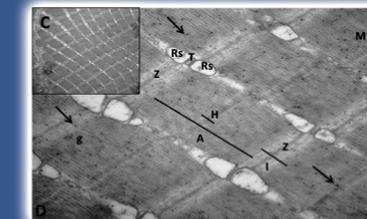
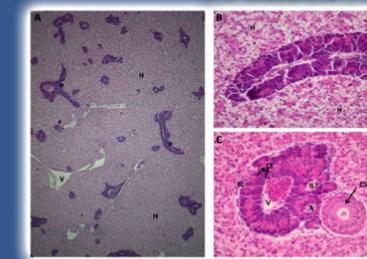
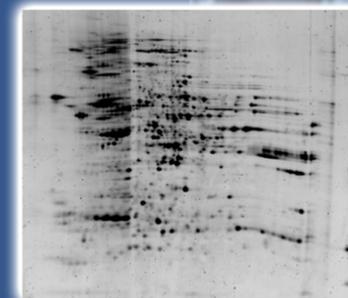
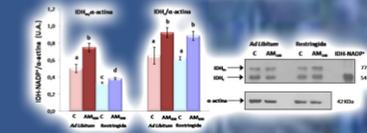
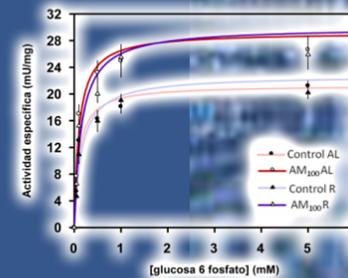
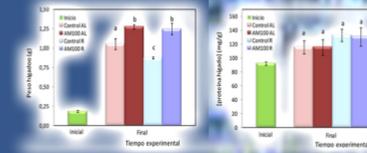
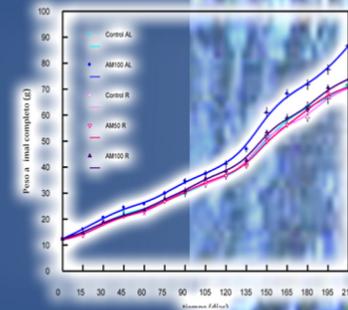


Tesis  
Doctoral

Evaluación nutricional y bioquímica del ácido maslínico,  
triterpeno natural, sobre el crecimiento de la dorada  
(*Sparus aurata*). Caracterización cinética y proteómica

El ácido maslínico (AM), 2- $\alpha$ , 3- $\beta$ -dihidroxiolean-12-en-28-oico, es un compuesto triterpénico de cinco anillos presente en la capa cerosa del fruto y hoja del olivo. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la inclusión de AM en la dieta de la dorada (*Sparus aurata*) y el uso de dos raciones diferentes, *ad libitum* (AL) y restricción del alimento al 1,5% del peso (R) sobre el crecimiento, recambio proteico, concentración de ácidos nucleicos y metabolitos, enzimas implicadas en el crecimiento y regulación del metabolismo de aminoácidos en hígado y músculo blanco de la dorada. Se ha caracterizado el proteoma completo del hígado y se ha estudiado la ultraestructura del hígado y músculo blanco en situaciones AL. Cinco grupos de doradas de 12 g de peso inicial se mantuvieron en condiciones de piscifactoría y se alimentaron durante 210 días con dietas que contenían 0, 50 y 100 mg de AM por kg de dieta (control, AM<sub>50</sub> y AM<sub>100</sub>, respectivamente). Los grupos experimentales fueron los siguientes: Control AL, AM<sub>100</sub> AL, Control R, AM<sub>50</sub> R y AM<sub>100</sub> R. Los resultados encontrados, acabado el periodo experimental, fueron una mayor tasa de crecimiento en el tamaño y peso corporal de las doradas alimentadas con AM<sub>100</sub>, tanto AL, como R. En general, los grupos R mostraron mejores índices de conversión que los AL. En el hígado y músculo blanco, las velocidades fraccionarias y absolutas de síntesis ( $K_s$  y  $A_s$ ) y degradación ( $K_D$  y  $A_D$ ) fueron mayores para los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R. En el hígado, la capacidad de síntesis ( $C_s$ ),  $K_{DNA}$  y  $K_{RNA}$ , fueron mayores significativamente en estos mismos grupos; las diferencias encontradas en músculo se presentaron en la  $C_s$ , encontrándose un aumento en los grupos AM. La eficacia de la síntesis (ERP), disminuyó en el hígado de los grupos AM y sólo en el músculo del grupo AM<sub>100</sub> AL. La naturaleza del crecimiento en ambos tejidos de los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R se produjo por cambios en la concentración de DNA total, por lo que predominaban los fenómenos de hiperplasia celular. En relación con la concentración de los diferentes metabolitos: G6P, F6P, 6PG, malato, lactato y glucógeno, existieron diferencias de acuerdo con los tejidos y situaciones nutricionales empleadas. De forma general, tanto en el hígado, como en el músculo blanco también se observa un incremento en los valores de actividad y velocidad máxima de enzimas marcadores del crecimiento y degradación de aminoácidos: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzima málico, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup>, serina deshidratasa y tirosina aminotransferasa. Estos resultados coincidieron con los encontrados en los niveles de expresión de estos enzimas mediante análisis de "Western blot". El proteoma del hígado de la dorada mostró diferencias entre las situaciones ensayadas, existiendo un mayor número de proteínas diferentes en el grupo AM<sub>100</sub> R. El análisis de la ultraestructura del hígado y músculo blanco por microscopía óptica y electrónica confirma los resultados anteriores, mostrando en las doradas alimentadas con AM<sub>100</sub> unos hepatocitos metabólicamente mucho más activos que los controles. Estos resultados demuestran que el ácido maslínico utilizado como aditivo en la dieta de la dorada en condiciones de piscifactoría puede comportarse como un factor de crecimiento capaz de estimular la síntesis y degradación de proteínas y el crecimiento celular en la dorada.

Trabajo subvencionado por la Junta de Andalucía (Grupo de Investigación BIO-157), OTRI (Universidad de Granada), Universidad de Jaén, Biomaslinc S.L y Azucarera del Guadalfeo División Acuicultura Marina S.L.



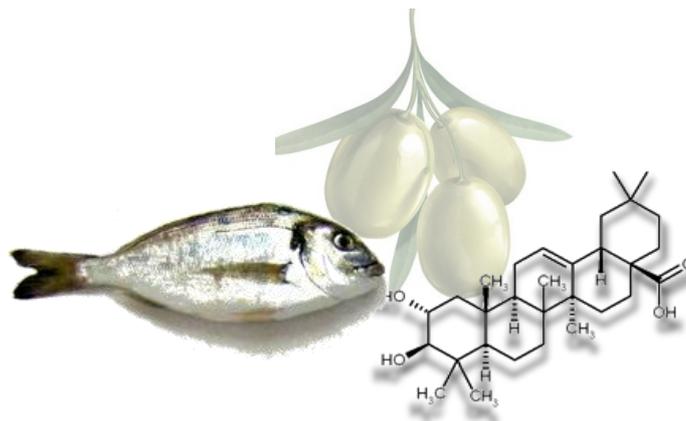
TESIS DOCTORAL

Evaluación nutricional y bioquímica del ácido maslínico, triterpeno natural, sobre el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*). Caracterización cinética y proteómica



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Evaluación nutricional y bioquímica del ácido maslínico, triterpeno natural, sobre el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*).  
Caracterización cinética y proteómica**



**Eva Encarnación Rufino Palomares**

TESIS DOCTORAL

2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Eva Encarnación Rufino Palomares  
D.L.: GR. 3056-2009  
ISBN: 978-84-692-5181-2





Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular I  
Departamento Biología Animal



Departamento de Biología  
Experimental. Área de  
Bioquímica y Biología Molecular

## **Evaluación nutricional y bioquímica del ácido maslínico, triterpeno natural, sobre el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*). Caracterización cinética y proteómica**

Memoria para optar al grado de Doctora, presentada  
por la Licenciada en Biología

**Eva Encarnación Rufino Palomares**

DIRECTORES DEL TRABAJO

**Dr. José Antonio Lupiáñez Cara**

**Dr. Manuel de la Higuera González**

**Dr. Juan Peragón Sánchez**

Catedrático de Bioquímica  
y Biología Molecular  
Universidad de Granada

Catedrático de Fisiología Animal  
Universidad de Granada

Profesor Titular de Bioquímica  
y Biología Molecular  
Universidad de Jaén

**JULIO 2009**



La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de investigación en colaboración con empresas, concedida por la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la Universidad de Granada con cargo al convenio entre la Universidad de Granada y las empresas Maninvest (Biomaslinic) S.L. y Azucarera del Guadalfeo, División Acuicultura Marina, S.A.

La investigación desarrollada ha sido financiada por el Plan Andaluz de Investigación (PAI) dentro de la subvención concedida al grupo de Investigación BIO-157, "Drogas, tóxicos ambientales y metabolismo celular" durante los años 2005 al 2009.

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido recogidos en las siguientes Comunicaciones a Congresos:

"Efecto del ácido maslínico, adicionado a la dieta, sobre el crecimiento y el recambio proteico del hígado de la dorada *Sparus aurata*". **Eva E. Rufino-Palomares**; Fernando J. Reyes-Zurita; E. Leticia García-Salguero; Juan Peragón; Manuel de La Higuera; José A. Lupiáñez. XXXII Congreso Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), Bilbao, 192-192, 2008.

"Effect of maslinic acid, added to the diet, on the growth and protein-turnover rate in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) liver". **Eva E. Rufino-Palomares**; Fernando J. Reyes-Zurita; E. Leticia García-Salguero; Juan Peragón; Manuel de La Higuera; José A. Lupiáñez. CIAS-2008, II Congreso Internacional sobre aceite de oliva y salud. II International Conference on Olive Oil and Health, Jaén-Córdoba, 49-49, 2008.



*A mis padres, Antonio y Eva  
por su amor e inestimable apoyo*



---

## AGRADECIMIENTOS

---

*Toda aventura, finalmente, tiene su recompensa, y para mí, el haberla podido vivir, simplemente, ya es parte del éxito.*

*Este trabajo no se habría podido realizar sin la generosa colaboración de muchas personas a quienes me gustaría expresar mi agradecimiento. Realmente, este trabajo es fruto de la colaboración de muchos, así que enhorabuena a todos, lo hemos conseguido.*

*En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis, al Dr. José Antonio Lupiáñez, Dr. Manuel de la Higuera y Dr. Juan Peragón el que me brindaran la oportunidad de trabajar con ellos y de conocer a tres personas "auténticas". A José Antonio, mil gracias, y mil gracias más, por su excelente dirección, asesoramiento, disponibilidad, confianza, cariño, consejos, paciencia, calidad como persona y apoyo brindado en todo momento. A Manolo, por su apoyo y ayuda, paciencia, cariño, disponibilidad, sus palabras tan acertadas y sinceras siempre, gracias por todo. A Juan, muchas gracias, por su paciencia, disponibilidad, apoyo, por estar siempre dispuesto a tender una mano y por su experiencia. Sinceramente, a los tres, muchas gracias!!! Me considero afortunada por haber podido contar con vosotros tres, si me dieran a elegir, repetiría. Por todo, GRACIAS.*

*Gracias a la empresa Azucarera del Guadalfeo, por aceptar colaborar con la Universidad de Granada y embarcarse en este proyecto. Sin su colaboración hubiese sido imposible. En especial me gustaría destacar a José Juan Nogales y Pepe Martínez, directores técnicos y de producción de la empresa, quienes me ayudaron tanto en los comienzos y quienes me facilitaron el camino en multitud de ocasiones. Gracias también a todo el personal de la piscifactoría y la fábrica, por aceptarme como uno más y por ayudarme en todo, gracias a Fran, Gustavo, Alejandro, Amanda, Fernando, Emilio, Antonio, Antoñazo, Ramón, Pirulo, Clavo, a Pepe Bonel, etc. por millones de momentos que no voy a olvidar nunca. A Pepa Cubero gracias, porque tú y tu ayuda han sido esenciales.*

*A la Empresa Biomaslínic por posibilitarme que esta aventura empezara, continuara y acabara. Gracias a Pepe Prados y Dr. Andrés García Granados por su implicación, amabilidad, interés y ayuda prestada.*

*Gracias también a la OTRI, por ofrecerme la beca predoctoral con la he podido trabajar a lo largo de estos 4 años.*

*Gracias a la gente del Departamento de Biología Animal, por acogerme como una más y tenderme la mano en todo momento. Gracias por posibilitarme realizar muchos de los ensayos en sus laboratorios y poner a mi disposición tantas cosas que me han hecho en falta en un momento dado. Gracias a Amalia E. Morales, Nani, por su cariño, consejos, amabilidad e interés en mi trabajo; a Mari Carmen Hidalgo por su cariño y serenidad; a Ana Sanz por su apoyo e interés; A Félix Hidalgo, Manuel García Gallego, Laura García Rejón, Gabriel Cardenete y Eugenio, muchas gracias. Encantada de haberos conocido a todos/as.*

*No pretendo olvidarme para nada de toda los becarios de este departamento que me han ayudado tanto. Amalia es un honor, para mí eres un ejemplo a seguir. Enhorabuena por ser quien eres, sigue así. Imposible olvidar lo que me ayudaste y enseñaste en mis comienzos, y esta última época de Western ha sido inolvidable, jejeje, me encantó trabajar contigo. Miriam muchas gracias por tu cariño, por tener tanta paciencia conmigo cuando no sabía dónde estaba nada y por brindarme siempre una sonrisa. Gracias también a Cristina, por su ternura y amabilidad, a Sergio por su cariño y apoyo, y también a Elena y Manolo.*

*He tenido la posibilidad también de trabajar en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I y conocer a todos y todas las personas que lo integran. Para mí, es un placer y estoy muy agradecida de que me hayáis abierto las “puertas de vuestra casa”. Gracias a Leticia García, por su ternura, amabilidad, interés y palabras de ánimo, que a veces hacen tanta falta. A M<sup>a</sup> Paz, por su amabilidad y por prestarme su calculadora, que por supuesto voy a devolverle!!! A Borí, Carmen Marco, Pepe Iglesias, Ana Linares, Marichu y Víctor, muchas gracias por todo. No puedo olvidarme de María, quien tanto cariño me ha dado, gracias por todo. Y mi Patricia, a quien admiro en todos los sentidos, eres una “crack”!!, muchas gracias por todo.*

*Gracias a mi compañero de “fatigas” Fernando por su valía profesional, su implicación en mi trabajo, su amistad, y por su apoyo cuando el estrés me invadía. Fernando muchas gracias por todo, nunca olvidaré todo lo que me has ayudado. A ver si nos dan el proyecto, no?*

*José Manuel mil gracias por estar siempre dispuesto a echar una mano, no sabes lo que se agradece. Gracias también a Sonia, Xiomara, Pablo y Carolina.*

*A Ramón Carmona por su colaboración en la parte de microscopía de este trabajo. Gracias. Y, como no, a Susana, que además de ser mi amiga, es toda una profesional haciendo “inclusiones y fotos”. Muchas gracias guapa!!*

*Aprovecho también para darle las gracias a Juanjo, a quien apreció mucho, y a quien nunca estaré totalmente agradecida por su ayuda en la presentación de mi DEA. A mi “primico” Fran por ser una persona excelente y por compartir tan buenos y malos momentos, ya te queda poquito a ti también, ánimo!!!*

*Me gustaría dar las gracias también a la gente Departamento de Bioquímica de la universidad de Jaén, a quienes he tenido la posibilidad de conocer y con quienes me ha encantado trabajar y “comer”. Gracias a todos, hacéis un equipo formidable.*

*Gracias a Andrés Moñino, del departamento de Biología Animal de Valencia, por su paciencia, correos y colaboración en la elaboración de las dietas de trabajo. También, a los servicios técnicos de Granada, quien tan amablemente siempre nos han atendido. Y, a los servicios técnicos de Córdoba, por su excelente trabajo e implicación con los ensayos de proteómica.*

*Mi familia para mí es el pilar básico de mi vida, ya que sin ellos, este trabajo tampoco hubiese podido realizarse. Mis padres lo son todo para mí y estoy orgullosísima de ser su hija y de poder aprender de ellos, porque ellos me han enseñado todo lo que sé y lo que soy. Os quiero con locura!!! Gracias por convertirme en la persona que soy hoy día, os lo debo a vosotros. Gracias a mis tíos Joaquín y Paquí por ser mis segundos padres, por brindarme todo su amor y cariño; os llevo siempre en mi corazón. Y, cómo no, a mis hermanos, Antonio y Lucía a quienes quiero un montón, y con quienes cada vez me siento más unida, salvo pequeñas excepciones, que ya sabemos que las hay, o no? jejeje*

*Primísssss, Vane y Elena, os adoro, sois parte de mí, me encanta la relación que tenemos, porque es sana ante todo. Sois geniales. Gracias por vuestro apoyo incondicional año tras año a lo largo de mi vida, no sé qué haría sin vosotras. Os quiero un montón. Gracias por estar siempre ahí, toque lo que toque.*

*Ahora le toca el turno a mis bióloguillas “ácidas” (qué recuerdos...), a Ángela, Lourdes y Tere, con quien he compartido tantos buenos momentos (y los que quedan...), con quien guardó una amistad muy especial y a quienes no olvidaré jamás. Amigas, os quierooooo, sois las mejores!!!. Gracias por ser mis amigas y estar siempre ahí.*

*Un agradecimiento muy especial a, a los amigos/as de siempre, como Santi, Isa, Dani, Alberto, Javi, Elisa, Rubén y Miriam, y a los que no son de siempre, pero no por ello menos importantes, Guzmán, Germán y M<sup>a</sup> Ángeles. A todos vosotros, muchas gracias por todo lo vivido juntos.*

*Un beso gigante para mi recién “sobrina-ahijada” Daniela, con quien estoy deseando compartir buenos (y no tan buenos) momentos.*

*Espero no haberme olvidado de nadie, y si me olvido de alguien que me perdone, lo siento, no era mi intención, ya que realmente estoy agradecida de todas aquellas personas que han formado parte de este trabajo tanto profesionalmente, como aquellas que han influido personalmente en mi vida.*

*A todos, MIL GRACIAS de corazón.*



---



---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---



---

μCi: microcurie	G <sub>R</sub> : velocidad de crecimiento corporal
αKG: α-cetoglutarato	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : peróxido de hidrógeno
β-PEA: β-feniletilamina	HIV: virus d la inmunodeficiencia humana
2-DE: electroforesis bidimensional	HSP60: chaperonina
6PG: 6-fosfogluconato	IAA: iodoacetamida
6PG: 6-fosfogluconato	IDH-NADP <sup>+</sup> : isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup>
6PGDH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa	IEF: isoelectroenfoque
Ácido maslínico: AM	Ig: inmunoglobulina
A <sub>D</sub> : velocidad absoluta de degradación de proteínas	IL: interleuquina
AE: actividad específica	IN: índice de nutrición
A <sub>G</sub> : velocidad absoluta de acumulación de proteínas	J: julio
AL: <i>ad libitum</i> o saciedad	kcal: kilocaloría
Ala:alanina	K <sub>D</sub> : velocidad fraccionaria de degradación proteica
Ala-AT: alanina aminotransferasa	kDa: kilodalton
AOAC: "Association of Official Analytical Chemists"	K <sub>DNA</sub> : velocidad de síntesis proteica por unidad de DNA
APS: persulfato de amonio	K <sub>G</sub> : velocidad fraccionaria de acumulación de proteínas
A <sub>S</sub> : velocidad absoluta de síntesis de proteínas	KJ: kilojulio
Asp-AT: aspartato aminotransferasa	K <sub>m</sub> : constante de Michaelis
BSA: albúmina sérica bovina	K <sub>RNA</sub> : eficacia de síntesis proteica
CAT: ciclo de los ácidos tricarbóxicos	K <sub>S</sub> : velocidad fraccionaria de síntesis proteica
CCT: coeficiente de crecimiento térmico	L: litro
CEC: coeficiente de eficacia del crecimiento	LDH: láctico deshidrogenasa
CPP: ciclo de las pentosas fosfato	Leu: leucina
C <sub>S</sub> : capacidad de síntesis proteica	LPS: lipopolisacárido
D.O.: densidad óptica	m/z: relación masa/carga
DAS: incremento calórico aparente	m <sup>3</sup> : metros cúbicos
DNA: ácido desoxirribonucleico	mA: miliamperios
dpm: desintegraciones por minuto	MALDI-TOF: Matrix Assited Laser Desorption Ionization-Time OF Flight
DTE: 1,4 ditioeritritol.	MBQ: megabecquerel
DTT: ditioneitol	MDH: malato deshidrogenasa
EA: eficacia alimentaria	MELN: materia libre de nitrógeno
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético	mg: miligramo
EF-2: factor de traducción eucariótico	mm: milímetro
EM: enzima málico	MS: espectrometria de masas
ERP: eficacia de retención de proteínas	MS/MS: espectrometria de masas en tandem
F6P: fructosa 6-fosfato	mU: miliunidad
FE: eficacia de conversión del alimento	NAD <sup>+</sup> : nicotinamín adenín dinucleótido
g: gramo	NADH: nicotinamín adenín dinucleótido reducido
G6P: glucosa 6-fosfato	
G6P: glucosa 6-fosfato	
G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	

