setmanes d'edat i es caracteritza per una obesitat severa, hiperfàgia, hiperglucèmia, hiperinsulinèmia temporal i posterior degeneració dels illots de Langerhans, i esterilitat (Herberg i Coleman, 1977).

### **2.3.1.2.5 Ratolí obès de Nova Zelanda (NZO)**

Fou en 1953 descrit per Bielschowsky i Bielschowsky, tot i que no està clar el mecanisme hereditari se li atribueix transmissió poligènica. Presenta obesitat mitjanament moderada amb hiperinsulinèmia, resistència a insulina i normoglucèmia. Es caracteritza per presentar l'acúmul de greix situat principalment en l'abdomen a diferència de les altres soques descrites (Bray i York, 1979).

### 2.3.1.2.6 Ratolí japonès (KK)

Va ser observat per en Kondo et al en 1957, el mecanisme de transmissió va ser considerat com a poligènic (Nakamura i Yamada, 1963) però posteriorment s'ha apuntat que podria ser un gen dominant de poca penetrància resultat d'un gen recesiu modificat (Butler i Gerritsen, 1970). També sembla afectat pel sexe (Nakamura i Yamada, 1963). Presenta obesitat tardana i moderada, també és moderada la hiperinsulinèmia, hiperglucèmia i resistència a insulina que presenta.

### 2.3.2 Obesitat hipotalàmica

En 1940 en Mohr descriu per primera vegada que un problema hipotalàmic comporta obesitat. A principis de segle Babinski (1901) i Frohlich (1900) descriuen alguns casos de tumors hipotalàmics associat a obesitat, esterilitat, problemes de visió, augment de la pressió craneal i estatura reduïda, síndrome que rep el nom de "adipogenital". Smith en 1927 mostra que l'extirpació de la hipòfisi sense lesionar el hipotàlem no produïa obesitat, però que si que la produïa lesions en el hipotàlem sense afectar la hipòfisi. Estudis succesius del hipotàlem relacionaven lesions en la zona ventromedial i aparició d'obesitat (Mayer i et al, 1955) i lesions en la zona lateral i pèrdua de gana i pes (Anand i Brobeck, 1951). Aquests resultats van dur a elaborar la teoria dual dels centres que regulen la gana (situat en la zona lateral) i la sacietat (situat en la zona ventromedial). El fet de que en posteriors estudis es trobes que alguns casos (animals joves), les lesions en la zona ventromedial hipotalàmica produïen obesitat sense provocar hiperfàgia ni augment de pes, doncs tan sols augmentava la proporció de greix (Bernadis i Goldman, 1976) va fer que la teoria esdevingués insostenible. El paper del hipotàlem pot ser que s'exerceixi a través de feixos de fibres que s'originen en la zona paraventricular (Sclafani i Berner, 1977).

Per tal produir les lesions hipotalàmiques les tècniques més utilitzades són:

- a) Electrolítiques
- b) Per calentament mitjançant radiofreqüència
- c) Quirúrgiques (talls de fibres longitudinals a nivell del nucli paraventricular)
- d) Administració de substàncies químiques:
  - 1) Injeccions al hipotàlem
    - Nitroquinolina
    - Glutamat monosòdic
    - Tioglucosa-or
  - 2) Via parenteral
    - Mostassa bipiperidilica
    - Glutamat monosòdic

Els trets característics dels animals amb lesió hipotalàmica depenen de l'edat i tècnica utilitzada. Pel que fa a la ingesta podem trobar en animals adults, amb lesió de la zona bilateral, increments de fins un 100% o més (Brobeck, 1946) mentre que en rata jove pot ser que no es doni hiperfàgia (Bernadis, 1973). Tampoc es dona augment de la ingesta amb l'obesitat hipotalàmica provocada per injeccions amb glutamat monosòdic (Rabin, 1974). Quan s'observa hiperfàgia moltes vegades s'acompanya d'un increment en el consum de només algun tipus d'aliment, suggerint

que la zona ventromedial també està implicada en la selecció del menjar (McGinty et al, 1965).

L'obesitat hipotalàmica Ventromedial presenta un increment en la secreció d'insulina (Hales i Kennedy, 1964) amb un augment de la mida dels illots de Langerhans i una més alta sensibilitat a la estreptozotocina (Kennedy i Parker, 1963, Inoue i Bray, 1978). Els nivells de corticoesteroïdes també es veuen alterats i l'adrenalectomia reverteix aquest tipus d'obesitat (Mook et al, 1975). La funció reproductora també pateix alteració, per exemple lesions electrolítiques o amb radiofreqüència provoquen una pèrdua de la freqüència del estrus en femelles i una reducció del pes de la testis i pròstata en mascles (Herrero, 1969).

Conseqüentment amb la hiperinsulinèmia el metabolisme està dirigit cap a la síntesi, de manera que hi ha una hiperlipidèmia marcada. El fetge esdevé el principal òrgan lipogènec, alliberant lipoproteïnes de molt baixa densitat (Schnatz et al, 1971). Amb perfusions de fetges de rates amb lesió hipotalàmica hi ha una més gran alliberació de triacilglicerols i urea, però una més baixa producció de cossos cetònics i glucosa que en fetges controls (Karaksh et al, 1977). Totes aquestes observacions indiquen que l'hiperlipidèmia es conseqüència d'una més elevada síntesi endògena i també una ingesta de greix més alta que en controls (alts nivells de quilomicrons en sang) El teixit adipós també té una activitat Lipoproteïna Lipasa i d'enzims lipogènecs elevada un 6-25% (Schnatz et al, 1971). Es troba també un recanvi de proteïnes elevat amb un conseqüent augment de urea en sang, reflex d'una elevada utilització d'aminoàcids cap a gluconeogènesi (Jeanrenaud, 1978).

### 2.3.3 Obesitat dietètica

#### 2.3.3.1 El nostre model: Dieta de *cafeteria*

La introducció per Sclafani i Springer en 1976 de l'anomenada dieta de *cafeteria* va suposar un triomf en aconseguir hiperfàgia en la rata per manipulació de la dieta. Fins aleshores s'havien fet nombrosos esforços per tal d'incrementar la ingesta voluntària de la rata mitjançant la palatibilitat, però cap d'ells amb èxit. L'animal mantenia un control estricte de la seva ingesta. Això havia fet pensar que la ingesta d'aliments en la rata no estava influïda per factors tals com el gust i la varietat.

La dieta de *cafeteria* es un règim dietètic no "estressant" i equilibrat que indueix un increment voluntari en la ingesta. Consisteix en oferir als animals junt amb el pinso habitual i l'aigua, una varietat d'aliments atractius (dels consumits normalment per l'home), que són en general rics en greixos i glúcids. D'aquesta manera s'aconsegueix trencar el control precís de la ingesta que exerceixen aquests animals. La marcada hiperfàgia aconseguida s'acompanya d'un increment de pes corporal, degut principalment a un increment en el contingut de greix (Rothwell i Stock, 1982).

La composició d'aquesta dieta varia segons els autors i pot incloure: formatge, xocolata, galetes, pastissos, pasta, pa, caramels tous, paté, pernil, cansalada, embotits, llet condensada o ensucrada, fruits secs, plàtans, etc, a més del pinso i aigua habituals (Sclafani i Springer, 1976).



Tot i la seva ampla utilització com a model d'obesitat induïda per hiperfàgia, la dieta de *cafeteria* ha estat criticada en diverses ocasions, sent classificada de deficient en algun dels components (Moore, 1987). De tot manera s'ha demostrat que malgrat la gran variació en els aliments seleccionats per cada animal, la proporció de nutrients es manté molt constant (Prats et al, 1989). No obstant, com a mesura de precaució hom inclou en molts casos suplementes vitamínics i minerals a més de mantenir a l'abast dels animals el pinso habitual.

La composició dels aliments de la dieta de *cafeteria* que es subministrava en els nostres estudis és una versió simplificada d'una prèviament utilitzada en el nostre laboratori. En aquest estudi previ es determinava quins aliments eren els més consumits pels animals (Prats et al, 1989). De manera que la dieta finalment estava formada per: cansalada fumada, paté de fetge de porc, galetes, plàtan, llet ensucrada i enriquida amb un suplement vitamínic i mineral, pinso i aigua.

La reversibilitat d'aquesta obesitat és variable, i sembla ser depenent de l'edat, la soca i fins i tot de la colònia del animal (Rothwell i Stock, 1980), ja que mentre animals joves guanyen poc pes malgrat ingestes molt elevades, els animals vells esdevenen ràpidament obesos i perden poc pes al retornar a la dieta amb pinso. Tractaments llargs i en animals adults, mostren que en retirar la dieta de *cafeteria* es dona una hipofàgia transitòria, que pot ser deguda a la monotonia del pinso en front al la varietat de la dieta de *cafeteria*, però aquests animals, tan sols perden eventualment una mica de pes, i continuen durant molt de temps amb un pes més elevat i un més gran contingut de lípids (Rolls et al, 1980). També es descriu que en tornar a la dieta amb pinso, la hipofàgia que es dona en aquests animals, en una primera etapa afecta tant la mida com la freqüència de la menjada, mentre que, ulteriorment sols es manifesta en la freqüència (Rogers, 1985).

### 2.3.3.2 Altres models

#### 2.3.3.2.1 Intubació gàstrica

Aquest mètode va ser un dels primers que es va emprar per tal de provocar un sobrepés a l'animal (Cohn i Joseph, 1959). El resultat era un increment del contingut de greix corporal, però quan s'aturava el tractament els animals esdevenien hipofàgics i perdien pes ràpidament retornen a valors controls. Un dels problemes d'aquesta metodologia es l'"estress" creat a l'animal que pot afectar a aspectes del metabolisme molt allunyats de la ingesta, además trenquen el patró habitual de ingesta.

#### 2.3.3.2.2 Dietes riques en greixos

L'oferiment de dietes amb un alt contingut de greixos provoca hiperfàgia i obesitat (Poole et al, 1977, Herberg et al, 1974). El grau d'obesitat aconseguida es moderat i depèn en gran mesura de la soca i edat dels animals (Schemmel i Mikelsen, 1973). L'obesitat reverteix en quan se'ls retorna a la dieta normal.



## 2.4 Regulació hormonal

### 2.4.1 Insulina

L'obesitat en l'home i en els models animals, tant genètica com induïda, en la majoria dels casos va associada a una hiperinsulinèmia (Modan et al, 1985). Malgrat això, no es coneix exactament quin és el paper que té en el desenvolupament de l'obesitat.

El fet que en els estudis de models animals es trobi que tant la hiperfàgia com la hiperinsulinèmia es presenten simultàniament, podria fer pensar que l'augment de la secreció de insulina és conseqüència directa de la hiperfàgia. Però la presència de hiperinsulinèmia en absència de hiperfàgia en animals joves amb lesió hipotalàmica (Assimacopoulos i Jeanrenaud, 1976) o bé el fet que la prevenció de la hiperfàgia en la rata Zucker (fa/fa) no evita l'aparició de l'obesitat (Chan i Stern, 1982), descarta aquesta possibilitat.

En l'estat dinàmic de l'obesitat (caracteritzada per un balanç energètic positiu) els teixits diana de la insulina es troben hiper-estimulats pels increments d'aquesta hormona. Aquest estat es caracteritza per una hipoglucèmia i una tolerància normal als sucres (Coleman i Hummel, 1974). Pel que fa a la fase estàtica, una vegada establerta l'obesitat, es dona una resistència perifèrica a la insulina degut a la persistent sobre-estimulació.

La hiperinsulinèmia podria tenir un origen hipotalàmic, doncs es produeix una hipersecreció de l'hormona després de la destrucció electrolítica de la regió ventromedial de l'hipotàlem (Hustverdt i Lovo, 1972). La hiperinsulinèmia podria ser un reflexe d'una resistència hipotalàmica a la insulina (Bray, 1991). La localització cromosòmica dels gens (I,II) de la insulina en el ratolí (cromosoma 7) descarta que la hiperinsulinèmia sigui la causa primera de l'obesitat en el ratolí db/db i ob/ob, sinó que seria més aviat una conseqüència (Johnson et al, 1991).

### 2.4.2 Glucocorticoïdes

El fet que tots els defectes dels animals obesos reverteixin mitjançant adrenalectomia (Bray, 1989) i que canvis en l'estatus adrenal produeixi aprimament (enfermetat d'Addison) o obesitat (síndrome de Cushing) en humans, suggereix que els glucocorticoïdes poden jugar un paper important en el desenvolupament i manteniment de l'estat obès (Bray, 1991).

Després de l'adrenalectomia es normalitzen tant el nivell de ingesta i el patró (Saito i Bray, 1984) com la despesa energètica (York et al, 1984). També baixen els nivells de insulina (Bailey et al, 1986) i millora la resistència del múscul a la insulina (Ohshima et al, 1982).

Aquests efectes podrien estar mediat per l'augment circulant de l'hormona alliberadora de corticotropina (CRF), que esdevé després de l'adrenalectomia com a resultat de la manca del senyal inhibitori dels glucocorticoïdes. S'ha descrit que augments de CRF incrementen l'activitat simpàtica i disminueixen la ingesta. Cal dir també que totes aquestes respostes a l'adrenalectomia es reverteixen amb l'adminis-

tració de glucocorticoïdes (Bray, 1989).

### 2.4.3 Hormona del creixement

La hormona del creixement (GH) incrementa la taxa metabòlica basal en individus prims i obesos (Bray, 1969) així com la deposició de proteïnes, mentre que redueix els dipòsits de greix. Els individus amb una deficiència de GH incrementen la proporció de greix, quan aquests individus reben dosis repetides de l'hormona, el seu greix corporal es redueix considerablement (Bray, 1989). En l'edat adulta declina la secreció de GH coincidint amb un augment de greix corporal, que no té perquè acompanyar-se d'un increment de pes (Forbes i Reina, 1970).

Els nivells hipofisaris de GH estan disminuïts en la rata Zucker (Finkelstein et al, 1986) al igual que els seus nivells en sèrum (Martin i Wangsness, 1978), mentre que en el ratolí ob/ob el contingut hipofisari de GH depèn del sexe sent normals o lleugerament elevades en la femella i baixos en els mascles (Sinha, et al, 1975). Per altra banda l'extirpació de la hipòfisi atura la progressió de l'obesitat tant en la rata Zucker fa/fa (Powley i Opsahl, 1972) com en el ratolí ob/ob (Herbai, 1970), però no en animals amb lesió a la zona ventromedial del hipotàlam (York i Bray, 1974). L'efecte de l'hipofisectomia en la reducció de l'obesitat podria ser degut a que es produeix una manca de corticotropina (ACTH), amb efectes semblants a l'adrenalectomia.

Hi ha evidències de que en la rata fa/fa es desenvolupa primer la hiperinsulinèmia que la baixada de secreció de GH (Planche et al, 1983, Ahmad et al, 1990) i que "in vitro" la insulina disminueix els nivells de mRNA de la GH en cèl·lules de la hipòfisi (Yamashita i Melmed, 1986), fa pensar que la insulina pugui estar implicada en la regulació d'aquest gen, i sigui una causa de la baixada de GH en aquests animals.

### 2.4.4 Hormones tiroïdees

En la rata Zucker fa/fa s'han descrit nivells normals o bé disminuïts de tiroxina ( $T_4$ ) i triïode-tironina ( $T_3$ ) (Fletcher et al, 1986, Wu et al, 1987). Normalment en l'estat hipotiroïdeo es troba una taxa metabòlica reduïda i un augment del greix corporal, mentre que l'hipertiroïdisme contràriament hi ha una elevada taxa metabòlica i una disminució del greix corporal (Bray i Campfield, 1975). També s'ha observat que ratolins tractats amb tiroxina incrementen la seva ingesta després d'un període de latència de tres o quatre dies, i s'hi s'els permet escollir la dieta seleccionen més midons que d'altres nutrients (Donhoffer i Vonotzky, 1947), suggerint un paper d'aquestes hormones en el control de la ingesta.

### 2.4.5 Hormones sexuals

Com ja s'ha fet esment anteriorment s'observa una tendència diferencial en la distribució dels acúmuls de greix segons el sexe. Fet que podria ser explicat per una acció diferent de les hormones sexuals. Així, hi ha dones joves que presenten, en la zona dels malucs, adipòcits de mida més gran i amb una alta activitat de la lipoproteïna lipasa, que desapareix en la menopàusia, però que sembla reconstituïble amb una

teràpia de substitució amb hormones femenines (Rebbufé-Scrive, 1987). Aquesta regió mostra una reduïda resposta a estímuls lipolítics. Durant la gestació i alletament canvien aquestes activitats, afavorint-se la mobilització de greixos i disminuint l'activitat de la lipoproteïna lipasa. Canvis que suggereixen que la funció d'aquest dipòsit de greix seria acumular energia adicional per fer front a les necessitats energètiques del final de l'embarç i per l'alletament (Björntorp, 1989).

Els androgens actuen de manera diferent, així la testosterona, un dels androgens més potents, provoca un augment de la ingesta i del teixit magre, i un disminució del greix en rates (Nuñez i Grundman, 1982). En l'home s'ha descrit una més gran sensibilitat lipolítica en els adipòcits abdominals (típics de la distribució androide) deguda a un increment en el nombre de receptors  $\beta$ -adrenèrgics (Rebbufé-Scrive, 1989), efecte que podria induir-se per la testoterona (Björntorp, 1989).

En la majoria de models d'obesitat genètica es dona una alteració en la funció reproductora (Bray i York, 1979). També provoca obesitat la castració, però aquesta reverteix amb l'adrenalectomia (Schemmel et al, 1982).

## **2.5 Metabolisme: alteracions**

Com s'ha anat introduint ja en anteriors apartats en l'obesitat el metabolisme en general presenta una sèrie de anomalies, sobretot degut al fet que l'ambient hormonal s'ha vist modificat. Les modificacions més rellevants que pateix el metabolisme en l'obesitat es tractaran a continuació.

### **2.5.1 Metabolisme glucídic**

En la majoria de casos d'obesitat els nivells de glucosa en sang són elevats, menys en el cas de la rata Zucker fa/fa i de l'obesitat hipotalàmica que tenen normogluccèmia malgrat presentar nivells elevats d'insulina (Bray i York, 1979).

En general el metabolisme dels glúcids està condicionat per els alts nivells de glucocorticoïdes i la resistència a insulina, que afavoreixen l'acció del glucagó, a una taxa gluconeogènica alta, que alhora agreuja la hipergluccèmia (Bray i York, 1979).

### **2.5.2 Metabolisme lipídic**

El metabolisme dels lípids en l'estat obès es manifesta per un component fortament lipogenètic a expenses principalment del fetge (producció de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) i teixit adipós blanc (magatzem de triacilglicerols) que amb una elevada activitat lipoproteïna lipasa internalitza els àcids grassos que li arriben de la dieta (quilomicrons) o bé de síntesis endògena (VLDL). També s'ha descrit una elevada lipogènesi a partir de glucosa en el teixit adipós blanc, que s'ha afavoreix per un increment del transportador de glucosa, específic del teixit, GLUT-4 trobat recentment en la rata Zucker (Hainault et al, 1991).

Es troba un augment general de l'activitat dels enzims de la via lipogenètica en fetge i teixit adipós blanc. En la rata Zucker aquest augment es present en el teixit

adipós blanc ja des de la segona setmana de vida, mentre que en el fetge no apareix fins al voltant dels 21 dies, sent el deslletament, potser, una senyal important (Krief i Raymond, 1991). La hiperinsulinèmia podria ser responsable directe de la hiperlipogènesis, ja que en ratolins *ob/ob* tractats amb estreptozotocina s'hi inhibeix la lipogènesi (Loten, 1976).

### **2.5.3 Metabolisme proteic**

Quant el metabolisme proteic, sembla que pot haver-hi certes diferències segons el model estudiat. En el ratolí *ob/ob* es descriu una certa incapacitat per arribar a dipositar quantitats normals de proteïna muscular, fins el punt que a partir dels sis mesos s'atura el guany de pes i inclús pot perdre pes (Batt, 1978). En la rata Zucker la deposició proteica s'ha descrit com a normal en el primer període de vida (Bell i Stern, 1977), de manera que la diferència de pes es deguda tan sols a l'augmentada deposició de lípids, però a partir d'aquesta edat hi ha una reducció relativa de la deposició de proteïnes, més marcada en mascles (Radcliffe i Webster, 1976). Alguns autors suggereixen que les taxes metabòliques de síntesi són menors en la rata *fa/fa*, però, les taxes de degradació són similars (Chan, 1985).



### **3 CONTROL DEL PES CORPORAL**





### 3.1 Definició i evidències

En els mamífers la majoria de funcions fisiològiques estan regulades dintre uns límits precisos. Exemples típics i fàcils de copsar serien el cas de la temperatura corporal i els nivells de glucosa en sang. Malauradament la regulació del pes corporal es més complex i menys òbvia. L'amplia variació en el contingut de greix corporal que es troba en diferents individus, així com en un mateix al llarg de la vida podria fer pensar que el pes corporal no està ben regulat. Però, la precisió amb la que una funció homeostàtica es regula depèn dels límits que permeten la supervivència, que són molt estrets per la temperatura, però relativament amplis per el pes corporal (Stock i Rothwell, 1982).

La hipòtesi de que el pes corporal es regula a un nivell prefixat està recolzada per nombroses observacions en varies espècies, incloent rates (Chon i Joseph, 1962) i humans (Sims i Horton, 1968), en els que es forçava un guany o una pèrdua de pes mitjançant augment o reducció de la ingesta ,però que en parar l'estímul el pes retornava al pes normal. Altres estudis en animals en creixement, evidencien que hi ha un pes determinat per cada edat cronològica i que si en una determinada etapa del creixement se li restringeix l'aliment, el pes perdut el recupera quan torna a tenir aliment a la seva disposició, tot augmentant la ingesta (Wilson i Osbourn, 1960).

El pes corporal cal que estigui regulat dins marges limitats per tal d'aconseguir un funcionament òptim de l'organisme, ja manera que un sobrepés dificulta la mobilitat i a més en moviment representa un consum energètic més elevat (Blomm i Eidex, 1967). Un sobrepés també comporta problemes cardiovasculars i respiratoris, sistemes que han de fer front a un cos de mida anormalment gran (Vaughan i Conahan, 1980). En aquest mateix sentit el sistema esquelètic i locomotor també es veuen afectats, principalment els ossos que poden arribar a deformar-se, trencar-se o desgastar-se amb més facilitat degut al sobrepés. Pel que fa referència a un pes massa baix també comporta problemes, ja que implica una manca de reserves lipídiques que podrien dificultar la supervivència en èpoques de manca d'aliments (James i Trayhurn, 1976). També una capa aïllant de greix massa prima proporciona una pobra protecció al fred (Jéquier et al, 1974).

De manera general podrien dir que el fet que els individus adults, de la majoria de les espècies, mantinguin el pes relativament constant durant llargs períodes de temps, ens evidencia una regulació del pes. Aquesta regulació s'aconsegueix mitjançant un equilibri entre l'energia d'entrada i la de sortida i aquest equilibri implica una regulació complex amb molts factors implicats a diferents nivells, entre ells cal destacar el paper del sistema nerviós central.

### 3.2 Plantejaments teòrics del balanç energètic

Les variacions que es poden donar en el pes corporal són ,en general, un reflex de variacions en la composició energètica de l'individu. Aquesta variació es conseqüència d'un desequilibri entre les entrades i les sortides d'energia, aquest concepte el poden expressaren l'equació del balanç energètic:

$$E_i = E_T + E_D + E_E \quad (\text{Brobeck, 1981})$$

On:  $E_i$  és l'energia ingerida

$E_T$  és l'energia utilitzada per realitzar treball  
 $E_D$  és la despesa energètica  
 $E_E$  és l'energia emmagatzemada

D'aquesta equació en podem desglossar la despesa energètica en les seves diferents formes:

$$I = T + R + C + K + E + S \quad (\text{Kayser, 1964})$$

On: I és energia ingerida  
T és el treball extern realitzat  
R és el calor perdut en forma de radiació  
C és el calor perdut en forma convecció  
K és el calor perdut per conducció  
E és el calor perdut per evaporació  
S és l'energia emmagatzemada al cos

També cal considerar que a l'energia ingerida bruta cal restar-li les pèrdues per femta i orina per obtenir l'energia metabolitzable útil per l'organisme.

$$E_M = E_I - E_F - E_O \quad (\text{Blaxter, 1989})$$

On:  $E_M$  és l'energia metabolitzable  
 $E_I$  és l'energia ingerida  
 $E_F$  és l'energia en femtes  
 $E_O$  és l'energia en orina

En la vida adulta aquest balanç energètic s'apropa a zero, es a dir l'organisme està prop d'un equilibri energètic, que no implica un estat estacionari, sinó que es manté en un equilibri dinàmic (Blaxter i Waiman, 1961). Garrow (1975) suggereix que el pes corporal es mantingut per un control cognitiu, mentre que Payne i Dugdale (1977) desenvolupament un model simulat per ordinador, en el qual s'estableix un equilibri dinàmic, de manera que, una perturbació que produeix un canvi en el pes corporal és contrarrestada per un canvi en la despesa energètica. Mentre que Wirtshafter i Davis (1977) amb un model similar atribueixen un paper important a la modulació de la ingesta.

### 3.3 Mesura del balanç energètic

Per tal de fer una mesura precisa del balanç energètic cal determinar cada un dels paràmetres de l'equació anterior (Brobeck, 1981). Però donat les diferents característiques d'aquests paràmetres cal l'utilització de tècniques diferents.

#### 3.3.1 Mesura de l'energia ingerida

Com ja s'ha fet referència anteriorment, de l'energia que ingressa a l'organisme en forma d'aliment no tota es troba a disposició de ser utilitzada. Per aquests motius

cal tenir en compte els diferents "nivells" de l'energia ingerida.

### 3.3.1.1 Energia ingerida bruta

Es l'energia que conté l'aliment com a tal abans de ser ingerit. Es pot mesurar cremant l'aliment amb una bomba calorimètrica i mesurant la calor despresa. aquest procediment transforma totalment l'aliment en qüestió, en aigua, diòxid de carboni i altres compostos inorgànics. Però com que això no és exactament el que passa en un organisme viu ens caldrà fer d'altres determinacions.

### 3.3.1.2 Energia ingerida digerible

Aquesta es la mesura de l'energia que realment s'ha absorbit. S'obté de restar a l'energia ingerida bruta l'energia de la femta. Si bé aquesta fracció no absorbida i que es perd per la femta és majoritàriament fibra (polisacàrids no digeribles), cal tenir en compte que això és una característica de l'animal, donat que diferents tipus d'animals presenten diferents capacitats per digerir un aliment.

### 3.3.1.3 Energia metabolitzable

Es l'energia que el organisme té disponible per realitzar totes les seves funcions. L'energia metabolitzable s'obté de restar a l'energia ingerida digerible les pèrdues energètiques que són conseqüència de l'oxidació incompleta en el cos de proteïnes i altres materials nitrogenats i que són eliminades per orina, com són urea, creatinina i àcid úric.

L'energia metabolitzable és doncs, la que ens interessa quantificar a efectes de realitzar un balanç energètic. Per tal de determinar aquesta fracció podem trobar-nos amb alguns problemes metodològics que fan difícil fer-ne una mesura precisa. Una manera lògica de fer la mesura seria restar de l'energia bruta dels aliments l'energia de l'orina i de la femta, totes aquestes mesures fetes amb una bomba calorimètrica. Però l'alt contingut d'aigua en l'orina fa necessari que prèviament s'assequi, procés durant el que es poden volatilitzar alguns components que contenen energia.