NADP<sup>+</sup>: nicotinamín adenín dinucleótido  
fosfato  
NADPH: nicotinamín adenín dinucleótido  
fosfato reducido  
nm: nanómetro  
nmol: nanomol  
NO: óxido nítrico  
OAA: oxalacetato  
PEP: fosfoenolpiruvato  
PER: eficacia de conversión de proteínas  
PGI: fosfoglucoisomerasa  
PGM: fosfoglucomutasa  
pHBA: P-hidroxibenzaldehído  
Phe: fenilalanina  
pHPP: p-hidroxifenil piruvato  
pl: punto isoeléctrico  
PLP: piridoxal fosfato  
Pm: peso molecular  
PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo  
PVDF: difluoruro de polivinilideno  
R: restricción de la ración al 1,5% del peso  
RC: restricción calórica  
RHS: relación hepatosomática  
RMS: relación miosomática  
RNA: ácido ribonucleico  
ROS: especies reactivas del oxígeno

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de  
poliacrilamida con dodecil sulfato sódico  
SEM: error estándar de la media  
Ser: serina  
Ser-DH: serina deshidratasa  
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia  
adquirida  
ss: sustancia o materia seca  
T.E.M.: microscopio electrónico de  
transmisión  
T.H.: tampón de homogenización  
T.P.S.: tampón fosfato salino  
T.R.: tampón de reacción  
TCI: tasa de crecimiento instantáneo  
TEMED: tetrametiletilenodiamida  
TNF: factor de necrosis tumoral  
Tyr: tirosina  
Tyr-AT: tirosina aminotransferasa  
Tyr-DC: tirosina descarboxilasa  
U.A.: unidades arbitrarias  
V: voltio  
VPL: valor productivo de los lípidos  
VPP: valor productivo de la proteína  
W: watio  
 $\Delta$ Peso: incremento de peso

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

### 1. Introducción

<b>Figura 1.1.</b> Esquema de la FAO, 2007 en donde se muestra la morfología típica de la dorada y el resto de caracteres significativos de esta especie, su hábitat y biología, así como, el cultivo de la misma.....	26
<b>Figura 1.2.</b> Rutas implicadas en el metabolismo de aminoácidos .....	31
<b>Figura 1.3.</b> Catabolismo de aminoácidos .....	32
<b>Figura 1.4.</b> Esquema general de las reacciones de transdesaminación (transaminación y desaminación oxidativa) del metabolismo de los aminoácidos .....	32
<b>Figura 1.5.</b> Esquema general de la síntesis (flechas azules) y degradación (flechas verdes) del glucógeno .....	39
<b>Figura 1.6.</b> Modelo de crecimiento compensatorio (modificado, Mingarro et al., 2003).....	40
<b>Figura 1.7.</b> Modelo de estructura muscular del miotomo de un teleosteo .....	49
<b>Figura 1.8.</b> Estructura 3D de la molécula de nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido, NADPH <sup>+</sup> .....	59
<b>Figura 1.9.</b> Papel de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup> (IDH-NADP <sup>+</sup> ), diferenciando las actividades de la subunidad mitocondrial y la citoplasmática .....	61
<b>Figura 1.10.</b> Papel glucogénico del aminoácido alanina, en la mitocondria y citosol, por acción del enzima Ala-AT.....	63
<b>Figura 1.11.</b> Detalle de la hoja y fruto del árbol Olea europea, “el olivo” .....	65
<b>Figura 1.12.</b> Esquema del proceso de producción de aceite de oliva a partir de la aceituna .....	67
<b>Figura 1.13.</b> Estructura del ácido maslínico y otros triterpenos pentacíclicos estudiados .....	70
<b>Figura 1.14.</b> Descripción breve de las bioactividades del ácido maslínico.....	71
<b>Figura 1.15.</b> Esquema simplificado del mecanismo molecular intrínseco, por el que el ácido maslínico induce apoptosis en células HT29 (Reyes-Zurita et al., 2009) .....	73
<b>Figura 1.16.</b> Visión general de un enfoque clásico en un estudio proteómico en peces .....	82
<b>Figura 1.17.</b> Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas .....	84

### 2. Material y Métodos

<b>Figura 2.1.</b> Composición específica de la dieta empleada en el ensayo experimental de dorada alimentada con ácido maslínico.....	93
<b>Figura 2.2.</b> Situación geográfica de la piscifactoría donde se llevó a cabo el ensayo experimental .....	95
<b>Figura 2.3.</b> Detalle de las instalaciones y cubas experimentales en los que se llevó a cabo el ensayo .....	96
<b>Figura 2.4.</b> Detalle del destilador Selecta que se utilizó para determinar la concentración de proteína corporal (panel A) y extractor de grasas modelo Buchi 810 (panel B).....	101

<b>Figura 2.5.</b> Esquema general del procesamiento de las fracciones S <sub>A</sub> y S <sub>B</sub> ; protocolo de actuación para la incubación con Tyr-descarboxilasa, y posterior medida de radiactividad .....	104
<b>Figura 2.6.</b> Esquema general de la técnica empleada para la medida de β-feniletilamina .....	106
<b>Figura 2.7.</b> Esquema de las reacciones metabólicas implicadas en la determinación de los metabolitos, glucosa 6-fosfato, 6-fosfogluconato y fructosa 6-fosfato .....	111
<b>Figura 2.8.</b> Esquema de la reacción en la que se basa la medida de L-malato .....	113
<b>Figura 2.9.</b> Conversión del lactato a piruvato por acción de la enzima LDH .....	114
<b>Figura 2.10.</b> Esquema de las reacciones metabólicas en las que se basa la medida de NADP <sup>+</sup> .....	115
<b>Figura 2.11.</b> Reacciones en las que intervienen las enzimas GAPDH a la izquierda; y GDH a la derecha .....	116
<b>Figura 2.12.</b> Esquema de actuación de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) .....	117
<b>Figura 2.13.</b> Esquema de actuación de la actividad desramificante y fosforilasa del enzima amilo-glucosidasa en la degradación del glucógeno .....	118
<b>Figura 2.14.</b> Esquema de la fase oxidativa de ciclo de las pentosas fosfato en donde se reflejan las actividades de las enzimas G6PDH y 6PGDH .....	125
<b>Figura 2.15.</b> Transformación de malato en piruvato por la acción del enzima málico (EM) .....	126
<b>Figura 2.16.</b> Obtención de α-cetoglutarato a partir de isocitrato mediante la acción de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup> (IDH-NADP <sup>+</sup> ) .....	127
<b>Figura 2.17.</b> Reacción acoplada de la serina deshidratasa (Ser-DH) y la lactato deshidrogenasa (LDH) .....	128
<b>Figura 2.18.</b> Reacción catalizada por la alanina aminotransferasa (Ala-AT) .....	129
<b>Figura 2.19.</b> Fundamento de la determinación de la actividad Tyr-AT .....	130
<b>Figura 2.20.</b> Protocolo de actuación para la determinación de la actividad tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) .....	130
<b>Figura 2.21.</b> Procedimiento completo de la técnica “Western blot” .....	131
<b>Figura 2.22.</b> Esquema del protocolo de “western blotting” realizado en este trabajo .....	138
<b>Figura 2.23.</b> Esquema del procedimiento experimental seguido en el estudio de proteómica realizado basado en 2-DE y HPLC-MS .....	141

### 3. Resultados

<b>Figura 3.1.</b> Diferencias en el tamaño de las doradas alimentadas con las dietas Control AL, AM <sub>100</sub> AL, Control R y AM <sub>100</sub> R. a los 150 días del ensayo experimental .....	164
<b>Figura 3.2.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el peso medio del animal completo (g) a lo largo de los 210 días que duró el ensayo experimental .....	164
<b>Figura 3.3.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el peso del animal completo, hígado y músculo blanco (g) transcurridos los 210 días que duró el ensayo .....	165
<b>Figura 3.4.</b> Efecto de la adición de ácido maslínico a la dieta de dorada sobre el peso del hígado (g) y la concentración de proteínas del hígado (mg proteína/g tejido) .....	169
<b>Figura 3.5.</b> Influencia del ácido maslínico sobre la concentración de proteínas total (mg) y RNA total (mg) en el hígado de la dorada .....	170

<b>Figura 3.6.</b> Efecto del ácido maslínico adicionado a la dieta de juveniles de dorada sobre la concentración de DNA total (mg) y la relación Proteína/DNA en el hígado .....	171
<b>Figura 3.7.</b> Efecto de la adición de ácido maslínico sobre la relación RNA/DNA en el hígado de la dorada.....	172
<b>Figura 3.8.</b> Velocidades relativas de síntesis ( $K_s$ ), degradación ( $K_D$ ), y acumulación ( $K_G$ ) y absolutas de síntesis ( $A_s$ ), degradación ( $A_D$ ), y acumulación ( $A_G$ ) de proteínas en el hígado de dorada tras la administración de ácido maslínico a la dieta .....	174
<b>Figura 3.9.</b> Efecto de la adición de ácido maslínico a la dieta de dorada sobre el peso del músculo blanco (g) y la concentración de proteínas del músculo (mg proteína/g tejido) .....	176
<b>Figura 3.10.</b> Influencia del ácido maslínico adicionado a la dieta de dorada sobre la concentración de proteínas total (mg) y RNA total (mg) en el músculo blanco .....	176
<b>Figura 3.11.</b> Efecto del ácido maslínico adicionado a la dieta de juveniles de dorada sobre la concentración de DNA total (mg) y la relación proteína/DNA en el hígado de estos animales .....	177
<b>Figura 3.12.</b> Efecto del ácido maslínico sobre la relación RNA/DNA en el músculo blanco de dorada .....	178
<b>Figura 3.13.</b> Velocidades relativas de síntesis ( $K_s$ ), degradación ( $K_D$ ), y acumulación ( $K_G$ ) y velocidades absolutas de síntesis ( $A_s$ ), degradación ( $A_D$ ), y acumulación ( $A_G$ ) de proteínas en el músculo blanco de la dorada tras la administración de ácido maslínico a la dieta.....	180
<b>Figura 3.14.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en hígado de dorada .....	186
<b>Figura 3.15.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima 6fosfogluconato deshidrogenasa en hígado de dorada .....	187
<b>Figura 3.16.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima málico en hígado de dorada .....	189
<b>Figura 3.17.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima IDH-NADP <sup>+</sup> en el hígado de dorada .....	190
<b>Figura 3.18.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima serina deshidratasa (Ser-DH) en hígado de dorada.....	191
<b>Figura 3.19.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima alanina aminotransferasa en hígado de dorada .....	193
<b>Figura 3.20.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) en hígado de dorada.....	194
<b>Figura 3.21.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en músculo blanco de dorada .....	196
<b>Figura 3.22.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en músculo blanco de dorada .....	197
<b>Figura 3.23.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima málico (EM) en músculo blanco de dorada.....	198
<b>Figura 3.24.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima IDH-NADP <sup>+</sup> en músculo blanco de dorada.....	200

<b>Figura 3.25.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima Ser-DH en músculo blanco de dorada.....	201
<b>Figura 3.26.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima Ala-AT en músculo blanco de dorada.....	202
<b>Figura 3.27.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima málico (EM) en músculo blanco de dorada .....	203
<b>Figura 3.28.</b> Detalle de un gel al 15% de acrilamida teñido con azul .....	206
<b>Figura 3.29.</b> Tinción con rojo Ponceau de las membranas de hígado y músculo blanco de doradas, correspondientes a las diferentes condiciones experimentales ensayadas, con las que se incubó el anticuerpo anti-G6PDH.....	207
<b>Figura 3.30.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de G6PDH en extractos citosólicos de hígado de dorada alimentada con ácido maslínico.....	208
<b>Figura 3.31.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de EM en extractos citosólicos de hígado de dorada alimentada con ácido maslínico.....	209
<b>Figura 3.32.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de IDH-NADP <sup>+</sup> en extractos citosólicos de hígado de dorada alimentada con ácido maslínico.....	210
<b>Figura 3.33.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de Ser-DH en tejido hepático de dorada alimentada con ácido maslínico .....	211
<b>Figura 3.34.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de Ala-AT en tejido hepático de dorada alimentada con ácido maslínico .....	212
<b>Figura 3.35.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de G6PDH en tejido muscular de dorada alimentada con ácido maslínico .....	213
<b>Figura 3.36.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de ICD-NADP <sup>+</sup> en extractos citosólicos de músculo de dorada alimentada con AM .....	214
<b>Figura 3.37.</b> Análisis por “Western blot” del contenido de Ser-DH en tejido muscular de dorada alimentada con ácido maslínico .....	215
<b>Figura 3.38.</b> Gel “máster” representativo del proteoma del hígado de la dorada obtenido por electroforesis bidimensional (2-DE).....	217
<b>Figura 3.39.</b> Gel obtenido por electroforesis bidimensional (2-DE) de hígado de la dorada correspondiente a la situación nutricional AM <sub>100</sub> AL.....	220
<b>Figura 3.40.</b> Gel 2-DE de hígado de dorada correspondiente a la situación nutricional AM <sub>100</sub> R.....	221
<b>Figura 3.41.</b> Conjunto de spots que presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre los grupos experimentales alimentados ad libitum .....	222
<b>Figura 3.42.</b> Conjunto de spots que presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre los grupos experimentales alimentados con dieta restringida .....	224
<b>Figura 3.43.</b> Histograma representativo de la cantidad de spot existente en condiciones ad libitum.....	225
<b>Figura 3.44.</b> Histograma representativo de la cantidad de spot existente en condiciones de alimentación restringida al 1,5% de la biomasa total de la cuba .....	226
<b>Figura 3.45.</b> Estructura del hígado a microscopía óptica en los grupos control AL y AM <sub>100</sub> AL .....	232
<b>Figura 3.46.</b> Estructura del hígado a microscopía óptica en los grupos control R y AM <sub>100</sub> R .....	232
<b>Figura 3.47.</b> Estructura a microscopio óptico del hepatopáncreas .....	234

<b>Figura 3.48.</b> Músculo estriado esquelético a microscopía óptica en sección transversal.....	235
<b>Figura 3.49.</b> Ultraestructura a microscopía electrónica de transmisión (MET) del hígado de la dorada alimentada con dieta control AL .....	236
<b>Figura 3.50.</b> Ultraestructura a microscopía electrónica de transmisión (MET) del hígado de la dorada alimentada con dieta AM <sub>100</sub> AL.....	238
<b>Figura 3.51.</b> Ultraestructura a microscopía electrónica de transmisión (MET) del músculo de la dorada alimentada con dieta control AL y AM <sub>100</sub> AL .....	239

#### **4. Discusión**

<b>Figura 4.1.</b> Relación entre la ingesta (g/100 g pez) y la temperatura (°C) de los grupos control AL y AM <sub>100</sub> AL en distintos periodos del ensayo experimental.....	244
<b>Figura 4.2.</b> Evolución mensual de la ingesta de los grupos control AL y AM <sub>100</sub> AL a lo largo del ensayo experimental .....	244
<b>Figura 4.3.</b> Multifuncionalidad del ciclo de las pentosas fosfato (CPP) .....	256
<b>Figura 4.4.</b> Posible ruta de señalización celular inducida por la ingestión de ácido maslínico en el hígado de dorada alimentada con ración restringida .....	278
<b>Figura 4.5.</b> Morfología típica de los lisosomas secundarios encontrados en una situación control AL y en una situación AM <sub>100</sub> AL.....	282

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

### 1. Introducción

<b>Tabla.1.1.</b> Requerimientos de aminoácidos en la dorada (NRC, 1983).....	31
<b>Tabla.1.2.</b> Descripción breve de las bioactividades del ácido maslínico .....	71

### 2. Material y Métodos

<b>Tabla 2.1.</b> Composición general de las dietas utilizadas en el ensayo de crecimiento de la dorada.....	94
<b>Tabla 2.2.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de G6P, 6PG y F6P .....	112
<b>Tabla 2.3.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de L-malato .....	113
<b>Tabla 2.4.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de lactato .....	114
<b>Tabla 2.5.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de NADP .....	115
<b>Tabla 2.6.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de las concentraciones de NADH y NADPH .....	116
<b>Tabla 2.7.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de NAD <sup>+</sup> .....	117
<b>Tabla 2.8.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de G6PDH y 6PGDH.....	125
<b>Tabla 2.9.</b> Preparación de los medios de ensayo para la medida de la actividad EM .....	126
<b>Tabla 2.10.</b> Preparación del medio de ensayo para la medida de IDH-NADP <sup>+</sup> .....	127
<b>Tabla 2.11.</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de la Ser-DH .....	128
<b>Tabla 2.12.:</b> Preparación del medio de ensayo para la determinación de Ala-AT.....	129
<b>Tabla 2.13.</b> Protocolo para la preparación de geles para la SDS-PAGE de tejido hepático y muscular de doradas.....	134
<b>Tabla 2.14.</b> Protocolo de preparación de la disolución para la detección de quimioluminiscencia .....	140
<b>Tabla 2.15.</b> Programa de isoelectroenfoque de extractos de proteína total .....	144
<b>Tabla 2.16.</b> Reactivos para composición corporal.....	157
<b>Tabla 2.17.</b> Reactivos para recambio proteico y ácidos nucleicos .....	158
<b>Tabla 2.18.</b> Reactivos para metabolitos y coenzimas.....	158
<b>Tabla 2.19.</b> Reactivos para ensayos enzimáticos .....	157
<b>Tabla 2.20.</b> Reactivos para SDS-PAGE e inmunotransferencia .....	159
<b>Tabla 2.21.</b> Reactivos para estudio de proteómica .....	160

### 3. Resultados

<b>Tabla 3.1.</b> Crecimiento e índices biométricos de las doradas alimentadas con ácido maslínico .....	163
<b>Tabla 3.2.</b> Efecto del ácido maslínico sobre la ingesta y utilización nutritiva de la dieta .....	165
<b>Tabla 3.3.</b> Valores de ingesta absoluta y relativa de ácido maslínico .....	166

<b>Tabla 3.4.</b> Temperatura, coeficiente de crecimiento térmico y supervivencia.....	167
<b>Tabla 3.5.</b> Composición corporal de las doradas alimentadas con ácido maslínico .....	167
<b>Tabla 3.6.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el peso, la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en el hígado de la dorada .....	169
<b>Tabla 3.7.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico en el hígado de la dorada .....	172
<b>Tabla 3.8.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el peso, la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en el músculo blanco de la dorada .....	175
<b>Tabla 3.9.</b> Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico en el músculo de la dorada.....	178
<b>Tabla 3.10.</b> Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones de G6P, 6FG, F6P, lactato, malato y glucógeno en el hígado.....	181
<b>Tabla 3.11.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los metabolitos G6P, 6FG, F6P, lactato, malato y glucógeno en el músculo blanco .....	182
<b>Tabla 3.12.</b> Efecto del ácido maslínico en el hígado de la dorada sobre los coenzimas de óxido-reducción, y la razón entre ellos .....	184
<b>Tabla 3.13.</b> Efecto del ácido maslínico en el músculo de la dorada sobre los coenzimas de óxido-reducción, y la razón entre ellos .....	185
<b>Tabla 3.14.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la G6PDH del hígado de la dorada.....	187
<b>Tabla 3.15.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la 6PGDH del hígado de la dorada.....	188
<b>Tabla 3.16.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos del EM del hígado de la dorada .....	189
<b>Tabla 3.17.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la IDH-NADP <sup>+</sup> del hígado de la dorada.....	191
<b>Tabla 3.18.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ser-DH del hígado de la dorada.....	192
<b>Tabla 3.19.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ala-AT del hígado de la dorada.....	193
<b>Tabla 3.20.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Tyr-AT del hígado de la dorada.....	194
<b>Tabla 3.21.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la G6PDH del músculo de la dorada .....	196
<b>Tabla 3.22.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la 6PGDH del músculo de la dorada .....	198
<b>Tabla 3.23.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos del EM del músculo de la dorada .....	199
<b>Tabla 3.24.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la IDH-NADP <sup>+</sup> del músculo de la dorada .....	200
<b>Tabla 3.25.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ser-DH del músculo de la dorada .....	202
<b>Tabla 3.26.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ala-AT del músculo de la dorada .....	203

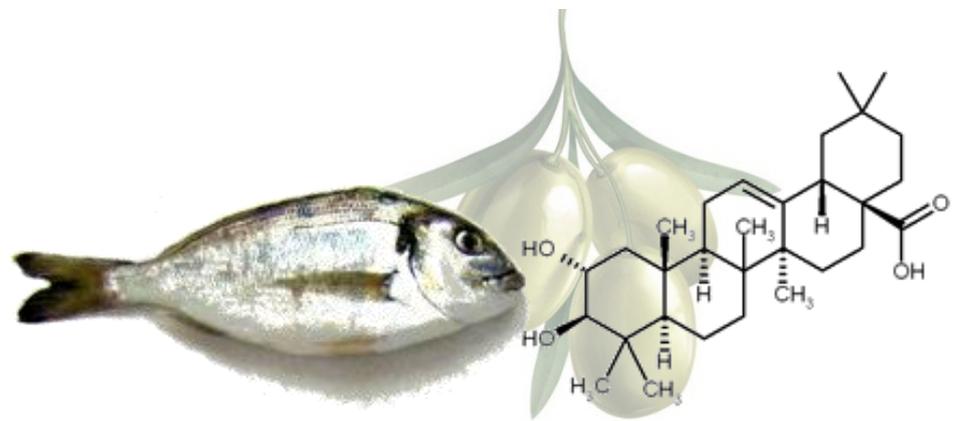
<b>Tabla 3.27.</b> Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Tyr-AT del músculo de la dorada.....	204
<b>Tabla 3.28.</b> Masas moleculares y puntos isoelectrónicos de los diferentes spots que mostraron diferencias de expresión.....	219
<b>Tabla 3.29.</b> Conjunto de proteínas identificadas por MS y búsqueda en la base de datos.....	228
<b>Tabla 3.30.</b> Funciones de las proteínas identificadas.....	230

#### **4. Discusión**

<b>Tabla 4.1.</b> Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de G6P y actividad específica de la G6PDH del hígado y músculo blanco de la dorada en el estado estacionario de cada situación nutricional .....	259
<b>Tabla 4.2.</b> Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de 6PG y actividad específica de la 6PGDH del hígado y músculo blanco de la dorada en el estado estacionario de cada situación nutricional .....	260
<b>Tabla 4.3.</b> Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de malato y actividad específica del enzima málico (EM) del hígado y músculo blanco de la dorada en el estado estacionario de cada situación nutricional.....	264

# Índice

---







Índice	
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>III. MEMORIA DE LA TESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1. Especie de interés: la dorada (<i>Sparus aurata</i>). Generalidades.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2. Nutrición y metabolismo en peces .....</b>	<b>28</b>
1.2.1. Niveles de proteína y su metabolismo .....	29
1.2.2. Niveles de lípidos y su metabolismo .....	34
1.1.2.3. Niveles de carbohidratos y su metabolismo .....	36
1.1.2.3. Efecto de la restricción alimenticia .....	40
<b>1.4. Crecimiento y recambio proteico .....</b>	<b>47</b>
1.4.1. Crecimiento en peces.....	47
1.4.2. Factores que afectan al crecimiento .....	51
1.4.3. Recambio proteico en peces .....	56
1.4.4. Enzimas relacionadas con el crecimiento en peces .....	59
1.4.4.1. Enzimas productoras de NADPH .....	59
1.4.4.2. Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico .....	62
<b>1.5. Ácido maslínico .....</b>	<b>65</b>
1.5.1. El ácido maslínico como triterpeno. Generalidades.....	65
1.5.2. Estructura del ácido maslínico .....	69
1.5.3. Importancia del ácido maslínico: bioactividades .....	71
1.5.3.1. Actividad anticancerígena .....	72
1.5.3.2. Actividad antioxidante .....	73
1.5.3.3. Efecto inmuno-modulador .....	75
1.5.3.4. Efecto vaso-modulador .....	75
1.5.3.5. Efecto sobre actividades enzimáticas.....	75
1.5.3.6. Efecto anti-microbiano.....	76



1.5.3.7. Efecto anti-viral .....	77
1.5.3.8. Aditivo alimentario.....	77
<b>1.6. Introducción a la proteómica en peces .....</b>	<b>80</b>
1.6.1. Generalidades de proteómica.....	80
1.6.2. Aplicaciones de la proteómica a peces .....	86
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>93</b>
<b>2.1. Diseño experimental.....</b>	<b>93</b>
2.1.1. Dietas experimentales.....	93
2.1.2. Condiciones experimentales .....	95
2.1.3. Alimentación .....	96
2.1.4. Toma de muestras.....	97
<b>2.2. Índices biológicos del crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y composición corporal.....</b>	<b>98</b>
2.2.1. Crecimiento y eficacia alimentaria .....	98
2.2.2. Utilización de la proteína y los lípidos.....	98
2.2.3. Índices biométricos .....	99
2.2.4. Análisis de composición corporal.....	100
<b>2.3. Determinación de las velocidades de recambio de proteínas en el hígado y músculo blanco de la dorada .....</b>	<b>102</b>
2.3.1. Fundamento .....	102
2.3.2. Técnica .....	102
2.3.3. Determinación de la concentración de $\beta$ -feniletilamina total .....	105
2.3.3.1. Fundamento.....	105
2.3.3.2. Técnica .....	106
2.3.4. Cálculo de las velocidades de recambio proteico .....	107
2.3.5. Determinación de la concentración de DNA.....	108
2.3.5.1. Fundamento .....	108
2.3.5.2. Técnica .....	109
2.3.6. Determinación de la concentración de RNA .....	109
2.3.6.1. Fundamento.....	109
2.3.6.2. Técnica .....	109
<b>2.4. Determinación enzimática de metabolitos en hígado y músculo blanco de dorada .</b>	<b>110</b>
2.4.1. Determinación de la concentración de glucosa 6-fosfato, 6-fosfogluconato y fructosa 6-fosfato.....	111



2.4.1.1. Fundamento .....	111
2.4.1.2. Técnica .....	111
2.4.1.3. Cálculos .....	112
2.4.2. Determinación de la concentración de L-malato .....	112
2.4.2.1. Fundamento .....	112
2.4.2.2. Técnica .....	113
2.4.2.3. Cálculos .....	113
2.4.3. Determinación de la concentración de L-lactato .....	113
2.4.3.1. Fundamento .....	113
2.4.3.2. Técnica .....	114
2.4.3.3. Cálculos .....	114
2.4.4. Determinación enzimática de la concentración de NADP <sup>+</sup> .....	114
2.4.4.1. Fundamento .....	114
2.4.4.2. Técnica .....	115
2.4.4.3. Cálculos .....	115
2.4.5. Determinación simultánea de las concentraciones de NADH y NADPH .....	115
2.4.5.1. Fundamento .....	115
2.4.5.2. Técnica .....	116
2.4.5.3. Cálculos .....	117
2.4.6. Determinación de la concentración de NAD <sup>+</sup> .....	117
2.4.6.1. Fundamento .....	117
2.4.6.2. Técnica .....	117
2.4.6.3. Cálculos .....	118
2.4.7. Determinación de la concentración de glucógeno tisular.....	118
2.4.7.1. Fundamento .....	118
2.4.7.2. Reactivos .....	118
2.4.7.3. Procedimiento .....	119
2.4.7.4. Cálculos .....	119
2.4.8. Determinación cuantitativa de proteínas en hígado y músculo blanco.....	120
2.4.8.1. Método de Lowry .....	120
2.4.8.2. Método de Bradford.....	120
<b>2.5. Determinación de actividades enzimáticas en hígado y músculo blanco .....</b>	<b>122</b>
2.5.1. Preparación de las muestras para las determinaciones enzimáticas.....	122
2.5.2. Cálculos .....	123
2.5.3. Parámetros cinéticos.....	123
2.5.4. Determinación de las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6- fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) .....	124
2.5.4.1. Fundamento .....	124



2.5.4.2. Técnica .....	125
2.5.5. Determinación de la actividad del enzima málico (EM) .....	126
2.5.5.1. Fundamento .....	126
2.5.5.2. Técnica .....	126
2.5.6. Determinación de la actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup> (IDH-NADP <sup>+</sup> ) .....	127
2.5.6.1. Fundamento .....	127
2.5.6.2. Técnica .....	127
2.5.7. Determinación de la actividad serina deshidratasa (Ser-DH).....	128
2.5.7.1. Fundamento .....	128
2.5.7.2. Técnica .....	128
2.5.8. Determinación de la actividad alanina aminotransferasa (Ala-AT ó GPT) .....	129
2.5.8.1. Fundamento .....	129
2.5.8.2. Técnica .....	129
2.5.9. Determinación de la actividad tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) .....	130
2.5.9.1. Fundamento .....	130
2.5.9.2. Técnica .....	130
<b>2.6. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por “Western blotting” .....</b>	<b>131</b>
2.6.1. Fundamento .....	131
2.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) .....	132
2.6.2.1. Fundamento .....	132
2.6.2.2. Reactivos y disoluciones.....	133
2.6.2.3. Técnica .....	133
2.6.3. Tinción del gel .....	135
2.6.4. Transferencia.....	135
2.6.4.1. Material y reactivos.....	135
2.6.4.2. Técnica .....	135
2.6.4.3. Eficacia de la transferencia .....	136
2.6.5. Inmunoblotting .....	136
2.6.5.1. Fundamento .....	136
2.6.5.2. Reactivos y disoluciones empleadas .....	136
2.6.5.3. Técnica .....	137
2.6.6. Revelado.....	139
2.6.6.1. Fundamento .....	139
2.6.6.2. Reactivos .....	139
2.6.6.3. Técnica .....	140



<b>2.7. Análisis del patrón global de expresión de proteínas (proteoma) de hígado de dorada mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MALDI-TOF)</b>	<b>141</b>
2.7.1. Preparación de la muestra	142
2.7.1.1. Fundamento	142
2.7.1.2. Reactivos	142
2.7.1.3. Técnica	142
2.7.2. Electroforesis bidimensional (2-DE)	143
2.7.2.1. Fundamento	143
2.7.2.2. Reactivos	143
2.7.2.3. Técnica	144
2.7.3. Análisis de la imagen	145
2.7.3.1. Fundamento	145
2.7.3.2. Técnica	145
2.7.4. Identificación de las proteínas analizadas	146
2.7.4.1. Fundamento	146
2.7.4.2. Técnica	148
2.7.5. Interpretación de los resultados	149
2.7.5.1. Fundamento	149
2.7.5.2. Técnica	149
<b>2.8. Estudio histológico</b>	<b>151</b>
2.8.1. Microscopía óptica	151
2.8.1.1. Reactivos	151
2.8.1.2. Técnica	152
2.8.2. Microscopía electrónica de transmisión	153
2.8.2.1. Reactivos	153
2.8.2.2. Técnica	153
<b>2.9. Análisis estadístico de los resultados</b>	<b>155</b>
<b>2.10. Recursos técnicos e instrumentales</b>	<b>156</b>
2.10.1. Productos químicos	157
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>163</b>
<b>3.1. Influencia del ácido maslínico sobre el crecimiento, índices biométricos, parámetros nutricionales y composición corporal de la dorada en estadio juvenil.</b>	<b>163</b>
3.1.1. Crecimiento e índices biométricos	163
3.1.2. Ingesta y utilización nutritiva del alimento	165



3.1.3. Efecto de la temperatura y supervivencia .....	167
3.1.4. Composición corporal .....	167
<b>3.2. Efecto del ácido maslínico sobre la velocidad y naturaleza del crecimiento y del recambio proteico en hígado y músculo blanco de la dorada .....</b>	<b>169</b>
3.2.1. Peso del hígado y concentraciones de proteínas, DNA y RNA de la dorada .....	169
3.2.2. Efecto del ácido maslínico sobre la naturaleza del crecimiento del hígado de la dorada ....	171
3.2.3. Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico del hígado de la dorada.....	172
3.2.4. Efecto del ácido maslínico sobre el peso y las concentraciones de proteínas, DNA y RNA del músculo blanco de la dorada .....	175
3.2.5. Efecto del ácido maslínico sobre la naturaleza del crecimiento del músculo blanco de la dorada.....	177
3.2.6. Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico en el músculo blanco de la dorada.	178
<b>3.3. Efecto del ácido maslínico sobre los niveles de diferentes metabolitos y coenzimas redox en el hígado y músculo blanco de la dorada .....</b>	<b>181</b>
3.3.1. Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de G6P, 6PG, F6P, lactato, malato y glucógeno.....	181
3.3.1.1. Hígado .....	181
3.3.1.2. Músculo blanco .....	182
3.3.2. Efecto del ácido maslínico sobre los niveles de los coenzimas de óxido-reducción, NAD <sup>+</sup> , NADH, NADP <sup>+</sup> y NADPH y de sus respectivas relaciones.....	183
3.3.2.1. Hígado .....	183
3.3.2.2. Músculo blanco .....	184
<b>3.4. Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético de los sistemas de producción de NADPH y enzimas claves del metabolismo proteico en el hígado y músculo blanco de la dorada .....</b>	<b>186</b>
3.4.1. Enzimas del hígado de la dorada.....	186
3.4.1.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) .....	186
3.4.1.2. Enzima málico (EM).....	188
3.4.1.3. Isocitrato deshidrogenasa dependiente NADP <sup>+</sup> (IDH-NADP <sup>+</sup> ).....	190
3.4.1.4. Serina deshidratasa (Ser-DH) .....	191
3.4.1.5. Alanina aminotransferasa (Ala-AT) .....	192
3.4.1.6. Tirosina aminotransferasa (Tyr-AT).....	194
3.4.2. Enzimas del músculo blanco de la dorada .....	195
3.4.2.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) .....	195
3.4.2.2. Enzima málico (EM).....	198



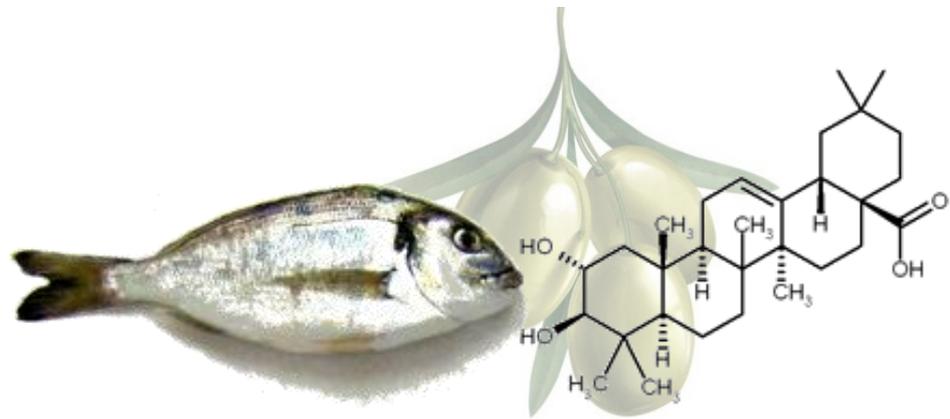
3.4.2.3. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup> (IDH-NADP <sup>+</sup> ) .....	199
3.4.2.4. Serina deshidratasa (Ser-DH) .....	201
3.4.2.5. Alanina aminotransferasa (Ala-AT) .....	202
3.4.2.6. Tirosina aminotransferasa (Tyr-AT).....	203
<b>3.5. Efecto del ácido maslínico sobre los niveles de expresión proteica de los diferentes enzimas estudiados por la técnica” Western blot” .....</b>	<b>206</b>
3.5.1. Niveles de expresión proteica en hígado de dorada .....	207
3.5.1.1. Niveles de expresión de G6PDH .....	207
3.5.1.2. Niveles de expresión de EM .....	208
3.5.1.3. Niveles de expresión de IDH-NADP <sup>+</sup> .....	210
3.5.1.4. Niveles de expresión de Ser-DH .....	211
3.5.1.5. Niveles de expresión de Ala-AT .....	212
3.5.2. Niveles de expresión proteica en músculo blanco de dorada.....	213
3.5.2.1. Niveles de expresión de G6PDH .....	213
3.5.2.2. Niveles de expresión de IDH-NADP <sup>+</sup> .....	214
3.5.2.3. Niveles de expresión de Ser-DH .....	215
<b>3.6. Análisis del patrón de expresión de proteínas (proteoma) en el hígado de la dorada alimentada con ácido maslínico.....</b>	<b>217</b>
3.6.1. Patrón de expresión proteico en el hígado de la dorada .....	217
3.6.2. Identificación de las proteínas con patrón de expresión diferente .....	227
3.6.3. Clasificación funcional de las proteínas identificadas .....	229
<b>3.7. Análisis de la estructura del hígado y músculo blanco de dorada por microscopía óptica y electrónica .....</b>	<b>231</b>
3.7.1. Análisis histológico por microscopía óptica .....	231
3.7.2. Análisis histológico por microscopía electrónica de transmisión.....	236
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>243</b>
<b>4.1. Efecto del ácido maslínico y restricción del alimento sobre la utilización de la dieta y crecimiento de las doradas.....</b>	<b>243</b>
<b>4.2. Recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del hígado y músculo blanco de la dorada .....</b>	<b>247</b>
4.2.1. Velocidad y naturaleza del crecimiento del hígado de doradas alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico .....	247
4.2.2. Velocidades de recambio de proteínas y contenido de ácidos nucleicos del hígado de dorada alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico .....	248



4.2.3. Velocidad y naturaleza del crecimiento del músculo blanco de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico.....	250
4.2.4. Velocidades de recambio de proteínas y contenido de ácidos nucleicos del músculo blanco de doradas alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico .....	251
<b>4.3. Influencia del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético y nivel de expresión de diferentes enzimas del metabolismo intermediario del hígado y músculo blanco de la dorada.....</b>	<b>253</b>
4.3.1. Sistemas de producción de equivalentes de reducción del hígado y músculo blanco de la dorada.....	255
4.3.1.1. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa del hígado y músculo blanco de la dorada.....	257
4.3.1.2. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa del hígado y músculo blanco de la dorada.....	259
4.3.1.3. Enzima málico del hígado y músculo blanco de la dorada .....	262
4.3.1.4. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup> del hígado y músculo blanco de la dorada .....	265
4.3.2. Enzimas claves del metabolismo proteico del hígado y músculo blanco de la dorada.....	267
4.3.2.1. Serina deshidratasa del hígado y músculo blanco de la dorada .....	268
4.3.2.2. Alanina aminotransferasa del hígado y músculo blanco de la dorada.....	269
4.3.2.3. Tirosina aminotransferasa del hígado y músculo blanco de la dorada .....	271
<b>4.4. Caracterización proteómica por electroforesis bidimensional y espectrometría de masas del hígado de la dorada.....</b>	<b>273</b>
4.4.1. Efectos del ácido maslínico y la restricción alimentaria sobre el proteoma del hígado de la dorada.....	273
4.4.2. Análisis de las proteínas identificadas en el hígado de la dorada con patrón de expresión modificado .....	274
<b>4.5. Análisis estructural del tejido hepático y muscular de las doradas alimentadas con ácido maslínico .....</b>	<b>280</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>287</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>293</b>