Com alternativa es poden fer mesures aproximades a partir de la composició dels aliments que diferents autors han compilat en taules. D'entre elles, unes de les més emprades són les de McCance i Widdowson, revisades posteriorment per Paul i Southgate (1978), que constitueixen les taules estàndard al Regne Unit, i que han estat utilitzades per autors com Rothwell i Stock (1979). Als Estats Units s'utilitzen majoritàriament les taules de Merrill i Watt (1955). Els valors d'energia metabolitzable obtinguts per aquest procediment varien considerablement segons les taules emprades, i també segons els aliments, en aquest sentit els més variables són les fruites i d'altres productes vegetals (Blaxter, 1989).

També podem determinar l'energia metabolitzable a partir de la proporció relativa dels nutrients, que obtindrem mitjançant una anàlisi química dels seus components, tenint en compte l'efectivitat de la utilització promig de cada un d'ells pel cos (Paul i Southgate, 1978) i utilitzant un equivalent calòric per les proteïnes que tingui en consideració la seva oxidació parcial en l'organisme. Paul i Southgate per estimar l'energia metabolitzable de les dietes per humans,

consideren que els glúcids no digeribles (fibra) no tenen valor nutritiu i que els factors per proteïna, lípid i glúcid disponibles són completament independents. En contra d'aquesta simplificació hi han els estudis de Southgate i Durnin (1970) en els que es mostra que l'home pot metabolitzar part de les pentoses i cel·lulosa de la dieta, a més la proporció de glúcids no digeribles en la dieta baixa la digestibilitat de greixos i proteïnes.

L'energia continguda en la femta i orina varia segons les espècies i la dieta. Per exemple en herbívors, la femta es un component considerable degut a la dieta rica amb fibra que consumeixen aquests animals. Pel que fa als remugants cal tenir en compte també el metà i l'hidrogen que es produeix en el tracte digestiu com a conseqüència de fermentacions microbianes. Aquests gasos són principalment eliminats com eructes i flatulències, tot i que petites quantitats són absorbides i excretades pels pulmons.

### **3.3.2 Mesura de l'energia emmagatzemada**

El mètode més directe de determinar l'energia retinguda en el cos és mitjançant la combustió del cos abans de començar l'experiment i al final. Però el principal problema que se'ns planteja és que un animal tan sols el podem cremar un cop. L'alternativa és agafar un grup d'animals representatius pels començament i un altre que segueix l'experiment i al final se'ls determina el seu contingut energètic, la diferència d'ambdós grups serà l'energia retinguda. Aquest va ser un dels primers mètodes utilitzats (Lawes i Gilbert, 1861). Les tècniques per estimar l'energia del cos impliquen que abans s'ha de fer un buidat del tracte intestinal i una posterior homogenització. Aquest últim procés es força fàcil per animals petits, però ben al contrari per animals grans que calen varies determinacions amb les conseqüents pèrdues i errors.

L'estudi de l'energia retinguda també es pot fer determinant la composició del cos fent l'anàlisi química dels components majoritaris (proteïnes, lípids i glúcids) i aplicant els corresponents factors energètics. Cal igual que abans dos grups d'animals diferents al principi i al final de l'experiment.

Hi ha d'altres mètodes indirectes que no requereixen la mort de l'animal, es basen en el càlcul de l'entalpia de combustió una vegada coneguda la composició corporal. Hi ha diferents tècniques que permeten estimar la composició corporal i que són molt emprades en l'home, entre elles: mesura del aigua pel principi de la dilució d'una substància, mesura de la massa prima per distribució del  $^{40}\text{K}$ , doncs l'estimació de la densitat del cos permet el càlcul del greix corporal. Recentment es disposen de tècniques més sofisticades com l'estimació de la composició elemental del cos per anàlisi d'activació de neutrons (Baxter, 1989).

### **3.3.3 Mesura de la despesa energètica**

Qualsevol tipus d'activitat física va lligada a una producció de calor induïda per la contracció muscular, sent l'eficiència del múscul esquelètic d'un màxim del 50% durant la contracció isotònica (treball efectiu contra la gravetat) i nul·la durant la contracció isomètrica. De manera que la resta d'energia química consumida es desprèn

en forma de calor.

Degut a que l'activitat física transforma els substrats energètics i produeix calor, l'energia emprada en aquesta activitat pot expressar-se correctament en forma de calor equivalent. També l'energia que es desprèn de l'organisme en estat de repòs ho fa en forma de calor. Per tant, la manera d'expressar la quantitat d'energia consumida, emmagatzemada i gastada es en forma de calor, i la primera unitat per expressar l'energia en el camp de la nutrició va ser la caloria (cal), si bé actualment es tendeix a utilitzar les unitats del sistema internacional, el Joule (J) per expressar l'energia i el Watt (W) per la potència, energia per unitat de temps ( $1W = 1J \times s^{-1}$ ).

Com hem mencionat anteriorment, en l'equació del balanç energètic veiem que les pèrdues de calor que es produeixen en un individu són de diversos tipus. Així en un individu en repòs l'equació del balanç de calor segons Jéquier (1987) és:

$$M = (R + C + K + E) + T$$

On: M és la producció de calor pel propi metabolisme  
R és el calor alliberat per radiació  
C és el calor alliberat per convecció  
K és el calor alliberat per conducció  
E és el calor alliberat per evapotranspiració  
T és el calor emmagatzemat en el cos

Per tal de mesurar les pèrdues de calor o la producció de calor en organismes vius, hom pot utilitzar diverses tècniques calorimètriques, les quals es poden dividir en dos grans grups: calorimetria directa i calorimetria indirecta.

#### a) Calorimetria directa

Per aquesta tècnica es mesura la calor despresa per l'organisme com a tal, per tant mesurem els paràmetres R, C i K de l'equació anterior. Mentre que el paràmetre E, l'evapotranspiració roman en controvèrsia si es mesurat o no en la calorimetria directa, així, Mount (1978) diu que aquest calor no es pot incloure dins la mesura directa, mentre que Jéquier (1987) insisteix en la conveniència de mesurar les diferències de pressió de vapor d'aigua entre l'entrada i la sortida de l'aire i també el flux.

Els calorímetres que s'utilitzen són de diferent tipus, que podem agrupar de la següent manera:

\* Calorímetres adiabàtics: en ells les pèrdues de calor del cos es mesuren extraient la calor mitjançant diferents sistemes i impeding les pèrdues a través de les superfícies de les cambres que contenen l'organisme. Podem distingir tres tipus:

"Heat-Sink": Construïts per primera vegada per Atwater i Rosa (1899). Consta d'una cambra amb parets aïllants, de la qual s'extreu la calor mitjançant un bescanviador de calor, generalment l'aigua freda que circula per conductes. El calor alliberat per l'animal fa

augmentar la temperatura del aigua.

De convecció: Es basen en la mesura de l'augment de temperatura de l'aire que es fa circular per l'interior de la cambra.

Diferencials: Hi han dues cambres, l'una té l'animal i l'altra una font artificial de calor que s'ajusta perquè produeixi un augment de temperatura idèntic que en la cambra on hi ha l'animal, mesurant-se la quantitat de calor utilitzada per la font.

\* Calorímetres de gradient: Descrit per Benzinger i Kitzinger (1949). Consisteix en la mesura de la diferència de temperatura entre les dues superfícies d'una làmina de material aïllant que envolta el calorímetre. La pèrdua de calor de l'animal es pot quantificar a partir del gruix, la conductivitat tèrmica i la superfície total de les parets.

#### b) Calorimetría indirecta

L'energia que es produeix en el cos en els processos d'oxidació, implica que es consumeixi oxigen i es produeixi diòxid de carboni i aigua. Són precisament, el consum d'oxigen i la producció de diòxid de carboni, els paràmetres que es mesuren en la calorimetría indirecta.

Amb aquesta tècnica mesurarem el paràmetre M de l'equació anterior. Les reaccions metabòliques implicades en l'alliberament d'energia lliure dels substrats oxidats estan acoplades a la síntesi d'ATP, i és en aquesta que l'energia es fa disponible pel manteniment del metabolisme. Aproximadament, una tercera part de l'energia dels nutrients es perd en forma de calor al sintetitzar-se l'ATP, i dues terceres parts de l'energia són alliberades en la hidròlisi de ATP (Flatt, 1984). Per tant, tota l'energia serà eventualment transformada en calor. En definitiva, la mesura de la quantitat de substrats oxidats, o indirectament de l'oxigen utilitzat per oxidar-los, serà una mesura indirecta de la quantitat d'energia alliberada per l'organisme.

### 3.4 Control de la ingesta

Les observacions de que una ingesta elevada freqüentment comporta un guany de pes i obesitat, o que una baixa ingesta es correlaciona amb una pèrdua de pes, han portat a creure que la ingesta és el principal factor en la regulació del balanç energètic. Però cal tenir clar el que es volem dir amb els termes hiperfàgia (o sobrealimentació) i hipofàgia. Si hiperfàgia es refereix a que l'energia ingerida és més gran que la despesa energètica, aleshores tenint en compte l'equació del balanç energètic, caldrà esperar un augment en el contingut energètic corporal, i a l'inversa per la hipofàgia. Ara bé, la confusió esdevé quan hiperfàgia es refereix al fet que la ingesta es més gran del "normal" o bé més gran de la mitja de la població. En aquest sentit hi han individus que un moment determinat incrementen la seva ingesta per sobre del seu nivell habitual, degut a que per algun motiu també ha incrementat la seva despesa energètica i es manté el seu balanç energètic, segons la definició anterior aquest individus no són hiperfàgics (Stock i Rothwell, 1982).

La ingesta està molt ben controlada en alguns animals, com per exemple la rata

(Snowdon, 1969), però aquest control no sembla ser tan eficient en el cas de l'home. Aquest control s'exerceix des del cervell, des del centre de la gana, situat en la zona ventromedial del hipotàlem (Leibowitz, 1987). A aquesta zona hi arriben senyals perifèriques, com l'estat de glucèmia, l'estat d'ompliment de l'estómac, que afecten el control a curt termini, i senyals d'altres zones del cervell que estan implicades en el control a més llarg termini (Alemany, 1989).

Hi han moltes evidències de que aquest control precís de la ingesta existeix. En mamífers, nombrosos estudis en els quals es provoca experimentalment un canvi de pes i composició corporal, s'observa que quan la pertorbació desapareix, es recupera el nivell normal a expenses de la ingesta. Per exemple, períodes de privació d'aliment normalment són seguits d'hiperfàgia que té una durada més o menys llarga segons la magnitud de la pèrdua de pes. En l'obesitat experimental mitjançant alimentació forçada (intubació) (Cohn i Joseph, 1959), quan para l'estímul, els animals esdevenen hipofàgics i inclús afàgics fins perdre l'excés de pes. En humans en el treball de Sims et al (1973) on s'induïa la ingesta de grans quantitats d'aliments en presoners per tal d'estudiar l'aparició d'obesitat, es descriu una gran dificultat per a mantenir aquesta elevada ingesta durant un període llarg, a més quan es retirava alguns individus perdien pes espontàniament.

Normalment un canvi en la ingesta comporta un canvi inapropiat en el pes corporal i contingut de greix, es un cas evident l'obesitat genètica que presenten alguns rossegadors. Però existeixen algunes situacions en les que aquest canvi de composició corporal no comporta una desavantatge, sinó ben al contrari és una avantatge per l'animal. Podem citar el cas dels animals hivernants que a la tardor incrementen la seva ingesta aconseguint un gran acúmulo de greix que servirà de reserva durant l'època de letargia. S'observa una hiperfàgia en el període pre-migratori de les aus acumulant energia suficient per la llarga volada (Stock i Rothwell, 1982).

La regulació de la ingesta es complex i són molts els factors i senyals que hi estan implicats. En alguns casos està bastant clar el funcionament, però hi han d'altres en els que no es coneix massa bé com influeixen en aquest control.

Algunes de les senyals i factors implicats en aquest control són:

#### **3.4.1 Senyals sensorials**

L'aspecte i l'olor dels aliments són senyals importants per començar a menjar i per a identificar el tipus de menjar. A més, una vegada a la boca, la textura i el gust informen de la qualitat del menjar i serveixen per continuar menjant o bé deixar de fer-ho (Sclafani et al, 1981). Es coneguda l'habilitat que tenen la majoria dels animals per evitar els aliments que saben que els hi són perjudicials, per exemple els verins.

#### **3.4.2 Senyals gastro-intestinals**

Una vegada el menjar s'endinsa en el tracte gastro-intestinal, es produeixen dos tipus de senyals fonamentals. Una es la distensió gastro-intestinal i l'altra l'alliberament d'hormones intestinals provocada directament pels aliments i que activen els receptors neurals d'aquesta zona. La distensió gastro-intestinal es un mecanisme de "feedback" negatiu de control de la ingesta. El nervi vagus es el principal efector de

l'informació de l'estat gastro-intestinal (Kral et al, 1983).

La colecistoquinina (CCK) i la bombesina, ambdues alliberades en el tracte intestinal, serveixen com a senyals inhibidores de la ingesta (Baile et al, 1986). Un mecanisme per explicar l'actuació de la colecistoquinina per inhibir la ingesta, seria mitjançant un estrenyiment del pílor que provocaria un retard en el buidat gàstric que alhora prolongaria la distensió gàstrica i com a conseqüència la senyal. Això ho faria mitjançant els receptors específics CCK-A situats en la zona del pílor. La vagotomia inhibeix els efectes provocats per la CCK, suggerint doncs, que el nervi vagus seria el responsable de la transmissió de les senyals perifèriques al sistema nerviós central (Bray, 1989). Però la CCK també té receptors específics en el cervell CCK-B i la CCK es alliberada per el tracte digestiu i per el cervell de manera que sembla que per l'efecte de sacietat sigui més important l'estimulació dels CCK-B que dels receptors CCK-A (Dourish et al, 1989).

### 3.4.3 Composició de nutrients

La composició dels nutrients afecta de manera considerable la ingesta, així, dietes no equilibrades acostumen a ser poc atractives i tenir un gust poc agradable. Dietes amb contingut de proteïna molt alta o molt baixa, o amb un balanç d'aminoàcids no equilibrat tendeixen a fer baixar la ingesta, el mateix s'observa amb dietes amb molt poc greix. Potser perquè són menys gustoses, més difícils d'empassar i potser també perquè l'ompliment de l'estómac atura l'ingesta tot i que la densitat energètica sigui molt més baixa (Stock i Rothwell, 1982).

Els glúcids i específicament la glucosa tenen una implicació directa en el control de la ingesta. La hipoglucèmia estimula la gana formant part d'un mecanisme homeostàtic pel manteniment dels nivells sanguinis de glucosa. Hi ha evidències de que la concentració de glucosa portal modula l'estimulació vagal, de manera que concentracions elevades de glucosa disminueixen l'intensitat vagal i viceversa, informant al cervell de l'estat de glucèmia. Així sembla que la senyal que inicia el procés de menjar va precedir d'una baixada del 15% de la glucosa plasmàtica (Campfield et al, 1985). La teoria de que la glucèmia podia estar relacionada amb el control de la gana ja va ser introduïda per en Mayer en 1953, i es va anomenar **Teoria glucostàtica**, que posteriorment va modificar (Mayer, 1955) suggerint que més que els nivells de glucosa sanguinis, el que determinaria la ingesta seria la velocitat d'entrada d'aquesta a les cèl·lules. Aquesta modificació permetia explicar que individus amb alts nivells de glucosa en sang, per manca d'insulina, cas dels diabètics, tinguessin ingestes molt elevades, al no poder entrar la glucosa a les cèl·lules. De tota manera sembla difícil acceptat que la taxa d'utilització de glucosa sigui un element de regulació de la ingesta a llarg termini, donat les grans variacions que experimenta la glucèmia d'un àpat a un altra. Si més no, la glucosa pot tenir un paper important en el control de la gana a curt termini. De fet, però el propi Mayer reconeixia dos ajustaments, un a curt termini (dia, dia) regulat per la glucosa i un altre a llarg termini controlat per lípids (Van Itallie, 1990)

Kennedy (1953) va ser el primer en proposar la **Teoria lipostàtica**, suggerint que els nivells de lípids corporals es mantindrien a un valor determinat (serien la variable regulada), i que una variació en aquest nivell provocaria un canvi en la ingesta (seria la variable controlada). Aquest control es faria mitjançant una senyal que s'originaria



directament en els dipòsits de lípids, potser algun metabòlit, com per exemple, els àcids grassos.

Treballs més recents mostren que la metabolització dels àcids grassos i el potencial redox hepàtic semblen estar implicats en el control de la ingesta (Scharrer i Langhans, 1986). L'increment de l'oxidació d'àcids grassos en fetge inhibeix la ingesta. S'ha suggerit que el 3-hidroxibutirat, producte de la degradació dels greixos, pot ser una senyal de la regulació de la ingesta (Bray i Campfield, 1975, Nishizawa i Bray, 1980). LeMagnan (1983) suggereix que l'increment en el flux de "combustibles" endogens (àcids grassos, glicerol, 3-hidroxibutirat) que venen d'una activa lipòlisi, pot ser el responsable de la baixada de la ingesta durant el dia, a la rata. També s'observa que una dieta rica amb àcids grassos de cadena mitjana no provoca obesitat, ja que s'oxiden ràpidament a 3-hidroxibutirat i no s'incorporen a les reserves lipídiques (Bach i Babayan, 1982). Injeccions perifèriques de 3-hidroxibutirat (però no de acetoacetat) inhibeixen la ingesta, suggerint que el pas de 3-hidroxibutirat a acetoacetat és important per contribuir a un estat de sacietat (Langhans et al, 1983). Estudis de l'efecte de varis parells redox, com 3-hidroxibutirat/ acetoacetat, lactat/piruvat i glicerol/dihidroxiacetona, en el control de la ingesta indiquen la importància de l'estat en que es troba la mitocondria en l'oxidació d'aliments. Així un increment en la producció, en la mitocondria, d'equivalents reduïts pot ser una senyal per inhibir la ingesta. Aquest efecte es podria explicar perquè un increment en l'oxidació d'aliments produeix un increment de NADH, que mitjançant la cadena respiratòria ens donarà ATP, el qual pot estimular l'activitat de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  i donar-se una hiperpolarització de la membrana, que serà el senyal de sacietat que serà conduït pel vagus cap el cervell (Langhans i Scharrer, 1987).

També els canvis en les concentracions d'aminoàcids juguen un paper important en la regulació de la gana, sobre tot tirosina i triptofan que són precursors de neurotransmisors que poden jugar un paper important en assenyalar una ingesta adequada de proteïnes (Bray, 1990). En aquest sentit, el fet que els animals tendeixin a escollir una dieta amb una proporció d'aminoàcids equilibrada va portar al desenvolupament d'una Teoria aminostàtica, en la que es dona als aminoàcids un paper en la regulació de la ingesta, possiblement relacionat amb el control de la massa magra del cos. La rata Zucker, que és hiperfàgica oxida molts aminoàcids que poden utilitzar-se per a sintetitzar greix, al temps que hi ha un creixement de la massa magra limitat, quan la rata Zucker es sotmet a dieta rica en proteïnes s'aboleix la hiperfàgia i també de manera significativa el guany de pes degut a greix (Stock i Rothwell, 1982).

#### 3.4.4 Senyals hormonals

Els nivells d'insulina en plasma es correlacionen directament amb els nivells d'ingesta, pes i de greix corporal. La insulina és la principal hormona que afecta la ingesta. Evidències d'aquesta afirmació són les observacions que en rates obesas per lesió hipotalàmica, l'obesitat reverteix per vagotomia, impeding-se la secreció de l'hormona. L'obesitat és absent en animals amb diabetis degut a la destrucció de les cèl·lules  $\beta$  del pàncreas (Stock i Rothwell, 1982).

Una modificació de la idea anterior es que el que influeix en la regulació no són directament els nivells de insulina, sinó la relació insulina/glucagó o insulina/ hormona

del creixement. Hi ha una correlació directa entre aquestes relacions i la ingesta (Stock i Rothwell, 1982).

Les hormones esteroïdes també influeixen en la ingesta i pes corporal, inhibeixen la gana, de manera que l'extirpació dels ovaris produeix hiperfàgia i obesitat. Els grans augments dels nivells de progesterona durant l'embarç poden ser els responsables de la hiperfàgia gestacional (Stock i Rothwell, 1982).

Els corticoesteroïdes incrementen la ingesta, i es coneix que l'adrenalectomia produeix hipofàgia i pèrdua de pes (Castonguay et al, 1986). L'acció de les hormones tiroïdes estimula la taxa metabòlica, que s'acompanya d'un increment en la ingesta per tal de mantenir el pes (Stock i Rothwell, 1982).

També hormones secretades en el tracte gastro-intestinal mostren un paper regulador en el consum d'aliments. Entre d'elles potser la més potent és la colecistoquinina de la que ja hem parlat anteriorment (Bray, 1991).

### **3.4.5 Temperatura ambient**

Un altre factor a tenir en compte en aquesta regulació es la temperatura ambient i la producció de calor. Les altes temperatures ambientals redueixen la ingesta mentre que les baixes temperatures l'incrementen. També s'ha suggerit que la producció de calor endògena pel teixit adipós marró o altres teixits pot actuar com una senyal de sacietat (Bray, 1990).

### **3.4.6 Activitat física**

L'activitat física moderada té un efecte petit sobre la ingesta. Un exercici intens estimula la gana tant en animals com en l'home, mentre que un exercici molt intens i prolongat causa una reducció momentània de la ingesta (Stock i Rothwell, 1982).

## **3.5 Control de la despesa energètica**

### **3.5.1 Factors que afecten la despesa energètica**

La despesa energètica es veu afectada per diferents factors ja siguin ambientals o de comportament. Alguns d'aquests factors són els que indiquem a continuació.

#### **3.5.1.1 Mida del cos**

Per tal de determinar si hi han diferències en la taxa metabòlica (energia requerida pel manteniment de les funcions vitals, vegeu apartat 3.5.2.1) en relació a la mida del cos, cal fer les mesures de producció de calor en unes condicions definides: l'individu ha d'estar 1) en estat post-pandrial (en dejuni), 2) en repòs i 3) en temperatura termoneutra. Les mesures fetes en aquestes condicions corresponen a **taxa metabòlica basal (TMB)** (Stock i Rothwell, 1982).

Fa temps es va observar que la TMB, expressada per Kg de pes, disminueix al augmentar la mida del animal. Els valors s'uniformitzen quan els valors

s'expressaven en funció de la superfície corporal, això es lògic si tenim en compte que els animals a l'augmentar de tamany (volum) la seva superfície en relació del volum baixa, per tant perd menys calor i li costa menys mantenir la seva temperatura corporal. Després de nombrosos esforços per tal de mesurar la superfície corporal, es va trobar que hi ha una relació lineal entre el logaritme de la TMB i el pes corporal amb un pendent aproximat a 0.75, de manera que la TMB es proporcional  $\text{pes}^{0.75}$ , que es coneix com a "mida metabòlica del cos" (Stock i Rothwell, 1982).

### 3.5.1.2 Temperatura ambient

La TMB es manté independent de la temperatura ambient dintre d'uns estrets marges, aquesta zona on la TMB es manté constant es la anomenada **zona termoneutra**. La zona termoneutra està limitada per la **temperatura crítica alta**, per sobre de la qual es produeixen respostes que afavoreixen les pèrdues de calor i per la **temperatura crítica baixa**, per sota de la qual es desencadenen mecanismes de producció de calor i d'estalvi de les pèrdues (Gordon, 1989). Així doncs la taxa metabòlica basal incrementa al anar disminuint la temperatura, per sota de la temperatura crítica baixa. Per sobre de la temperatura crítica alta es perd calor per fenòmens d'evaporació principalment, quan l'evaporació arriba al límit la temperatura corporal pot pujar i produir una pujada exponencial de la TMB. En aquest cas, la pujada de TMB no es conseqüència de mecanismes fisiològics d'adaptació (com en el cas de la termogènesi a temperatures baixes), sinó que és un senzill efecte físic de la temperatura sobre la velocitat de les reaccions químiques del cos. Aquest efecte de la temperatura en la TMB es pot expressar com el factor  $Q_{10}$ , que és el canvi produït per un augment de temperatura de 10°C. Per la majoria d'animals el  $Q_{10}$  és de 2, que vol dir que la taxa metabòlica basal es duplica cada 10°C d'augment de temperatura (Stock i Rothwell, 1982).

### 3.5.1.3 Activitat física

Hi ha una relació proporcional entre el cost d'una acció física i el tamany del cos. Per exemple, per pujar una muntanya com la Ben Nevis (Gran Bretanya), un ratolí gasta un 5,5 % de la seva TMB considerant una eficiència d'un 30 %, mentre que a l'home li costa un 42 % de la TMB (Stock i Rothwell, 1982).

### 3.5.1.4 Manteniment, creixement i menjar

Es considera que si la TMB es de  $300\text{Kj}/\text{pes}^{0.75}/\text{dia}$  (Stock i Rothwell, 1982) llavors es necessitarà aproximadament la mateixa quantitat d'energia metabolitzable de la ingesta per tal de mantenir el balanç energètic. Això es cert en condicions de manteniment, però altres situacions fisiològiques com creixement, embarç, lactància i obesitat requereixen una ingesta superior a la taxa metabòlica basal

## 3.5.2 Pèrdues de calor (termogènesi): Modalitats

### 3.5.2.1 Producció obligatòria de calor o taxa metabòlica basal (TMB)

Com ja s'esmentat la TMB correspon a l'energia mínima necessària per a les

funcions dels òrgans i cèl·lules en un animal en repòs mental i físic, conscient, en estat post-pandrial i mantingut a temperatura termoneutra. Aquest calor és degut a les reaccions del metabolisme basal i no a cap mecanisme fisiològic adaptatiu. Cal tenir en compte però que aquest no correspon al nivell més baix de producció de calor en un animal viu, sinó que un animal adormit produeix menys calor (Cabanac, 1975). L'estandarització d'unes condicions basals ens permet comparar les taxes metabòliques de diferents individus i espècies. Aquesta situació ve propiciada pel fet que tots els teixits produeixen calor, en consumir substrats pel seu metabolisme. Ara bé, dins d'aquests teixits n'hi ha que semblen jugar un paper més actiu, com són el teixit adipós marró (vegeu apartat 3.5.3.1), el fetge (Ma i Foster, 1989) i el ronyó (Closa et al, 1992). Aquests teixits són els que contribueixen de manera més important a mantenir la temperatura corporal basal (Closa et al, 1992), acció que poden exercir sense problemes en ser teixits que estan situats en el nucli de l'animal, especialment fetge i ronyó, i no pas a la superfície.

### **3.5.2.2 Termogènesi adaptativa**

#### **3.5.2.2.1 Termogènesi induïda pel fred**

Quan la temperatura ambient es inferior a la temperatura crítica baixa, té lloc un increment en la producció de calor. Hi han dos tipus de mecanismes implicats en la generació de calor deguda a l'exposició al fred, un implica la tremolor i se'l anomena **termogènesi tremolosa**, mentre que, l'altre és independent de tremolor, pel que rep el nom de **termogènesi no tremolosa**. Els mecanismes bioquímics implicats són diferents per ambdós tipus de termogènesi.

##### **3.5.2.2.1.1 Termogènesi tremolosa**

Es un mecanisme adaptatiu de producció de calor que es dona com a primera resposta a l'exposició aguda al fred o en l'exposició al fred molt intens. Consisteix en un augment de l'activitat muscular, de manera que actuen de forma consecutiva en un curt espai de temps músculs antagònics (abductors i abductors), amb el resultat d'un nul treball energètic però amb un fort consum de substrats, amb un alliberament de calor residual compensa l'efecte del fred. Aquest procés té una duració limitada en ser substituïda gradualment per la termogènesi no tremolosa, degut a que la tremolor interfereix en la locomoció i coordinació (és similar a la tetània) i pot dificultar la son. Malgrat que la tremolor pot augmentar considerablement la producció de calor, no és un sistema massa eficient perquè també augmenta el flux sanguini perifèric i el moviment de les extremitats, incrementant-se les pèrdues de calor. Com a conseqüència d'això, probablement menys del 20% de la calor produïda és retinguda per compensar el dèficit tèrmic. La devallada en la tremolor durant el fred es deu probablement al escalfament dels termo-receptors que estimulen la tremolor, disminuint així el marge de temperatura requerit per estimular la seva activació (Stock i Rothwell, 1982).

##### **3.5.2.2.1.2 Termogènesi no tremolosa**

La termogènesi no tremolosa no solament substitueix la tremolor en l'exposició crònica al fred, sinó que en nadons d'algunes espècies, inclòs l'home, constitueix l'única font extra de calor per fer front al fred (Smith i Horwitz, 1969). La capacitat de tremolor pot desenvolupar-se un temps després de néixer, dependent de la maduresa assolida al moment de néixer en cada espècie, així en l'home no es desenvolupa fins aproximadament al any de vida. Això junt amb els canvis de la relació superfície/volum en el creixement, explica perquè en individus joves la capacitat de termogènesi no tremolosa és alta i declina amb l'edat (Stock i Rothwell, 1982).

En la termogènesi no tremolosa es poden diferenciar dues components, una basal i l'altra adaptativa o termo-reguladora (Jansky, 1973). La component basal és la calor produïda per aquells processos que constitueixen la taxa metabòlica basal, i que contribueixen en el manteniment de la temperatura corporal en condicions basals. La component adaptativa es produeix com a resposta a una necessitat específica de termo-regulació en l'exposició al fred.

L'estudi de la termogènesi no tremolosa s'ha fet principalment en animals petit exposats al fred (Stock i Rothwell, 1982). Inicialment, l'augment de calor es va atribuir l'increment voluntari de ingesta que es dona en l'exposició prolongada al fred. Però, aquesta, no podia justificar totalment l'increment de calor induït pel fred. L'observació de que els ratolins obesos ob/ob morien d'hipotèrmia al exposar-los a temperatures de 3-4°C (Davis i Mayer, 1954), va fer relacionar aquesta anormalitat amb una incapacitat de mantenir la taxa de producció de calor en condicions de fred, i posteriorment es va relacionar amb una dificultat en la producció de la termogènesi no tremolosa (Trayhurn i James, 1981).

El principal teixit implicat en el component adaptatiu de la termogènesi no tremolosa és el teixit adipós marró. L'implicació del teixit adipós marró en la termogènesi no tremolosa es va demostrar en mesures del flux sanguini en rates exposades al fred, ja que la irrigació del teixit augmentava considerablement (Foster i Frydman, 1978) augment que es correlacionava amb un increment de la massa del teixit (Foster i Frydman, 1979).

#### 3.5.2.2 Termogènesi induïda per la dieta (TID)

La termogènesi induïda per la dieta fa referència al augment de calor que es produeix en relació a la ingesta d'aliments. La TID està formada, al igual que la termogènesi no tremolosa, per dues components: **La component obligatòria**, que inclou els costos de digestió, absorció, processat i emmagatzemament de substrats, i **la component adaptativa o reguladora**, que es dona com a resposta a una ingesta que superi les necessitats momentànies de l'organisme (Trayhurn i James, 1981).

La component adaptativa ha estat evident amb la introducció de la dieta de *cafeteria* (Sclafani i Springer, 1976) (descrita en l'apartat 2.3.3), ja que en rates joves de la soca Sprague-Dawley s'han descrit increments d'un 80% de

l'energia metabolitzable, acompanyats de tan sols un petit increment en el pes corporal. La consideració que aquesta sobrealimentació induïa un increment en la TID ha estat confirmada amb mesures de la taxa metabòlica basal (Rothwell i Stock, 1979)

El mecanisme metabòlic de la TID sembla ser que són els mateixos que en la termogènesi no tremolosa. Evidències d'això són els treballs amb animals sotmesos a una dieta de *cafeteria*, que en exposar-los al fred mantenen una temperatura interna alta, sense tremolor, per mantenir la seva generació de calor, com fan els animals control (Rothwell i Stock, 1979). A més, aquests animals també presenten un increment de la massa del teixit adipós marró, no solament degut a una deposició de triacilglicerols més gran, sinó també a un augment del contingut proteic (Foster i Frydman, 1978).

### 3.5.3 Teixits implicats en la producció de calor

#### 3.5.3.1 Teixit adipós marró (TAM): Proteïna desacopladora

El teixit adipós marró s'ha identificat com el principal responsable de la termogènesi adaptativa no tremolosa. La presència d'aquest teixit s'ha evidenciat en un gran nombre de mamífers, com rosegadors, carnívors, primats, etc, però no existeix en ocells, mamífers aquàtics, marsupials, algun primat (loris) i en el porc. El TAM es important sobretot en petits mamífers hibernants (rat-penat, hamster, marmota,) i també en nounats d'espècies que incloent grans mamífers com el cas de l'ovella i l'home entre d'altres (Stock i Rothwell, 1982).

Com el seu nom indica, aquest teixit presenta un color marró i un aspecte multivacuolar, a diferència del teixit adipós blanc que presenta una única vacuola. La seva localització pot variar segons les espècies, però en general es troba en les zones inter-escapular, cervical i axilars. També hi han dipòsits més profund i difosos al voltant dels ronyons, zona inguinal, al voltant de l'aorta abdominal i en la regió toràctica al voltant del cor i l'aorta. Aquestes localitzacions poden tenir un significat funcional relacionat amb la preservació de la temperatura dels òrgans vitals, o amb el reescalfament d'aquests durant el despertar de la hibernació. El TAM de la zona inter-escapular és el dipòsit més gran, més fàcil d'identificar i extreure, i en la rata representa del 25-30 % del total del TAM. Les estimacions de la massa total de TAM són difícils donada la dificultat de separar les masses més petites i disperses d'aquest teixit. Normalment es considera que el TAM representa prop d'un 1 % del pes corporal, tot i que pot arribar a un 2 % en animals adoptats al fred.

El color marró del TAM s'ha relacionat amb l'elevat nombre de mitocondries amb un considerable contingut de citocroms i també a que està molt ben vascularitzat de manera que hi arriben grans quantitats d'hemoglobina (Stock i Rothwell, 1982).

La inervació simpàtica del TAM és molt important i explica el seu alt contingut en noradrenalina. El nombre de receptors  $\beta$ -adrenèrgics en la membrana cel·lular d'aquests adipòcits és unes deu vegades més gran la d'altres cèl·lules de l'organisme. Experiments "in vitro" demostren que l'estimulació nerviosa provoca

una despolarització de la membrana i conseqüentment una activació del metabolisme cel·lular, activant la lipòlisi i la termogènesi.

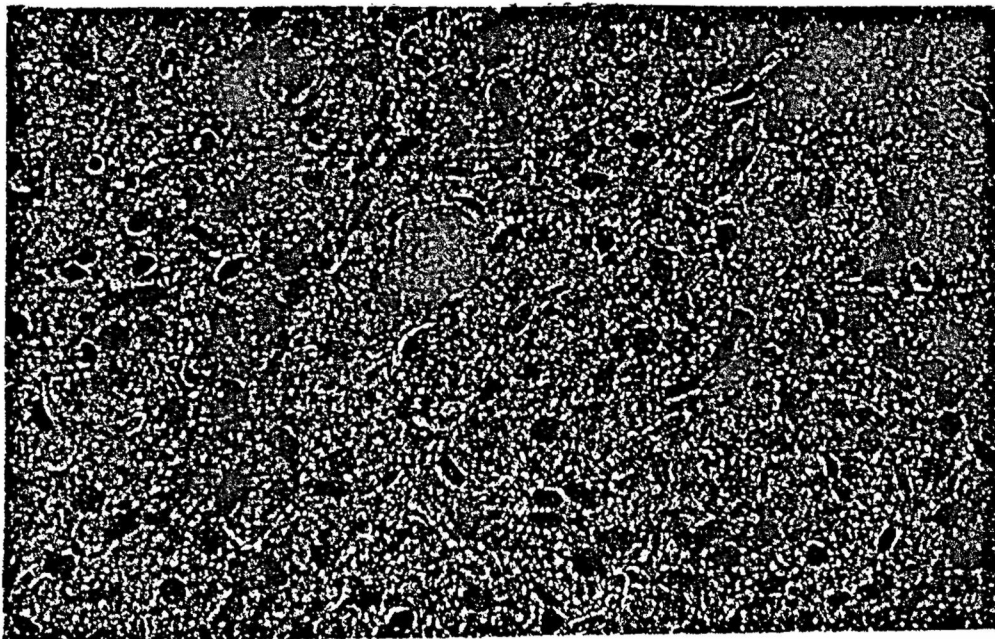
Quant al metabolisme del teixit adipós marró, es pot resumir amb la frase que diu "tot allò que pot fer el teixit adipós blanc, el TAM ho pot fer millor" (Stock i Rothwell, 1982). Així, el TAM té una elevada capacitat oxidativa, varies vegades superior a la del teixit adipós blanc, però, en aquest cas la capacitat oxidativa, majoritàriament, no està acoplada a la producció d'ATP, sinó a la producció de calor. Al contrari que el teixit adipós blanc, el TAM no actua com a font d'àcids grassos per utilització en d'altres teixits, sinó que utilitza els triacilglicerols emmagatzemats com a suport del seu propi metabolisme. De manera que el tret principal del TAM en el metabolisme intermediari és mobilitzar triacilglicerols (lipòlisi) i síntesi "de novo" de triacilglicerols (lipogènesi), resultant altes taxes de termogènesi.

El mecanisme bioquímic mitjançant el qual el TAM produeix calor va ser proposat per Nicholls (1979) i consisteix en que les mitocondries del TAM tenen una via única de conductància als protons que pot dissipar el gradient de protons generat per la respiració, impedit així la formació d'ATP mitjançant la fosforilació oxidativa. Aquesta està mitjançada per una proteïna de pes molecular de 32 kD, anomenada termogenina o UCP (uncoupling protein) que es troba situada a la membrana mitocondrial interna. Aquesta proteïna té una considerable similitud estructural amb el sistema de bescanvi ATP/ADP de la membrana mitocondrial. La seva funcionalitat com a canal que permet el pas lliure de protons és inhibida pel lligam de nucleotids de purina (GDP i ADP), de manera que la conductància als protons és proporcional al nombre de llocs d'unió al GDP. Així, l'activitat de la via pot ser estimada per assajos de lligam al GDP, també anomenats "GDP-binding". La termogenina s'uneix de manera reversible als àcids grassos o d'altres compostos amb restes acil, aquesta unió provoca un canvi conformacional que fa que quedi un espai lliure entre les cadenes de termogenina pel qual poden passar els protons a favor de gradient electroquímic, perdent-se l'energia quimiosmòtica necessària per la síntesi d'ATP en forma de calor (James i Trayhurn, 1981).

La seqüència d'esdeveniments que es produeixen sembla ser la següent. Un alliberament de noradrenalina activa, mitjançant la unió als receptors  $\beta_1$  de la membrana, l'adenil ciclase generant-se AMPc, aquest activa la lipasa responsable de la hidròlisi dels triacilglicerols a glicerol i àcids grassos. Finalment els àcids grassos activen la termogenina i augmenten la permeabilitat de la membrana mitocondrial als protons. Gran part dels àcids grassos són oxidats en la mitocondria, els protons generats passen a través de la membrana mitocondrial interna de la mateixa manera que en altres teixits, però enlloc de retornar per la via habitual - ATP sintetasa- ho fan a través de la termogenina, sense síntesi d'ATP i la conseqüent producció de calor (Trayhurn i James, 1981).

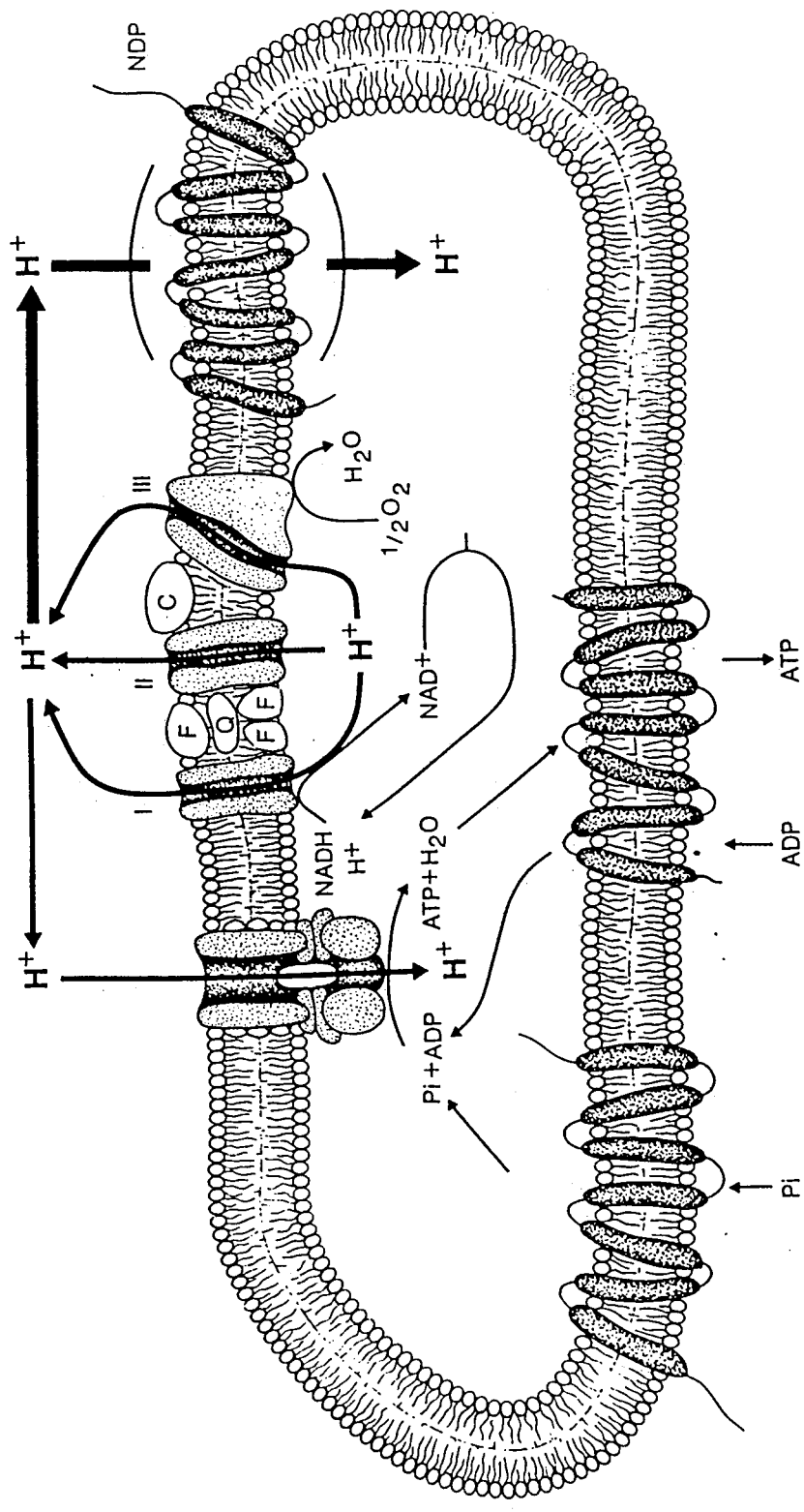
La presència i funcionalitat del TAM en l'home és motiu de controvèrsia. En els nadons es troba que el TAM es present i funcional, essent molt important per fer front a les necessitats de calor durant el part i les primeres hores de vida. De fet, últimament la presència de TAM en els adults sembla estar clara, ja que s'ha detectat TAM fins i tot en cadàvers de individus de 80 anys (Stock i Rothwell, 1982), el que no estar tant clar es la seva funcionalitat. Sembla que pot haver una baixada d'activitat amb l'edat, que començaria a partir dels 30 anys, fet que

coincideix en l'època d'aparició de molts casos d'obesitat. Amb l'edat les cèl·lules del TAM van acumulant lípids i es fa difícil de distingir-les del teixit adipós blanc. A més, sembla ser que, la quantitat de lípids del TAM està inversament relacionada amb la seva capacitat termogènica (Mrosovsky i Rwlatt, 1968). De manera, que si bé, en l'adult es troba una considerable massa de TAM derivat del



*Imatges del teixit adipós : en la part superior es mostren cèl·lules del teixit adipós blanc. En la part inferior es mostren cèl·lules de teixit adipós marró*





Membrana mitocondrial (teixit adipós marró). A la part superior s'han representat els sistemes de transport de  $H^+$ . Al centre hi figuren els components del sistema de transport electrònic (I, II i III) que passen els  $H^+$  cap a l'exterior. A l'esquerra hi figura el sistema de l'ATP sintetasa, on s'aprofita el gradient electroquímich dels  $H^+$  per a formar ATP. A la dreta està representat el sistema de la proteïna desacopladora (UCP), que contribueix a dissipar el gradient electroquímich. També s'ha representat el lloc específic d'unió dels nucleòsids difosfat (NDP).

TAM del nounat, la seva aparença histològica suggereix que aquest té una activitat termogènica més aviat baixa (Lean, 1992). En aquest sentit, Astrup (1989) no troba TAM intraescapular, però si en troba de perirrenal, malgrat això experiments d'estimulació amb adrenalina, no detecta activitat en 4 de 5 individus examinats (Astrup et al, 1985), indiquen que el TAM no està implicat en la termogènesi en els humans, i suggereix un paper important al múscul esquelètic. Malgrat això, s'han descrit algunes patologies que estan relacionades amb una marcada activitat del TAM, com el cas de la feocromocitoma i l'hibernoma. L'hibernoma es creu que es un tumor de TAM, ja hi ha un creixement de masses cel·lulars en els típics llocs on hi ha TAM en la infància i aquestes tenen histologia típica de TAM, i a més els individus que el presenten s'aprimen (Lean, 1989).

En canvi, en rossegadors sembla que el TAM és funcional i és el principal responsable de termogènesi adaptativa (Himms-Hagen, 1989). De manera, que un defecte en el TAM de rates obeses disminuiria la seva capacitat de resposta termogènica (Himms-Hagen, 1989). Experiments de Closa et al (1992) mostren la reduïda capacitat d'aquests animals obesos a l'exposició al fred.

La termogènesi produïda en el TAM seria la principal responsable del component adaptatiu de la termogènesi no tremolosa induïda pel fred i de la termogènesi induïda per la dieta (TID) (Rothwell i Stock, 1980, Trayhurn i James, 1981).

### **3.5.3.2 Altres mecanismes implicats en la termogènesi en d'altres òrgans**

#### **3.5.3.2.1 ATP-asa $\text{Na}^+/\text{K}^+$**

L'ATP-asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  és un enzim associat a membrana implicat en el transport actiu de sodi. S'ha proposat que l'activitat d'aquest enzim pot contribuir en una fracció important en la producció de calor induïda per hormones tiroïdees (Smith i Edelman, 1979).

S'ha trobat una activitat reduïda de l'ATP-asa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en múscul, ronyó i fetge de ratolí ob/ob (York et al, 1978, Lin et al 1978), i també en fetge de ratolí db/db (Bray et al, 1978), així com un menor nombre d'unitats d'enzim en múscul, però no en fetge de ratolí ob/ob de 14 dies d'edat (Lin et al, 1979). Les conclusions d'aquests resultats han estat discutides per Clausen i Hansen (1982), ja que no troba cap reducció del nombre d'unitats d'enzim en el ratolí ob/ob, i degut a que considera que el transport de  $\text{Na}^+$  es un mecanisme que pot contribuir quantitativament poc respecte al total de la despesa energètica. També s'ha suggerit que aquest enzim podria contribuir a la termogènesi induïda pel fred a TAM ja que també es activat per noradrenalina (Horwitz, 1973).

#### **3.5.3.2.2 Cicles entre substrats**

Moltes reaccions del metabolisme intermediari són reversibles, però en alguns casos es requereixen enzims diferents per fer les reaccions en sentit invers, per això és possible que es produeixi un reciclatge de metabòlits en

aquests punts. Degut a que molts d'aquests cicles utilitzen ATP es poden considerar termogènics, de manera que quant més ràpid funcionin més calor es pot generar. Aquests cicles s'anomenen fútils i contribueixen de manera important al control del metabolisme. Si bé aïlladament la contribució d'aquests cicles a la termogènesi global és limitada, quan es consideren en conjunt dins d'una via metabòlica, la seva contribució podria ser considerable (Stock i Rothwell, 1982).

En el mateix sentit, podria contribuir a la termogènesi global el cost del recanvi proteic. Sembla que en l'exposició al fred aquest augmenta i que en l'obesitat disminueix (Garrow, 1978).

També podria contribuir a la termogènesi, pel mateix principi, el trencament de greixos per la lipòlisi seguit per la reesterificació dels àcids grassos, amb la consegüent despesa energètica (Stock i Rothwell, 1982).

Donat que aquests mecanismes poden tenir lloc en els diferents teixits, no es pot excloure un paper potencial del múscul, fetge o teixit adipós blanc en la termogènesi. De fet hi han estudis en rates alimentades amb dieta de cafeteria, on l'hepatectomia parcial redueix considerablement el consum d'oxigen global, suggerint que és el fetge el principal responsable de la termogènesi induïda per la dieta (Ma i Foster, 1989). Això pot venir confirmat pel fet que la temperatura del fetge és sempre superior a la de l'aorta abdominal (Closa et al, 1992), de la mateixa manera que passa amb el ronyó. Així, aquests teixits s'han de tenir en compte per aquest paper.

### **3.6 Control hormonal del balanç energètic**

#### **3.6.1 Insulina**

La insulina té un paper fonamental en el control del pes corporal, ja que es qui regula la disponibilitat de substrats per les cèl·lules, especialment l'entrada de glucosa i captació dels àcids grassos, regulant l'expressió de la lipoproteïna lipasa.

Tot i que la insulina és una hormona típicament anabòlica, sembla que també es requereix per la termogènesi, procés clarament catabòlic. Hi ha evidències de que els animals diabètics no són capaços de mantenir la seva temperatura corporal en l'exposició al fred (Poe et al, 1962). Mentre que la inducció d'hiperinsulinèmia en rates els provoca un augment del contingut de lípids i de la despesa energètica.

El modus d'acció de la insulina per estimular la termogènesi en el TAM no està clar, podria ser a través del sistema nerviós simpàtic (Rowe et al, 1981), però aquest mecanisme si bé podria ser important a temperatures properes a la termoneutralitat no seria funcional en l'exposició al fred. L'adaptació al fred estimula el sistema parasimpàtic i consegüentment hi ha una inhibició de la secreció d'insulina (Vallerand et al, 1983). Una acció directa de la insulina sobre el TAM també s'ha descartat, ja que estudis en cèl·lules aïllades mostren que la insulina no estimula la termogènesi, al contrari inhibeix parcialment els efectes colinèrgics de la noradrenalina (Bukowiecki, 1982). Potser tingui, en definitiva un efecte purament permissiu (Shibata et al, 1987).

### 3.6.2 Hormones tiroïdees

L'efecte de les hormones tiroïdees en el metabolisme energètic pot ser molt important. La principal hormona produïda per la glàndula tiroïdea és la tiroxina ( $T_4$ ) però l'hormona fisiològicament activa és la triiodo-tironina ( $T_3$ ). En l'hipertiroïdisme l'excés d'aquesta hormona provoca un fort augment de la taxa metabòlica en dejuni (de l'ordre del 100%), mentre que en l'hipotiroïdisme es produeix un marcat descens d'aquesta (aproximadament d'un terç). Però en condicions normals la influència d'aquestes hormones és menys clara.

Els nivells sèrics de  $T_3$  responen ràpidament als canvis en la ingesta energètica. Durant la restricció d'aliments els nivells de  $T_3$  disminueixen, revertint-se amb la realimentació (Jung et al, 1980), mentre que amb la sobrealimentació (Danforth et al, 1979), especialment dietes riques en glúcids (Jung et al, 1984), es produeix un augment dels nivells de  $T_3$ . Aquestes respostes semblarien apropiades a condicions que requereixen respectivament, la conservació i dissipació d'energia.

De tota manera, no sembla que els efectes termogènics de la  $T_3$  estiguin directament implicats en el control de la despesa energètica. Experiments on s'han mantingut constants els nivells de  $T_3$ , també es produeixen canvis en la taxa metabòlica, indicant que les fluctuacions produïdes per variacions en la ingesta energètica simplement faciliten els efectes del sistema nerviós simpàtic sobre la termogènesi. D'altra banda, hi ha un gran nombre d'evidències que relacionen l'acció de les hormones tiroïdees amb el sistema nerviós simpàtic, per exemple augmentant el nombre de receptors  $\beta$ -adrenèrgics, doncs en absència de tiroïdes (Wiersinga et al, 1980) les respostes metabòliques a l'estimulació simpàtica estan considerablement esmorteïdes. L'administració de noradrenalina estimula la conversió de la tiroxina a  $T_3$  per la 5' mono-desiodasa en teixits perifèrics (Wiersinga et al, 1980), incloent-hi el TAM (Silva i Larsen, 1985). El paper de les hormones tiroïdees en la termogènesi sembla ser essencialment permissiu i facilitador (Stock i Rothwell, 1982).

### 3.6.3 Hormones sexuals

Els estrogens influeixen en la ingesta energètica i en el pes corporal, això és il·lustrat pels canvis de pes de femelles en moltes espècies, i potser en menor grau en la dona, durant el cicle estral o menstrual. Alguns d'aquests canvis es deuen en a oscil·lacions en el contingut d'aigua, però els estrogens també inhibeixen la ingesta, així, la ovariectomia en rates femelles adultes induïx hiperfàgia i obesitat, que són reversibles amb un tractament amb estrogens.

La progesterona estimula la ingesta i deposició de greix, potser per efecte de la supressió de la producció endògena d'estrogens.

Pel que fa als androgens, els nivells de testosterona són baixos en l'obesitat mòrbida en l'home (Barbato i Landau, 1974). Així la testosterona i altres androgens afecten significativament el pes corporal, sobretot incrementant la deposició corporal de proteïna muscular, fet que ha estat utilitzat per incrementar la potència física d'atletes.

### 3.6.4 Glucocorticoïdes

Els corticoesteroides adrenals indueixen un augment de la ingesta d'aliments mentre que l'adrenalectomia provoca hipofàgia i pèrdua de greix corporal en animals adults (Rothwell i Stock, 1988). L'adrenalectomia també reverteix o prevé algunes formes d'obesitat, tant genètiques com induïdes per la dieta (York i Godbole, 1979), i l'administració de corticosterona en animals obesos adrenalectomitzats torna a elevar la seva ingesta calòrica (Yukimura i Bray, 1978).

L'activitat del TAM en l'adrenalectomia està associada amb un augment del recanvi de noradrenalina (Marchington et al, 1986) i no es produeix si el teixit s'ha denervat (Rothwell i Stock, 1984). En rates normals que desenvolupen una obesitat moderada amb l'edat, l'adrenalectomia també estimula el TAM (Rothwell i Stock, 1984), però hi ha dades més recents de que la hipofisectomia exerceix efectes més potents que l'adrenalectomia (Rothwell i Stock, 1985). Suggestint que el punt de control i efecte del eix hipotàlem-hipòfisi-adrenals sobre el pes corporal no es limita a una actuació mitjançada pels corticoesteroides, ja que l'ACTH té efectes propis relacionats amb l'aparició i manteniment de l'obesitat, i el CRH que controla la seva secreció intervé efectivament entre altres punts del control de la ingesta.

Sembla doncs, que els corticoesteroides juguen un paper important en la regulació del pes corporal a mig i llarg termini, i que cal tenir-los en compte especialment en casos en que l'obesitat es manifesta paral·lelament a diverses alteracions de l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenals.