# Resumen

---







## I. RESUMEN

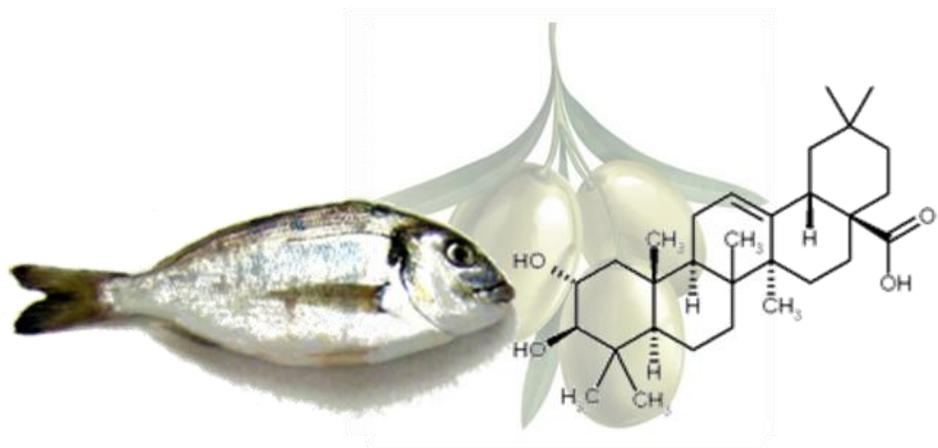
El ácido maslínico (AM), 2- $\alpha$ , 3- $\beta$ -dihidroxiolean-12-en-28-oico, es un compuesto triterpénico de cinco anillos presente en la capa cerosa del fruto y hoja del olivo. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la inclusión de AM en la dieta de la dorada (*Sparus aurata*) y el uso de dos raciones diferentes, *ad libitum* (AL) y restricción del alimento al 1,5% del peso (R) sobre el crecimiento, recambio proteico, concentración de ácidos nucleicos y metabolitos, enzimas implicadas en el crecimiento y regulación del metabolismo de aminoácidos en hígado y músculo blanco de la dorada. Se ha caracterizado el proteoma completo del hígado y se ha estudiado la ultraestructura del hígado y músculo blanco en situaciones AL. Cinco grupos de doradas de 12 g de peso inicial se mantuvieron en condiciones de piscifactoría y se alimentaron durante 210 días con dietas que contenían 0, 50 y 100 mg de AM por kg de dieta (control, AM<sub>50</sub> y AM<sub>100</sub>, respectivamente). Los grupos experimentales fueron los siguientes: Control AL, AM<sub>100</sub> AL, Control R, AM<sub>50</sub> R y AM<sub>100</sub> R. Los resultados encontrados, acabado el periodo experimental, fueron una mayor tasa de crecimiento en el tamaño y peso corporal de las doradas alimentadas con AM<sub>100</sub>, tanto AL, como R. En general, los grupos R mostraron mejores índices de conversión que los AL. En el hígado y músculo blanco, las velocidades fraccionarias y absolutas de síntesis ( $K_S$  y  $A_S$ ) y degradación ( $K_D$  y  $A_D$ ) fueron mayores para los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R. En el hígado, la capacidad de síntesis ( $C_S$ ),  $K_{DNA}$  y  $K_{RNA}$ , fueron mayores significativamente en estos mismos grupos; las diferencias encontradas en músculo se presentaron en la  $C_S$ , encontrándose un aumento en los grupos AM. La eficacia de la síntesis (ERP), disminuyó en el hígado de los grupos AM y sólo en el músculo del grupo AM<sub>100</sub> AL. La naturaleza del crecimiento en ambos tejidos de los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R se produjo por cambios en la concentración de DNA total, por lo que predominaban los fenómenos de hiperplasia celular. En relación con la concentración de los diferentes metabolitos: G6P, F6P, 6PG, malato, lactato y glucógeno, existieron diferencias de acuerdo con los tejidos y situaciones nutricionales empleadas. De forma general, tanto en el hígado, como en el músculo blanco también se observa un incremento en los valores de actividad y velocidad máxima de enzimas marcadores del crecimiento y degradación de aminoácidos: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzima málico, isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup>, serina deshidratasa y tirosina aminotransferasa. Estos resultados coincidieron con los encontrados en los niveles de expresión de estas enzimas mediante análisis de "Western blot". El proteoma del hígado de la dorada mostró diferencias entre las situaciones ensayadas, existiendo un mayor número de proteínas diferentes en el grupo AM<sub>100</sub> R. El análisis de la ultraestructura del hígado y músculo blanco por microscopía óptica y electrónica confirma los resultados anteriores, mostrando en las doradas alimentadas con AM<sub>100</sub> unos hepatocitos metabólicamente mucho más activos que los controles. Estos resultados demuestran que el ácido maslínico utilizado como aditivo en la dieta de la dorada en condiciones de piscifactoría puede comportarse como un factor de crecimiento capaz de estimular la síntesis y degradación de proteínas y el crecimiento celular en la dorada.

**Trabajo subvencionado por la Junta de Andalucía (Grupo de Investigación BIO-157), OTRI (Universidad de Granada), Universidad de Jaén, Biomáslinic S.L y Azucarera del Guadalfeo División Acuicultura Marina S.L.**



# *Justificación y objetivos*

---







## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El interés suscitado por el ácido maslínico en los últimos cinco años no es mera casualidad, sino que está desencadenado por la variedad de actividades biológicas en las que este compuesto parece estar implicado. Se trata de un triterpeno pentacíclico natural, aislado y purificado, principalmente de la cera superficial que recubre las hojas y fruto del olivo, *Olea europaea*. Por su capacidad como inhibidor de proteasas, ha sido utilizado en el tratamiento de patologías causadas por parásitos del género *Cryptosporidium*, o las causadas por el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). También se ha demostrado que el ácido maslínico induce apoptosis selectiva en las líneas celulares tumorales, HT29 y Caco-2, pudiendo ser empleado como supresor de tumores en el cáncer de colon. El ácido maslínico influye, además, sobre ciertas actividades enzimáticas, por ejemplo, se ha descrito como inhibidor de la glucógeno fosforilasa, de elastasas, etc. También se ha estudiado su capacidad antioxidante en situaciones de estrés oxidativo y su capacidad antiinflamatoria, entre otras. Además, se ha estudiado la adición de ácido maslínico a la dieta de trucha arco iris demostrándose que este compuesto estimula la velocidad de crecimiento en el animal completo, en el hígado y en el músculo blanco, ya que es capaz de estimular las velocidades de síntesis de proteínas frente a las velocidades de degradación, produciéndose una mayor velocidad de acumulación proteica.

El cultivo de la dorada se enfrenta actualmente a un mercado cada vez más competitivo, tanto por la bajada de los precios, como por el auge en la producción de nuevas especies; en este sentido, se requiere una reducción en los costes de producción, un mayor crecimiento de la dorada en el menor tiempo posible, una mayor calidad del producto final y el desarrollo de tecnologías que permitan minimizar el impacto medioambiental de las explotaciones en cultivo. Una de las asignaturas pendientes en la producción de muchas especies acuícolas es la adecuación de las pautas de alimentación al potencial de crecimiento y a la época del año en que se desarrolla el cultivo. En este sentido, parece lógico que los estudios en la dorada se dirijan a mejorar su cultivo y producción, para que siga siendo una especie a la vanguardia de las necesidades acuícolas. Así, los estudios en dorada están encaminados a mejorar su crecimiento y es por lo que en los últimos años la genómica y proteómica se están aplicando en peces; el conocimiento exhaustivo de las proteínas expresadas en determinadas situaciones (ayuno, realimentación, temperatura, calidad de la dieta, régimen de alimentación...) puede ser de gran ayuda. Una dieta equilibrada que aporte todos los requerimientos nutricionales que necesita el pez, y que suministrándola en menor cantidad, no afecte a la capacidad de crecimiento podría ser uno de los aspectos clave en la producción. En este sentido, el ácido maslínico, podría jugar un papel importante ya que por sí sólo es un estimulador/controlador del crecimiento en general y al comportarse como inhibidor de serín proteasas puede prevenir enfermedades causadas por patógenos alterando la capacidad invasiva de estos; y, en consecuencia, puede disminuir la mortalidad.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, el presente trabajo tiene como objetivo global, analizar exhaustivamente el efecto del ácido maslínico (AM) sobre el comportamiento y naturaleza del crecimiento, en juveniles de dorada. Este estudio se ha realizado en condiciones de



piscifactoría lo cual hace que los resultados obtenidos sean extrapolables a las condiciones que rigen la producción industrial de estos peces. Además, se ha estudiado el efecto de dos regímenes de alimentación diferentes, la alimentación a saciedad o *ad libitum* y el efecto de una ración restringida al 1,5% del peso de la dorada. Con tal fin se emplearon tres dietas con diferentes cantidades de ácido maslínico: 0; 50 y 100 mg de AM por kg de dieta, que se correspondieron con los grupos Control, AM<sub>50</sub> y AM100, respectivamente). De acuerdo con esto, los grupos experimentales que se eligieron fueron los siguientes: Control AL, AM<sub>100</sub> AL, Control R, AM<sub>100</sub> R y AM<sub>100</sub> R. Esto nos permitiría, por un lado conocer la dosis óptima de ácido maslínico para la dorada, y compararla con la empleada en la trucha arco iris, y, por otro lado, estudiar los efectos de una alimentación a saciedad *versus* la restricción del alimento al 1,5% del peso del animal, en donde las necesidades nutricionales y energéticas están por debajo de las requeridas y, por otro lado, combinar los efectos de la restricción de la ración y la adición de ácido maslínico pueden contrarrestar los efectos que pueda ocasionar la restricción alimentaria.

El estudio de crecimiento de la dorada, además de hacerse para el animal completo, se llevó a cabo en el hígado y músculo blanco por la relevancia que presentan ambos en los peces. El hígado desempeña un importante papel regulador en el metabolismo energético, amoniogénesis y, en general, en la homeostasis metabólica, siendo clave en el desarrollo del animal. El músculo blanco, por su parte, es el tejido mayoritario del pez, actúa como almacén de proteínas en situaciones de estrés nutritivo, y es responsable final del crecimiento del pez.

El objetivo global de nuestro trabajo, descrito previamente, puede desglosarse en los siguientes objetivos concretos:

#### **A. Objetivos concretos relacionados con la evaluación nutricional del ácido maslínico:**

1. Estudiar el efecto del ácido maslínico y de la restricción de la ración de alimento sobre la dinámica del crecimiento del animal completo, hígado y músculo blanco de la dorada en condiciones de piscifactoría.
2. Analizar el recambio proteico en el hígado y músculo blanco de la dorada, entendido éste como el balance entre las velocidades fraccionarias de síntesis ( $K_s$ ) y de degradación ( $K_d$ ) de proteínas en ambos tejidos, en relación con la velocidad fraccionaria de acumulación ( $K_G$ ) de proteínas. Se trata de estudiar si efectivamente el ácido maslínico desplaza el equilibrio del recambio proteico hacia la síntesis de proteínas, y por tanto, hacia un mayor crecimiento.
3. Determinar la relación entre los parámetros de recambio proteico y el contenido celular en ácidos nucleicos (DNA y RNA) para determinar la naturaleza del crecimiento en cada tejido estudiado. El crecimiento puede deberse a fenómenos de hiperplasia (incremento del número de unidades celulares) y/o de hipertrofia (aumento del tamaño celular).

**B. Objetivos concretos relacionados con la evaluación bioquímica del ácido maslínico:**

4. Determinar el efecto de la adición de ácido maslínico a la dieta de la dorada sobre la concentración tisular de glucosa 6-fosfato, 6-fosfogluconato y fructosa 6-fosfato, todos ellos metabolitos representativos del ciclo de las pentosas fosfato. Además, ver el efecto de este compuesto sobre el metabolismo del lactato, malato, del glucógeno, así como el estado estacionario de los coenzimas de óxido-reducción en las formas oxidadas y reducidas.
5. Determinar el comportamiento cinético y los niveles de expresión proteica de los enzimas productores de NADPH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), enzima málico (EM) e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>). Estos enzimas constituyen uno de los factores más importantes implicados en los procesos de crecimiento y proliferación celular.
6. Determinar el comportamiento cinético y los niveles de expresión proteica de algunos de los enzimas clave relacionados con el metabolismo de aminoácidos, en concreto, serina deshidratasa (Ser-DH), tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) y alanina aminotransferasa (Ala-AT).
7. Caracterizar el proteoma del hígado de la dorada y estudiar el efecto del ácido maslínico y la restricción de la ración sobre el patrón global expresión de proteínas de este órgano. Para ello se utilizarán técnicas de proteómica basadas en la electroforesis 2-DE y espectrometría de masas (MS).

**C. Objetivos concretos relacionados con la evaluación citológica del ácido maslínico:**

8. Determinar, por medio de técnicas de microscopía óptica y electrónica, todas las modificaciones estructurales que puedan producirse en el tejido hepático y en el músculo blanco de la dorada, atribuibles a la acción del ácido maslínico y a la restricción de la dieta.

Los resultados obtenidos en este estudio permitirán evaluar, a los tres niveles indicados, la inclusión de ácido maslínico a la dieta estándar de dorada así como el régimen de alimentación. De este modo, se podría mejorar su cultivo a gran escala; además de aprovechar un subproducto natural obtenido de la molturación de la aceituna, eliminando una parte importante del gran impacto medioambiental que se origina durante el proceso de extracción del aceite.



# ***Memoria de la tesis***

***1. Introducción***

***2. Material y Métodos***

***3. Resultados***

***4. Discusión***

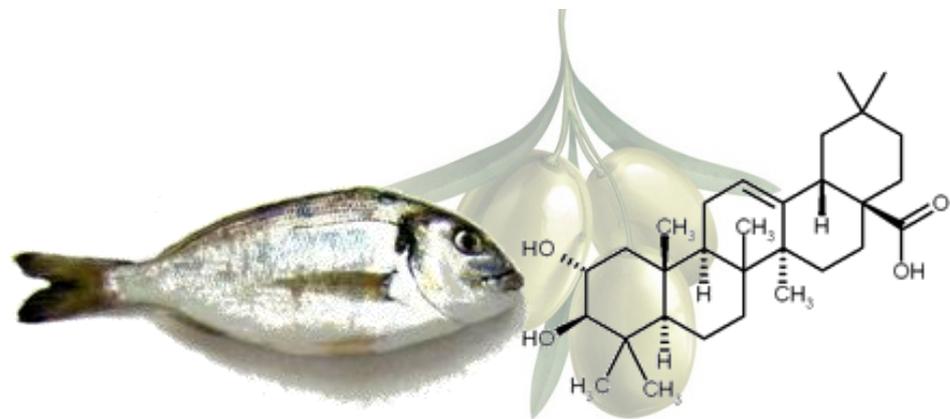
***5. Conclusiones***

***6. Bibliografía***



# *Introducción*

---







### III. MEMORIA DE LA TESIS

#### 1. Introducción

##### 1.1. Especie de interés: la dorada (*Sparus aurata*). Generalidades

La dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758), es una especie que pertenece a la familia de los Espáridos, orden Perciformes y clase Actinopterygios. Morfológicamente, el cuerpo de la dorada es oval y lateralmente comprimido. La cabeza es robusta (bastante arqueada). Presenta una aleta dorsal completa, espinosa sólo en parte y en su parte media es visible una parte oscura (Bauchot y Pras, 1987); la aleta anal es corta; la caudal es grande, bastante escotada y bordeada de color negro; las pectorales son falsas (no unidas al esqueleto) y las pélvicas se encuentran en posición torácica presentando una espina y cinco radios). La boca de la dorada es pequeña y de posición inferior, con mandíbulas poco extensibles y de labios gruesos. La mandíbula superior es ligeramente más prominente que la inferior. Los dientes de esta especie presentan formas muy variadas (incisivos, caninos, molares, etc.). La dorada presenta escamas ctenoideas en todo el cuerpo (entre 75 y 85 en la línea lateral).

El color de la dorada depende del lugar donde habite; comúnmente presenta el dorso gris azulado (metálico) con los flancos plateados, la cara ventral blanquecina, una mancha dorada sobre la frente y entre los ojos; además presenta una mancha negra en el opérculo (el cual carece de espinas), subrayada frecuentemente de color rojo. La dorada es capaz de alcanzar una talla máxima de 70 cm (Terofal, 1990), y un peso aproximado de 5 kg (Serra, 1999). En la **Figura 1.1** se muestra un esquema de las características de la dorada, de su hábitat y biología y del cultivo de la misma (FAO, 2007).

La dorada es común del Mar Mediterráneo, aunque también se encuentra distribuida a lo largo de la costa oriental del Atlántico desde Senegal hasta Gran Bretaña, y raramente en el Mar Negro. La dorada es una especie de naturaleza euritermia y eurisalina, habita zonas litorales en ambiente marinos, lagunas costeras y zonas de estuarios en particular durante las primeras fases del ciclo de vida. En la vida silvestre, la dorada nace en mar abierto entre octubre y diciembre, los juveniles típicamente migran hacia las zonas costeras a principios de la primavera, porque la dorada es muy sensible a las bajas temperaturas (letal a 4°C), y a finales de otoño vuelve a mar abierto. En el mar abierto, la dorada es encontrada usualmente sobre rocas o campos de *Posidonea oceanica*, pero es capturada generalmente en fondos arenosos. La dorada es una especie hermafrodita proterándrica, es decir, que la mayoría de los individuos comienzan su ciclo de vida siendo machos y al cabo de 2-3 años se transforman en hembras. La dorada es un pez carnívoro que presenta una diversidad alimenticia que está relacionada con la talla de los individuos; los juveniles se alimentan de poliquetos y pequeños crustáceos, y los animales más grandes de moluscos, lamelibranquios, gasterópodos y crustáceos (Arias, 1980; Colloca y Cerasi, 2005).



La reproducción en el Mediterráneo se lleva a cabo entre octubre y diciembre, cuando la temperatura baja a 19°C, aunque algunas veces puede alargarse hasta febrero-abril. Las gónadas maduran entre septiembre y octubre, realizándose la puesta en el mes de noviembre (Castelló-Orvay, 1993), cuando el agua se encuentra entre 14-15°C.

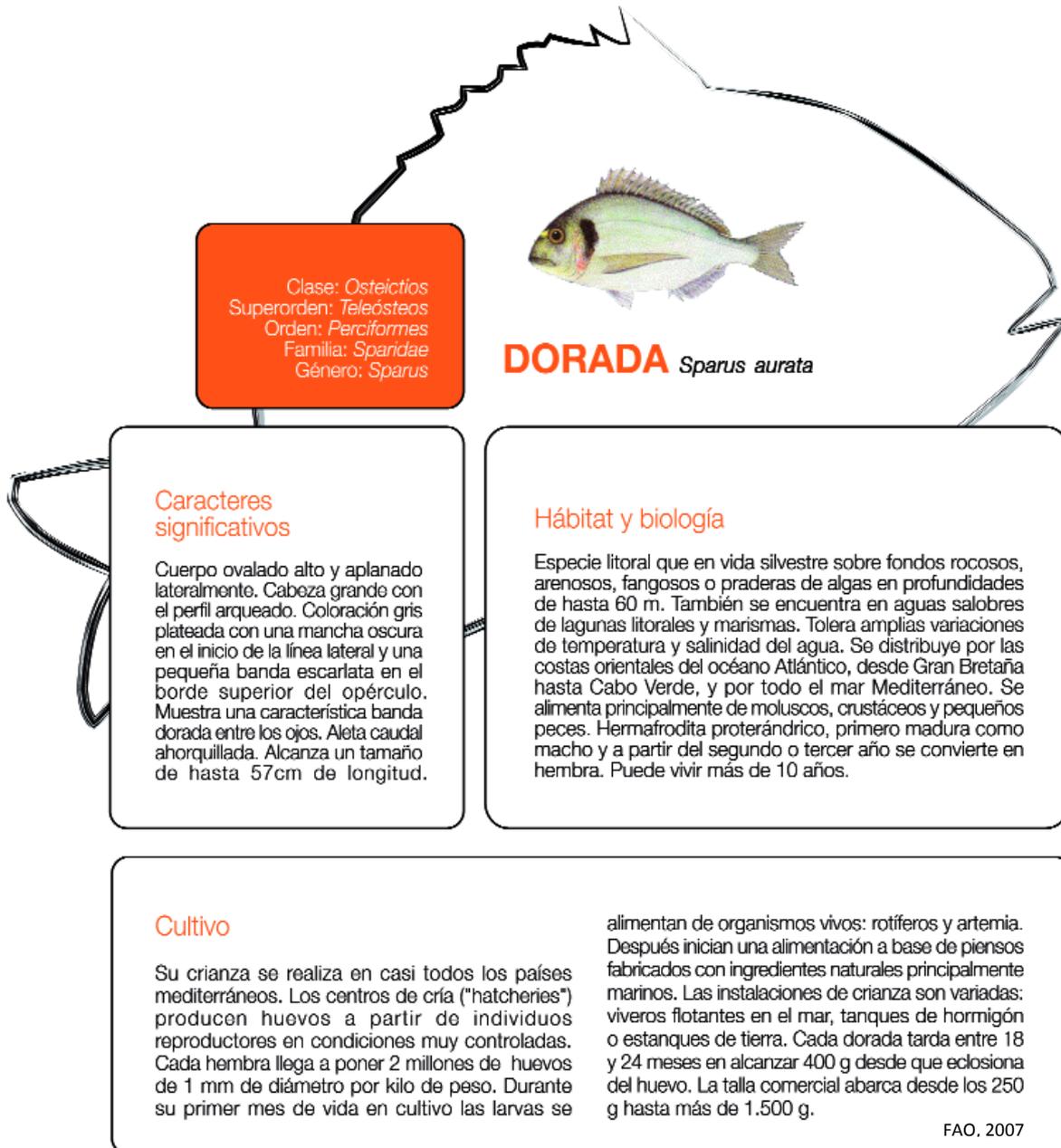


Figura 1.1. Esquema de la FAO,2007 en donde se muestra la morfología típica de la dorada y el resto de caracteres significativos de esta especie, su hábitat y biología, así como, el cultivo de la misma.