### 3.6.5 Hormona del creixement

L'hormona del creixement (GH) potència la deposició de materials en el cos, afavorint així el creixement. Es va observar que les rates Zucker presentaven un creixement enlentit i que els seus nivells hipofisaris de GH eren baixos (Martin et al, 1977), per això es va associar la deficiència d'aquesta hormona amb l'obesitat. Però, s'ha vist que els nivells baixos són posteriors a l'establiment de la hiperinsulinèmia i que la insulina podria regular l'expressió del gen de la GH (Yamashita i Melmed, 1986).

També s'ha suggerit que els efectes lipolítics i de conservació del nitrogen d'aquesta hormona poden mitigar les pèrdues de massa magra que es produeixen en tractaments en dietes hipocalòriques, contribuint a més a la reducció dels lípids corporals. Aquest fet s'ha comprovat en rates Zucker obeses a les quals se les ha tractat amb GH (Martin et al, 1989).

## 3.7 Control neural del balanç energètic

Com la majoria de funcions de l'organisme el balanç energètic es creu regulat en última instància pel sistema nerviós, tant a nivell central (SNC) com autònom (SNA), que integraria tota la informació metabòlica i hormonal. Això fa que el control de la gana s'hagi d'enfocar no solament des d'un punt de vista purament metabòlic, sinó que cal tenir en compte tres nivells (Blundell, 1991):

- 1) els esdeveniments psicològics (com percepció de la gana) i de comportament

(àpats, ingesta energètica i de macronutrients).

2) Esdeveniments perifèrics metabòlics i fisiològics.

3) Neurotransmisors i interaccions metabòliques a nivell cerebral.

En aquest sentit, Bray va proposar un model del control de les reserves energètiques basat en la teoria dels sistemes de control (Bray i Campfield, 1975), model que ha anat polint amb els anys i que ha generat la hipòtesi autònoma i endocrina de l'obesitat. Aquest model proposa l'existència d'un controlador situat en el cervell que integra les senyals aferents o de "feedback" d'origen perifèric que li diuen al controlador en quina situació es troba el sistema controlat que consistiria en l'ingesta, digestió, absorció, emmagatzemant i metabolisme. Amb aquesta informació el controlador inicia unes senyals de control eferents que regulen el sistema controlat.

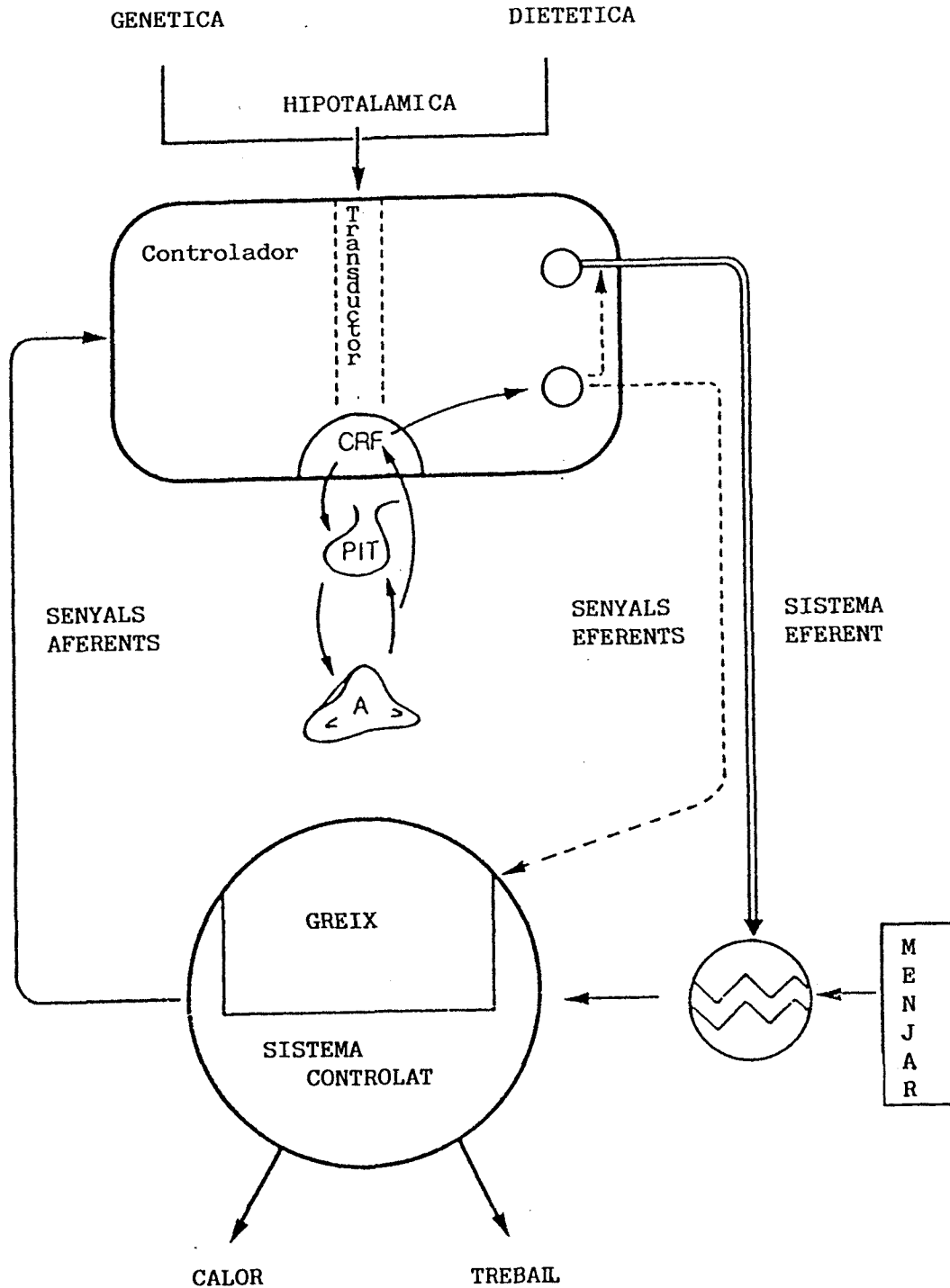
### 3.7.1 Paper del sistema nerviós central

En el cervell hi han diverses zones que sembla que juguen un paper molt important en el control del balanç energètic (Luiten et al, 1987). Així, una lesió en la zona ventromedial hipotalàmica provoca hiperfagia i obesitat en la majoria d'espècies estudiades (Bray, 1989). D'altra banda, una lesió en la zona lateral del hipotàlem porta a una situació de pèrdua de gana, de pes i de reserves lipídiques (Keesey i Powley, 1986). En aquest procés de control, hi ha diversos neurotransmisors que hi poden jugar un paper important. Així, l'àcid gamma amino butíric (GABA) es un neurotransmissor d'activació ràpida que sembla jugar un paper en la regulació de la ingesta. Infusions de GABA en el cervell poden estimular o inhibir la ingesta depenent de la zona en que es faci la infusió (Kasser et al, 1985, Cattabeni et al 1978). En condicions d'hipoglucèmia es troben concentracions elevades de GABA en la zona medial de l'hipotàlem, mentre que són baixes en la zona lateral (Kimura i Kuriyama, 1975).

D'altra banda varies monoamines com noradrenalina, serotonina i histamina que son neurotransmisors d'activació més lenta també juguen un paper important en la regulació de la ingesta i possiblement en el control del tipus de menjar ingerit. Infusions de noradrenalina en la zona ventromedial hipotalàmica incrementen la ingesta mitjançant receptors adrenèrgics  $\alpha_1$  i en la zona perifornical mitjançant receptors  $\beta$ -adrenèrgics inhibeixen la ingesta. La serotonina i precursors (triptofan i 5-OH-triptofan) actuen inhibint la ingesta (Bray, 1990). A més, sembla que aquests neurotransmisors actuen regulant específicament el tipus de menjar a ingerir. Així la noradrenalina sembla afavorir la ingesta de glúcids (Leibowitz et al, 1985).

Hi ha certs neuropèptids que també intervenen en aquest control energètic (Morley, 1987), uns activen la ingesta com el neuropèptid Y, la beta endorfina, la dinorfina, l'hormona estimuladora de l'hormona del creixament (GHRH) i la gal·lanina. D'altres, inhibeixen l'ingesta com la bombesina, la colecitoquinina, l'anorectina, la calcitonina, la neurotensina, l'hormona estimuladora de la tirotròpina (TRH) i l'hormona estimuladora de la corticotropina (CRH) quan s'injecten tòpicament en la zona ventromedial de l'hipotàlem (Bray). S'ha hipotetitzat que determinats pèptids específics regulen la ingesta específica de determinats tipus d'aliments, ja que injeccions d'insulina inhibeixen la ingesta sols en animals que tenen una dieta molt rica en glúcids i no afecta aquells que menjen una dieta rica en greix (Arase et al, 1988).

O B E S I T A T



Model de sistema de control (Bray, G. 1989). El model es basa en la presència d'un controlador que controla un sistema. Les senyals aferents són de tipus nerviós (simpàtic i parasimpàtic) i nutricionals. El controlador té components de recepció, transducció de senyals i generació de senyals. Els components eferents inclouen l'activitat motora associada a la ingesta i l'activitat controladora sobre el metabolisme del sistema nerviós autònom. El sistema controlat inclou la ingesta, la digestió, l'enmagatzemament i el metabolisme dels nutrients.

El neuropèptid Y pot estar implicat en la ingesta de glúcids (Stanley et al, 1985), i els últims aminoàcids terminals de la procolipasa podria modular la ingesta de greixos (Okada et al, 1990).

### 3.7.2 Paper del sistema nerviós autònom (SNA)

#### 3.7.2.1 El sistema nerviós simpàtic (SNS)

La noradrenalina és el neurotransmissor adrenèrgic i es sintetitza i emmagatzema a les terminals nervioses perifèriques, sent alliberada en resposta a impulsos nerviosos eferents que arriben a les fibres simpàtiques terminals. La noradrenalina actua principalment en les proximitats del seu lloc d'alliberament i sota moltes circumstàncies no actua com una hormona circulant. En canvi l'adrenalina és l'hormona circulant alliberada per la medulla adrenal, alliberada en resposta als estímuls dels nervis esplànctics i actua sobre els receptors adrenèrgics de tot el cos.

La implicació del SNS en la regulació de la temperatura va ser suggerit fa uns 30 anys en uns experiments en els que es va veure que l'administració d'un bloquejant gangliònic abolia l'augment del consum d'oxigen en animals adaptats al fred, i en canvi l'atropina (antagonista colinèrgic) no tenia efecte, una dosi prèvia de noradrenalina impedia el descens del consum d'oxigen (Hsieh et al, 1957).

Posteriorment s'ha observat que el TAM està densament inervat amb terminals simpàtiques, el seu contingut en noradrenalina és més alt que en altres teixits i augmenta molt durant l'aclimatació al fred (Young et al, 1982). Varies tècniques experimentals han demostrat la importància d'aquesta inervació pel TAM: l'estimulació elèctrica de la seva inervació provoca un augment de la producció de calor (Smith i Horwitz, 1969), l'exposició crònica i aguda al fred, així com les dietes de cafeteria acceleren el recanvi de la noradrenalina (Young et al, 1982).

El SNS juga un paper important en l'activació de la termogènesi en TAM (Girardier i Stock, 1983). L'administració de noradrenalina exògena mimetitza l'efecte de l'estimulació simpàtica i augmenta la producció de calor d'un 50-200% en rosegadors petits. Aquest augment depèn de la resposta adaptativa a diferents influències tèrmiques i de la ingesta d'aliments, i ha estat àmpliament utilitzat per estudiar canvis en la capacitat termogènica (Mejsnar i Jansky, 1971). Els estudis amb antagonistes  $\alpha$  i  $\beta$ -adrenèrgics han mostrat que l'estimulació de la termogènesi pel sistema nerviós simpàtic o per noradrenalina exògena és deguda principalment a l'activació de receptors  $\beta$  (Schonbaum et al, 1966), i potser, amb un petit component  $\alpha$ -adrenoreceptor (Foster, 1985). Com que la termogènesi al TAM "in vitro" es mitjançada per  $\beta$ -adrenoreceptors, sovint s'utilitzen agonistes, de tipus  $\beta$ , com l'isoproterenol, en lloc de la noradrenalina, tant per estudis "in vivo" com "in vitro". Recentment s'ha desenvolupat una nova sèrie de  $\beta$  agonistes, que presenten el tret comú que tots ells són drogues potencialment termogèniques pel tractament de l'obesitat. Donat que, l'obesitat tant genètica com experimental, es caracteritza per presentar problemes en el seu control simpàtic de la termogènesi (Rothwell i Stock, 1982). Aquestes drogues tenen pocs efectes mitjançats per  $\alpha_1$  i  $\beta_2$  i són altament selectius per la termogè-



nesi i més potents que els utilitzats fins ara. Tot això fa pensar que els receptors del TAM són atípics i s'ha proposat d'anomenar-los  $\beta_3$  (Carlisle i Stock, 1991).

### 3.7.2.2 El sistema nerviós parasimpàtic (SNP)

Les fibres vagals que s'originen en el fetge són estimulades per nivells baixos de glucosa en sang, aquesta fibres arriben al hipotàlem, el qual és capaç de revertir la hipoglucèmia a través de la seva influència sobre els patrons hormonals i augmentant la ingesta (Langhans i Scharrer, 1987).

En animals amb obesitat hipotalàmica, hi ha evidències d'una activitat eferent parasimpàtica incrementada. L'estimulació vagal ajuda a augmentar la secreció d'insulina que caracteritza l'obesitat (Bray, 1989), una sobre-estimulació vagal també sembla que podria estar implicada en la hiperinsulinèmia de la rata Zucker (Rohner-Jeanrenaud et al, 1983). En rosegadors obesos la vagotomia aboleix dràsticament la hiperinsulinèmia i la hiperfàgia (Giorgino et al, 1992). Estudis de vagotomia han mostrat que augmenta el consum d'oxigen i la pressió sanguínia en rates aclimatades al fred, suggerint un efecte supressor de la resposta termogènica per part de SNP (LeBlanc i Cote, 1967). Alguns autors han demostrat que en humans el bloqueig  $\beta$ -adrenèrgic amb propranolol no influència la termogènesi induïda per la dieta, però en canvi l'administració d'un antagonista colinèrgic, com l'atropina, en provoca una inhibició considerable (Nacht et al, 1987).



#### **4 BALANÇ NITROGENAT**



#### 4.1 Breu visió històrica

El paper del nitrogen en la dieta va ser observat per primera vegada per en Magendie en 1816, després d'una sèrie d'estudis en gossos, els quals morien en unes poques setmanes, si aquests animals estaven alimentats solament amb lípids i glúcids, mentre que si menjaven formatge i ous vivien indefinidament. Von, en 1840 va observar diferències en la qualitat de les proteïnes, de manera que animals alimentats amb gelatina morien d'una extremada debilitat física. Uns 20 anys més tard, Voit dissenyà els primers experiments de balanç de nitrogen, demostrant que la dieta amb gelatina no permet un equilibri de nitrogen en gossos, que era la causa de la mort observada per en Von. L'obtenció d'aminoàcids per hidròlisi de proteïnes no s'aconseguí fins 1820, tot i que ja es tenia coneixement de la seva existència des de 1810 quan Wollaston trobà cistina en l'orina de pacients amb cistinúria. No va ser fins a començaments de segle que es va intuir la diferència quantitativa del contingut d'aminoàcids de les proteïnes, gràcies als experiments d'en Willcock i Hopkins (1906), que aconseguien prolongar la supervivència de ratolins alimentats amb zeïna, mitjançant suplementació amb triptòfan. Quan Osborne i Mendel (1914) suplementaven amb lisina i triptòfan aconseguien un excel·lent creixement, demostrant que ambdós eren essencials. Això va fer postular a Mendel (1914) la llei del mínim requerit, en la que indicava que es donava un creixement deficient si no hi havia un mínim de cada aminoàcid essencial.

Seguidament a aquestes troballes, es van fer una sèrie d'experiments que van permetre establir l'essencialitat o no de varis aminoàcids. No va ser fins el 1943 que es va fer el primer estudi per determinar les necessitats d'aminoàcids en infants (Levin et al, 1943). Des d'aleshores ençà, hi ha hagut un gran interès en determinar els requeriments d'aminoàcids en l'home, sobretot en el creixement, però la gran diversitat individual i errors en els procediments metodològics fa difícil arribar a resultats concloents (Snyderman, 1991).

#### 4.2 Significat del balanç de nitrogen

El balanç de nitrogen és un dels paràmetres més utilitzats en estudis de nutrició, per establir l'estat nutricional dels individus. La quantificació del nitrogen excretat (orina i femta) en comparació amb l'ingerit dona una mesura indirecta de l'estat de les proteïnes de l'organisme, doncs, una depleció en les proteïnes corporals es farà evident amb un augment de nitrogen en l'orina. D'altra banda, quan a un animal se'l sotmet a una dieta lliure de proteïna ràpidament disminueix l'excreció de nitrogen per orina, la qual cosa ens indica un estalvi del nitrogen endogen, es a dir una disminució del recanvi de les proteïnes dels teixits (Lloyd et al, 1978).

Així, el balanç de nitrogen es basa en la idea que un individu adult, que ja ha arribat a completar el seu creixement, es manté en un equilibri de nitrogen, es a dir un balanç entre entrades i sortides proper a zero. De manera que, quan incrementi la proporció de proteïna a la dieta mostrarà un balanç positiu (la ingesta superior a les pèrdues), mentre que si la dieta és deficient en proteïnes el balanç de nitrogen esdevindrà negatiu. Si bé, el balanç de nitrogen és positiu en situacions en que l'organisme produeix un creixement net, com ara, durant la infància, embarç, o situacions de regeneració tisular en l'adult, o bé després de períodes de malnutrició.

També s'observat en animals d'experimentació, que poden donar-se balanços de

nitrogen negatiu al excloure-se de la dieta un o més dels aminoàcids essencials, de manera que la resta d'aminoàcids no podran ser utilitzats per la síntesi de proteïnes i es produeix una pèrdua neta (obligatòria) d'aminoàcids essencials provinents de la degradació proteica (Munro i Crim, 1980).

Cal tenir en compte, també, que un balanç negatiu de nitrogen, és a dir quan les pèrdues són superiors a la ingesta, no està correlacionat sempre amb una pèrdua de pes corporal, ja que pot donar-se junt amb un balanç energètic positiu que permeti l'emmagatzemant de greix i guany de pes (Lloyd et al, 1978).

El balanç de nitrogen, alhora, és un índex dels requeriments dietètics de proteïna (Rand et al, 1977), de manera que les necessitats proteiques de l'organisme són les que condicionen el manteniment d'un equilibri de nitrogen en individus adults i en canvi permet un balanç positiu en individus en creixement (Scriver i Rosenberg, 1973).

El balanç de nitrogen pot utilitzar-se també per a la determinació del valor nutritiu de les proteïnes, tècnica que rep el nom d'*índex de balanç de nitrogen*. En condicions de ingestes a nivell de submantaniment aquest índex coincideix amb el valor biològic de la proteïna (proporció del nitrogen absorbit que es retingut en l'organisme). L'índex de balanç de nitrogen consisteix en comparar la pendent de les rectes de regressió pel balanç de nitrogen en vers el nitrogen absorbit amb ingestes més baixes i lleugerament superiors a l'equilibri nitrogenat (Lloyd et al, 1978).

#### 4.3 El N com a senyal proteica

En nutrició una pràctica habitual és l'estima del contingut de la proteïna dels aliments mitjançant la determinació del nitrogen, degut a que és una anàlisi més ràpida i barata, que no pas determinar la composició en aminoàcids. Aquesta mesura és suficient per donar idea del estat nutritiu d'un individu o del valor nutritiu d'un aliment.

S'ha calculat que de mitjana el nitrogen representa el 16 % del pes molecular de les proteïnes. De manera que la la quantitat de proteïna es pot estimar com a 6,25 vegades el contingut de nitrogen valorat. Aquest valor està calculat a partir de la composició aproximada en aminoàcids de les proteïnes, però, és tan sols una aproximació, ja que depèn del seu contingut concret en aminoàcids, el percentatge de nitrogen de les proteïnes pot variar de un 15% a un 18%. Les proteïnes de la llet, per exemple, contenen tan sols un 15,5% de N, mentre que les plantes no lleguminoses un 17,5%. Aliments com ous, carn, peix i lleguminoses tenen un contingut de nitrogen més proper al 16%. Si bé el 6,25 és molt utilitzat i es considera un bon índex de proteïnes, en alguns casos pot ser aconsellable utilitzar el factor específic si es coneix, per exemple el 6,38 per la llet i el 5,70 pel blat i els productes derivats. De tota manera, cal tenir cura de fer un ús correcte d'aquest factor, ja que per exemple, les fulles de plantes (sobretot les cultivades en sols molt fertilitzats), arrels i tubercles, així com els llevats, tenen un alt contingut de nitrogen no proteic i de l'aplicació del factor 6,25 en se'n resultaria una sobrevaloració del seu contingut proteic. Mentre que en el cas de les llavors, carns i peixos el nitrogen present és quasi bé tot en forma de proteïna, sent molt correcte utilitzar el factor de 6,25 per estimar el seu contingut en proteïnes (Lloyd et al, 1978).

Aplicant el mateix raonament, podríem plantejar si la quantificació de la quantitat de proteïna que hi ha en un organisme, utilitzant el factor de 6,25 és correcte. En realitat cada

teixit té una composició proteica diferent de la dels altres i no tenen perquè coincidir, a més, en agafar l'animal sencer i valorar el seu contingut proteic, si utilitzem la mesura del nitrogen total cometent errors prou importants. Malgrat això, hi ha molts treballs en que la valoració del contingut proteic s'ha fet d'aquesta manera (Lin i Huang, 1982, Sotelo-López i Lucas-Florentino, 1978).

El N es l'organisme es troba en la major part formant part dels aminoàcids, bé sigui incorporats a proteïnes o en el "pool" d'aminoàcids lliures. Només una part insignificant forma part de les bases púriques i pirimidíniques.

El nitrogen de la dieta s'ingereix majoritàriament en forma de proteïnes, que en el tub digestiu són hidrolitzades, de manera que s'absorbeixen com aminoàcids o dipèptids. Una vegada en l'organisme aquests aminoàcids poden metabolitzar-se de diverses maneres, poden incorporar-se a la proteïna endògena sense perdre el seu nitrogen, o bé entrar en el metabolisme general mitjançant una desaminació, aleshores, mentre el seu esquelet carbonat serà indistingible dels lípids i glúcids, el nitrogen s'haurà d'eliminar forçosament i en el cas dels mamífers això es fa en forma d'urea majoritàriament. Així la determinació d'urea o bé de N en orina ens dona un bon índex de quina ha estat l'utilització d'aminoàcids en l'organisme (Meister, 1965, Rongstad, 1977).

#### 4.4 Factors que influeixen en la determinació del balanç nitrogenat

##### 4.4.1 La ingesta

Una anàlisi del N que contenen els aliments ens indica quin es el nivell d'ingesta, però no té en compte paràmetres com la digestibilitat i la proporció d'aminoàcids en la proteïna, que pot afectar molt la posterior utilització en l'organisme. Així, en els estudis de requeriments proteics els resultats poden ser molt diversos segons la font proteica que s'utilitzi, per aquest motiu s'han establert una sèrie d'índexs que indiquen la qualitat de la proteïna de les diverses fonts alimentàries.

Podem definir **qualitat proteica** com la proporció d'aminoàcids essencials que conté una proteïna. Així, una proteïna té una qualitat proteica més elevada quan més propera sigui la seva composició d'aminoàcids essencials a la de la proteïna del cos de l'animal que l'ingereix. En conseqüència quan més elevada sigui la qualitat de la proteïna, millor podrà ser utilitzada per l'animal.

Però una dieta amb una proteïna amb una proporció d'aminoàcids adequada, es a dir amb una qualitat proteica molt bona, no garanteix que la seva **disponibilitat** pels requeriments de l'animal sigui també bona. Pot ser que en certes condicions alguns aminoàcids no estiguin a disposició de ser absorbides per l'animal. En aquest sentit, tenim l'exemple de les mucoproteïnes en les que algunes parts de la cadena peptídica, que es troben adjacents als sucres, són totalment resistents a la digestió. Altres vegades els aliments contenen inhibidors dels enzims digestius, com el cas de les proteïnes de llavor de soja que porten un inhibidor de la tripsina, però aquest és làbil al calor, de manera que un tractament tèrmic facilita la seva digestió. Mentre que, en uns casos el tractament en calor pot ser beneficiós en altres pot ser ben al contrari, ja que en aquest procés pot donar-se la reacció de Maillard, de manera, que es produeix una reducció de sucres reaccionant amb els restes  $\epsilon$ -amino de la lisina que esdevé inaccessible. Aquests exemples fan evidents els problemes existents en la

determinació de la qualitat proteica.

#### 4.4.1.1 Índexs de qualitat proteica

La principal funció de la proteïna de la dieta és proporcionar els aminoàcids necessaris pel creixement i manteniment. Cal doncs, per obtenir mesures adequades, que els estudis es facin en les espècies en concret a qui es destina l'aliment. Però inconvenients com el cost i dificultat de fer les mesures en humans i animals grans, fa que aquestes es realitzin, en general, en animals de laboratori en unes determinades condicions estàndard. Així els mètodes més utilitzats són:

##### 4.4.1.1.1 Valor biològic (BV)

Va ser un dels primers índex utilitzat per evaluar la qualitat proteica. Consisteix en determinar la proporció del nitrogen absorbit que és retingut en l'animal. En principi el nitrogen de la dieta que ha estat eliminat el trobarem en la orina i la femta, la resta serà el retingut. El valor biològic és un percentatge de quin és el nitrogen retingut de la proteïna realment digerible. S'assumeix que el nitrogen és un bon reflexe de la quantitat d'aminoàcids. El valor biològic pot ser expressat per l'equació de Thomas-Mitchell (1924):

$$\%BV = \frac{100 \times \text{Ningerit} - ((\text{Nfemta} - \text{Nmetabòlic}) + (\text{Norina} - \text{Nendogen}))}{\text{Ningerit} - (\text{Nfemtes} - \text{Nmetabòlic})}$$

El nitrogen metabòlic de la femta, i el nitrogen endogen de l'orina es determinen amb una dieta lliura de proteïnes, i és aquell nitrogen que s'elimina i que no es degut directament a la ingesta, sinó que és conseqüència del metabolisme residual.

El inconvenient de la tècnica és la laboriositat i que calen estudis a temps llarg.

##### 4.4.1.1.2 Utilització neta de proteïna (NPU)

Aquests índex combina el valor biològic amb l'índex de digestibilitat (NPU = BV x digestibilitat). El NPU es pot calcular mitjançant l'estima del N retingut.

$$NPU = \frac{\text{N retingut}}{\text{N ingerit}}$$

Hi han treballs que indiquen que existeix una bona correlació entre el NPU calculat a partir de el N de tot el cos i NPU calculats a partir de N de fetge o de l'extremitat posterior en rates (Sotelo-lópez i Lucas-Florentino, 1978).



Aquest mètode és menys laboriós que el valor biològic, però té l'inconvenient de que cal matar l'animal per analitzar el contingut de N, per això el seu ús es limita a animals petits. En humans es pot estimar el NPU mesurant el N en orina i femta i estimant el retengut.

#### 4.4.1.1.3 Índex de creixement

La taxa de creixement d'un animal és un índex francament bo per estimar la qualitat proteica. En condicions controlades el guany de pes és proporcional a la quantitat d'aminoàcids essencials que aporta la dieta. Existeix una correlació molt bona entre el guany de pes i el guany de nitrogen en el cos durant el creixement. Aquesta és una tècnica ampliament utilitzada per la seva senzillesa, i permet la utilització en nens. S'ha comprovat que dades de qualitat proteica mitjançant el seguiment de creixement en rates, poden ser aplicables per l'evaluació de dietes en l'home.