La dorada es muy apreciada comercialmente debido a que posee una carne de excelente textura y sabor, sin embargo hasta el desarrollo de los sistemas de cultivos intensivos en los años 80, el cultivo de la misma sólo se realizaba en lagunas costeras y estanques de agua de mar. La producción a gran escala de la dorada fue conseguida por España, Italia y Grecia entre 1988 y 1989. Esta especie presentó una alta adaptabilidad a las condiciones de cultivo del sistema intensivo, tanto en estanques, como en jaulas flotantes, así pues, la producción anual de la dorada se incrementó regularmente hasta el 2000, cuando el pico de producción alcanzó las 87.000 toneladas (Colloca y Cerasi, 2005).

La producción acuícola total de dorada (*Sparus aurata*) en Europa y el resto del mundo en 2007 ha sido de 151.096 Tm, un 21,2 % superior a la cifra de 2006. En el 2008 en torno a las 163.342 Tm, un 8,1% más que el año anterior (FAO, 2007). Los principales países productores de dorada son Grecia (52,9 %), Turquía (15,9 %), España (14,8 %) e Italia (5,9 %). Producciones menores se dan en Egipto, Israel, Francia, Chipre, Portugal, Croacia Malta, Túnez y Marruecos, mientras que hay producciones incipientes en Albania, República Dominicana, Marruecos, Emiratos Árabes Unidos, Bosnia, Omán, Libia y Kuwait.

La dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Psetta maxima*) son las más importantes especies de peces marinos de crianza producidas en los países europeos meridionales. Prácticamente todos los países ribereños del Mediterráneo producen dorada y lubina mediante acuicultura, coexistiendo en muchas ocasiones en las mismas instalaciones, mientras que la crianza del rodaballo se realiza en la vertiente atlántica europea, siendo más reducido el número de países productores.



## 1.2. Nutrición y metabolismo en peces

La alimentación se puede definir como el proceso de captura e ingesta del material de origen biológico necesario para el funcionamiento de los organismos vivos. Los alimentos contienen cantidades variables de agua, lípidos, vitaminas, minerales, y otros compuestos, incluyendo los que imparten aroma, sabor y color (Bui, 1988).

La nutrición, por su parte, puede definirse como el proceso por el que los organismos utilizan el alimento para la obtención de la energía para el crecimiento, mantenimiento y reparación de tejidos

De esta manera, si se habla de la nutrición y alimentación de los peces, se tiene que considerar como toda una ciencia encargada de determinar los requerimientos y necesidades alimenticias, así como las técnicas de alimentación durante todos los periodos de desarrollo de estos organismos.

Los peces necesitan energía para mantener sus procesos vitales y para producir nuevos tejidos, lo que constituye la base del crecimiento y la reproducción. Esta energía la sustraen de los nutrientes que presente la dieta suministrada. Los peces se encuentran entre los animales con mayor eficacia de transformar los nutrientes de la dieta en crecimiento corporal, dado su bajo requerimiento en energía de mantenimiento (Smith, 1989).

Las necesidades energéticas, en peces, varían de acuerdo con diferentes propiedades y características, la temperatura del agua, la especie, el tamaño, la edad, las actividades físicas y fisiológicas, la composición de la dieta...etc. Estas necesidades son cubiertas por los nutrientes obtenidos en los alimentos, gracias a los procesos de degradación de: proteínas (proteólisis), lípidos (lipólisis) e hidratos de carbono (glucólisis).

A nivel comercial, el principal objetivo de la producción de peces es el de maximizar el crecimiento y la supervivencia al mínimo costo (Knights, 1985), siendo condición, la óptima satisfacción de los requerimientos fisiológicos y metabólicos de los peces objeto de estudio, proveyéndolos de unas condiciones ambientales favorables y alimentándolos con dietas adecuadas (Steffens y Strubbe, 1987). Sin embargo, una de las principales limitaciones para el desarrollo de la acuicultura la supone el coste y la disponibilidad de alimento (James et al., 1992).

Puesto que la alimentación representa uno de los mayores gastos en la producción intensiva de peces, el desarrollo de dietas comerciales capaces de satisfacer los requerimientos de la especie cultivada bajo unas condiciones determinadas y con el menor coste posible, es considerado como uno de los principales objetivos en las investigaciones en acuicultura (Tiews et al., 1979; Hardy, 1989).

En la dorada, se ha conseguido la formulación óptima y equilibrada de nutrientes para su mejor crecimiento en cultivo, aunque, aún hoy día, la dieta empleada depende en gran parte de la proteína animal.



### 1.2.1. Niveles de proteína y su metabolismo

Las proteínas son el componente fundamental (65-70%) del peso de la materia seca de los peces, la mayor parte de ellas se encuentra en el músculo esquelético. La proteína ingerida es hidrolizada en el digestivo hasta aminoácidos, estos son absorbidos y distribuidos en los diferentes tejidos, donde son utilizados para la síntesis de nuevas estructuras celulares (crecimiento), para reponer las ya existentes (mantenimiento) o bien, pueden ser catabolizadas para obtener energía en mayor o menor grado, dependiendo del estado fisiológico, edad y condiciones ambientales.

Las necesidades energéticas de los peces son diferentes de las de los mamíferos terrestres, así en comparación con otros vertebrados, el contenido proteico de la dieta de los peces es notablemente más alto (Cowey y Sargent, 1979; Wilson, 1986; Cowey, 1994). En aves y mamíferos, el nivel óptimo de proteína oscila entre el 12-25%. Los peces carnívoros requieren entre un 40-50% (Millikin, 1982), mientras que los omnívoros precisan entre un 35-45% de proteína (NRC, 1977).

Se han elaborado numerosos estudios en cuanto a las necesidades específicas de proteína en peces y se ha comprobado que pueden variar atendiendo a los siguientes factores: especie, talla, temperatura del agua, salinidad, calidad de la proteína, energía no proteica, racionamiento alimentario, densidad de cultivo... etc., (NRC, 1983).

Los primeros en estudiar las necesidades proteicas en la dorada fueron Sabaut y Luquet (1973), quienes establecieron que como mínimo debía existir un 45% de proteína en la dieta. Posteriormente, Vergara en 1992 las estableció en un 42% para peces de 80 g de peso y en un 55% de proteína para doradas de 2 gramos. En el mismo sentido, muchos autores coinciden en que los individuos jóvenes necesitan mayor concentración de proteínas en la dieta que los de mayor tamaño (Cho et al., 1985; Vergara, 1996a). Este efecto se relaciona con la disminución progresiva de la síntesis proteica corporal a lo largo del desarrollo, asociada a una menor velocidad de crecimiento (Fauconneau, 1985a; Houlihan y McMillan., 1989a).

El alto contenido de proteína en la dieta, así como la alta representación de especies carnívoras entre los peces (85%), es en realidad reflejo de una alta eficiencia en la transformación de energía; fruto del bajo coste de la termorregulación, la locomoción y la excreción mayoritariamente en forma de iones amonio en el medio acuático (Pandian y Vivekanandan, 1985; Kaushik, 1997).

En consecuencia, la demanda de sustratos no proteicos para fines energéticos disminuye, por lo que aumenta la relación óptima de proteína/energía en la dieta. No obstante, para una determinada especie la relación óptima de proteína/energía varía con la edad y el tamaño del animal (Satia, 1974; Kaushik, 1995). Es de suponer que variaciones similares también tienen lugar con la temperatura y el nivel de ración, aunque desgraciadamente ello está deficientemente tipificado.

En la dorada existen evidencias experimentales que demuestran que la composición óptima de la dieta varía en función de la tasa de ingesta (Company et al., 1999), la tasa de conversión del



alimento no disminuye en animales alimentados a saciedad con dietas de alto contenido proteico; mientras que con la reducción de la relación proteína/energía de la dieta hay que restringir la ingesta para seguir manteniendo una alta conversión del alimento.

A la hora de formular un pienso ideal para peces carnívoros cultivables se debe de tener presente, que la proteína tiene un papel crucial tanto cualitativo, como cuantitativo. En este sentido, establecer los requerimientos de proteína en la dieta de la especie a cultivar (mínimo nivel de proteína expresado como porcentaje del peso seco de la dieta que produce un máximo crecimiento, Pandian y Vivekanandan, 1985), es esencial para poder diseñar un pienso artificial bien equilibrado con el que obtener una alimentación rentable (de la Higuera, 1990). Los estudios sobre los requerimientos óptimos dietarios de proteína para peces son múltiples y diversos, y están afectados por la composición de las dietas y condiciones experimentales. En realidad, los peces como otros animales, no presentan un requerimiento de proteína “per se”, sino de un balance equilibrado entre aminoácidos esenciales y no esenciales disponibles a partir de la dieta mediante la digestión de las proteínas.

La proteína consumida por los peces es hidrolizada en aminoácidos, los cuales son absorbidos en el tracto intestinal y usados por diversos tejidos para sintetizar nuevas proteínas. Por otra parte, los aminoácidos en exceso, son utilizados como fuente de energía. Por ello, niveles en defecto de proteína provocan una reducción del crecimiento, incluso pérdida de peso. En contraposición, cuando la proteína está en exceso, sólo una parte es empleada para nueva síntesis proteica, siendo el remanente degradado para obtener energía (Wilson, 1986). Las proteínas están continuamente siendo sintetizadas y degradadas en los aminoácidos que las componen (Fauconneau, 1985; Jürs y Bastrop, 1995; Dabrowski y Guderley, 2002). Cuando las proteínas son hidrolizadas se obtienen un total de 20 aminoácidos. Estos aminoácidos son los productos finales de la digestión de las proteínas, esto indica claramente que la calidad de las proteínas vendrá definida por la calidad y cantidad de aminoácidos, así como por la disponibilidad de los mismos. A través del epitelio intestinal, los productos de la digestión proteica, principalmente aminoácidos libres, alcanzan el torrente sanguíneo. Esos aminoácidos absorbidos pueden seguir las siguientes rutas:

- Ser incorporados al pool metabólicos de aminoácidos libres, siendo mezclados con los aminoácidos libres originados en diferentes tejidos del organismo.
- Los aminoácidos en el pool metabólico pueden entrar en las rutas de síntesis de proteínas, y a su vez, los aminoácidos derivados de la degradación de las proteínas son incorporados al pool metabólico de aminoácidos libres, reflejando el balance neto de proteínas corporales.
- Participar en las rutas de síntesis de compuestos nitrogenados, tales como ácidos nucleicos, hormonas y enzimas.
- Pueden ser desaminados, originando cadenas hidrocarbonadas y grupos amino.
- Las cadenas hidrocarbonadas resultantes pueden ser oxidadas para obtener energía o entrar en las rutas de síntesis de lípidos, hidratos de carbono e, incluso, aminoácidos.
- Los grupos amino, liberados de los aminoácidos, son excretados como urea y amonio.

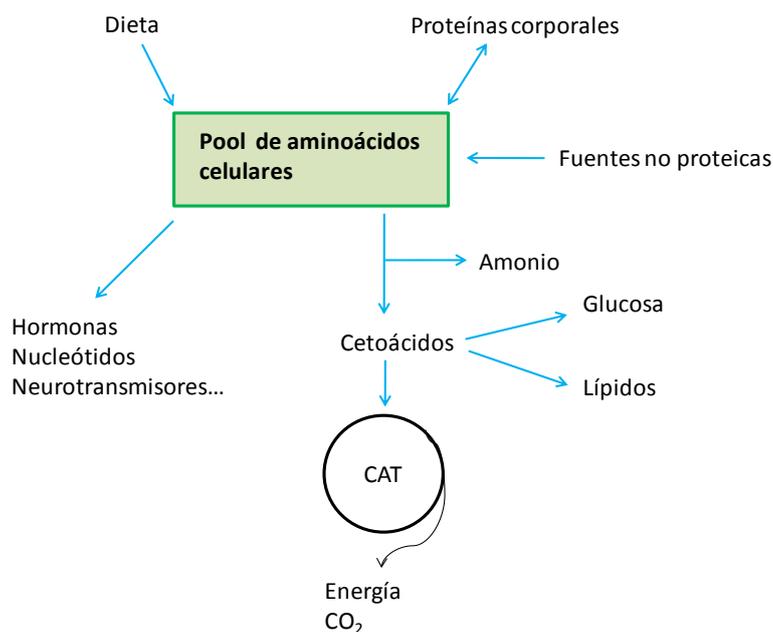


Figura 1.2. Rutas implicadas en el metabolismo de aminoácidos en peces.

Las tasas de proteínas son más altas en hígado, branquias, tracto digestivo, riñón y bazo, que en corazón y músculo blanco o rojo (Faunconneau, 1980; Smith, 1981). Pero, aunque la tasa del metabolismo de las proteínas es más baja en músculo, que en el hígado, la masa muscular excede cuantitativamente al resto de tejidos, siendo, por tanto, este tejido el más importante de todos para la síntesis de proteína. Asimismo, gran parte de la degradación y el catabolismo de los aminoácidos ocurre en el músculo (Hepher, 1988). En juveniles de dorada, los niveles de requerimientos de aminoácidos esenciales se refieren a cuatro de ellos (arginina, lisina, metionina + cisteína y triptófano) (NRC, 1983). En la **Tabla 1.1** se muestran los porcentajes necesarios de estos aminoácidos, según la cantidad de proteína dietaria.

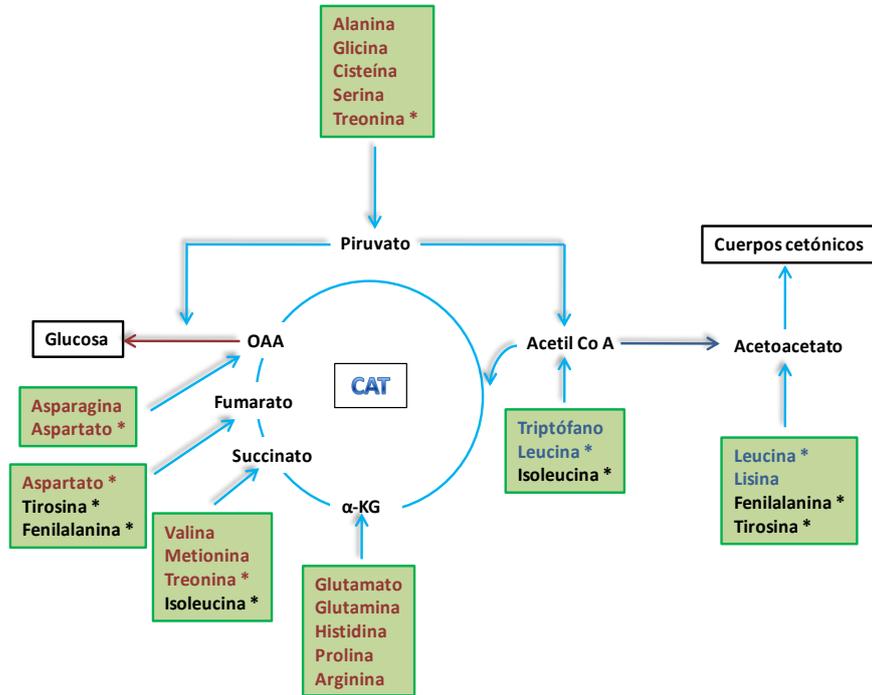
Tabla.1.1. Requerimientos de aminoácidos en la dorada (NRC, 1983)

Aminoácidos	Requerimientos		
	Proteína dietaria (%)	% de proteínas	% de dieta
<b>Arginina</b>	34	5,0	1,7
<b>Lisina</b>	34	5,0	1,7
<b>Metionina+Cisteína</b>	34	4,0	1,4
<b>Triptófano</b>	34	0,6	0,2

La síntesis de aminoácidos no esenciales, realizada principalmente por el hígado, se produce mediante transaminación a partir de intermediarios derivados de la glucolisis, el ciclo de krebs y la vía de las pentosas fosfato. Los mismos procesos son los que intervienen en el catabolismo de

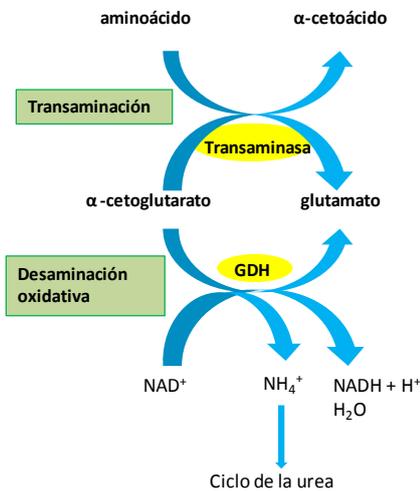


aminoácidos. Los aminoácidos se convierten en intermediarios del ciclo de Krebs para finalmente formar glucosa, acetoacetato o piruvato dependiendo de las necesidades celulares (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Catabolismo de aminoácidos. En granate se representan los aminoácidos glucogénicos, en azul, los cetogénicos, en negro, ambos y representados con asterisco los que presentan más de una ruta de entrada.

Las reacciones de transaminación se refieren a aquellas en las que un aminoácido se convierte en otro. Se realizan por medio de transaminasas que catalizan la transferencia del grupo amino ( $\text{NH}_3$ ) de un aminoácido a un  $\alpha$ -cetoácido, tal como piruvato, oxalacetato o más frecuentemente  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). Consecuentemente se forma un nuevo aminoácido y un nuevo  $\alpha$ -cetoácido (**Figura 1.4**). Las transaminasas más habituales en la transaminación son: alanina-aminotransferasa (Ala-AT) y asparto-aminotransferasa (Asp-AT). Requieren, como cofactor, piridoxal-fosfato (PLP), un derivado de la vitamina B6. Son reversibles, por lo que también pueden verse implicadas en rutas catabólicas de aminoácidos. Además de la transaminación, que generalmente constituye el



**Figura 1.4.** Esquema general de las reacciones de transdesaminación (transaminación y desaminación oxidativa) del metabolismo de los aminoácidos.



primer paso de degradación proteica, los aminoácidos, también se pueden catabolizar por desaminación oxidativa. La suma de ambas se denomina transdesaminación. Se conoce que en peces, el hígado y músculo blanco poseen capacidad para desaminar todos los aminoácidos (Van Waarde, 1983), aunque se sabe que en músculo esa degradación es menor (Fauconneau, 1985; Houlihan et al., 1986, Houlihan et al., 1988; Halver y Hardy, 2002).