#### 4.4.1.1.4 Taxa d'eficiència proteica (PER)

Es defineix com el guany de pes per gram de proteïna consumida. És el mètode més utilitzat per determinar la qualitat proteica, ja que és aplicable a un ampli nombre d'espècies. S'han fet, però, recomanacions per tal d'estandaritzar les condicions del mètode, com fixar el nombre d'animals, l'edat, la llargada de l'estudi i la composició de la dieta (Campbell, 1963).

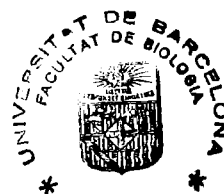
El PER ha sigut objecte de crítiques, ja que el mètode asumeix que tota la proteïna s'utilitza pel creixement, i no té en compte la que es requereix pel manteniment. Però malgrat això és àmpliament utilitzat per la seva senzillesa.

#### 4.4.1.1.5 Taxa neta de proteïna (NPR)

La taxa neta de proteïna és una modificació de la PER, per tal de solventar el problema del N de manteniment. El NPR és el guany de pes d'un grup de rates alimentades amb la dieta prova que té proteïna, més la pèrdua de pes d'un grup similar alimentat amb dieta sense proteïna, dividit pel pes de proteïna consumit.

#### 4.4.1.1.6 Índex químic

Degut a que determinar la qualitat proteica en animals és car i laboriós, es van desenvolupar mètodes químics. Block i Mitchell en 1947 van introduir el mètode de l'*índex químic*, que es basa en comparar la proporció d'aminoàcids essencials d'una proteïna problema amb una de referència, que acostuma a ser la proteïna d'ou de gallina. Però aquest mètode asumeix que la disponibilitat d'aminoàcids per l'organisme és el mateix que la proporció que es determina químicament, i això ja hem vist que no es del tot cert.



#### 4.4.2 La femta

La determinació del nitrogen de la femta ens dona idea de quina part del N ingerit no s'ha absorbit, de manera que hom pot utilitzar-lo per a l'índex de digestibilitat de la proteïna. Però, no tot el nitrogen que trobem en la femta és d'origen dietètic, ja que hi han pèrdues degudes a nitrogen endogen, així el recanvi de les cèl·lules epitelials del tub digestiu contribueix al nitrogen de la femta, però és N metabòlic i no exògen. L'única manera de distingir quina proporció de N de la femta és d'origen exogen o bé endogen és fent dos grups d'experiments, un animals alimentats sense proteïna i l'altre amb proteïna (Lloyd et al, 1978).

#### 4.4.3 L'orina

La determinació del N en l'orina ens dona idea de quina ha estat la metabolització dels aminoàcids aportats per la dieta. Així del catabolisme dels aminoàcids obtindrem la formació d'urea, que s'extreta per orina. El nitrogen de l'orina en 80-90% està en forma d'urea (Pastor-Anglada i Remesar, 1986), la resta es troba en forma d'aminoàcid, creatinina, o bé en forma d'algun tipus de derivat d'aminoàcid característic del catabolisme de les proteïnes musculars, per exemple el 3-metil-histidina (Young i Munro, 1978). De manera que, en l'orina també podem distingir entre N procedent de l'excés en la dieta, que s'oxida i s'elimina, i N degut a un mínim recanvi obligatori, que correspondrà a N endògen. Al igual que en el cas de les femtes, l'única manera de distingir-los és fer dos grups experimentals, un amb dieta amb proteïna i un altre grup una dieta sense font de nitrogen.

S'han fet estudis en els que es correlaciona el nitrogen excretat en orina amb la quantitat de nitrogen ingerit, de manera que es suggereix que la simplificació de mesurar tan sols el nitrogen de l'orina ens pot servir per indicar quin es l'estat proteic de la ingesta d'un individu. Això simplificaria molt els estudis, sobretot en l'aplicació clínica (Bingham i Cummings, 1985, Tilve, 1982).

A partir del nitrogen de la ingesta i del nitrogen de l'orina i femta es poden fer balanços nitrogenats, que són utilitzats no solament com indicador de l'efecte nutricional d'una dieta (o proteïna), sinó també, per evaluar l'estat clínic de l'organisme, en ser un paràmetre comunment utilitzat en clínica, malgrat els problemes que comporta (veure apartat 4.5) la seva realització (Waterlow et al., 1978). Així la utilització d'aquest balanç pot tenir clarament un caire aplicat.

### 4.5 Altres aspectes i problemes del balanç de nitrogen

#### 4.5.1 Durada de l'experiment

Per tal d'obtenir un bona mesura de quin es l'estat nutricional proteic d'un organisme cal fer una mesura a llarg plaç, ja que en estudis a curt termini pot ser que l'estatus proteic de l'organisme no es vegi afectat per la composició de la dieta (Lin i Huang, 1982). També es important tenir en compte els ritmes endogens d'oxidació de la proteïna de la dieta, així s'ha observat que la màxima taxa d'oxidació es dona a les 4-8 hores després de menjar i que a més aquests ritmes desapareixen en dietes lliures de proteïna, així com, es fan molt més marcats als incrementar la proporció de

proteïna en la ingesta (Wannemacher i Dinterma, 1980). En estudis per determinar la NPU s'han descrit períodes mínims de 28 dies (Lachance i Miller, 1973), tot i que també s'han descrit resultats comparables en estudis de tan sols 21 dies, però períodes més curts sembla no ser suficient (Sotelo-López i Lucas-Florentino, 1978).

#### 4.5.2 Pèrdues no controlades

La metodologia clàssica utilitzada per a fer un balanç de nitrogen, es a dir la mesura de la ingesta, la femta i l'orina, ha estat àmpliament criticada, principalment en dos aspectes: En primer lloc, perquè no té en compte pèrdues per suor, descamació de la pell (en cas d'animals pèrdua de pel), exhalació d'amoni, i en segon lloc, perquè es descriuen moltes situacions en que hi ha un balanç positiu de nitrogen, malgrat no estar en edat de creixement, però que no es corroboren amb un conseqüent guany de pes.

Alguns dels problemes associats a la mesura del balanç de nitrogen, són els errors que es produeixen en la recollida de les mostres, de manera que es pot subestimar les pèrdues per femta i orina degut als restes que es queden adherits a les parets dels tubs en els que es recullen. En el mateix sentit, es pot sobre-estimar la ingesta, resultant finalment un balanç més positiu del que en realitat és. A més, a aquest efecte s'hi suma l'omissió d'aquelles pèrdues que normalment no es mesuren, com per exemple, la suor.

S'han fet esforços per intentar determinar quina pèrdua de nitrogen representa la suor, així com altres normalment també ignorades. En aquest sentit, trobem el treball de Calloway et al (1971) en humans, en el que fa un estudi minucios de les pèrdues per suor i descamació (utilitzant uns vestits especials), que representen de 0.3-0.4 mg N/m<sup>2</sup> segons el grau d'activitat física, també valora les pèrdues de descamació recuperades en l'aigua de rentar-se, així com el nitrogen del raspall de dents, cabells i altres pèrdues en la higiene diària, etc, i les pèrdues d'amoni per exhalació, que representen uns 115 mg N/dia, altres pèrdues poden ser sang, saliva, semen, de manera que la suma de totes juntes representa aproximadament 0.5 g de nitrogen/dia en un individu sedentari i en un ambient confortable.

Altres autors han mesurat el nitrogen excretat en forma de nitrat en la femta i orina (Kurzer i Calloway, 1981) i han trobat que pot representar un 5% del N excretat. Estudis més recents detecten la formació de nitrat per oxidació de l'amoni en rates (Saul i Archer, 1984), si bé l'amoni es quantitativament important en la formació de nitrat, i hi ha una bona correlació entre nivell d'amoni en plasma i aparició de nitrat, sembla que tan sols un 50% del nitrat produït es deriva de l'amoni i que l'altre 50% es produeix per una via no coneguda (Wagner et al, 1985).

Però, amb anterioritat, Costa (1960) davant el fet de que balanços de N positius no s'acompanyessin d'un guany de pes, va postular la possible existència d'una via d'eliminació de N no coneguda. Va ser aquest mateix autor que en l'any 1968 va detectar la producció de nitrogen gas en ratolins i en l'home, de manera que aquest podia representar de un 5-10% el N de la ingesta. Treballs posteriors semblen confirmar aquesta producció de nitrogen gas en l'home (Cissik et al, 1972), a més aquesta producció sembla que està directament correlacionada amb la proporció de nitrogen a la dieta.

Aquestes dades fan que un augmenti la precaució alhora de fer un balanç de nitrògen, caldrà doncs, anar molt en compte a mesurar el més exacta possible la ingesta, i les pèrdues. També és convenient, sempre que sigui possible estudiar la retenció, ja que hem evidenciat que l'estima del retingut a partir de la ingesta menys les pèrdues per femta i orina no es corresponen exactament al retingut, i que en resulta sobre-estimat. Evidentment, en estudis clínics la determinació directa del retingut no es possible, i cal fer una estimació indirecta.

#### 4.6 Balanç d'aminoàcids

Si bé el balanç de nitrogen ens aporta una idea general de quin és l'estatus proteic d'un organisme, un estudi més detallat de balanç d'aminoàcids ens aportarà una informació molt més amplia de les necessitats d'aquest organisme.

Des del punt de vista de la pràctica nutricional, es fa necessari establir els requeriments mínims dels aminoàcids essencials, aquells que l'organisme no pot sintetitzar, i que la seva presència en la dieta determina en gran part l'estat nutricional global de l'organisme. Podríem definir els **requeriments d'aminoàcid**, com la quantitat mínima d'aminoàcid essencial necessari per mantenir el balanç al mínim, es a dir que hi hagi les mínimes pèrdues per oxidació (Young i Bier, 1987). Aquesta estima s'ha fet durant molt de temps mitjançant estudis de balanç de N (Rose i Wixom, 1955). Però, el balanç global de N sembla que és un mètode inadequat per mesurar els requeriments d'un aminoàcid (Young, 1987), ja que un equilibri en el balanç de N no reflecteix necessàriament un estat nutricional adequat, perquè no ens indica quina és la qualitat o distribució del metabolisme de les proteïnes, en els diferents òrgans i teixits. Malgrat que es mesurin totes les pèrdues possibles al fer el balanç de N, per tal de mimetitzar al màxim els errors, cal tenir en compte, també, que el nivell energètic global de la dieta pot influir en l'utilització dels aminoàcids, així per exemple, si es fa la mesura dels requeriments d'aminoàcids amb una dieta amb un nivell energètic global massa alt (Rose i Wixom, 1955), pot passar que els requeriments reals necessaris (amb una dieta que assegurí el manteniment energètic de l'organisme sense guany de pes), siguin subestimats. A més la interpretació nutricional dels balanços és difícil, donat que en adults, balanços amb ingestes de N superiors a les requerides, esdevenen progressivament més positius, mentre que ingestes de N baixes poden semblar adequades, establint-se un equilibri de nitrogen en un període suficient de temps (Garza et al, 1977).

Alternativament, s'han intentat establir altres tècniques per mesurar els requeriments d'aminoàcids essencials, sense utilitzar balanços. S'ha indicat que el estudi del nivell d'aminoàcids plasmàtics és un bon índex de la qualitat de la proteïna, mostrant una alta correlació amb el NPU (Sarwar et al, 1983). El nivell dels aminoàcids plasmàtics, també sembla ser un bon indicador de l'estat nutricional d'un individu, essent un reflex del metabolisme proteic dels teixits, de manera que s'ha utilitzat per estudiar els requeriment d'aminoàcids (Young et al, 1971), tot i que també ha estat criticat per alguns autors, degut a que en estudis amb deficiència de metionina no estrobava una disminució d'aquest aminoàcid en plasma (Lakshmann et al, 1976). Una tècnica descrita més recentment per estimar els requeriments d'aminoàcids, es basa en estudis cinètics mitjançant un traçador marcat amb un isòtop estable ( $^{13}\text{C}$ ) (Meguid et al, 1986). Utilitzant aquesta tècnica es descriuen uns requeriments d'aminoàcids essencials més elevats que els descrits mitjançant estudis de balanços de N. De manera que els autors suggereixen que els valors actualment recomenats (FAO/WHO/UNU, 1985), estan subestimats per un factor de dos

o tres vegades, ja que malgrat que permetin un equilibri nitrogenat en l'individu, els estudis cinètics evidencien que s'assoleix a expenses d'un recanvi disminuït (Young, 1987). d'aquest mètode en humans.

Cal indicar que també hi ha altres aplicacions dels estudis de balanços, que no tenen directament un enfoc clínic. Així, pot interessar estudiar els trets generals del metabolisme proteic en diferents situacions fisiològiques, per exemple, en el nostre cas, l'obesitat. De manera que, la utilització dels balanços nitrogenats pot proporcionar-nos informació de mecanismes generals d'adaptació en les diferents situacions. Aquests mecanismes podran ser millor estudiats quan es faci un estudi detallat de cada aminoàcid.

Al fer un estudi de balanç d'aminoàcids podrem obtenir informació de la disposició de cada aminoàcid, de la seva utilització, d'alteracions en els mecanismes de transport, com afecten els diferents components de la dieta, entre altres.

Cal dir, però que una aplicació del balanç d'aminoàcids, amb un sentit més estricte, s'ha utilitzat desde un punt de vista no tant clínic ni nutricional, sino des de l'enfoc de la investigació bàsica. De manera que en fer un estudi de balanç d'aminoàcids podrem obtenir informació de la disposició de cada aminoàcid, de la seva utilització, d'alteracions en els mecanismes de transport i també com afecten els diferents components de la dieta.

Normalment els estudis de balanç d'aminoàcids s'han fet mitjançant les diferències arterio-venoses dels diferents òrgans i teixits. D'aquesta mesura s'obté una idea de quina és la captació i/o l'alliberament d'un aminoàcid per part d'un teixit i/o òrgan. En aquest sentit, per exemple s'ha estudiat el paper dels eritròcits en el transport d'aminoàcids en l'organisme (Elwyn et al, 1972). També s'ha utilitzat en humans per estudiar la captació/alliberament d'aminoàcids en múscul del braç (Felig i Wahren, 1971), i ha estat àmpliament utilitzada en animals d'experimentació per estudiar el metabolisme d'aminoàcids en diversos teixits (Brosnan et al, 1983), fins i tot en glàndula mamària (Viñas et al, 1987), sota les més diverses condicions. Aquesta tècnica té com avantatge, que és fàcil de realitzar, s'obtenen uns valors fàcilment reproduïbles i que es poden fer els experiments "in vivo". Quan les diferències d'aminoàcids són corregides pel flux de sang que passa per el teixit i/o òrgan, aleshores s'obtenen els valors de la velocitat real de captació i/o alliberament de l'aminoàcid pel teixit i/o òrgan (Casado et al, 1987).

El desavantatge que presenta aquesta tècnica és que, si bé per els aminoàcids essencials és cert que ens permet saber la captació i/o alliberament, no ho és tant per els aminoàcids no essencials, donat la seva més ràpida velocitat de transformació.



## **5 RESULTATS**





## The effect of cafeteria—feeding on energy balance in Wistar and in lean and obese Zucker rats

Immaculada Rafecas, Montserrat Esteve, Xavier Remesar and Marià Alemany

*Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona 08071 Barcelona, Spain*

### SYNOPSIS

The carcass accretion of lipid, protein and carbohydrate was measured in Wistar, Zucker lean and Zucker obese rats fed controlled standard or cafeteria diets from days 30 to 60 after birth. In all groups the cafeteria diet induced a higher carcass energy deposition than the control diet, the effects being more marked in rats aged 45 to 60 days than in those aged 30 to 45 days. Obese Zucker rats deposited larger amounts of lipid than the other animals studied, due in part to a higher energy intake and increased efficiency of energy deposition. In all rats, cafeteria-feeding induced a relative increase in fat deposition as well as gains in gross weight and protein. The effects on body weight of cafeteria diet and genetic obesity were partly additive, suggesting a mechanism of influencing overall accretion of reserves and thus body weight, shared only in part. It is postulated that the Zucker *fa/fa* rats had to eat more as a way to produce enough residual metabolic heat to maintain their thermal homeostasis that takes precedence over energy homeostasis. This implies the accumulation of excess metabolites that finally find their way into body reserves.

### INTRODUCTION

The mechanism of control of food intake in

the rat is an essential element in the maintenance of energy homeostasis (Alemany, 1989). The tight adjustment of energy intake, however, can be considerably stretched when the animal is challenged with high energy and palatable diets (Sclafani & Springer, 1976; Friedman, 1984), such as the diets known under the generic denomination of 'cafeteria diet' (Sclafani & Springer, 1976; Rothwell & Stock, 1979). It has been established that the morsels of cafeteria diets selected by rats are rather uniform in their nutrient composition (Prats *et al.* 1989), cafeteria diets being unusually rich in fats (Naim *et al.* 1985; Prats *et al.* 1989). Ingestion of a cafeteria diet by young animals results in increases in both thermogenesis (Rothwell & Stock, 1979) and fat deposition (Rolls *et al.* 1980; Rothwell & Stock, 1982; Barr & McCracken, 1984; Naim *et al.* 1985), which is one reason why they have been considered acceptable models of bulimic human obesity (Sclafani & Springer, 1976). Cafeteria-fed rats have also been used as a physiological model for diet-induced thermogenesis (Rothwell & Stock 1979, 1986).

Allelic recessive mutant Zucker *fa/fa* rats are another widely studied model of



obesity (Zucker & Zucker, 1961; Bray, 1977). These animals have a defective thermogenic system (Godbole *et al.* 1978), which lowers their ability to survive cold exposure (Triandafillou & Himms-Hagen, 1983; Kaul *et al.* 1985), despite a high intake of energy (Radcliffe & Webster, 1978; Harris *et al.* 1988). Since the thermogenic apparatus of their brown adipose tissue is not fully functional (Triandafillou & Himms-Hagen, 1983; Planche *et al.* 1983; Bazin *et al.* 1984), it has been postulated that they do not present diet-induced thermogenesis, and thus deposit a significant part of their available energy in the form of fat (Zucker, 1975; Radcliffe & Webster, 1978; Planche *et al.* 1983).

The combination of these two models of experimental obesity: dietary and genetic, could give us some insight into the mechanisms governing the development of obesity, and of diet-induced thermogenesis. The purpose of this study is to determine whether there is an additive effect of cafeteria feeding upon genetic obesity in the deposition of fat reserves, by comparing the energy intake and energy deposition by young weaned Wistar, Zucker and obese Zucker rats fed control or cafeteria diets.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Three groups of rats, all female and aged 30 days (weaned at 22), were used in this study: A) Wistar rats (bred at the University of Barcelona Animal Service from Charles River France stock), B) Lean Zucker (Fa/?) rats and C) Obese Zucker (fa/fa) rats; all Zucker rats were bred in the same Service, from heterozygous parents (Harlan-Ollac, UK). Their weight and growth curves can be seen in Figure 1. The fa/fa rats were identified on weaning by their aspect and a rapid fall in their rectal temperature during a short exposure to the cold.

The rats were housed individually, either in polypropylene-bottomed cages with

wood shavings as absorbent material, or in polycarbonate metabolic cages (Tecniplast Gazzada, Italy) which allowed the daily estimation of the consumption of individual food items. The cages were maintained in a light (on from 08.00 to 20.00), humidity (70-80 % relative humidity) and temperature (21-22 °C) controlled environment.

### *Dietary treatments*

Control rats were fed commercial pellets (type A03 from Panlab, Barcelona) and tap water *ad libitum*. All studies involving the measurement of food intake were carried out with the rats kept in metabolic cages. The rats given the cafeteria diet were presented daily with a fresh offering of biscuits spread with liver pâté, bacon, banana, chow pellets (as indicated above), tap water and whole milk complemented with 333 g/l sucrose plus 10 g/l of a mineral and vitamin supplement (Gevral, Cyanamid Ibérica) (Prats *et al.* 1989). All the materials were previously weighed and presented in excess (c. 20-30 % higher than the expected consumption). Twenty-four hours later, the remaining debris was isolated, identified and weighed. The drying of food leftovers was corrected by determining the amount of water lost in one day from known weight food samples left in a cage with no rats. This diet is a simplified version of an earlier cafeteria diet developed and studied by us (Salvadó *et al.* 1986; Prats *et al.* 1989), scaled down by selecting only the items actually consumed in significant portions. The animals were weighed every day at the same hour (11.00 to 12.00).

### *Experimental setup*

The three rat stocks defined: Wistar, lean Zucker and obese Zucker were studied under two dietary conditions: controls (fed rat chow pellets and water) and cafeteria (receiving the cafeteria diet). For each group three sets (5-7 rats each) of animals were studied, being killed at 30 (0 days of dietary

treatment), 45 (15 days of treatment) or 60 (30 days of treatment) of age. The rats belonging to the 60 day group were used for daily individual diet intake analysis (metabolic cages) during the whole 30 days of the study. The other rats (45 days, as well as weaned 30 day old rats) were kept individually in ordinary cages, where they were fed the same diets, but their intake was not measured.

On days 30, 45 or 60, the allotted groups of rats were weighed and immediately killed by decapitation. Their corpses were again weighed (the difference being the net loss of blood and fluids) and then dissected. The content of their intestine was carefully removed and weighed. The weights recorded and used for calculations were the empty body weights. The remaining carcass was then minced and ground with a blender, and stored frozen at  $-23^{\circ}\text{C}$  until processing.

#### *Analytical procedures*

The frozen ground carcasses were sampled (c. 2 g per sample in four bits taken from different parts of the ground rat following a previously tested sampling protocol). The samples were then homogenized with a Politron homogenizer; the resulting paste was then used for analysis. The constituents of the diets given to the animals were ground and homogenized, and then subjected to the same analyses as the samples of rat carcass.

The water content of the carcasses was estimated by differential weighing after drying the samples at  $110^{\circ}\text{C}$  for 24 hours. Digestible carbohydrate content in the samples was measured with an anthrone method (Fraga, 1956), after alkaline digestion (Good *et al.* 1933); this method did not include fibre. Protein was measured in the alkaline digests with a Folin phenol reagent method (Lowry *et al.* 1951); the samples heavily loaded with fat were cleaned with solid MgO. When performing food analyses, the protein fraction undigested by the alkaline treatment was not taken into account. In

carcass analyses, all protein was measured by further boiling in KOH until complete solubilization (Lin & Huang, 1982). Total lipids were estimated gravimetrically from the chloroform:methanol extracts (Folch *et al.* 1957).

The blood of a series of animals was collected in dry heparinized beakers and subjected to the analytical procedures outlined above to measure: water, carbohydrate, lipid, and protein content per g of blood. The empty body weight allowed for the calculation of the 'in vivo' content of water, protein, carbohydrate and lipid of the animals,

#### *Calculations and statistics*

The analyses of body composition of the series of rats killed on days 30 and 45 were used for the calculation of the composition of the rats kept in metabolic cages (killed at 60 days after one month of daily measurement of intake and body weight) on days 30 and 45. Since their weights were very close ( $P > 0.95$ , Student's *t* test) and the feeding scheme was the same, it was assumed that the percentage composition of the three series of rats was identical for matching age, strain and diet. This allowed the calculation of increases in body components and energy stores, always related to the actual empty body weight of the animal referred to the age of comparison.

Standard energy equivalences of non-fibre carbohydrate, [17.5 kJ/g], fat [38 kJ/g, assuming 95 % absorption] and protein [18.6 kJ/g] were used for the calculation of nominal food energy content (Passmore & Eastwood, 1986). Carcass energy was calculated from the determined weight of protein and fat using values of 23.7 and 39.6 kJ/g respectively for the energy contents.

The composition of the food items (Table 1) was used to establish the amount of digestible carbohydrate, lipid, protein (and computed overall energy) taken up and ingested by each rat for each day. The tabulated data for each diet component were combined in

order to determine the amount of each nutrient class ingested every day as well as its energy equivalence.

Statistical comparisons between the groups were made with standard three-way analysis of the variance (ANOVA) programmes.

## RESULTS

The mean composition of blood samples was 81.1 (SE 0.6) % water, 16.0 (SE 0.8) % protein, 0.48 (SE 0.03) % lipid and 0.14 (SE 0.03) % carbohydrate for all rats. The intake of the three groups of Wistar and Zucker rats during both periods studied (30–60 and 45–60 days) are presented in Table 2. The availability of a cafeteria diet resulted in increased energy intake for all rats. The ingestion of this energy-rich diet resulted in a consistent increase in lipid consumption, and decreased the carbohydrate intake of obese Zucker rats with age. Wistar rats did not show time-related changes in protein consumption, but lean and obese Zucker rats increased their mean daily intake of protein in the second period studied.

Figure 1 presents body weight increases with age. All cafeteria-fed groups showed higher values than their pellet-fed counterparts throughout. The highest weights were those of Zucker obese rats, followed by Wistar and finally by Zucker lean rats. The weights of the three groups of rats increased uniformly with age throughout the period studied. Body weight changes were significantly different for diet and strain.

Table 3 presents the weight and composition of 30, 45 and 60 day old rats fed pellet or cafeteria diets. The proportion of change in weight, water, carbohydrate, lipid, protein and energy content was very similar for both groups of lean rats, the Zucker obese animals showing much higher rates of change for all parameters in the 30 day period. Cafeteria-fed rats showed consistently higher rates of

deposition of nutrients and a much higher increase in energy content for the whole period. The rates of change were highest for lipid content, which increased 3.4 to 3.6-fold in one month in lean rats versus 5.6 in the fa/fa. The corresponding figures when rats were given a cafeteria diet were 8.2 to 7.3 to 7.7-fold for all three groups. The energy content increased by a factor of 3–3.2 in both lean rat groups and 5.0 in fatty rats (under the cafeteria diet the figures were 5.1–5.4 and 7.0-fold respectively). Mineral and other organic components were not measured and may account for the differences of body composition with respect to 100 %.

The net calculated energy and nutrient deposition (the differences in composition between the different age groups) for the various strain and diet groups are presented in Table 4. All groups showed net increases for all nutrients and energy in both periods studied. The rats that received the cafeteria diet consistently presented higher nutrient deposition figures than their control-fed counterparts. The rates of weight change were hardly altered for Zucker fa/fa rats, decreasing with age for both groups of lean rats. Despite this trend, there was a higher deposition of nutrients and energy in the 45-60 day group than in the 30-45 day group. The amount of water deposited in the second part of the study was smaller than in the first, except for fa/fa rats. The pattern of accretion of carbohydrate, lipid and protein was different in all three strains, and was affected by the type of diet. The buildup of lipid was considerable, especially for cafeteria rats. The rates of protein accretion changed very little with age. The stored lipid-to-stored protein ratio was strongly influenced over the whole period by cafeteria-feeding in lean animals (doubling the stored lipid/protein ratio in both groups); the effects upon obese rats were less marked (increase of only 19 %).

Comparisons between the combined values for energy ingested and energy stored are presented in Table 5. The data have

been derived from the figures in Tables 2 and 4. Zucker obese rats ate more than the Wistar controls in both periods. The energy ingested by all cafeteria-fed groups was higher than that of chow-fed controls. The Zucker fa/fa rats showed higher values than Wistar rats. The accumulation of energy was maximal for all cafeteria-fed groups, and highest for the obese Zucker rats, the values for the 45-60 day period being consistently higher than those of the first (30-45 day) period. The differences between energy ingested and energy stored or accrued were consistently higher for cafeteria-fed rats. Zucker fa/fa rats showed the highest values of energy ingested and accrued.

Cafeteria-fed rats incorporated a high proportion of the energy ingested. The highest values were found in Zucker obese rats. The fraction of the ingested energy stored in the body was higher for the 45-60 day rats than for the younger ones except for Zucker fa/fa rats, which showed very high deposition rates throughout.

## DISCUSSION

The changes in energy deposition in experimental animals can be studied either from their known or supposed composition (Rolls *et al.* 1980) or by measuring actual differences in energy content by means of a bomb calorimeter (Zucker, 1975; Rothwell & Stock, 1979). The results obtained as to the effect of cafeteria or high energy diets are not uniform (Barr & McCracken, 1984), probably due to different methodological approaches (Rothwell & Stock, 1988), different ages (Rothwell & Stock, 1982; Salvadó *et al.* 1986; Iglesias *et al.* 1986) and animal strains (Rothwell & Stock, 1980) as well as to the different composition and administration strategies of the cafeteria diets (Moore, 1987; Rothwell & Stock, 1988; Prats *et al.* 1989).

The rats fed a cafeteria diet in-

creased their fat (and to a lesser extent) their protein deposition, with an efficiency in the utilization of ingested energy for the buildup of their body masses that was higher than in chow-fed controls, in agreement with previous reports by other authors (Barr & McCracken, 1984). Obese Zucker rats showed a high gross efficiency of fat deposition, even when they were practically absent from the control diet, and showed the highest increases in body weight and storage of reserves (Zucker, 1975; Radcliffe *et al.* 1978; Planche *et al.* 1983). The effects of a cafeteria diet were —relatively— not so apparent upon the weight of Zucker fa/fa rats as in other groups, although after one month of dietary treatment, the fa/fa rats increased their weight almost by a factor of four. Obese rats showed higher stored lipid/protein ratios than their lean counterparts; the ingestion of a cafeteria diet had little effect on their high ratios, probably because they were already near the limit for new tissue fat accretion. This means that the storage of fat in obese rats actually follows a different pattern from that found in rats receiving the cafeteria diet; the latter incorporated relatively more protein than the fa/fa rats.

There was considerable uniformity in the efficiency of protein incorporation, which was higher, however, in the cafeteria-fed rats, especially in comparison with the wide variation in the deposition of fat. The differences observed between the amount of fat actually eaten by the rats subjected to the control (chow pellet) diet and that deposited implies considerable lipogenesis from protein or carbohydrate (Kannan *et al.* 1980). In humans (receiving much lower proportions of fat in the diet) the lipogenic pathway is already blocked by the dietary fatty acids (Weiss *et al.* 1986). This does not seem to be the case here, since the net lipogenic consequences of the control diet are clear, especially for the Zucker fa/fa rats (Bloxham *et al.* 1977). The extent of this metabolic ability is unclear in the case of rats fed a cafeteria diet, since their dietary availability of

fats is much higher, in agreement with previous results (Prats *et al.* 1989). However, since their stored lipid/protein ratio indicates the lower fat-accruing ability of cafeteria-fed lean rats versus obese rats, it could be supposed that they actively oxidize dietary fats at a high rate, as observed in mice (Cartañà *et al.* 1989).

It was assumed that the differences between energy intake and energy available for metabolic activities were essentially small and uniform, thus it was presumed that a significant portion of the energy available for all animals studied—especially cafeteria-fed and Zucker obese rats—must be eliminated as heat, since it was ingested and was not deposited as body mass.

Since the Zucker obese rats maintain their body temperature with residual metabolic heat (Himms-Hagen, 1989), their ability to control body temperature is restricted to the control of energy losses. However, to a certain extent they can influence their real heat production by increasing metabolic activity. Since the energetics of ATP formation from oxidizable substrates represents a loss of about 1/3rd of the energy (Flatt *et al.* 1984) and the additional use of ATP in exergonic synthesis reactions represents the loss of about one half of the ATP energy, we can assume that the overall energy efficiency of the complete oxidation of substrates is about a third of the initial energy, which means that about two thirds of this energy would finally be lost as heat (Ferrannini, 1988). Since Zucker rats need this heat, they can activate the utilization of substrates as a way of obtaining more residual energy. However, since they cannot use substrates inefficiently because of a failure in their thermogenesis system (Triandafillou & Himms-Hagen, 1983; Planche *et al.* 1983; Bazin *et al.* 1984), they are not able to eliminate their excess energy and must store it. It is a contradiction that these animals should eat more (Radcliffe & Webster, 1978; Harris *et al.* 1988) to maintain a high residual metabolic energy and gain some headway in their control

of body temperature, but they have to pay dearly for it by enormously increasing their reserves, since they have no other place to dump the excess energy ingested.

Protein turnover is considered to be one of the most energy demanding components of basal metabolic activity in the mammal (Milligan, 1971; Reeds *et al.* 1982; Waterlow, 1984). The increase in protein deposition, and thence in protein mass subjected to this turnover would considerably increase the amount of energy needed to maintain it, and thence the amount of residual energy liberated in the process. Thus, the high net protein deposition observed in all cafeteria-fed groups and the high amounts of protein accrued by obese Zucker rats suggest that this may contribute to the overall process of converting nutrient energy into heat (cafeteria feeding) and using it to maintain body temperature (Zucker fa/fa rats).

The body weight control system is an integrated entity that controls the size of body reserves in a direct mutual relationship of control with the center governing body temperature (Janský, 1973). Both processes are vital for the homeostatic function of the homeotherm, and share some effectors in their actuation, like brown adipose tissue, a site of the diet and cold-induced thermogenesis (Rothwell & Stock, 1979; Ma & Foster, 1989), so it is reasonable to assume that a failure in this system would eventually affect the entire thermostatic system, despite this important drawback. The fact that in obese Zucker rats the thermic homeostasis has taken preeminence over energy homeostasis, as our data seem to point out, clearly indicates the degree of immediate importance of these systems for survival.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the 'Dirección General de Investigación Científica y Técnica' from the Government of

Spain (PB86-0512), and from the 'Instituto de Estudios Documentales del Azúcar', as well as by a personal grant (I. Rafecas) from the CIRIT of the Government of Catalonia. Thanks are given to Robin Rycroft for his revision of the text and editorial advice.

## REFERENCES

- Alemany, M. (1989) The etiologic basis for the classification of obesity. *Progress in Food and Nutrition Science* **13**, 45-66.
- Barr, H.G., McCracken, K.J. (1984) High efficiency of energy utilization in 'cafeteria' -and force-fed rats kept at 29 °. *British Journal of Nutrition* **51**, 379-387.
- Bazin, R., Eteve, D., Lavau, M. (1984) Evidence for decreased GDP binding to brown adipose tissue mitochondria of obese Zucker (fa/fa) rats in the very first days of life. *Biochemical Journal* **221**, 241-245.
- Bloxham, D.P., Fitzsimons, J.T.R., York, D.A. (1977) Lipogenesis in hepatocytes of genetically obese rats. *Hormone and Metabolic Research* **9**, 304-309.
- Bray, G.A. (1977) The Zucker-fatty rat: a review. *Federation Proceedings* **36**, 148-153.
- Cartañà, J., Huguet, J., Arola, Ll., Alemany, M. (1989) Effects of a high lipidic diet on murine energetic reserves in food deprivation. *Hormone and Metabolic Research* **21**, 606-611.
- Ferrannini, E. (1988) The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. *Metabolism* **37**, 287-301.
- Flatt, J.P., Pahud, P., Ravussin, E., Jéquier, E. (1984) An estimate of the P:O ratio in man. *Trends in Biochemical Sciences* **9**, 466-468.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 497-509.
- Fraga, F. (1956) Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de la antrona. *Investigación Pesquera* **3**, 69-74.
- Friedman, M.I. (1984) Psychologic determinants of food intake. In: *Malnutrition: determinants and consequences*, pp. 295-303. New York: Alan R. Liss.
- Godbole, V., York, D.A., Bloxham, D.P. (1978) Developmental changes in the fatty (fa/fa) rat: evidence for defective thermogenesis preceding the hyperlipogenesis and hyperinsulinemia. *Diabetologia* **15**, 41-44.
- Good, C.A., Kramer, H., Somogyi, M. (1933) The determination of glycogen. *Journal of Biological Chemistry* **100**, 485-494.
- Harris, R.B.S., Tobin, G., Hervey, G.R. (1988) Voluntary food intake of lean and obese Zucker rats in relation to dietary energy and nitrogen content. *Journal of Nutrition* **118**, 503-514.
- Himms-Hagen, J. (1989) Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **67**, 394-401.
- Iglesias, R., Andrés, V., Castellà, J., Alemany, M. (1986) Lack of effect of the onset of cafeteria feeding on growth and thermogenesis in young rats. *Nutrition Reports International* **34**, 229-239.
- Janský, L. (1973) Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biological Reviews* **48**, 85-132.
- Kannan, R., Learn, D.B., Baker, N., Elovson, J. (1980) Fatty acid synthesis in vivo and hepatic contribution to whole body lipogenic rates in obese Zucker rats. *Lipids* **15**, 993-998.
- Kaul, R., Schmidt, I., Carlisle, H. (1985) Maturation of thermoregulation in Zucker rats. *International Journal of Obesity* **9**, 401-409.
- Lin, C.P., Huang, P.C. (1982) Actual nitrogen deposition in mature adult rats fed moderate to high protein diets. *Journal of Nutrition* **112**, 1067-1074.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Ma, S.W.Y., Foster, D.O. (1989) Brown adipose tissue, liver and diet induced thermogenesis in cafeteria diet-fed rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **67**, 376-381.
- Milligan, L.P. (1971) Energetic efficiency and metabolic transformations. *Federation Proceedings of the* **30**, 1454-1458.
- Moore, B.J. (1987) The cafeteria diet—an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *Journal of Nutrition* **117**, 227-231.
- Naim, M., Brand, J.G., Kare, M.R., Carpenter, R.G. (1985) Energy intake, weight gain and fat deposition in rats fed flavored, nutritionally controlled diets in a multi-choice ('cafeteria') design. *Journal of Nutrition* **115**, 1447-1458.
- Passmore, R., Eastwood, M.A. (1986) *Davidson and Passmore Human Nutrition and Dietetics*. Ch.3. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Planche, E., Joliff, M., de Gasquet, P., Le Liepvre, X. (1983) Evidence of a defect in energy expenditure in 7-day-old Zucker rat (fa/fa). *American Journal of Physiology* **245**, E107-E113.
- Prats, E., Monfar, M., Castellà, J., Iglesias, R., Alemany, M. (1989) Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiology and Behavior* **45**, 263-272.
- Radcliffe, J.D., Webster, A.J.F. (1978) Sex, body composition and regulation of food intake during growth in the Zucker rat. *British Journal of Nutrition* **309**, 483-492.
- Reeds, P.J., Wahle, K.W.J., Haggarty, P. (1982) Energy costs of protein and fatty acid synthesis. *Proceedings of the Nutrition Society* **41**, 15-161.
- Rolls, B.J., Rowe, E.A., Turner, R.C. (1980) Persistent obesity in rats following a period of consumption of a mixed, high energy diet. *Journal of Physiology* **298**, 415-427.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J. (1979) A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31-35.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J. (1980) Intra-strain differences in the response to overfeeding in the rat. *Proceedings of the Nutrition Society* **39**, 20A.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J. (1982) Effects of feeding a palatable 'cafeteria' diet on energy balance in young and adult lean (+/?) Zucker rats. *British Journal of Nutrition* **47**, 461-471.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J. (1986) Diet-induced thermogenesis. In: *Brown adipose tissue*, pp.269-298 [P. Trayhurn & D.G. Nicholls, editors]. London: Edward Arnold.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J. (1988) The cafeteria diet as a tool for studies of thermogenesis. *Journal of Nutrition* **118**,

- 925-928.
- Salvadó, J., Segués, T., Alemany, M., Arola, L.I. (1986) Effects of lactation on circulating plasma metabolites in 'cafeteria-fed' rats. *British Journal of Nutrition* **55**, 139-147.
- Sclafani, A., Springer, D. (1976) Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology and Behavior* **17**, 461-471.
- Triandafillou, J., Himms-Hagen, J. (1983) Brown adipose tissue in genetically obese (fa/fa) rats. Response to cold and diet. *American Journal of Physiology* **244**, E145-E150.
- Waterlow, J.C. (1984) Protein turnover, with special reference to man. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* **69**, 409-438.
- Weiss, L., Hoffmann, G.E., Schreiber, R., Andres, H., Fuchs, E., Körber, E., Kolb, H.J. (1986) Fatty acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **367**, 905-912.
- Zucker, L.M. (1975) Efficiency of energy utilization by the Zucker hereditarily obese rat "fatty". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **148**, 498-500.
- Zucker L.M., Zucker, T.F. (1961) Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity* **52**, 275-278.



**Table 1****Composition of the diets offered to Wistar and Zucker rats**

component	content in grams per kg (liter for water and milk)				
	water	digestible carbohydrate	lipid	protein	other components
chow pellets	120	587	30	170	93
biscuits	67	655	155	63	60
liver pâté	556	7	291	123	23
bacon	437	0	299	173	91
banana	780	171	1	14	34
tap water	999	0	0	0	1
enriched milk	632	319	19	22	8

The data represent the values used for calculations of food intake. They are the mean of 5 different samples

**Table 2****Intake of Wistar and Zucker rats offered a cafeteria diet**

strain and diet:	period	Wistar		Zucker Fa/?		Zucker fa/fa		SEM
		control	cafeteria	control	cafeteria	control	cafeteria	
carbohydrate intake (g/day)	30-45	9.13 <sup>a</sup>	9.10 <sup>a</sup>	7.60 <sup>b</sup>	7.47 <sup>b</sup>	12.26 <sup>c</sup>	12.58 <sup>c</sup>	0.32
	45-60	9.96 <sup>a</sup>	10.92 <sup>d</sup>	9.91 <sup>a,d</sup>	9.85 <sup>a,d</sup>	16.95 <sup>e</sup>	13.80 <sup>c</sup>	
lipid intake (g/day)	30-45	0.47 <sup>a</sup>	2.15 <sup>b</sup>	0.39 <sup>c</sup>	2.23 <sup>b</sup>	0.63 <sup>d</sup>	3.47 <sup>e</sup>	0.14
	45-60	0.49 <sup>a</sup>	2.12 <sup>b</sup>	0.51 <sup>a</sup>	2.41 <sup>b</sup>	0.87 <sup>f</sup>	4.04 <sup>g</sup>	
protein intake (g/day)	30-45	2.65 <sup>a</sup>	2.32 <sup>b,d</sup>	2.20 <sup>b,d</sup>	2.08 <sup>b</sup>	3.55 <sup>c</sup>	2.99 <sup>a,e</sup>	0.09
	45-60	2.82 <sup>a</sup>	2.23 <sup>b,d</sup>	2.87 <sup>a,e</sup>	2.35 <sup>d</sup>	4.91 <sup>f</sup>	3.25 <sup>c,e</sup>	

All data are the mean of 6-7 different animals. Means —in the same row— not bearing the same superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ). The SEM data refer to the complete 30-60 day period.

**Statistical significance of differences (ANOVA):**

parameters compared	carbohydrate		lipid		protein	
	df	P	df	P	df	P
STRAIN	2,62	0.0000	2,62	0.0000	2,62	0.0000
DIET	1,62	0.3349	1,62	0.0000	1,62	0.0000
TIME	1,62	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Wistar – diet	1,62	0.2880	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Wistar – time	1,62	0.0008	1,62	0.3892	1,62	0.5742
Zucker Fa/? – diet	1,62	0.7277	1,62	0.0000	1,62	0.0001
Zucker Fa/? – time	1,62	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Zucker fa/fa – diet	1,62	0.0195	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Zucker fa/fa – time	1,62	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0000

**Table 3**

**Body composition of Wistar and Zucker rats offered a cafeteria diet**

age			weight	carbohydrate	lipid	protein	water	energy
days	strain	diet	g	g	g	g	g	MJ
30	Wistar	control	92.5 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>	11.6 <sup>a</sup>	68.6 <sup>a</sup>	0.498 <sup>a</sup>
	Zucker Fa/?	control	70.3 <sup>b</sup>	0.12 <sup>b</sup>	4.2 <sup>b</sup>	9.0 <sup>b</sup>	51.4 <sup>b</sup>	0.382 <sup>b</sup>
	Zucker fa/fa	control	83.3 <sup>a</sup>	0.16 <sup>a</sup>	14.2 <sup>c,d</sup>	10.8 <sup>a</sup>	51.6 <sup>b</sup>	0.820 <sup>c</sup>
45	Wistar	control	152.1 <sup>c</sup>	0.24 <sup>c</sup>	11.3 <sup>c</sup>	21.0 <sup>c</sup>	108.5 <sup>c</sup>	0.948 <sup>d</sup>
		cafeteria	176.5 <sup>d</sup>	0.27 <sup>d</sup>	15.6 <sup>d</sup>	25.6 <sup>d</sup>	122.5 <sup>d</sup>	1.230 <sup>e</sup>
	Zucker Fa/?	control	122.5 <sup>e</sup>	0.22 <sup>c,e</sup>	7.3 <sup>e</sup>	16.5 <sup>e</sup>	86.7 <sup>e</sup>	0.682 <sup>c</sup>
		cafeteria	146.7 <sup>c</sup>	0.19 <sup>e</sup>	17.3 <sup>f</sup>	18.3 <sup>e</sup>	97.2 <sup>f</sup>	1.118 <sup>f</sup>
	Zucker fa/fa	control	173.7 <sup>d</sup>	0.34 <sup>f</sup>	37.3 <sup>g,i</sup>	23.7 <sup>d</sup>	99.0 <sup>f</sup>	2.044 <sup>g</sup>
		cafeteria	223.6 <sup>f</sup>	0.19 <sup>e</sup>	65.3 <sup>h</sup>	33.0 <sup>f</sup>	108.3 <sup>c</sup>	3.369 <sup>h</sup>
60	Wistar	control	198.8 <sup>g</sup>	0.28 <sup>d</sup>	18.9 <sup>f</sup>	31.9 <sup>f</sup>	133.5 <sup>g</sup>	1.508 <sup>i</sup>
		cafeteria	248.2 <sup>h</sup>	0.32 <sup>f</sup>	40.8 <sup>g</sup>	39.0 <sup>g</sup>	150.0 <sup>h</sup>	2.547 <sup>j</sup>
	Zucker Fa/?	control	165.9 <sup>d</sup>	0.28 <sup>d</sup>	15.1 <sup>d</sup>	26.2 <sup>d</sup>	110.2 <sup>c</sup>	1.225 <sup>e</sup>
		cafeteria	209.1 <sup>g</sup>	0.36 <sup>f</sup>	32.3 <sup>i</sup>	30.1 <sup>f</sup>	125.6 <sup>d</sup>	2.037 <sup>g</sup>
	Zucker fa/fa	control	279.3 <sup>i</sup>	0.55 <sup>g</sup>	79.4 <sup>j</sup>	37.1 <sup>g</sup>	145.8 <sup>h</sup>	4.031 <sup>h</sup>
		cafeteria	350.4 <sup>j</sup>	0.69 <sup>h</sup>	116.9 <sup>k</sup>	45.9 <sup>h</sup>	168.7 <sup>i</sup>	5.727 <sup>k</sup>
		SEM	7.41	0.01	2.84	1.08	3.43	0.13

All data are the mean of 6-7 different animals. Means —for each column— not bearing the same superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Statistical significance of differences (ANOVA):

parameters compared	weight		carbohydrate		lipid		protein		water		energy	
	df	P	df	P	df	P	df	P	df	P	df	P
STRAIN	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,92	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000
DIET	1,93	0.0000	1,93	0.0268	1,92	0.0000	1,93	0.0000	1,93	0.0000	1,93	0.0000
TIME	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,92	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000
Wistar – diet	1,93	0.0000	1,93	0.0001	1,92	0.0000	1,93	0.0000	1,93	0.0003	1,93	0.0000
Wistar – time	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,92	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000
Zucker Fa/?–diet	1,93	0.0000	1,93	0.0062	1,92	0.0000	1,93	0.0017	1,93	0.0003	1,93	0.0000
Zucker Fa/?–time	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,92	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000
Zucker fa/fa–diet	1,93	0.0000	1,93	0.0059	1,92	0.0000	1,93	0.0000	1,93	0.0000	1,93	0.0000
Zucker fa/fa–time	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,92	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000	2,93	0.0000

**Table 4**

Deposition of carbohydrate, lipid, protein and water in the body of Wistar and Zucker rats offered a cafeteria diet

strain and diet:	period	Wistar	Wistar	Zucker	Zucker	Zucker	Zucker	SEM
		control	cafeteria	Fa/? control	Fa/? cafeteria	fa/fa control	fa/fa cafeteria	
weight increase (g)	30-45	65.4 <sup>a</sup>	84.0 <sup>b,c</sup>	56.2 <sup>a</sup>	76.4 <sup>b</sup>	92.9 <sup>c</sup>	140.2 <sup>d</sup>	3.5
	30-60	112.1 <sup>a</sup>	155.7 <sup>b</sup>	99.6 <sup>a</sup>	138.8 <sup>b</sup>	198.4 <sup>c</sup>	267.0 <sup>d</sup>	
carbohydrate stored (g)	30-45	0.10 <sup>a</sup>	0.12 <sup>b</sup>	0.11 <sup>a,b</sup>	0.07 <sup>c</sup>	0.18 <sup>d</sup>	0.05 <sup>e</sup>	0.01
	30-60	0.13 <sup>a</sup>	0.17 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>	0.24 <sup>c</sup>	0.40 <sup>d</sup>	0.54 <sup>e</sup>	
lipid stored (g)	30-45	6.1 <sup>a</sup>	10.1 <sup>b</sup>	3.3 <sup>c</sup>	13.0 <sup>d</sup>	23.6 <sup>e</sup>	51.1 <sup>f</sup>	1.96
	30-60	13.7 <sup>a</sup>	35.3 <sup>b</sup>	11.1 <sup>c</sup>	29.1 <sup>d</sup>	65.7 <sup>e</sup>	102.7 <sup>f</sup>	
protein stored (g)	30-45	10.1 <sup>a</sup>	13.9 <sup>b</sup>	7.6 <sup>c</sup>	9.4 <sup>a</sup>	13.1 <sup>b</sup>	22.1 <sup>d</sup>	0.43
	30-60	21.0 <sup>a</sup>	27.4 <sup>b</sup>	17.4 <sup>c</sup>	21.1 <sup>a</sup>	26.6 <sup>b</sup>	35.0 <sup>d</sup>	
water stored (g)	30-45	44.2 <sup>a,d</sup>	53.8 <sup>b,e</sup>	38.2 <sup>a</sup>	45.5 <sup>a,d</sup>	48.9 <sup>b,d</sup>	56.7 <sup>e</sup>	1.59
	30-60	69.2 <sup>a,b</sup>	81.4 <sup>a</sup>	61.7 <sup>b</sup>	74.2 <sup>a,b</sup>	95.7 <sup>c</sup>	117.1 <sup>d</sup>	
stored lipid/stored protein ratio (g/g)	30-45	0.60	0.73	0.43	1.38	1.80	2.31	
	30-60	0.65	1.29	0.64	1.38	2.47	2.93	

All data are the mean of 6-7 different animals. Means —in the same row— not bearing the same superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ). The SEM data refer to the complete 30-60 day period.

Statistical significance of differences (ANOVA):

parameters compared	weight		carbohydrate		lipid		protein		water	
	df	P	df	P	df	P	df	P	df	P
STRAIN	2,62	0.0000	2,62	0.0000	2,92	0.0000	2,62	0.0000	2,62	0.0000
DIET	1,62	0.0000	1,62	0.0127	1,92	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0000
TIME	1,62	0.0000	1,62	0.0108	1,92	0.0000	1,62	0.8863	1,62	0.0000
Wistar – diet	1,62	0.0000	1,62	0.0013	1,92	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0270
Wistar – time	1,62	0.0000	1,62	0.0000	1,92	0.0000	1,62	0.7255	1,62	0.0000
Zucker Fa/?–diet	1,62	0.0000	1,62	0.0004	1,92	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0118
Zucker Fa/?–time	1,62	0.0000	1,62	0.2023	1,92	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Zucker fa/fa–diet	1,62	0.0000	1,62	0.0117	1,92	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Zucker fa/fa–time	1,62	0.7779	1,62	0.0000	1,92	0.0000	1,62	0.0000	1,62	0.0000



**Table 5**

Energy balance of Wistar and Zucker rats offered a cafeteria diet

strain and diet:	period	Wistar	Wistar	Zucker	Zucker	Zucker	Zucker	SEM
		control	cafeteria	Fa/? control	Fa/? cafeteria	fa/fa control	fa/fa cafeteria	
energy ingested (MJ)	30-45	3.41 <sup>a</sup>	4.24 <sup>b</sup>	2.84 <sup>c</sup>	3.80 <sup>a</sup>	4.58 <sup>b</sup>	6.08 <sup>d</sup>	0.14
	30-60	7.13 <sup>a</sup>	8.87 <sup>b</sup>	6.53 <sup>c</sup>	8.35 <sup>b</sup>	10.97 <sup>d</sup>	12.87 <sup>e</sup>	
energy stored (MJ)	30-45	0.48 <sup>a</sup>	0.73 <sup>b</sup>	0.31 <sup>c</sup>	0.74 <sup>b</sup>	1.25 <sup>d</sup>	2.55 <sup>e</sup>	0.09
	30-60	1.04 <sup>a</sup>	2.05 <sup>b</sup>	0.85 <sup>c</sup>	1.66 <sup>d</sup>	3.24 <sup>e</sup>	4.91 <sup>f</sup>	
% of energy ingested		14.1	17.0	10.9	19.5	27.3	41.9	
% of energy ingested		14.6	23.0	13.0	19.9	29.7	38.1	
energy available (ingested – stored) (MJ)	30-45	2.93	3.56	2.52	3.06	3.32	3.53	
	30-60	6.09	6.82	5.68	6.70	7.67	7.97	

All data are the mean of 6-7 different animals. See the text for the method of calculation of composition. Means —in the same row— not bearing the same superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Statistical significance of differences (ANOVA):

parameters compared	energy ingested		energy stored	
	df	P	df	P
STRAIN	2,62	0.0000	2,62	0.0000
DIET	1,62	0.0000	1,62	0.0000
TIME	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Wistar – diet	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Wistar – time	1,62	0.0040	1,62	0.0000
Zucker Fa/? – diet	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Zucker Fa/? – time	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Zucker fa/fa – diet	1,62	0.0000	1,62	0.0000
Zucker fa/fa – time	1,62	0.0000	1,62	0.0000

## Legend of Figure

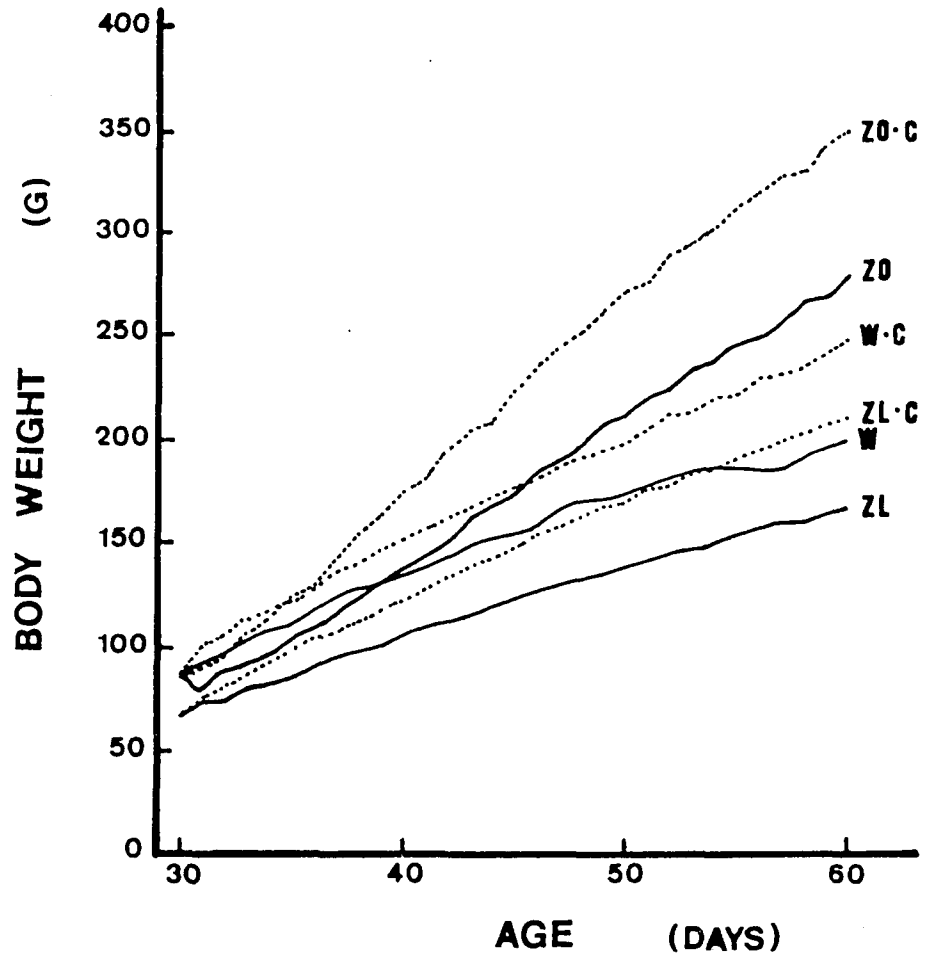
### Figure 1

Body weight of the Wistar and Zucker rat groups used in the experiment from days 30 to 60

The graphs represent the mean weight for each group (N=5-7) determined daily. Solid lines correspond to control (pellet) diet, and dot lines to cafeteria-feeding. **ZO·C** Zucker obese cafeteria-fed; **ZO** Zucker obese control-fed; **W·C** Wistar cafeteria-fed; **ZL·C** Zucker lean cafeteria-fed; **W** Wistar control-fed; **ZL** Zucker lean control-fed.