En los últimos diez años, y como consecuencia del aumento del cultivo de la dorada, entre otras especies, todos los esfuerzos se han encaminado a reducir la cantidad de proteína dietaria y sustituirla por lípidos o carbohidratos (Bonamusa et al., 1991; García Alcázar et al., 1994; Santinha et al., 1996; Vergara et al., 1996b; Fernández et al., 1998; Metón et al., 1999b, Metón et al., 2000, Metón et al., 2004; Venou et al., 2003), o bien, sustituir la harina de pescado, por proteína de origen vegetal (Robaina et al., 1995; Gómez-Requeni et al., 2003; Pereira y Oliva-Teles, 2003; Sánchez Muros et al., 2003).

La harina de pescado es una materia prima de origen animal de elevada concentración proteica, con un valor nutritivo alto, en relación con las harinas vegetales, por su excelente equilibrio en la composición de aminoácidos, su adecuada composición en ácidos grasos para todos los peces, su contenido en vitaminas del grupo B, elevadas concentraciones de ácido fosfórico e incluso por la existencia de un “factor de crecimiento no identificado” (Robaina et al., 1995). Pero presenta la problemática, que su producción viene determinada por el nivel de recursos disponibles, que desafortunadamente cada vez son más escasos. De este modo, la harina de pescado se convierte en el ingrediente dietario empleado más caro. Por ello no es de extrañar, que muchos de los estudios de nutrición en acuicultura hayan desviado su atención a sustituir esta harina de pescado, al menos, en parte por otras fuentes proteicas alternativas, o bien por un mayor nivel de lípidos o carbohidratos (Tidwell y Allan, 2001; Tacon, 2003) con objeto de elaborar alimentos para peces de menor costo.

Las fuentes alternativas a la harina de pescado que se han venido empleando, hasta la actualidad, son:

- Proteínas de origen animal, entre las que se incluyen desperdicios de matadero (carne, huesos, plumas y sangre (Tacon et al., 1984), ensilados de peces (Tacon, 1979), derivados lácteos y algunas proteínas menos convencionales como las harinas de krill, lombriz y pupa de gusano de seda.
- Proteínas de origen vegetal, harinas de semillas y hojas. En este sentido, la harina de soja (Lovell, 1988) ha sido muy utilizada, así como, el gluten de maíz (Moyano, 1990), la harina de altramuces (en trucha arco iris, de la Higuera et al., 1988; Moyano et al., 1992, en carpa y tilapia, Viola et al., 1982), entre otras.
- Concentrados de proteínas vegetales, por ejemplo de patata (PPC) (Tacon et al., 1985) o de hojas (LPC) (Olvera-Novoa et al., 1990). Se trata de precipitados a partir de una suspensión acuosa mediante procesos de coagulación térmica.
- Proteínas de organismos unicelulares (SCP), levaduras, algas, bacterias y hongos.
- Fuentes de nitrógeno no proteico, como la urea o el ácido úrico.



- Encapsulación de aminoácidos, microdietas para larvas...
- Entre otras alternativas...

El problema principal de estas fuentes alternativas, son la deficiencia de algún aminoácido específico o el desequilibrio de aminoácidos en general. A esto hay que añadir la presencia de factores antinutricionales, principalmente en los ingredientes vegetales, aunque gracias a los adelantos tecnológicos (procesados con calor seco/húmedo, micronización, extrusión y expansión) se ha mejorado la digestibilidad de estas harinas; el que puedan ser perjudiciales para el pez si se suministran en altas concentraciones, como ocurre con las SCP (Sánchez-Muniz et al., 1979); la existencia de resultados contradictorios en unos estudios y otros; la influencia de la edad de la especie...

Todos estos hechos hacen que, a pesar de ser un tema ampliamente estudiado, y los piensos de peces estén bien formulados y equilibrados, se sigan encaminando estudios hacia la mejora del crecimiento de estos animales, en poco tiempo, con bajo costo y que el impacto medioambiental sea el mínimo posible.

### **1.2.2. Niveles de lípidos y su metabolismo**

Los lípidos en la dieta son fuente de ácidos grasos esenciales y energía para el normal desarrollo y crecimiento de los peces. Además, su capacidad de sustitución energética de proteína, asegura una mayor disponibilidad de aminoácidos para crecimiento (Vergara et al., 1996b). Así, por regla general, la adición de lípidos a la dieta contribuye a una mejor utilización de la proteína, reflejada en unas mejoras en el crecimiento de los animales y en los índices de utilización proteica (de la Higuera et al., 1977a; Beamish y Medlan, 1986). No obstante, el contenido graso total no sólo depende del nivel lipídico, sino también del contenido y tipo de carbohidratos, y en general, del nivel energético de la dieta y de la ingesta calórica total (de la Higuera et al., 1977b; Buckley y Groves, 1979; Cardenete et al., 1987).

En este sentido, existen numerosos estudios en los que se valora la utilización nutritiva de la proteína en función del aporte de lípidos. Boonyaratpalinn (1991) determinó que el nivel de proteínas en dorada se podría reducir de un 50% a un 45% sin afectar al crecimiento, siempre que se aumentaran los lípidos de un 15% a un 18%. Kalogeropoulos et al. (1992) establecieron que basta un 12% de lípidos en la dieta para cubrir las necesidades nutritivas de la dorada, siempre que sean suministrados como aceite de pescado y no como aceite vegetal, pues Kissil et al. (1982) encontraron que, en la dorada, el aceite de pescado induce una mejor utilización de la proteína, que el aceite de soja.

Los lípidos han sido tradicionalmente utilizados en la sustitución parcial de la proteína dietaria para obtención de energía, ya que, además de ser fuente fundamental de ácidos grasos esenciales y vehículo transportador de vitaminas y micronutrientes liposolubles, son fácilmente digeridos y metabolizados por los peces (Sargent et al., 1999, Sargent et al., 2002; Oliva-Teles, 2000). Muchas



especies han mostrado la eficiencia de este nutriente en el efecto ahorro de la proteína dietaria, aunque los niveles recomendados por cada autor varían dependiendo de las condiciones experimentales (Dias et al., 2003).

En el caso de la dorada, Vergara et al. (1996b) estimaron que el nivel de proteína podía reducirse del 58% al 46% incrementando los lípidos desde el 9 al 15%. En esta misma especie, García-Alcázar et al. (1994) y Vergara et al. (1999) propusieron una elevación del contenido lipídico hasta el 22% para esta misma especie, sin que se vieran afectados los parámetros de crecimiento, utilización del alimento o contenido en grasa corporal. Otros estudios en dorada respaldan el uso eficaz que esta especie hace de los lípidos dietarios para ahorro proteico (Santinha et al., 1999).

Sin embargo, si se considera que la principal fuente de los lípidos es el aceite de pescado, posiblemente su utilización presenta el mismo inconveniente que la proteína. De esta forma, también se han realizado estudios dirigidos a la posibilidad de sustituir el aceite de pescado, por otros aceites de origen vegetal (Tacon, 1994; Watanabe, 2002).

Por otra parte, el suministro de energía digestible en las dietas a través de lípidos y carbohidratos debe ser establecido dentro de unos límites (Pérez-Jiménez, 2007). Así, aquellos casos en los que la relación proteína/energía (P/E) es muy baja y existe un exceso de energía no proteica, podría tener como consecuencia una prematura saciedad de las necesidades energéticas de los peces, generando una interrupción voluntaria de la ingesta antes de consumir la proteína y otros nutrientes necesarios para cubrir las mínimas necesidades para el correcto desarrollo (Watanabe, 1982; Ellis y Reigh, 1991).

Además, altos niveles de lípidos en la dieta pueden afectar la composición corporal de los peces debido a un incremento en la acumulación lipídica, con las consecuencias generadas sobre la calidad del producto (Vergara et al., 1999). Por el contrario, y como ya hemos indicado, una alta relación P/E, es decir, insuficiente energía no proteica, supondría un uso de las proteínas dietarias para la obtención de energía comprometiendo el crecimiento y aumentando la liberación de compuestos nitrogenados al medio (Shyong et al., 1998).

Es lógico pensar, por tanto, que la determinación precisa de las necesidades de proteína para una especie estará marcada por el delicado balance entre proteína y energía, siendo necesaria la optimización de esta relación con el aporte adecuado de carbohidratos y/o lípidos.

Diversos estudios indican que los peces capaces de utilizar altos niveles de lípidos dietarios como fuente de energía, requieren bajas relaciones P/E. Así, Lee y Putnam, (1980) establecieron que la relación óptima P/E para la trucha arco iris era de 22 g MJ<sup>-1</sup>. En el caso de lubina, la relación óptima se estimó en 20,5 g MJ<sup>-1</sup> (Dias et al., 1998). Estas ligeras variaciones se ven afectadas por la calidad de los nutrientes, así como por las necesidades específicas de la especie.



La homeostasis lipídica es el equilibrio entre el aporte de lípidos en la dieta y la síntesis “de novo”, remodelación, almacenamiento, movilización y el metabolismo neto (Tocher, 2002). Los lípidos se clasifican atendiendo a sus funciones, ya que químicamente son un grupo muy heterogéneo de compuestos. A grandes rasgos, en peces abundan ácidos grasos libres, fosfolípidos polares (con un papel fundamental en las membranas celulares) y triacilglicéridos neutros (de almacenamiento en la mayoría de vertebrados). Los lípidos, y en particular los triglicéridos, junto con los ácidos grasos que los componen son la principal fuente de energía para el crecimiento, reproducción y natación en los peces.

El catabolismo de lípidos en peces, es similar al de mamíferos (Tocher, 2002). El almacenamiento de estos se hace en forma de triglicéridos y son transportados acoplados a la albúmina y quilomicrones (Sheridan, 1991). A diferencia de mamíferos, en peces, la acumulación de triglicéridos ocurre en varios tejidos, como el hígado, tejido adiposo perivisceral, músculo o en el tejido subcutáneo.

La síntesis de ácidos grasos, se realiza principalmente en el hígado y requiere la participación del complejo ácido graso sintetasa. Los ácidos grasos sintetizados “de novo” son los saturados, palmitato (C16), estearato (C18) y miristato (C14). Los ácidos linoléico (C18:2 n6) y linolénico (C18:3 n3) son esenciales tanto en peces, como en el resto de vertebrados. Los ácidos grasos aportados por la dieta, y los sintetizados “de novo”, pueden sufrir la acción de desaturasas y elongasas a distintos niveles de la cadena hidrocarbonada, y formar lípidos más complejos.

Los ácidos grasos obtenidos de la degradación de los lípidos, por acción de lipasas, son transportados a la mitocondria por la acción de acil-carnitina transferasa, en donde sufren ciclos sucesivos de  $\beta$ -oxidación originando moléculas de acetil-CoA que entra en el ciclo de Krebs para finalmente conseguir la obtención de energía.

### 1.1.2.3. Niveles de carbohidratos y su metabolismo

Los carbohidratos también podrías sustituir a las harinas de pescado en la dieta. En peces, no se han encontrado necesidades reales de este nutriente (NRC, 1993; Wilson, 1994); aunque su inclusión, llevaría numerosos beneficios. Así, por ejemplo, el empleo de carbohidratos supondría una reducción en los costes de alimentación, al igual que una mejora en las propiedades físicas del alimento fabricado (Wilson, 1994). Además, un nivel adecuado de carbohidratos digeribles podría minimizar el catabolismo de las proteínas con fines energéticos o proveer de intermediarios metabólicos para la síntesis de otros compuestos biológicamente importantes, lo cual aumentaría la retención proteica, favoreciendo el crecimiento y minimizando la liberación de productos nitrogenados al medio (Wilson, 1994; Shiao y Lan, 1996; Hemre et al., 2002).

Sin embargo, la capacidad de los peces para utilizar los carbohidratos de la dieta como fuente de energía varía ampliamente entre especies (Pérez-Jiménez, 2007). Estas diferencias parecen estar relacionadas con el sistema digestivo y el metabolismo de los peces, que se encuentran adaptados a



los nutrientes existentes en el medio acuático donde viven, condicionando la alimentación (Krogdahl et al., 2005). Así, la utilización de carbohidratos por la mayoría de los peces carnívoros son generalmente más bajas que la de los herbívoros u omnívoros (Hidalgo et al., 1999; Yamamoto et al., 2001).

Por otra parte, en general, los peces de agua dulce y templada parecen digerir más eficientemente los carbohidratos que los peces marinos y de agua fría (Shimeno et al., 1977; Wilson, 1994). Además de las diferencias interespecíficas, la eficiencia intraespecífica de la utilización de carbohidratos en la dieta está condicionada por muchos factores, tanto por la complejidad y el tratamiento físico al que han sido previamente sometidos, como por su nivel de inclusión dietaria (Krogdahl et al., 2005).

En general, los peces parecen mostrar una reducida capacidad para digerir carbohidratos no pretratados y de mayor complejidad molecular. Por ejemplo, el empleo de almidón crudo, en vez de gelatinizado, o el uso de carbohidratos de menor peso molecular (dextrina, maltosa, glucosa, etc.) disminuye los coeficientes de digestibilidad aparente de este nutriente en especies como la dorada (Venou et al., 2003), entre otras especies.

El nivel adecuado de inclusión de carbohidratos digestibles se ha establecido entre un máximo recomendado del 20% para especies carnívoras, incluyendo salmónidos y peces marinos, y el 40% para especies omnívoras de agua caliente (Wilson, 1994). Existe controversia de resultados, en cuanto a la utilización de carbohidratos digestibles; así algunos autores, (Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993; Peragón et al., 1999a) obtienen mejores resultados de índices de utilización proteica (CEC y VPP) en dietas que incluían carbohidratos digestibles, lo que confirmaría el buen uso de este nutriente para promover el ahorro proteico con fines estructurales; pero, por el contrario, también existen, otros parámetros afectados negativamente cuando se incluyen carbohidratos en la dieta (Pérez et al., 1997; Hillestad et al., 2001). A su vez, existe controversia, entre si son los carbohidratos menos tratados y complejos, o, por el contrario, los más complejos, son los que suponen mejoras en los índices de crecimiento (Venou et al., 2003; Tan et al., 2006). Por otro lado, otros autores no encuentran efecto alguno en el crecimiento, utilización nutritiva del alimento o eficiencia de la proteína para crecimiento, derivado de la inclusión de distintos tipos y niveles de carbohidratos en las dietas (Martino et al., 2005; Enes et al., 2006).

Por lo que respecta a la influencia del balance de micronutrientes dietarios sobre el metabolismo intermediario, distintos estudios han observado que los peces son capaces de adaptarse a las nuevas situaciones nutricionales adaptando su perfil metabólico (Walton y Cowey, 1982; Lundstedt et al., 2004).

En términos muy generales, las principales modulaciones metabólicas generadas por el estado nutricional de los peces implicarían que, dietas ricas en proteína estimularían las vías proteolíticas y gluconeogénicas. Por otro lado, la sustitución parcial de las proteínas por lípidos inhibirían las vías



lipogénicas, mientras que el uso de carbohidratos estimularía la glucólisis, glucogénesis y lipogénesis, disminuyendo la actividad de catálisis de las proteínas y gluconeogénesis.

Los principales efectos de dietas hiperproteicas son un incremento en la actividad hepática de los enzimas transaminasas, GOT, Ala-AT y GDH, representativas del catabolismo de aminoácidos (Suárez et al., 1995; Sánchez-Muros et al., 1998; Bibiano Melo et al., 2006). Sin embargo, otros autores apuntan que la actividad de estos enzimas no se ve afectada por el nivel de proteína dietaria (Cowey y Walton, 1989; Kirchner et al., 2003).

En cuanto a la sustitución parcial de proteína por carbohidratos o lípidos parece producir una disminución en la actividad de estas transaminasas (Suárez et al., 1995). Este aumento de los enzimas degradativos de aminoácidos, consecuencia de un mayor nivel de proteína de la dieta, suele ser paralelo a un descenso en la actividad de la vía glucolítica y al incremento de la vía gluconeogénica, como se observa en la actividad FBPasa hepática en especies como la dorada (Caseras et al., 2002). A su vez, el uso de dietas pobres en proteínas también parece disminuir la actividad de los enzimas hepáticos generadores de NADPH (Walton, 1986; Barroso et al., 1993), aunque la ausencia de tal efecto también ha sido observada por otros autores (Lupiáñez et al., 1989).

Tradicionalmente, los peces se pensaba que eran incapaces de utilizar metabólicamente la glucosa ingerida (Barroso et al., 2001), encontrando altos niveles de glucosa postprandial en la mayor parte de teleósteos, con ligeras diferencias entre especies (Bergot, 1979).

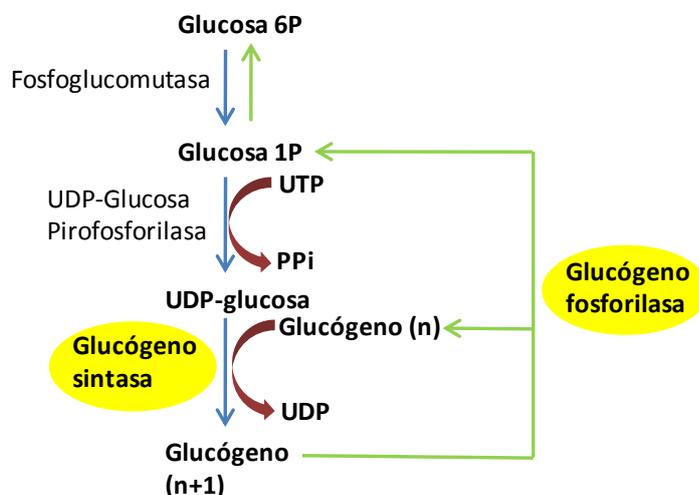
Actualmente, se conoce que sí la metabolizan, pero la capacidad de fosforilación de la glucosa que presentan las enzimas que la llevan a cabo es limitada, o bien, que presentan diferente receptividad tisular a la glucosa (Nagayama y Ahshima, 1974). En cualquier caso, tras la digestión y absorción de los carbohidratos dietarios, la glucosa liberada en el proceso de glucólisis, posee diferentes destinos metabólicos (Moon y Foster, 1995; Dabrowski y Gudereley, 2002).

En condiciones de anaerobiosis, el piruvato es transformado en lactato en una reacción catalizada por el enzima láctico deshidrogenasa (LDH) en presencia de NADH que es oxidado a  $\text{NAD}^+$ . Esto ocurre con frecuencia en el músculo blanco de los peces. En condiciones de aerobiosis, el piruvato es descarboxilado para producir acetyl-Co A que será posteriormente empleado en la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol, cuerpos cetónicos o para su participación en el ciclo de Krebs. En dicho ciclo el acetyl-Co A, procedente tanto de la degradación de la glucosa como del catabolismo de ácidos grasos y aminoácidos cetogénicos, es oxidado completamente. En el proceso se obtiene  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y poder reductor ( $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ ) que se utiliza en la fosforilación oxidativa para la formación de energía. Una ruta alternativa a la glucólisis, es el ciclo de las pentosas fosfato (CPP), cuya función principal es la de producir equivalentes de reducción, NADPH necesarios en los procesos biosintéticos, fundamentalmente de ácidos grasos insaturados y esteroides. Además genera ribosa, necesaria para la síntesis de nucleótidos. El NADPH, también presenta un papel protector frente a radicales libres.



El lactato es un metabolito que proviene de la reducción del piruvato en condiciones de anaerobiosis. En peces, esto ocurre, en el músculo blanco ante una situación de ejercicio intenso. Este tejido obtiene gran parte de la energía necesaria para su funcionamiento de la vía glucolítica, así durante el ejercicio se van a movilizar reservas de glucógeno para obtener glucosa, la cual se oxidará rápidamente. En este punto, es en donde los peces presentan una particularidad con respecto a los demás vertebrados, y es que el lactato que se produce en exceso en el músculo, no va directamente a la sangre, sino que gran parte es retenido en el músculo, y transformado en piruvato para recargar los almacenes de glucógeno “in situ”. Si los peces, no hicieran esto, la concentración de lactato sería elevadísima (Laberee y Milligan, 1999; Hochachka y Somero, 2002). El lactato, junto con los aminoácidos, es el sustrato preferido para las rutas gluconeogénicas en peces (Suárez y Mommsen, 1987; Moon y Foster, 1995). Se puede utilizar pues, como precursor de la síntesis de glucosa y/o de la acumulación de glucógeno en el hígado, en situaciones de intensificación de la glucolisis en otros tejidos como el músculo.