Statistical significance of the differences (ANOVA calculated from values taken at 5-day intervals):

parameters compared	body weight	
	df	P
STRAIN	2,209	0.0000
DIET	1,209	0.0000
TIME	6,209	0.0000
Wistar – diet	1,209	0.0000
Zucker Fa/?–diet	1,209	0.0000
Zucker fa/fa–diet	1,209	0.0000



## NITROGEN BALANCE DISCREPANCY IN WISTAR RATS FED A CAFETERIA DIET

Montserrat Esteve, Immaculada Rafecas, Xavier Remesar and Marià Alemany

*Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona  
08071 Barcelona, Spain*

### Abstract

The nitrogen balance of Wistar rats aged 30-45 and 45-60 days fed either control or cafeteria diet has been determined by measuring the intake, fecal and urinary excretion and nitrogen deposition in the body. The efficiency of extraction of dietary nitrogen was higher for cafeteria diet-fed rats, which showed a lower nitrogen excretion and higher body nitrogen accretion than controls. The accurate measurement of nitrogen intake, excretion and deposition showed a consistent proportion of nitrogen unaccounted for (10-26 % of net intake) in the studied fractions, which proportion was higher in the youngest cafeteria diet-fed rats.

KEY WORDS: *nitrogen balance; nitrogen excretion; nitrogen deposition.*

### Introduction

One of the best available models of diet-induced obesity and hyperphagia are the varied self-selected diets known as 'cafeteria' diets (1). These diets differ in composition and schedules, but in general terms result in a significant increase in the energy ingested by the animal (2). Despite some claims of purported unreliability of the composition of the diets actually selected by the rats (3), it has been shown that in spite of a highly variable selection of foods, the nutrient composition of the ingested diet is fairly constant (4). The cafeteria diets are grossly hyperlipidic, with lower proportions (but not absolute amounts) of carbohydrate and protein ingested with respect to standard common pellet chow diets (4).

The rats subjected to a cafeteria diet show altered nitrogen metabolism, with higher carcass nitrogen retention (2,5), and diminished activity of the urea cycle (6). The overall result is a higher efficiency of dietary protein nitrogen utilization, since amino acids are used in lower proportion as

energy fuels (7), and the availability of essential amino acids for protein synthesis can be enhanced in part because of the higher biological quality of the protein present in the foods selected (2). The main energy effect of the cafeteria diets is an increased heat output (2,8) because of the activation of diet-induced thermogenesis (9), which contributes to the elimination of the energy ingested in excess (10).

One of the problems most commonly encountered in the establishment of nitrogen balances is the combination of errors from various sources that often results in unbalanced input/output tables (11). This is fairly recurrent in studies on rodents (6,12), in which there is very often a significant amount of nitrogen 'not accounted for' (13). We have previously found this problem and tried to quantify the extent of variation of the measurements in obese rats (13), checking the sources of error in order to establish the origin of the repeated discrepancies.

## Materials and Methods

Female Wistar rats, aged 30 days (weaned at 22) weighing 83-88 g were used. The animals were housed under standard conditions (21-22 °C, 70-80 % relative humidity, lights on from 08.00 to 20.00) in plastic metabolic cages (Tecniplast Gazzada, Italy). They were fed either standard rat chow pellets (type A04 from Panlab, Barcelona), or a simplified version of our cafeteria diet (4,14), consisting of daily fresh offerings of excess rat chow pellets, liver pâté on cookies, bacon, banana and milk enriched (10 g/l) with a protein, vitamin and mineral supplement (Gevral, Cyanamid Ibérica, Barcelona) and 333 g/l sucrose. The animals had free access to tap water. The composition of the foods used is presented in Table 1 (4). The amount of each food eaten every day for each cage was determined by differential weighing. The values were corrected for drying up by comparing the weights with those of a similar set of food samples left in an unoccupied cage. The food crumbs were carefully recovered every day and weighed. For each animal, separate urine and droppings were recovered in vials. Urine samples were kept under octyl alcohol, and were acidified with a drop of HCl to prevent losses of ammonia. All samples were maintained frozen in hermetic tubes until analyzed.

The nitrogen content of the samples was determined by means of a Carlo Erba NA-1500 elemental analyzer. Urinary urea content was measured with a standard urease method (15). All measurements of the same sample were done at least in duplicate. The nitrogen content of the food samples was determined in a similar sampling pattern, using at least 5 different measurements of each sample. Every batch of food used was measured separately and used for the appropriate calculations. The food samples were maintained frozen until 1 hour before being presented to the animals.

Five groups of animals were studied: the first was killed on day 30 after birth, then two groups were fed the standard rat chow pellet diet for 15 or 30 days, and were killed on days 45 or 60. The remaining two groups were fed the cafeteria diet for 15 or 30 days and were killed on days 45 or 60. The measurement of food ingested and the analyses of excreta were done only on the group studied from day 30 to day 60.

After decapitation, the stomach and intestine contents were removed and weighed. The rat carcasses were then quartered, minced and homogenized whole in a large blender. The resulting paste was extended on a flat surface and c. 10 samples of about 0.5 g were taken from fixed parts.



These samples were frozen in liquid nitrogen and powdered with a ceramic mortar and pestle. The powders were used for the measurement of nitrogen content. The differences between live weight and that of the minced rat (corrected by intestinal content weight) were found to be a consequence of the loss of blood in the process of decapitation and mincing. Thus, samples of blood were taken from the rats immediately after their decapitation and used for the measurement of nitrogen content. The final data on nitrogen content of the rat was, then, a composite of the mean nitrogen content of the homogenate-paste plus that of the blood lost and not included in the rat paste measurements. The droppings were also frozen in liquid nitrogen and then powdered in a mortar. The resulting powder was used for the measurement of faeces nitrogen content.

**TABLE 1**  
**Mean nitrogen and energy composition of the food given to the experimental animals**

item	energy content kJ/g	nitrogen content g N/kg
rat chow pellet	14.6	27.2
bacon	15.1	27.6
liver pâté	13.9	19.6
cookies	18.8	10.2
banana	3.5	2.3
enriched milk	6.4 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>
tap water	0.0	0.0

The data are the mean values used for most calculations. Only very small differences between food batches were observed. In each case the actual value for each food batch was used for the calculations. See the text for further information

<sup>a</sup> kJ/ml; <sup>b</sup> g N/l.

Whole (metabolizable) carbohydrate content in the samples was measured with an anthrone method (16), after alkaline digestion (17); this method did not include fiber. Protein was measured in the alkaline digests with a Folin phenol reagent method (18); the samples heavily loaded with fat were cleaned with solid MgO. Total lipids were estimated gravimetrically from the chloroform: methanol extracts (19). The estimation of the energy content of the rat bodies was calculated (20) from their composition.

Statistical significance of the differences between groups was

determined by using the Student's *t* test, and establishing a limit of confidence of  $P < 0.05$  for all comparisons.

## Results

In Table 2, the rat weights are presented by age and dietary group, together with the nitrogen and total energy content in their bodies. The rats subjected to a cafeteria diet grew faster and to a larger extent than those receiving the control diet. The accretion of nitrogen showed no differences as to dietary treatment. Since the amount of energy stored in the bodies of cafeteria-fed rats was higher, the relationship between nitrogen and energy deposited was lower in cafeteria-fed rats than in controls, and differed little from the initial (30-day) figures.

Table 3 presents the results obtained for nitrogen intake from the tabulation of the foods ingested and their nitrogen composition, as well as the total ingested energy for the periods of 15 days considered. The amount of nitrogen ingested for each of the two 15-day periods was virtually the same under both dietary treatments; however, the cafeteria-fed rats had a lower total nitrogen intake than

**TABLE II**  
**Weight and nitrogen content of the body of Wistar rats subjected to control or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth.**

diet	age days	body weight g	total nitrogen in the body g	total energy in the body MJ	body N/energy ratio g N/ MJ
Control	30	85.5 ± 2.0	1.92 ± 0.07	0.41 ± 0.01*	4.68
	45	149.6 ± 7.1*	4.26 ± 0.20*	0.83 ± 0.04*	5.13
	60	198.8 ± 4.2**	5.56 ± 0.23**	1.36 ± 0.03**	4.09
Cafeteria	45	160.8 ± 5.9*	4.04 ± 0.13*	1.00 ± 0.04♦*	4.04
	60	248.2 ± 4.9♦**	6.14 ± 0.21**	2.42 ± 0.05♦**	

All data are the mean ± s.e.m. of 5-7 different animals.  
 Statistical analysis of the differences between means:  
 Differences of cafeteria versus control diet: ♦ = P < 0.05  
 Differences versus day 30: \* = P < 0.05  
 Differences versus day 45: \*\* = P < 0.05

254

pellet-fed controls. The proportion of energy that could eventually be derived from the protein (nitrogen) content of the diet ingested was again much lower in cafeteria-fed rats, since their energy intake was higher than that of controls.

Table 4 shows the data on nitrogen excretion. The nitrogen content of the drop-

pings from cafeteria rats was much lower than that of controls, as was the total urinary nitrogen excreted. The urinary excretion of nitrogen, in addition, was more marked in both 45-60 day groups than in their younger counterparts. Most of the nitrogen excreted in the urine was in the form of urea, which accounted for more than 90 % in all groups.

**TABLE 3**  
**Nitrogen ingested by Wistar rats subjected to control or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth.**

diet	age days	total nitrogen ingested g/15 days	ingested protein energy kJ/15 days	total ingested energy MJ/15 days	mean ingested protein as % of ingested energy
Control	30-45	6.35 ± 0.20	738 ± 23	3.41 ± 0.11	21.6 <sup>a</sup>
	45-60	6.79 ± 0.15	788 ± 18	3.64 ± 0.07	21.6 <sup>a</sup>
Cafeteria	30-45	5.56 ± 0.12♦	647 ± 14♦	4.28 ± 0.07♦	15.1
	45-60	5.52 ± 0.14♦	621 ± 17♦	4.67 ± 0.09♦♦	13.3

The data refer to a 15 day interval in each case. All data are the mean ± s.e.m. of 5-7 different animals.  
 Statistical analysis of the differences between means: Differences of cafeteria versus control diet: ♦ = P < 0.05. Differences of days 45-60 versus days 30-45: ♦♦ = P < 0.05.  
<sup>a</sup> The protein content of the control diet is fixed.

Table 5 presents an overview of the fate of the nitrogen ingested by the rats. These data have been calculated from the means of Tables 2 to 4. The net nitrogen intake (i.e. the nitrogen ingested minus that excreted through the faeces) is the actual proportion of the ingested nitrogen that has to be taken into account, since the rest passes through the

rat gut without being absorbed. This unused ingested nitrogen portion was much higher in control-fed rats; cafeteria-fed animals showed a higher ability to retain the ingested nitrogen.

The difference between the net nitrogen ingested and that excreted through the urine is the theoretically retained nitrogen. The figures obtained in our experiment showed values that decreased with the age of the rats, being higher for cafeteria-fed rats than for controls. However, the actual nitrogen retained in the carcass and measured experimentally (difference in content of rats aged 45

TABLE 4

**Nitrogen excreted by Wistar rats subjected to control or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth.**

diet	age days	fecal N g/15 days	fecal N % intake	urinary N g/15 days	urea N mmoles/15 days	urinaryN as urea (%)
Control	30-45	1.22 ± 0.02	19.2	2.24 ± 0.05	79.3 ± 2.2	99.0 ± 3.2
	45-60	1.35 ± 0.06	19.9	3.35 ± 0.14♦	113.2 ± 6.3♦	94.6 ± 4.5
Cafeteria	30-45	0.75 ± 0.02♦	13.5	1.42 ± 0.05♦	46.1 ± 3.2♦	90.6 ± 3.3
	45-60	0.73 ± 0.03♦	13.2	2.00 ± 0.09♦♦	68.2 ± 3.8♦♦	95.8 ± 5.3

The data refer to a 15 day interval in each case. All data are the mean ± s.e.m. of 5-7 different animals.

Statistical analysis of the differences between means: Differences of cafeteria versus control diet:

♦ = P < 0.05. Differences of days 45-60 versus days 30-45: ♦♦ = P < 0.05.

and 30 or 60 and 45 days) gave much lower and more uniform values. The differences between these data and the theoretically retained nitrogen gives us the amount of nitrogen 'unaccounted for'.

The distribution of the net ingested nitrogen between the three fractions: carcass-retained, excreted in the urine or unaccounted for is also presented in Table 5. The nitrogen actually retained in the carcass decreased in the 45-60 day period versus the 30-45 for controls, but was unchanged in cafeteria-fed rats, which showed very high rates throughout, comparable to those of the younger controls. The nitrogen excreted was maximal for the 45-60 day rats in both groups, but overall, the controls showed much higher excretion figures. The 'unaccounted for' nitrogen was a significant proportion of the net ingested nitrogen, ranging from 11 to 27 %.

TABLE 5

**Fate of the nitrogen ingested in Wistar rats subjected to control or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth.**

parameter	control diet 30-45 days	control diet 45-60 days	cafeteria-diet 30-45 days	cafeteria-diet 45-60 days
Net nitrogen intake (g/ 15 days)	5.13	5.44	4.81	4.79
Theoretically retained nitrogen (g/ 15 days)	2.89	2.10	3.40	2.79
Body retained nitrogen (g/ 15 days)	2.34	1.31	2.12	2.10
<i>Body retained nitrogen</i> <sup>a</sup>	45.6	24.1	44.1	43.8
Urinary excreted nitrogen (g/ 15 days)	2.24	3.35	1.42	2.00
<i>Urinary excreted nitrogen</i> <sup>a</sup>	43.7	61.6	29.5	41.7
'Unaccounted for' nitrogen (g/ 15 days)	0.55	0.79	1.28	0.69
<i>'Unaccounted for' nitrogen</i> <sup>a</sup>	10.7	14.3	26.4	14.5

<sup>a</sup> Values expressed as a percentage of net ingested nitrogen

## Discussion

Cafeteria-feeding results in a higher energy intake and higher energy deposition in the body (1,2,4), mainly in the form of excess fat (21). The results presented agree with this general trend. The

nitrogen management of cafeteria-fed rats is more efficient in general terms than that of paired pelleted controls (6). Despite a lower nitrogen intake, the cafeteria-fed rats managed to retain a comparable amount of protein than controls, thanks to a better intestinal uptake (13), lower nitrogen excretion and more efficient retention in the carcass (6,22). Despite their lower rates of urea production, the proportion of urea in urine was maintained within values comparable to those of controls. The difference was not in the proportion but in the absolute amounts released.

The existence of sizeable proportions of 'unaccounted for' nitrogen poses very serious problems of confidence in the methodology used. Many reports dismiss the differences without explanation (6,12) or refer them to unspecified methodological problems (11). In the present study, the utmost care has been taken to minimize the losses due to scaled-down sampling, consistency of measurements and calculations. The sampling procedures were repeated several times and all discordances checked. The possible matrix effect of organic matter in the measurement of biological samples was ruled out by using additional pure protein standards. The possible effect of water in the under- or over-estimation of sample weight was also eliminated by referring every measurement to gram of dry matter (differential weighing before and after 36 hours at 110 °C), but using wet samples instead for analysis (in order not to lose volatile nitrogen-containing compounds such as ammonia). The losses of ammonia from urine were minimized by acid fixation (which also killed bacteria and prevented further degradation). The computation of carcass nitrogen content took into account the blood losses, and the results were corrected up to the live weight.

The possible losses of nitrogen as free ammonia lost from the lungs are small, and respiratory losses of ammonia are directly related to their circulating levels (23), very low in the standard-fed and kept rat (24). The total amount of nitrogen lost through the lungs in the form of ammonia would thus account for a very small fraction of the 'unaccounted for' nitrogen.

As for the measurement of intake, the food samples were batch-analyzed by using the same uniform procedure used for all other samples. Spilled food was recovered in a very large proportion. In any case, any missing food—as well as hair and skin scales—would be found as contaminant of the droppings or urine, thus not affecting the overall balance. Any error in the accounting of hair and skin scales, however, was not considered to be large enough to justify differences, which in some cases were of the same order of magnitude as the urinary excretion of nitrogen.

Another source of error often cited is the need to use different batches of animals for comparisons and calculations derived from body composition. This is true indeed, but the s.e.m. values obtained in most of our measurements were fairly low, and thus the deviation of the calculated mean values could not represent figures as large as 11 to 26 % of the net ingested nitrogen. The method used for estimation of nitrogen accrued may justify part of the unexplained differences, but it is logical to expect that the influence of the variation within each group would result in a 'noise' or random variation around the mean values. Such an influence could never be used, however, to justify a repetitive trend towards lower values of accrued nitrogen than those expected from the inputs and outputs. The existence of a similar situation in other experiments from other groups strongly supports a hitherto unknown destination for part of the ingested nitrogen. This proportion is quantitatively significant (13).

As to the actual fate of this 'unaccounted for' nitrogen, one only can speculate. A likely

candidate would be the elimination of this nitrogen in the form of gas (N<sub>2</sub>). Against this postulate is the fact that no major pathway (and due to its sheer size it ought to be a major pathway!) has been described in the mammal that would convert 2-amino or ammonia nitrogen into N<sub>2</sub>. Endorsing this supposition, however, we find a series of carefully developed experiments that demonstrate that the mammal (men and mice) indeed produce gaseous nitrogen (25), which further stress the fact that a higher protein intake results in higher N<sub>2</sub> release. The proportion of nitrogen ingested that would find its way into N<sub>2</sub> was estimated to be about ten percent for mice, a value comparable to those found here: 8.7 %, 11.6 % [30-45 and 45-60 day controls], 23.0 % and 12.5 % [30-45 and 45-60 day cafeteria-fed] respect to the nitrogen actually ingested. These results are in the same range as those found for Zucker rats (13).

The results obtained suggest that the existence of alternative pathways for nitrogen elimination apart from urinary or fecal excretion should not be ruled out, and indeed, there is supporting evidence for their existence. The actual final form that this nitrogen waste might take might take can only be hinted at as being gaseous N<sub>2</sub>.

### Acknowledgements

Work supported by grants nos. PB86-0512 and PB88-0208 from the 'Dirección General de Investigación Científica y Técnica' from the Government of Spain. Thanks are given to Robin Rycroft for his help in the correction of the manuscript.

### References

1. Sclafani, A. and Springer, D. (1976) *Physiol. Behav.* 17: 461-471.
2. Rothwell, N.J. and Stock, M.J. (1979) *Nature* 281: 31-35.
3. Moore, B.J. (1987) *J. Nutr.* 117: 227-231.
4. Prats, E., Monfar, M., Castellà, J., Iglesias, R. and Alemany, M. (1989) *Physiol. Behav.* 45: 263-272.
5. Barr, H.G. and McCracken, K.J. (1984) *Br. J. Nutr.* 51: 379-387.
6. Barber, T., Viña, J.R., Viña, J. and Cabo, J. (1975) *Biochem. J.* 230: 675-681.
7. Henry, C.J.K., Rivers, J.P.W. and Payne, P.R. (1986) *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 4: 87-92.
8. Castellà, J. and Alemany, M. (1986) *Comp. Biochem. Physiol. A* 85: 203-206.
9. Rothwell, N.J. and Stock, M.J. (1986) In: *Brown adipose tissue*. (Trayhurn, Nicholls, eds.). Edward Arnold, London, pp. 269-298.
10. Rothwell, N.J. and Stock, M.J. (1982) *J. Physiol.* 328: 371-377.
11. Wallace, W.M. (1959) *Fed. Proc.* 18: 1125-1130.
12. Lin, C.P. and Huang, P.C. (1982) *J. Nutr.* 112: 1067-1074.
13. Esteve, M., Rafecas, I., Remesar, X. and Alemany, M. (1992) *Int. J. Obesity* in the press.
14. Salvadó, J., Segués, T., Alemany, M. and Arola, L. (1986) *Brit. J. Nutr.* 55: 139-147.
15. Fawcett, J.K. and Scott, J.E. (1960) *J. Clin. Pathol.* 13: 156-163.
16. Fraga, F. (1956) *Invest. Pesquera* 3: 69-74.
17. Good, C.A., Kramer, H. and Somogyi, M. (1933) *J. Biol. Chem.* 100: 485-494.
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
19. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* 266: 497-509.
20. Brouwer, E. (1965) In: *Energy metabolism*. (Blaxter, ed.). Academic Press, London, pp. 441-443.
21. Naim, M., Brand, J.G., Kare, M.R. and Carpenter, R.G. (1985) *J. Nutr.* 115: 1447-1458.

22. Henry, C.J.K., Rivers, O.P.W. and Payne P.R. (1987) *Nutr. Res.* 7: 1243-1252.
23. Rubin, E.D., Travis, D.M., Bromberg, P.A., Forkner, C.E. and Tyler, J.M. (1959) *Science* 129: 270-271.
24. Zamora, F., Arola, L. and Alemany, M. (1988) *J. Biochem. Biophys. Meth.* 16: 293-300.
25. Costa, G., Ullrich, L., Kantor, F. and Holland, J.F. (1968) *Nature* 218: 546-551.

## Nitrogen balances of lean and obese Zucker rats subjected to a cafeteria diet

Montserrat Esteve, Immaculada Rafecas, Xavier Remesar and Marià Alemany

Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

### Summary

The effects of a cafeteria diet on nitrogen balance in lean (*Fa/?*) and obese Zucker rats (*fa/fa*) was studied for two consecutive 15 day periods after weaning. Obese rats were able to absorb a lower proportion of dietary nitrogen than the lean controls. Cafeteria diet increased the retention of dietary nitrogen, and lowered urinary nitrogen losses in both obese and lean rats. Urea constituted practically the only product of urinary nitrogen excretion in obese rats, whereas it accounted for only about 75% of that eliminated by *Fa/?* rats. Nitrogen accretion in the body was highest for the younger animals, and again increased with cafeteria feeding. Obese *fa/fa* rats showed a lower percentage of body nitrogen retention than their lean counterparts; obese rats were able, however, to accumulate large amounts of nitrogen and fat, in part because of their higher intake. A significant part of the absorbed nitrogen was not found in either the body or the urine; the cafeteria diet markedly increased the weight of this fraction of nitrogen unaccounted for.

In conclusion, the effects of cafeteria feeding on weight and nitrogen handling were comparable in lean and obese rats, i.e. the effects of genetic and dietary obesity seem to be additive with regard to nitrogen extraction and excretion for Zucker rats.

**Keywords:** nitrogen balance, Zucker *fa/fa* rat, cafeteria diet, nitrogen excretion.

### Introduction

Obesity in Zucker 'fatty' (*fa/fa*) rats develops rapidly after birth.<sup>1,2</sup> These animals are unable to adjust their thermogenic response to food<sup>3,4</sup> or cold,<sup>3,5</sup> and tend to accumulate inordinate amounts of fat reserves.<sup>2</sup> Their lean counterparts (*Fa/?*) do not show this trend, and are considered to possess a fully functional thermogenic system.<sup>6</sup> The Zucker *fa/fa* rat has been extensively used as an animal model for the study of the metabolism of obesity.<sup>7</sup> The energy balance of these rats has often been studied in comparison with their lean counterparts;<sup>8</sup> 'fatty' rats show a higher ability to retain energy in their bodies, and produce a much lower heat output than lean rats.<sup>9</sup> However, the nitrogen handling

ability of these animals has received little attention,<sup>10</sup> despite its interest in comparison with other obesity models in which there are significant changes in the fate of ingested nitrogen.

The administration of palatable self-selecting diets rich in fat (known as 'cafeteria' diets) is another available model of obesity.<sup>11</sup> Cafeteria diets may differ somewhat in composition, but they have in common an increase in the fat content and in the energy density of the food consumed.<sup>12,13</sup> Despite some claims of a purported unreliability of the composition of the diets actually selected by the rats,<sup>14</sup> it has been shown that in spite of a highly variable selection of food, the nutrient composition of the ingested diet is fairly constant.<sup>13</sup>

Rats subjected to a cafeteria diet show a higher carcass nitrogen retention,<sup>15</sup> and lower urea cycle enzyme activities.<sup>16</sup> The overall result is a

Correspondence to: Marià Alemany, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08071 Barcelona, Spain.

higher efficiency of dietary protein nitrogen utilization, since a lower proportion of amino acids are used as energy fuels,<sup>17</sup> and the availability of essential amino acids for protein synthesis is thus enhanced.

The main energy effect of the cafeteria diets is an increased heat output,<sup>18,19</sup> due to activation of diet-induced thermogenesis,<sup>18</sup> which eliminates some of the excess energy ingested.<sup>20</sup> Thus, we have fed a cafeteria diet to *fa/fa* rats in order to determine whether there are any parallels between the two models of obesity, genetic and dietary, with respect to nitrogen balance.

#### Materials and methods

Female Zucker rats weaned on day 22, aged 30 days and weighing 65–67 g (*Fa/?*) or 80–87 g (*fa/fa*) were used. The animals were housed under standard conditions (21–22°C, 70–80% relative humidity, lights on from 08:00 to 20:00 hours) in plastic metabolic cages (Tecniplast Gazzada, Italy). They were fed either standard chow pellets (type A04 from Panlab, Barcelona, Spain) or a simplified version of our cafeteria diet,<sup>13</sup> consisting of daily fresh offerings of excess chow pellets, liver pâté on cookies, bacon, banana and milk enriched with 333 g/l sucrose and 10 g/l of a protein, vitamin and mineral supplement (Gevral, Cyanamid Ibérica, Barcelona, Spain). The animals had free access to tap water. The composition of the foods used is presented in Table 1. The amount of each food item eaten every day for each cage was determined by differential weighing. The values were corrected for drying by comparing the weights with those of a similar set of food samples left in an unoccupied cage. The food crumbs were carefully recovered every day and weighed. For each animal, separate urine and droppings were

recovered in vials. Urine samples were kept under octyl alcohol and acidified with a drop of HCl to prevent loss of ammonia.

The nitrogen content of the samples was determined by means of a Carlo Erba NA-1500 elemental analyser. Urinary urea content was measured with a standard urease method.<sup>21</sup> All measurements were performed at least in duplicate. The nitrogen content of the food samples was determined in a similar sampling pattern, using at least five different measurements of each sample. Every batch of food used was measured separately and used for the appropriate calculations. The food samples were maintained frozen until one hour prior to being presented to the animals.