Por otra parte, la glucosa puede almacenarse como fuente de energía en forma de glucógeno, a través de glucogénesis. El glucógeno es un polímero de almacenamiento de glucosa en animales, incluidos los peces, y constituye una fuente de glucosa disponible rápida en tiempos de necesidades metabólicas. La síntesis y degradación de glucógeno se realiza según se puede ver en la **Figura 1.5**. La glucógeno sintasa es la enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis y se activa cuando los niveles celulares de energía son altos, es decir cuando los niveles de ATP, glucosa y glucosa 6-P son elevados, inhibiéndose cuando estos son bajos o en presencia de AMP. La glucógeno fosforilasa es la enzima que regula el proceso de degradación, y se activa cuando existen demandas de energía, y en presencia de AMP, inhibiéndose en la situación contraria.



**Figura 1.5.** Esquema general de la síntesis (flechas azules) y degradación (flechas verdes) del glucógeno. Rodeadas aparecen las dos enzimas reguladoras del proceso.



En el hígado de los peces, los niveles de glucógeno aumentan, cuando estos ingieren una dieta con un alto contenido en carbohidratos (Suárez et al., 1995; Metón et al., 1999; Borrebaek y Christophersen, 2000). Un periodo de ayuno, provoca un descenso en los niveles de glucógeno (Navarro et al., 1992; Metón et al., 1999; Borrebaek y Christophersen, 2000), que se recuperan con la realimentación, en dependencia del contenido de la dieta y la ración.

### 1.1.2.3. Efecto de la restricción alimenticia

En la naturaleza, la disponibilidad de alimento no es constante, por lo que a menudo los animales se enfrentan a periodos de privación o restricción de alimento como parte de su ciclo vital. Cuando la disponibilidad de alimento vuelve a restablecerse, el animal recupera peso a lo largo de un periodo de crecimiento acelerado cuya intensidad y duración depende de la crudeza del periodo de restricción de alimento y de la especie en estudio. Este fenómeno denominado, “crecimiento compensatorio”, también se da en animales de granja y ha sido descrito para una gran variedad de especies de peces, tales como: trucha arco iris (Weatherley y Gill, 1981; Quinton y Blake, 1990; Teskeredzic et al., 1995; Jobling y Koskela, 1996), pescardo (Russell y Wooten, 1992), pez gato (Kim y Lovell, 1995; Gaylord y Gatlin, 2001), salmón (Nicieza y Metcalfe, 1997), carpa híbrida (Hayward y cols., 1997) y tilapia (Melard et al., 1998).

Los mecanismos últimos que rigen el crecimiento compensatorio son todavía objeto de debate, aunque se ha especulado sobre su posible aplicación en cultivos de peces de interés comercial en el área mediterránea (lubina y dorada). La presión evolutiva ha hecho que este crecimiento explosivo durante la fase de crecimiento compensatorio sea especialmente evidente en especies de peces adaptadas a aguas frías (Schwarz et al., 1985; Kim y Lovell, 1995; Hayward et al., 1997). Por tanto, es de suponer que especies como la lubina y la dorada, adaptadas a zonas templadas de regiones meridionales, no sean el mejor modelo de crecimiento compensatorio en peces (**Figura 1.6**). Sin embargo, voluntaria o involuntariamente, la práctica de la acuicultura ha hecho que se seleccionen sistemáticamente individuos con una alta capacidad de ingesta, pero no necesariamente con una alta eficiencia de conversión del alimento. De ahí el interés en determinar en qué medida, regímenes de alimentación restringida mejoran la eficiencia del cultivo.

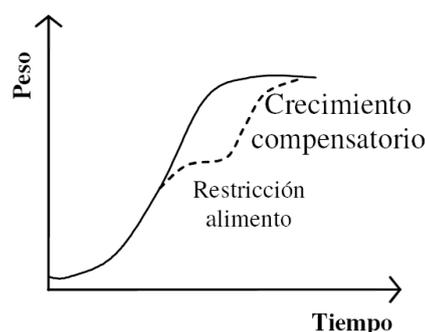


Figura 1.6. Modelo de crecimiento compensatorio (modificado, Mingarro et al., 2003).



De acuerdo con el modelo de crecimiento compensatorio, en ausencia de restricción de la ingesta, la curva de crecimiento sigue un patrón normal. No obstante, un periodo de ayuno o restricción de alimento causa una desviación de la curva teórica, y cuando el alimento está de nuevo disponible en exceso, el animal gana peso rápidamente en un intento de recobrar el patrón ideal. Los cambios que acontecen en dicho proceso son, por consiguiente, hiperfagia y una mejora en las tasas de conversión del alimento. En cuanto a los factores que regulan la duración e intensidad de este crecimiento compensatorio se incluyen la severidad y duración de la restricción, el tamaño del animal, el sexo, la edad, el estado de la madurez sexual y las condiciones de cultivo (Marais et al., 1991; Stamataris et al., 1991; Jones y Farrell, 1992a; Jones y Farrell, 1992b).

El uso inadecuado de dietas hiperenergéticas, con un alto contenido graso, puede provocar un aumento en el grado de adiposidad de los animales en cultivo. Ello comporta por sí mismo una pérdida del valor añadido que supone la incorporación del pescado en la dieta humana, sin olvidar que ello también altera la percepción de frescura y el grado de conservación, así como las propiedades físicas y organolépticas (Sheehan et al., 1996; Gjedrem, 1997; Einen y Skrede, 1998). De ahí que, como mal menor, una práctica habitual en ciertos cultivos haya sido imponer un periodo de ayuno relativamente largo a los peces destinados a la venta (Blokus, 1986; Lie y Huse, 1992; Bonnet et al., 1996; Einen et al., 1998).

Un incremento excesivo del grado de adiposidad también puede comprometer la capacidad de respuesta del sistema inmune. Diferentes estudios en vertebrados superiores muestran que la obesidad y el consumo de dietas con alto contenido en grasas perjudican la respuesta inmune y aumentan el riesgo de enfermedades infecciosas graves (Lamas et al., 2002).

Por otra parte, la obesidad en humanos se ha relacionado con una gran variedad de problemas de salud, entre los que se incluyen hipertensión, dislipemia, enfermedades cardiovasculares, *diabetes mellitus*, lipoapoptosis de las células pancreáticas y ciertos tipos de cáncer (Unger, 2000; Samartin y Chandra, 2001).

En la última década, numerosos estudios han intentado establecer las interrelaciones existentes entre el nivel de grasa de la dieta y el sistema inmune (Calder, 1998). Sin embargo, aunque cada vez hay más evidencias de las ventajas de mantener un determinado grado de adiposidad, los mecanismos y vías metabólicas implicadas en ello no están delimitados, y sólo existe un cuadro clínico que relacione adiposidad con disfunciones de capacidad de respuesta (Lamas et al., 2002).

Como sabemos, uno de los factores que afecta al crecimiento en los peces es la cantidad de alimento ingerido (energía y nutrientes). Dependiendo de éste, así será el crecimiento del animal. La lógica, nos lleva a pensar que cuanto más alimento ingiera un animal, más crece, lo cual es cierto, pero debemos de tener en cuenta la calidad de ese crecimiento. En este sentido, “una dorada alimentada hasta la saciedad, no es un pez mejor alimentado” (Pérez-Sánchez et al., 2002).



Este autor afirma que los piensos hiperenergéticos de alto contenido en grasas, aplicados en piscicultura mejoran la tasa de crecimiento de las doradas y acortan el ciclo de engorde. La contrapartida es que estos piensos no sólo tienen altos costes, sino que también podrían ser demasiado ricos en grasas. A su vez, las doradas demasiado alimentadas, no sólo tienen más grasa, sino que presentan una peor salud.

La dorada en estado natural, ha desarrollado un ciclo de crecimiento compensatorio, en el que, como su propio nombre indica, compensan los periodos de restricción alimentaria con estados posteriores de hiperfagia, en el que el animal come mucho más, y recupera su peso. En condiciones de cultivo, estos ciclos de alimentación quedan enmascarados, de tal modo que el alimento está asegurado y es masivo para disminuir el tiempo de engorde, y, además, el ciclo de crecimiento está “cambiado” (no es el natural), ello provoca un desajuste hormonal, que puede provocar alteraciones.

De este modo, la optimización de las pautas de alimentación es beneficiosa para los propios animales, que crecen en mejores condiciones, con menos riesgo de contraer enfermedades, y también se ve beneficiada la empresa y el consumidor, ya que se optimizan los recursos disponibles y el producto final presenta mayor calidad. La sugerencia de estos autores (Mingarro et al., 2004), es que una buena dieta, para el crecimiento de las doradas en condiciones de piscifactoría, necesita de una mayor regulación de la ingesta, pudiendo estar la clave en una dieta restringida, en la que se tenga presente la composición de la dieta y el origen de las materias primas utilizadas en la fabricación de estos piensos.

Estos investigadores realizaron ensayos en los que compararon el efecto de alimentar doradas a saciedad, con doradas alimentadas con dieta restringida en tres estadios del desarrollo diferente, y los resultados que encontraron fueron que las doradas sometidas a la alimentación restringida presentaban un mejor estado inmunitario, menor tasa de mortalidad, menos infecciones por patógenos y menos alteraciones, en general, que las doradas alimentadas a saciedad (Mingarro et al., 2003).

Muchas especies de peces pueden, durante algún periodo de su vida, estar sometidas a variaciones en la disponibilidad de alimento debido a diversas situaciones, por ejemplo: de tipo estacional, climáticas, por competición alimentaria interespecífica o migraciones reproductivas. Estos periodos de ayuno son entonces condiciones frecuentes en la vida de los peces.

Las modificaciones del entorno condujeron en la vía evolutiva de las especies al desarrollo de cambios metabólicos y de comportamiento con el fin de adaptarse a las condiciones imperantes (Bastrop et al., 1992; Méndez y Weiser, 1993). De este modo algunas especies pueden sobrevivir varios meses e incluso años sin ingerir alimento (Shimeno et al., 1990; Olivereau y Olivereau, 1997).

Las respuestas metabólicas a las oscilaciones en la disponibilidad de alimento varían dependiendo de numerosos factores, tales como la especie, la edad, y el tamaño de los peces (Stimpson, 1965; Shimeno et al., 1990; Méndez y Weiser, 1993).



Así, las consecuencias del ayuno sobre el metabolismo son más pronunciadas en larvas en estadios juveniles que en peces adultos, probablemente debido a una menor cantidad de reservas energéticas (Gadomski y Petersen, 1988; Richard et al., 1991). Causas extrínsecas como la temperatura también pueden tener incidencia en la respuesta metabólica (Brett, 1979; Méndez y Wieser, 1993).

Otro factor importante a tener en cuenta en la dinámica de adaptación es la duración del periodo de ayuno y realimentación, ya que esto condiciona la priorización de una u otra vía metabólica. Las pautas de alimentación de las distintas especies también influyen en la respuesta adaptativa. Así, las especies herbívoras y detritívoras ingieren alimento en forma continua, mientras que las carnívoras lo hacen con menos frecuencia y, por tanto, se encuentran mejor adaptadas a periodos de restricción alimentaria (Bond, 1996).

Hoy en día, la aplicación de restricción alimentaria en las especies de granja se estudia y aplica para observar el comportamiento de diferentes criterios de selección, como acumulación de grasa, peso corporal compensatorio (Summers et al., 1990), eficacia alimentaria (Robinson et al., 1992); recientemente se está utilizando para disminuir los problemas locomotores (deformaciones óseas y problemas de patas/aletas), así como para el control de enfermedades metabólicas (Arce et al., 1992). Estos estudios se han realizado sobre todo en ganado vacuno, pollos, cerdos, y en peces; en estos últimos, las investigaciones sobre la restricción de alimento han consistido en periodos de ayuno, seguidos de realimentación.

Numerosos trabajos han estudiado la influencia de la restricción alimenticia sobre la productividad y la calidad en la carne en cerdo blanco (Daza et al., 2006; Heyer y Lebret, 2007). Sin embargo, la información existente sobre este particular en cerdo Ibérico en cría intensiva es escasa (Serrano et al., 2008b). La disminución de la ganancia media diaria de peso durante la fase de restricción es proporcional al porcentaje de restricción del consumo practicado en una especie cruzada de cerdo ibérico (Ibérico x Duroc) en cultivo intensivo (Serrano et al., 2008b).

Tras la fase de restricción de alimento, una vez que todos los cerdos recibieron pienso *ad libitum*, los cerdos que previamente habían estado restringidos comieron un 9% más, crecieron un 20% más y convirtieron un 13% mejor que los cerdos que fueron alimentados *ad libitum*. En cualquier caso, el incremento del consumo y la mejora de la ganancia que tuvo lugar en esta fase de alimentación *ad libitum* no compensó el pobre crecimiento que tuvo lugar durante la fase de restricción. En consecuencia, al final del ensayo los cerdos alimentados *ad libitum* pesaron 8 kg más que los cerdos restringidos. Los autores concluyeron que una restricción del 82% del consumo *ad libitum* de 152 a 201 días y del 72% de 202 a 263 días de edad permite ralentizar el crecimiento de los cruces de cerdo Ibérico x Duroc alimentados con pienso hasta el sacrificio mejorando el rendimiento de partes nobles perfiladas sin perjudicar la eficiencia alimenticia y la calidad de la carne. Se ha recomendado aplicar porcentajes de restricción en función del sexo de manera que estos sean mayores, cuanto mayor sea el ritmo de crecimiento.



Sin embargo, Serrano et al., 2008a han observado que machos castrados y hembras castradas de cerdo Ibérico x Duroc de 25 a 151 kg consumen más pienso y tienden a convertir peor el alimento, que hembras puras, sin que se detecten diferencias en cuanto al crecimiento. Por lo tanto, de confirmarse estos resultados, el porcentaje de restricción aplicado podría ser igual para machos castrados, hembras castradas y hembras enteras facilitando el manejo en granja.

Sin duda alguna, la evolución genética de algunos animales de granja ha traído consecuencias favorables a la industria productiva, ya que mejora el índice de conversión alimentaria y reduce el tiempo de finalización de los animales cultivados, entre otras; sin embargo, a partir de la necesidad de alimentar a los animales de manera constante, su metabolismo acelerado propicia una mayor demanda de nutrientes, lo que se refleja en un crecimiento acelerado, que posteriormente provoca problemas de origen metabólico, como puede ser la ascitis en pollos, y sobrepeso, como los defectos o deformidades en el esqueleto o patas; además, al suministrar alimento a libre acceso, los pollos se vuelven, hasta cierto grado, ineficientes, debido a que el desperdicio de alimento por las aves se vuelve un inconveniente (Mc Kay, 1989).

El empleo de programas de restricción alimenticia en pollos de engorde, generalmente se utiliza para disminuir la incidencia del síndrome ascítico (Arce, 1993).

Por otro lado, son varios los autores que han abordado el estudio de relación que existe entre la frecuencia de alimentación y ciertos parámetros de cultivo como la tasa de conversión del alimento, el aprovechamiento de la proteína o el crecimiento (Shearer, 1994; Guinea y Fernández, 1997). Esta relación puede deberse bien a que un aumento de la frecuencia de alimentación produzca un aumento en la ingesta, o que, a igualdad de alimento ingerido, la ingestión más o menos pausada conlleve un aprovechamiento distinto del mismo. Cuando se alimentan salmónidos con una ración diaria similar, el aumento del número de veces en que se distribuye no parece afectar a su composición corporal (Shearer, 1994). Generalmente, un largo periodo con varias tomas durante el día, régimen característico de las granjas de salmones, produce unos niveles relativamente constantes de metabolismo y excreción (Bergheim et al., 1991).

Asimismo, la frecuencia de alimentación ejerce un efecto sobre las relaciones sociales existentes en un grupo de peces confinados. En muchas especies existen comportamientos jerárquicos que regulan la toma de alimento (Jobling, 1983). Por regla general, los peces dominantes comen primero hasta la saciedad, no pudiendo alimentarse los dominados hasta ese momento. De acuerdo con experimentos preliminares realizados por Ruohonen (1986) con el salmón atlántico, *Salmo salar*, el crecimiento de los alevines y los índices de eficiencia alimentaria aumentan con la automatización de la alimentación.

Por otro lado, la variación de tallas disminuye cuando se usa la automatización ya que pueden utilizarse frecuencias de alimentación muy altas. Esto afecta a las jerarquías sociales de los peces dentro de un grupo. La frecuencia alimentaria no afecta únicamente a los parámetros de cultivo citados; puede modular asimismo el perfil diario de consumo de oxígeno (Yager y Summerfelt, 1993).



Esta característica tiene una gran importancia en la gestión de un cultivo productivo ya que determinadas frecuencias pueden producir picos de consumo de oxígeno que deben preverse a la hora de suministrar los caudales de agua pertinentes.

Según Beamish y Mc Mahon (1988) el incremento calórico aparente (SDA) relativo a la energía digerida por juveniles de *Stizostedion vitreum* no se ve afectado de forma demostrable al distribuir la ingesta diaria en una, dos o tres tomas idénticas. Hamada y Maeda (1983) y Guinea y Fernández (1997) también encontraron valores similares de SDA en *Cyprinus carpio* y *Sparus aurata* respectivamente, alimentadas con cantidades similares de alimento en el día, pero distribuido en diferente número de comidas.

Si otros componentes del metabolismo permanecen constantes, la alimentación continua a mayores niveles de ración produce un mayor incremento en las tasas metabólicas, y una mayor magnitud de la SDA (Lucas y Priede, 1992). Opinión contraria es lo observado por Boyce y Clarke (1997) en el pez antártico *Harpagifer antarcticus*, en el que la SDA no se ve afectada ni por el tamaño de la ración, ni por el número de veces en que se distribuye. Solo depende de si se alimenta o no al pez. A la luz de lo observado, estos autores afirman que el coste energético absoluto de procesar una comida es independiente del tamaño de comida.

Desde el punto de vista fisiológico, en una situación de restricción nutricional los requerimientos de energía pueden llegar a ser tan bajos como los correspondientes al metabolismo en ayunas. Esto es debido a que una restricción en la cantidad y/o calidad de la ración, y la consecuente reducción en la cantidad de energía y proteína disponibles, pueden generar una disminución en el tamaño del tracto gastrointestinal, hígado, riñones y corazón; estructuras que concentran el 40% de los requerimientos energéticos del animal.

Esta disminución de los requerimientos energéticos persiste en el animal durante 2-15 semanas después de haber superado el estrés nutricional (Ryan et al., 1993). La disminución del número de células de los órganos es un fenómeno poco común en situaciones de restricción nutricional (Sainz et al., 1995). Aunque un animal en situación de bajo plano nutricional muestra pérdidas en las reservas corporales de grasa y proteína, éstas se encuentran subordinadas a la reducción de los gastos energéticos de mantenimiento por disminución del tamaño de los órganos antes mencionados.

La primera vez que se hizo mención a que la restricción calórica retrasa el envejecimiento, y es capaz de prolongar la vida útil fue en 1935 por McCay (McCay et al., 1935). Desde entonces, se han realizados observaciones similares en variedades de especies, incluyendo ratas, ratones, peces, moscas, gusanos y levadura (Barrows et al., 1982; Weindruch et al., 1988). Existen datos, que apoyan la teoría que la tasa de mortalidad es menor en monos que consumen menos calorías, que en los que no (Kemnitz et al., 1993; Bodkin et al., 1995; Mazat et al., 2001). Además, los monos sometidos a restricción calórica tienen una menor temperatura corporal y una menor concentración en insulina (Roth et al., 2002), aunque ninguno de estas dos variables son marcadores biológicos de longevidad en roedores. La restricción calórica, también supone en roedores, una mayor concentración en



sulfato de dehidroepiandrosterona (Roth et al., 2002). La importancia de este compuesto aún no se conoce con exactitud, pero parece ser un marcador de longevidad en seres humanos (Mazat et al., 2001; Ravaglia et al., 2002).