Five groups of seven animals for each strain (*Fa/?* and *fa/fa*) were studied; the first group was killed on day 30 after birth, then two groups were fed the standard chow pellet diet for 15 or 30 days, and killed on days 45 or 60 after birth. The remaining two groups were fed the cafeteria diet and were also killed on days 45 or 60. The measurement of food ingested and the analysis of excreta were carried out only for the rats killed on day 60.

The rats were killed by decapitation, and immediately quartered, minced and homogenized in a large blender. The resulting paste was extended on a flat surface and 10 samplings of about 0.5 g were taken. These samples were frozen in liquid nitrogen, and then powdered together with a ceramic mortar and pestle. The finely powdered samples were used for the measurement of the nitrogen content of the body. The differences between live weight and that of the processed rat body were found to be a consequence of the loss of blood in the process of decapitation and mincing. Thus, samples of blood were taken from the rats after decapitation

**Table 1** Mean nitrogen and energy composition of the food given to the experimental animals

<i>item</i>	<i>energy content (kJ/g)</i>	<i>nitrogen content (mg N/g)</i>	<i>N/energy ratio (mg N/kJ)</i>	<i>energy derivable from protein (%)</i>
chow pellet	14.6	27.2	1.86	21.6
bacon	15.1	27.6	1.83	21.3
liver pâté	13.9	19.6	1.41	16.5
cookies	18.8	10.2	0.54	6.2
banana	3.5	2.3	0.66	7.4
enriched milk	6.4 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>	0.55	6.3
tap water	0.0	0.0	0.00	0.0

<sup>a</sup>kJ/ml; <sup>b</sup>mg N/ml.

The data are the mean values used for most calculations. Only very small differences between food batches were observed. In each case the actual value for each food batch was used for the calculations. See the text for further information.



and used for the measurement of their nitrogen content. The final data on nitrogen content of the 'live' rat was, then, a composite of the mean nitrogen content of the homogenate plus that of the blood lost and not included in the rat paste measurements. The droppings were also frozen in liquid nitrogen and then powdered in a mortar. The resulting powder was used for the measurement of faecal nitrogen content.

The carbohydrate<sup>22</sup> and lipid<sup>23</sup> contents of the samples were measured with standard methods. The estimation of energy content of the 'live' rat bodies was calculated from their composition using standard conversion factors.<sup>24</sup> Statistical comparisons between means were performed using the Student's *t* test and a standard three-way ANOVA program.

## Results

Figure 1 shows the daily change in body weight undergone by the four diet and strain groups of rats studied. The rats subjected to a cafeteria diet grew faster and reached a larger body weight than those receiving the standard chow diet. In Table 2, the weights attained by the rats by age and dietary group are presented, together with

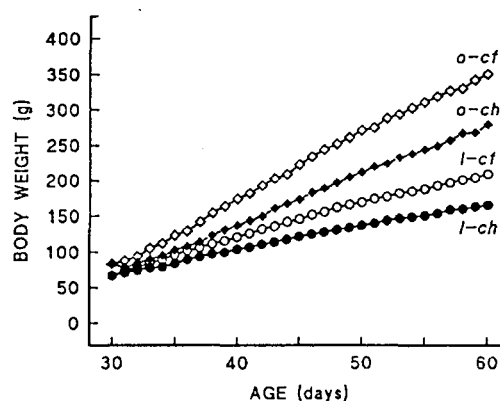


Figure 1 Variation of body weight of Zucker *Fa/?* and *fa/fa* rats fed chow or cafeteria diet from one month to two months of age. Each symbol is the mean of 7 different animals. ● [l-ch]: *Fa/?* rats fed standard chow; ○ [l-cf]: *Fa/?* rats fed the cafeteria diet; ◐ [o-ch]: *fa/fa* rats fed standard chow; ◑ [o-cf]: *fa/fa* rats fed the cafeteria diet.

Statistical treatment of the data (three way ANOVA)

factor	df	F	P
Time	6138	577	0.0000
Strain	1138	1023	0.0000
Diet	1138	285	0.0000

the nitrogen and total energy content in their bodies. In addition, *fa/fa* rats grew even faster. The mean daily increases in body weight computed for both consecutive 15 day intervals show that the rates for the first 15 days were much higher, (about two fold) than those of the 45-60 days period, being highest for *fa/fa* rats receiving the cafeteria diet, which grew at the enormous mean daily rate of about 10%. The effects of both dietary and genetic obesity on body weight increase thus appeared to be additive. The accretion of nitrogen showed small differences with dietary treatment, but the differences were more marked when comparing chow fed lean and obese rats, the latter accruing higher amounts of nitrogen. The amount of energy stored in the bodies of cafeteria fed rats was higher than in rats fed standard chow; in addition, obese rats showed a much higher deposition of energy. The ratio between nitrogen and energy deposited showed a trend to decrease with age, being lower in cafeteria fed rats than in pellet fed, and even lower in obese than in lean rats, the differences being widest between 30 day and 60 day cafeteria fed *fa/fa* rats.

Table 3 presents the results obtained for nitrogen intake from the tabulation of the food ingested and its nitrogen composition, as well as the total energy ingested for the periods of 15 days considered. The amount of nitrogen ingested in the second 15 day period was higher than that ingested in the first, for all groups except for cafeteria fed *fa/fa* rats. The cafeteria fed rats had lower total nitrogen intakes than pellet fed rats. Obese rats also had higher total nitrogen intake than their lean counterparts. The proportion of dietary protein energy was again much lower in cafeteria fed rats, since their energy intake was higher than for standard chow fed animals.

Table 4 presents the analyses of nitrogen excretion. The nitrogen content of the droppings from cafeteria rats was much lower than that of standard pellet fed animals; obese rats had higher absolute values than lean rats, but in all cases, as expected, the younger rats eliminated less faecal nitrogen than the 45-60 day rats. When the faecal nitrogen was expressed as a percentage of the total nitrogen intake, cafeteria fed rats showed lower values than chow fed rats, indicating a higher ability to absorb the ingested nitrogen despite its lower dietary concentration, perhaps due to different digestibility of the protein in the two diets. Obese rats had higher faecal nitrogen values than the comparable lean rat groups, even when related to nitrogen intake. The total urinary nitrogen excreted followed the same pattern as faecal nitrogen. The urinary

**Table 2** Weight and nitrogen content of the body of lean and obese Zucker rats subjected to standard chow or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth.

diet	age (days)	body weight (g)	mean daily body weight increase (%)	total nitrogen in the body (g)	total energy in the body (MJ)	body N/energy ratio (g N/MJ)
<i>Lean</i>						
Chow	30	66.9 ± 1.6	—	1.71 ± 0.03	0.33 ± 0.01	5.18
	45	122.5 ± 2.7 <sup>c</sup>	5.5	3.52 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>c</sup>	5.87
	60	165.9 ± 3.9 <sup>c,d</sup>	2.4	5.16 ± 0.07 <sup>c,d</sup>	1.09 ± 0.03 <sup>c,d</sup>	4.73
Cafeteria	45	147.7 ± 4.3 <sup>a,c</sup>	8.1	3.78 ± 0.23 <sup>c</sup>	1.06 ± 0.03 <sup>a,c</sup>	3.57
	60	209.1 ± 7.6 <sup>a,c,d</sup>	2.8	5.57 ± 0.16 <sup>a,c,d</sup>	1.91 ± 0.08 <sup>a,c,d</sup>	2.91
	<i>Obese</i>					
Chow	30	83.3 ± 4.6 <sup>b</sup>	—	2.00 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.63
	45	173.1 ± 3.9 <sup>b,c</sup>	7.2	3.76 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.92 ± 0.04 <sup>b,c</sup>	1.96
	60	279.3 ± 8.4 <sup>b,c,d</sup>	4.1	6.45 ± 0.27 <sup>b,c,d</sup>	3.84 ± 0.12 <sup>b,c,d</sup>	1.68
Cafeteria	45	207.4 ± 6.3 <sup>a,b,c</sup>	9.9	4.29 ± 0.17 <sup>a,c</sup>	2.97 ± 0.09 <sup>a,b,c</sup>	1.44
	60	350.4 ± 7.3 <sup>a,b,c,d</sup>	4.6	6.21 ± 0.38 <sup>c,d</sup>	5.48 ± 0.11 <sup>a,b,c,d</sup>	1.13

All data are the mean ± s.e.m. of 5–7 different animals. Statistical analysis of the differences between means: Differences of cafeteria versus chow diet: <sup>a</sup>*P* < 0.05. Differences of obese versus lean: <sup>b</sup>*P* < 0.05. Differences versus day 30: <sup>c</sup>*P* < 0.05. Differences versus day 45: <sup>d</sup>*P* < 0.05.

**Table 3** Nitrogen ingested by lean and obese Zucker rats subjected to standard chow or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth.

diet	age (days)	total nitrogen ingested (g/15 days)	total ingested energy (MJ/15 days)	mean ingested protein as % of ingested energy
<i>Lean</i>				
Chow	30–45	5.28 ± 0.24	2.83 ± 0.13	21.6*
	45–60	6.89 ± 0.19 <sup>c</sup>	3.70 ± 0.10 <sup>c</sup>	21.6*
Cafeteria	30–45	4.99 ± 0.14	3.84 ± 0.11 <sup>a</sup>	15.1
	45–60	5.65 ± 0.11 <sup>a,c</sup>	4.61 ± 0.09 <sup>a,c</sup>	14.2
<i>Obese</i>				
Chow	30–45	8.52 ± 0.34 <sup>b</sup>	4.57 ± 0.18 <sup>b</sup>	21.6*
	45–60	11.79 ± 0.14 <sup>b,c</sup>	6.33 ± 0.08 <sup>b,c</sup>	21.6*
Cafeteria	30–45	7.15 ± 0.31 <sup>a,d</sup>	6.14 ± 0.19 <sup>a,b</sup>	13.5
	45–60	7.81 ± 0.32 <sup>a,b</sup>	6.89 ± 0.24 <sup>a,b,c</sup>	13.2

The data refer to a 15 day interval in each case. All data are the mean ± s.e.m. of 5–7 different animals. Statistical analysis of the differences between means: Differences of cafeteria versus chow diet: <sup>a</sup>*P* < 0.05. Differences of obese versus lean: <sup>b</sup>*P* > 0.05. Differences of days 45–60 versus days 30–45: <sup>c</sup>*P* < 0.05. \*The protein content of the chow diet is fixed.

excretion of nitrogen was greater in all 45–60 day groups than in their younger counterparts. Most of the nitrogen excreted in the urine was in the form of urea in obese rats, accounting for practically all urinary nitrogen. However, lean rats showed much lower values, which only approached the obese values in the eldest cafeteria fed rat group.

The volume of urine produced by all groups of rats studied was very small, especially when compared with other strains of rats, such as Wistar adult rats (unpublished results), and it was not directly related to body size or to urinary

nitrogen excretion. As a consequence, the mean urea concentrations in urine (the ratio between the moles excreted in 15 days and the volume of urine secreted: 0.75/0.82, 0.54/0.55, 1.44/1.39 and 0.74/0.72 M respectively for lean: chow and cafeteria fed and obese: lean and cafeteria fed rats (30–45 days /45–60 days, respectively) showed lower concentrations in cafeteria fed than in standard pellet fed rats, with obese rats showing much higher mean concentrations. Those of chow fed *fa/fa* rats were about twice those of cafeteria fed *Fa/?* rats.

Table 5 presents an overview of the fate of the

Table 4 Nitrogen excreted by lean and obese Zucker rats subjected to chow or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth

diet	age (days)	faecal nitrogen (g/15 days)	faecal N in % ingested N	urinary nitrogen (g/15 days)	urinary urea (mmoles/15 days)	percentage of urinary N as urea	urine volume (ml/15 days)
<i>Lean</i>							
Chow	30-45	1.04 ± 0.05	19.7	2.02 ± 0.06	54.3 ± 2.7	75.1 ± 4.1	76.5 ± 17.4
	45-60	1.30 ± 0.02 <sup>c</sup>	18.9	3.31 ± 0.04 <sup>c</sup>	91.4 ± 5.4 <sup>c</sup>	77.3 ± 5.2	111.0 ± 22.8
Cafeteria	30-45	0.63 ± 0.02 <sup>a</sup>	12.6	1.15 ± 0.03 <sup>a</sup>	31.8 ± 2.7 <sup>a</sup>	77.0 ± 2.1	56.9 ± 6.3
	45-60	0.71 ± 0.02 <sup>a,c</sup>	12.6	1.79 ± 0.02 <sup>a,c</sup>	60.4 ± 4.2 <sup>a,c</sup>	94.4 ± 6.3 <sup>c</sup>	110.0 ± 6.9 <sup>c</sup>
<i>Obese</i>							
Chow	30-45	1.85 ± 0.04 <sup>b</sup>	21.7	3.91 ± 0.06 <sup>b</sup>	140.4 ± 4.8 <sup>b</sup>	100.4 ± 3.8 <sup>b</sup>	104.7 ± 9.2
	45-60	2.78 ± 0.06 <sup>b,c</sup>	23.6	5.83 ± 0.32 <sup>b,c</sup>	210.7 ± 8.7 <sup>b,c</sup>	101.2 ± 7.6 <sup>b</sup>	151.4 ± 4.2 <sup>c</sup>
Cafeteria	30-45	1.20 ± 0.04 <sup>a,b</sup>	16.8	2.08 ± 0.15 <sup>a,b</sup>	75.4 ± 3.5 <sup>a,b</sup>	101.4 ± 3.4 <sup>b</sup>	99.3 ± 8.6 <sup>b</sup>
	45-60	1.35 ± 0.06 <sup>a,b</sup>	17.3	3.00 ± 0.29 <sup>a,b,c</sup>	107.5 ± 6.2 <sup>a,b,c</sup>	100.3 ± 2.7	148.7 ± 17.1 <sup>c</sup>

The data refer to a 15 day interval in each case. All data are the mean ± s.e.m. of 5-7 different animals. Statistical analysis of the differences between means: Differences of cafeteria versus chow diet: <sup>a</sup>*P* < 0.05. Differences of obese versus lean: <sup>b</sup>*P* < 0.05. Differences of days 45-60 versus days 30-45: <sup>c</sup>*P* < 0.05.

nitrogen ingested by the rats. These data have been calculated from the means of Tables 2, 3 and 4. The nitrogen absorbed (i.e. the nitrogen ingested minus that excreted through the faeces) is the actual proportion of the ingested nitrogen that should be taken into account, since the rest passes through the rat gut without being absorbed. This unused ingested nitrogen portion was comparable in both series of lean rats, but was highest in chow-fed *fa/fa* rats.

The difference between the nitrogen absorbed and that excreted in the urine is the apparently retained nitrogen. The figures obtained in our experiment showed values that were practically unchanged with the age of the rats, but higher for cafeteria fed rats than for standard pellet fed rats. Despite *fa/fa* rats showing higher absolute values, the differences between the two strains of rats were remarkably small. However, the actual nitrogen retained in the carcass and measured experimentally (difference between content of rats aged 45 and 30 or 60 and 45 days) gave much lower and more uniform values. The differences between these data and the apparently retained nitrogen give us the nitrogen gap.

The nitrogen gap or unaccounted for nitrogen was a significant proportion of the net ingested nitrogen, ranging from 10-28%; the rats fed a cafeteria diet showed a higher nitrogen gap than chow fed rats. No effect of genotype on this parameter was observed.

The distribution of the absorbed nitrogen between the three fractions: carcass-retained, excreted in the urine or the nitrogen gap is also presented in Table 5. The nitrogen actually retained in the carcass decreased in the 45-60 days period versus the 30-45 for all groups,

except for chow fed *fa/fa* rats. The total amount of body nitrogen gain was, in general, greater in the obese than in the lean rats, although a smaller percentage of the amount of nitrogen absorbed was retained. The nitrogen excreted was highest for the 45-60 day rats in all groups, but overall, the rats fed standard chow showed much higher excretion figures. Obese rats also excreted comparatively more nitrogen.

#### Discussion

There were only minor differences between absolute nitrogen deposition rates for all groups; however, the obese rats showed somewhat higher figures. These differences were even less outstanding when compared with the high differences found in fat (and body weight) accretion rates. In fact, the effect of cafeteria diet on the rate of deposition of nitrogen in the body of rats was minimal. The results are consistent with the existence of different ceilings for fat and protein stores in the body of the rat.<sup>25</sup>

Obesity is a condition in which there is an excess of energy available,<sup>26</sup> and in which there is no immediate need to oxidize protein as energy fuel since there are plenty of other substrates available. Thus, there is always a protein preserving effect that is clearly apparent in rats fed a cafeteria (rich in fat) diet.<sup>27</sup> Since the need for protein is not pressing, the rat tended to choose less protein in its diet,<sup>13</sup> but used it more efficiently. The nitrogen management of cafeteria fed rats is more efficient in general terms than that of the animals fed the standard chow diet.<sup>16</sup> Despite a lower nitrogen intake, the cafeteria fed rats managed to retain an amount of protein

comparable to that retained by the rats receiving the standard chow diet, due to more efficient intestinal uptake, lower nitrogen excretion,<sup>16,27</sup> more efficient retention in the body,<sup>20</sup> and, perhaps, because of the higher purported biological quality of the protein from cafeteria diets.

The Zucker *Fa/?* rat has a different urinary nitrogen excretion pattern from that of other rat strains,<sup>28</sup> since only slightly more than three-quarters of it is in the form of urea. The lowered urea production of cafeteria fed rats did not affect the urea proportion in total urinary nitrogen, but lowered its mean concentration. Obese rats excreted practically all urinary nitrogen in the form of urea, attaining very high concentrations, especially in chow fed rats. This high concentration hints at the possible alteration of their water balance, since, within certain limits,<sup>29</sup> there is a direct relationship between the volume of urine and the amount of urea produced.

The Zucker *fa/fa* rats tended to eliminate a higher proportion of nitrogen in urine than the lean rats,<sup>30</sup> and to retain less nitrogen in their bodies. The accretion of both nitrogen and energy in obese rats is further accelerated by the provision of a very high energy diet, attaining enormous rates of accretion of energy. However, if we calculate the rates of accretion of protein (Table 5) and compare them with those of accretion of body weight (Table 2), we obtain very similar patterns for lean rats; but in obese rats the rates of protein accretion were lower than those of body weight accretion in most cases. The result is a diminishing proportion of nitrogen in the body mass in obese rats, because of their very high fat accretion.

The effects of genetic obesity and an energy-rich diet seem to be at least partly additive in the

Zucker rats for energy deposition (unpublished results), but not so for nitrogen deposition, since the 60 day chow fed *fa/fa* rats contain practically the same amount of nitrogen as the cafeteria fed ones, despite the latter weighing 25% more.

The nitrogen gap initially poses very serious problems of confidence in the methodology used.<sup>31</sup> In the present study, the utmost care was taken to minimize the losses due to scaled down sampling, consistency of measurements and calculations. The sampling procedures were repeated several times and all discordances checked as far as possible. One source of error is the need to use different batches of animals for comparisons and calculations derived from body composition. This is indeed true, but the randomized expected deviation of the calculated mean values could not be used to justify discrepancies as large as 27% of the net ingested nitrogen. In addition, it is not to be expected that the random influence of the variation within each group would result in consistently lower accrued nitrogen values than those expected from the input/output analysis alone. Since this is a generalized phenomenon<sup>16,31</sup> we can assume that this significant portion of ingested nitrogen is diverted into as yet unelucidated pathways. We can speculate that it is probable that its final fate will be as nitrogen gas (N<sub>2</sub>).<sup>32</sup> Previous experiments have shown that mice eliminate about 10% of their ingested nitrogen in the form of N<sub>2</sub>, the production of the gas increasing with higher protein content in the diet.<sup>32</sup> Cafeteria fed rats presented a higher nitrogen gap than the rats fed the chow diet (richer in protein); the lack of correlation of the size of the nitrogen gap with ingested protein seems to suggest that it is actually related to amino acid availability (higher in cafeteria fed rats).

Table 5 Fate of the nitrogen ingested in lean and obese Zucker rats subjected to chow or cafeteria diet from 30 to 60 days after birth

parameter	days:	lean ( <i>Fa/?</i> ) Zucker rats				obese ( <i>fa/fa</i> ) Zucker rats			
		chow diet		cafeteria diet		chow diet		cafeteria diet	
		30-45	45-60	30-45	45-60	30-45	45-60	30-45	45-60
Nitrogen absorbed (g/15 days)		4.24	5.59	4.36	4.94	6.67	9.01	5.95	6.46
Apparently retained N (g/15 days)*		2.22	2.28	3.20	3.14	2.76	2.86	3.87	3.56
Body retained N (g/15 days)		1.81	1.64	2.07	1.79	1.76	2.57	2.29	1.92
Body retained N <sup>†</sup>		42.7	29.3	47.5	36.3	26.4	28.5	38.5	29.7
Urinary excreted N (g/15 days)		2.02	3.31	1.15	1.79	3.91	5.83	2.08	3.00
Urinary excreted N <sup>†</sup>		47.6	59.2	26.4	36.2	58.6	64.7	35.0	46.4
Nitrogen gap (g/15 days)		0.41	0.64	1.13	1.35	1.00	0.61	1.58	1.54
Nitrogen gap <sup>†</sup>		9.7	11.5	26.1	27.6	15.0	6.8	26.5	23.9
Mean N accretion rates (% of BW)		7.1	3.1	8.1	3.2	5.9	4.8	7.6	3.0

\*Nitrogen absorbed minus urinary nitrogen excreted

<sup>†</sup>Values expressed as % of net ingested nitrogen

In conclusion, genetic obesity is somewhat different from diet induced obesity with regard to nitrogen deposition. The *fa/fa* rats are less efficient nitrogen retainers, since they extract less nitrogen from the diet and excrete more, retaining less than *Fa/?* rats. Cafeteria fed rats are more efficient and eliminate less nitrogen, but the size of the nitrogen gap is highest in their groups. Both models of obesity studied show different nitrogen handling patterns, with additive results.

**Acknowledgements**—This study was supported by grants no. PB86-0512 and PB88-0208 from the 'Dirección General de Investigación Científica y Técnica' from the Government of Spain. Thanks are given to Robin Rycroft for his help in the correction of the manuscript.

## References

- 1 Boulangé, A., Planche, E. & de Gasquet, P. (1979): Onset of genetic obesity without hyperphagia during the first week of life in the Zucker rat. *J Lipid Res* 20, 857–864.
- 2 Bray, G.A. & York, D.A. (1979): Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* 59, 719–809.
- 3 Holt, S.J., York, D.A. & Fitzsimons, J.T.R. (1983): The effects of corticosterone, cold exposure and overfeeding with sucrose on brown adipose tissue of obese Zucker rats (*fa/fa*). *Biochem J* 214, 215–223.
- 4 Triandafillou, J. & Himms-Hagen, J. (1983): Brown adipose tissue in genetically obese (*fa/fa*) rats: response to cold and diet. *Am J Physiol* 224: E145–E150.
- 5 Levin, B.E., Triscari, J. & Sullivan, A.C. (1980): Abnormal sympathoadrenal function and plasma catecholamine metabolism in peripheral organs of genetically obese Zucker rats. *Pharmacol Biochem Behav* 13, 107–113.
- 6 Kaul, R., Schmidt, I. & Carlisle, H. (1985): Maturation of thermoregulation in Zucker rats. *Int J Obes* 9, 401–409.
- 7 Kurtz, T.W., Morris, R.C. & Pershadsingh H.A. (1989): The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 13, 896–901.
- 8 Diersen-Schade, D.A., Shershen, D.J. & Cleary, M.P. (1988): Response of adult lean and obese Zucker rats to food restriction and refeeding. *Nutr Res* 8, 1029–1039.
- 9 Rafecas, I., Domènech, T., Esteve, M., Remesar, X., Argilés, J.M. & Alemany, M. (1989): The thermogenic effect of a sucrose gavage on the *fa/fa* rat. *Nutr Res* 9, 1407–1413.
- 10 Harris, R.B.S., Tobin, G. & Hervey, G.R. (1988): Voluntary food intake of lean and obese Zucker rats in relation to dietary energy and nitrogen content. *J Nutr* 118, 503–514.
- 11 Sclafani, A.A. & Springer, D. (1976): Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 17, 461–471.
- 12 Naim, M., Brand, J., Kare M.R. & Carpenter R.G. (1985): Energy intake, weight gain and fat deposition in rats fed flavored, nutritionally controlled diets in a multichoice ('cafeteria') design. *J Nutr* 115, 1447–1458.
- 13 Prats, E., Monfar, M., Castellà, J., Iglesias, R. & Alemany, M. (1989): Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav* 45, 263–272.
- 14 Moore, B. (1987): The cafeteria diet—an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *J Nutr* 117, 227–231.
- 15 Barr, H.G. & McCracken, K.J. (1984): High efficiency of utilization in 'cafeteria' and force-fed rats kept at 29°C. *Br J Nutr* 51, 279–387.
- 16 Barber, T., Viña, J.R., Viña, J. & Cabo, J. (1985): Decreased urea synthesis in cafeteria-diet induced obesity in the rat. *Biochem J* 230, 675–681.
- 17 Henry, C.J.K., Rivers, J.P.W. & Payne, P.P. (1986): Does the pattern of tissue mobilization dictate protein requirements. *Human Nutr Clin Nutr* 4, 87–92.
- 18 Rothwell, N.J. & Stock, M.J. (1982): Brown adipose tissue and diet-induced thermogenesis. In *Brown adipose tissue* eds, Trayhurn, P., Nicholls, D. pp. 269–298. London: Edward Arnold.
- 19 Castellà, J. & Alemany, M. (1986): Thermogenic effects of a 'cafeteria' diet on the rat during its reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol [A]* 85, 203–206.
- 20 Rothwell, N.J. & Stock, M.J. (1982): Energy expenditure of 'cafeteria-diet' rats determined from measurements of energy balance and indirect calorimetry. *J Physiol* 328, 371–377.
- 21 Fawcett, J.K. & Scott, J.E. (1960): A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol* 12, 156–163.
- 22 Fraga, F. (1956): Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de la antrona. *Invest Pesquera* 3, 69–74.
- 23 Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H.S. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509.
- 24 Brouwer, E. (1965): Report of sub-committee on constants and factors. In: *Energy Metabolism*, ed Blaxter, K.L., pp. 441–443. London: Academic Press.
- 25 Radcliffe, J.D. & Webster, A.J.F. (1978): Sex, body composition and regulation of food intake during growth in the Zucker rat. *Br J Nutr* 39, 483–492.
- 26 Bray, G.A. & York D.A. (1972): Studies on food intake of genetically obese rats. *Am J Physiol* 223, 176–179.
- 27 Henry, C.J.K., Rivers, J.P.W. & Payne, P.R. (1987): Reduced obligatory nitrogen loss in rats made obese by cafeteria feeding. *Nutr Res* 7, 1243–1252.
- 28 Fiske, W.D., Blouin, R.D., Mitchell, B. & McNamara, P.J. (1986): Renal function in the obese Zucker rat. *Int J Obes* 10, 175–183.

- 29 Hayashe, K., Yokogoshi, H. & Yoshida, A. (1980): Effects of dietary proteins and amino acid deficiencies on urinary excretion of nitrogen and the urea synthesizing system in rats. *J Nutr* **110**, 1327-1337.
- 30 Pullar, J.D. & Webster, A.J.F. (1977): The energy cost of fat and protein deposition in the rat. *Br J Nutr* **37**, 355-363.
- 31 Lin, C.P. & Huang, P.C. (1982): Actual nitrogen deposition in mature adult rats fed moderate to high protein diets. *J Nutr* **112**, 1067-1074.
- 32 Costa, G., Ullrich, L., Kantor, F. & Holland, J.F. (1968): Production of elemental nitrogen by certain mammals including man. *Nature* **218**, 546-551.