La falta de información adecuada sobre los efectos de la restricción calórica (RC) en los seres humanos se ve dificultada por consideraciones éticas y metodológicas. Episodios naturales de la RC en las poblaciones humanas son comunes en algunas partes del mundo. Sin embargo, es importante señalar que la mayoría de estas poblaciones están expuestas a dietas que carecen de proteínas y micronutrientes.

La restricción calórica en esas poblaciones, a menudo, se asocia con baja estatura, retraso de maduración reproductiva (Eveleth et al., 1990), la disminución de la producción de esteroides gonadales en adultos (Ellison et al., 1996), suprimió la función ovárica (Ellison et al., 1993), problemas de rendimiento de la lactancia (Roberts et al., 1982), problemas de fecundidad (Lee et al., 1979), y la disminución de la función inmune (Martorell et al., 1980 ; Ulijaszek et al., 1990).

Los estudios pioneros de Keys et al. (1950) mostraron cambios importantes, bajo restricción calórica, en muchas variables, incluyendo la tasa metabólica, pulso, temperatura corporal y presión arterial. Sin embargo, había que tener en cuenta que la dieta era de mala calidad y que existían efectos psicológicos que influían.

Sin embargo, existen estudios de los efectos prolongados de la restricción calórica relacionados con una dieta de alta calidad, con la salud y la longevidad. En este sentido se realizó un estudio (Kagawa et al., 1978) en 120 hombres, de los cuales 60 fueron asignados aleatoriamente como grupo control y 60 para el grupo con restricción de calorías. El grupo control fue alimentado 9600 kJ/día. Los sujetos con RC recibieron 1 litro de leche y 500 g de fruta cada día, lo que dio lugar a una media general de la ingesta energética de 6300 kJ/día (un 35% menos de la ingesta en el grupo control). Este régimen se aplicó durante 3 meses y los resultados que encontraron fueron que las personas sometidas a RC visitaron menos la enfermería y una diferencia no significativa en la tasa de mortalidad; estos resultados sugerían que la RC puede prolongar la vida en los seres humanos.

Muchos de los efectos de la RC prolongada han sido caracterizados, pero el mecanismo o mecanismos por los que aumenta la vida útil se siguen debatiendo. Una primera hipótesis es que un retraso en la maduración sexual puede ser uno de los mecanismos mediante los cuales ejerce su efecto sobre la longevidad. La reducción de la tasa metabólica es otra posible explicación para la lucha contra los efectos del envejecimiento de la RC, con la consiguiente reducción de los radicales libres. Sin embargo, muchas otras alteraciones metabólicas se asocian con la RC. Por ejemplo, a corto plazo en los seres humanos y los animales sometidos a restricción calórica pueden presentar alteraciones en la sensibilidad a la insulina, la secreción de numerosas hormonas y la actividad del sistema nervioso simpático. También se altera el perfil de expresión génica en el músculo, corazón y el cerebro. Todo (o una combinación) de estos cambios biológicos puede retardar el envejecimiento.



## 1.4. Crecimiento y recambio proteico

### 1.4.1. Crecimiento en peces

El crecimiento es una de las actividades más complejas de cualquier organismo. Es el resultado de una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento que, empezando por la ingestión de alimento, termina en la deposición de sustancia animal. El crecimiento se puede definir como cualquier cambio en el tamaño o cantidad de material corporal, positivo o negativo, temporal o intemporal (Schreck y Moyle, 1990).

Además, se puede describir en términos de longitud o peso, referido siempre a un intervalo de tiempo. El mejor ajuste propuesto para la tasa de crecimiento específico corresponde con una curva exponencial del tipo:

$$G = a P^b$$

donde, "G" es el crecimiento, "P" el peso/longitud y "a" y "b" constantes.

Para un instante de tiempo t, el crecimiento absoluto en peso ( $dP/dt$ ) es mayor en el punto de inflexión de la curva sigmoide; y el crecimiento relativo ( $(dP/dt)/P = dP/Pdt$ ) es generalmente mayor en los estadios juveniles. Esta última derivada corresponde a la tasa crecimiento de instantáneo (TCI), que multiplicada por 100 equivale al porcentaje del incremento en peso por unidad de tiempo (día) (Ricker, 1973). Actualmente, el crecimiento se mide para un intervalo de tiempo conocido, más que para un instante particular: si  $P_i$  y  $P_f$  son los pesos de un pez en los tiempos  $t_1$  y  $t_2$ , estimaremos la TCI según la ecuación:  $TCI (\%) = (\ln P_f - \ln P_i) / (t_2 - t_1) \times 100$ .

En peces, es importante diferenciar el crecimiento somático (aumento de masa muscular-deposición proteica) del reproductivo (producción de huevos y/o espermatozoides) (Mingarro et al., 2002). El crecimiento somático es un proceso continuo e indeterminado a lo largo de toda la vida del animal (Mommsen y Moon, 2001). El crecimiento reproductivo va muchas veces en detrimento del somático, por lo que solamente acontece una vez cubiertas las necesidades energéticas que aseguren la supervivencia del animal (Jobling, 1994).

El crecimiento somático es el resultado de la combinación de fenómenos de hiperplasia (aumento del número de células) e hipertrofia (aumento del tamaño celular) del músculo esquelético (Rowlerson y Veggetti, 2001). Desde un punto de vista analítico, ambos fenómenos pueden ser medidos, puesto que el tamaño celular, que representa el área celular controlada por un solo núcleo, puede ser estimado determinando la relación proteína/DNA, mientras que el número de células puede ser estimado determinando el contenido total de DNA. Por otra parte, esto nos permite relacionar los parámetros de recambio proteico con el contenido en ácidos nucleicos (Mc Millán et al., 1988, Millán et al., 1992; Mathers et al., 1993).



En los mamíferos, el número de fibras musculares está fijado desde el nacimiento, por lo que el desarrollo postnatal implica la hipertrofia de las células musculares ya existentes. Sin embargo, en los peces el crecimiento por hiperplasia sigue dándose hasta pasada la etapa juvenil, aunque la contribución de la hiperplasia frente a la hipertrofia disminuye con la edad y el tamaño corporal. Es más, existen periodos de crecimiento hiperplásico que alternan con periodos de crecimiento por hipertrofia, aunque los dos procesos no son excluyentes entre sí (Brooks y Johnston, 1993).

El músculo es el tejido mayoritario en la dorada, y el principal lugar de acumulación de proteínas. Ello implica que la velocidad específica de crecimiento del músculo blanco, será muy parecida a la que presenta el animal completo.

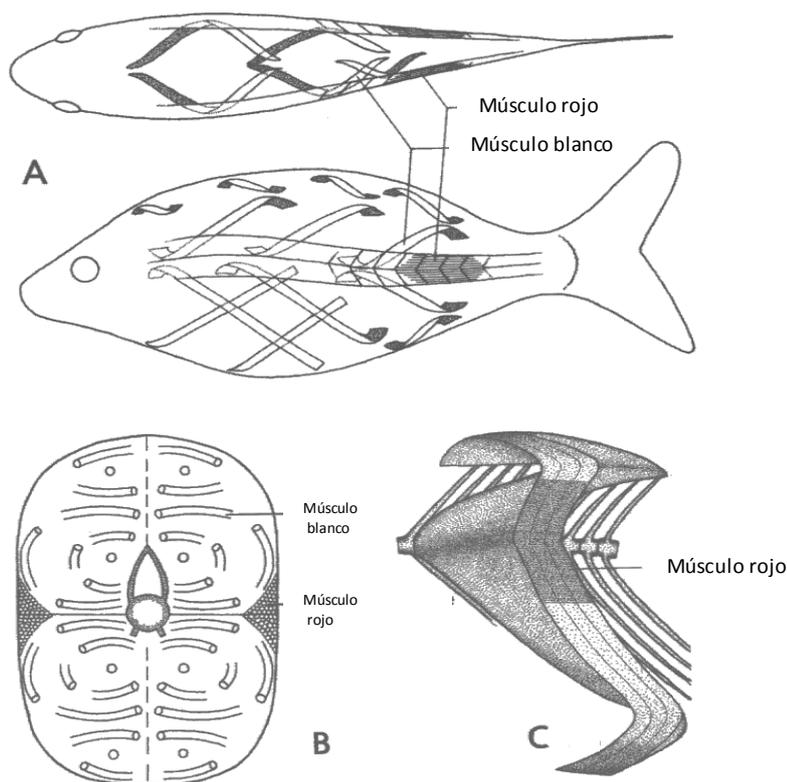
Durante el crecimiento del animal, en el músculo blanco predomina el fenómeno de hiperplasia, mientras que el reclutamiento de fibras o hipertrofia se hace equitativamente más importante a medida que el animal va adquiriendo su estado adulto, cuando el tamaño de la fibra es tal que un crecimiento posterior puede impedir el desarrollo adecuado de sus funciones metabólicas (Weatherley, 1990; Kiessling et al, 1991).

La anatomía del músculo de los peces también difiere de la de otros vertebrados, ya que carecen del sistema conectivo que entrelaza los paquetes musculares al esqueleto del animal. En cambio, poseen células musculares que corren en paralelo, separadas perpendicularmente por tabiques de tejido conectivo (miosepto) ancladas al esqueleto y la piel.

Los segmentos musculares situados entre estos tabiques se denominan miotomos. Los mioseptos corren de forma oblicua, formando un patrón de surcos perpendiculares al eje longitudinal del pez, desde la piel hasta la espina. Esta anatomía está adaptada para permitir la flexibilidad del músculo en los movimientos que propulsan al pez a través del agua (Huss, 1998). El músculo esquelético de los peces está compuesto mayoritariamente de músculo blanco, pero dependiendo de la especie también existe una importante fracción de músculo rojo, localizado debajo de la piel, a lo largo de todo el cuerpo del animal (**Figura 1.7**).

La proporción de músculo blanco y rojo varía en función de la actividad de los peces, ya que el primero está perfectamente adaptado para los movimientos súbitos, fuertes y cortos; mientras que el segundo está diseñado para movimientos continuos aunque no tan fuertes. Hay notables diferencias en la composición química de ambos tipos musculares, pero la más característica es el alto contenido de lípidos y hemoglobina que facilita un metabolismo mayoritariamente aeróbico en el músculo rojo (Huss, 1998; Sängner y Stoiber, 2001).

La hiperplasia muscular requiere una fuente adicional de núcleos, proporcionados por un conjunto de células biogénicas indiferenciadas (células satélite), localizadas debajo de la lámina basal. Estas células se activan en casos de daño tisular para la subsiguiente regeneración (Stockdale, 1992; Schultz, 1996), pero tanto en mamíferos, como en aves los mecanismos de activación son objeto de controversia. No obstante, se sabe que dichas células se originan a partir de células pluripotentes al final del desarrollo embrionario (Quinn et al., 1988; Stockdale, 1992).



**Figura 1.7.** Modelo de estructura muscular del miotomo de un teleósteo. (A) vista dorsal y lateral; (B), vista transversal (modificado de Sanger y Stoiber, 2001).

Los estudios realizados con células satelite en peces, hasta ahora son todavía incipientes, pero se cree que son responsables de la hipertrofia de las fibras musculares, así como de la biogénesis de nuevas fibras (Fauconneau y Paboeuf, 2001).

El hígado se trata de otro tejido implicado en la regulación directa del crecimiento del pez, pues está implicado en la regulación del metabolismo energético del pez y en la exportación de numerosos nutrientes al resto de los tejidos, constituyendo un órgano central en procesos de homeostasis metabólica. Se trata del principal lugar de amoniogénesis (Walton y Cowey, 1977), de síntesis de ácidos grasos (Henderson y Sargent, 1981) y de gluconeogénesis (Mommsen, 1986).

Diversos autores han realizado experimentos en hígado de rata (Goldspink et al., 1984) y en hígado de trucha arco iris (Peragón et al., 1998) y han concluido que la naturaleza del crecimiento del hígado responde a un proceso de proliferación celular, más que a un aumento en el tamaño de las células, utilizando para ello la medida del contenido total de DNA como índice de hiperplasia y la relación proteína/DNA como índice de hipertrofia. Según estos mismos autores la relación RNA/DNA se mantiene constante, lo que indica que la eficiencia en la transcripción no presenta cambios significativos durante el desarrollo del tejido.



En teleósteos, el tejido hepático conforma un volumen considerable en relación al cuerpo, encontrándose localizado a nivel del abdomen anterior y a la altura del septo transversal que separa la cavidad cardiaca de la peritoneal (Yasutake y Wales, 1983). El hígado se presenta como un órgano simple en la mayoría de los peces teleósteos; sin embargo, en algunas especies, como la carpa (*Cyprinus carpio*), está además constituido por tejido pancreático, constituyendo el “hepatopáncreas” (Hibiya, 1982). De esta manera, el hígado de teleósteos queda constituido por 2 ó 3 componentes básicos: tejido parenquimatoso hepático, sistema de drenaje biliar y tejido endo y exocrino del páncreas que se presenta externo a los vasos portales.

Histológicamente, la superficie del hígado está cubierta por una capa serosa y el tejido de la cápsula se proyecta hacia el parénquima (Yasutake y Wales, 1983; Dellmann, 1993). El hígado de los peces, difiere del de mamíferos, en que tienen una menor tendencia a disponerse en cordones, estando organizados en hileras de dos células, como en la mayoría de vertebrados inferiores; de este modo, el lobulillo hepático no está muy bien definido.

Los sinusoides, por donde circulan las células sanguíneas, son fenestrados y se presentan en menor número, encontrándose irregularmente distribuidos y, a su vez, revestidos por células endoteliales con núcleos prominentes. Los hepatocitos tienen forma piramidal hexagonal (Geyer, 1989), con un núcleo simple, esférico, eucromático, con uno o dos nucléolos. El citoplasma contiene una cantidad considerable de retículo endoplasmático rugoso y de glucógeno, mientras que el retículo endoplasmático liso es escaso.

Las gotas de lípidos ocupan algunas veces una proporción considerable de citoplasma. El aparato de Golgi, de localización apical, no es prominente. Se han localizado cuerpos densos a los electrones, la mayoría de ellos en posición supranuclear, correspondientes a peroxisomas, lisosomas, cuerpos residuales y lipopigmentos (Hampton et al., 1985).

En general, los hepatocitos presentan pocos orgánulos, si los comparamos a los de mamíferos. En cuanto a las células de Küpffer, estas son no funcionales, ya que el riñón y bazo, como parte del sistema fagocítico mononuclear, son órganos con mayor actividad macrofágica en las especies salmonídeas (Dalmo et al., 1997). Por otra parte, el hígado de los peces posee un componente hematopoyético y centro melanomacrofágicos dispuestos periféricamente a los principales vasos sanguíneos (Roberts, 1989).



### 1.4.2. Factores que afectan al crecimiento

La capacidad de crecimiento de una especie animal está determinada no sólo por sus características genéticas, sino también por una gran cantidad de factores que interactúan simultáneamente y que influyen de una manera decisiva en su control. Factores genéticos, nutricionales, ambientales y fisiológicos son también responsables de la capacidad de crecimiento del animal, de forma que de la acción combinada de todos ellos pueden obtenerse diferencias bastantes acusadas en las capacidades de crecimiento entre individuos de la misma especie, fenómeno muy común en salmónidos (Weatherley, 1990).

La capacidad intrínseca del animal para conseguir alimento, la capacidad de utilización de los nutrientes, la habilidad para competir por el alimento con otros peces, la jerarquía social, la práctica de la endogamia, los hábitos etológicos, el sexo, etc., son características relacionadas con el genotipo del animal y que van a condicionar su capacidad de crecimiento (Ferguson, 1992); aunque el crecimiento también se va a ver influenciado por la etapa del desarrollo, estado fisiológico, temperatura, fotoperiodo, salinidad, etc.

La capacidad de crecimiento de los peces está ligada a la etapa del desarrollo en que se encuentran, de tal forma que a medida que el animal se hace más grande, su capacidad de crecimiento disminuye (Brett, 1979; Houlihan et al., 1986; Mathers et al., 1993). La naturaleza de estos cambios está relacionada con las variaciones en el recambio proteico y en las concentraciones de ácidos nucleicos (Peragón et al., 1998; Peragón et al., 2001).

El estado fisiológico influye en el crecimiento de los peces. Aquellos que sufren algún tipo de enfermedad causada por cualquier tipo de agente infeccioso, ya sea, bacteriano, vírico o fúngico pueden ver ralentizado su crecimiento, incluso éste puede cesar del todo (Weatherley, 1990). Sin embargo, en muchas ocasiones los cambios en el crecimiento son debidos a situaciones que forman parte del propio estado de desarrollo del animal. Así, durante la maduración de las gónadas, muchos peces experimentan una inhibición temporal del crecimiento, puesto que el aporte de energía y nutrientes procedente de la dieta y de tejidos somáticos no es suficiente para poder mantener una tasa de crecimiento óptima y un perfecto desarrollo de las gónadas (Saunders et al., 1984).

La salinidad puede afectar directamente a los tejidos involucrados en el intercambio de iones entre el medio y el organismo, branquias, riñón y tracto digestivo, alterando la tasa de síntesis de proteínas en estos tejidos (Junghahn et al, 1988). La presión osmótica interna de los fluidos de los peces difiere en mayor o menor grado de la del agua que los rodea. Los peces de agua dulce tienen una concentración osmótica superior a la del medio, mientras que en los peces marinos, las sales de sus fluidos corporales se encuentran más diluidas que el agua de mar. La osmorregulación es la capacidad de controlar, tanto el agua como la concentración de electrolitos de los fluidos internos, dentro de "límites" estrechos cuando el animal se expone a diversas salinidades ambientales. En especies de agua dulce, el principal problema que produce el gradiente osmótico entre los fluidos internos y los externos, es la pérdida de sales y entrada de agua a través de las branquias.



El mantenimiento del balance interno se solventa mediante un riñón glomerular en el que los solutos filtrados son reabsorbidos, y el exceso de agua eliminada. La orina es muy diluida y producida en grandes cantidades lo que no evita la pérdida de sales, que deben ser reemplazadas en la dieta o mediante transporte activo a través de las branquias (Jobling, 1994).

En los teleósteos marinos, con una osmolaridad interna inferior a la del medio, el problema del control iónico es a la inversa: sufren pérdida de agua, principalmente a través de piel y branquias y entrada excesiva de sales por difusión. Esta pérdida de agua osmótica es compensada bebiendo agua de mar y absorbiendo agua por el tubo digestivo. Sin embargo, hay algunas especies capaces de sobrevivir en un amplio rango de salinidades. Se denominan eurihalinas y los movimientos que realizan a zonas de distintas salinidades, están asociados, a menudo, con su ciclo vital.

Existen dos tipos de especies eurihalinas: las que toleran y se adaptan a fluctuaciones rápidas de la salinidad externa; y las que realizan migraciones en algún periodo de su ciclo vital entre medios dulceacuícolas y marinos. Las primeras viven en estuarios, salinas y zonas litorales (entre las que se incluye la dorada) y pueden experimentar cambios desde agua de mar a agua dulce en el tiempo de un ciclo mareal. El segundo grupo lo conforman las especies que requieren de cambios fisiológicos a largo plazo (e irreversibles) cuando realizan migraciones desde distintas salinidades ambientales (los salmónidos, por ejemplo).

La concentración de oxígeno en el agua puede afectar a la capacidad de crecimiento. Existe una concentración crítica de oxígeno disuelto (OD) en el agua para el crecimiento, por debajo de la cual la disminución de la tasa de crecimiento es directamente proporcional a la disminución de la concentración de oxígeno (el descenso en 1ppm puede reducir la tasa de crecimiento en un 30%) (Stewart et al., 1967; Herrmann y Marchock, 1963).

Por otro lado, un exceso de la concentración de OD puede ser letal. En el momento de la alimentación y horas después, se produce un aumento en la tasa metabólica de los peces. El incremento del consumo de oxígeno es proporcional a la cantidad de alimento ingerido. El oxígeno ambiental puede actuar como un factor limitante de las vías de transformación del alimento, restringiendo el crecimiento y la eficacia de conversión por debajo de un nivel crítico de oxígeno (alrededor de 5 ppm). La reducción de la concentración de oxígeno disponible actúa como una señal para reducir el apetito (Brett, 1979; Jobling, 1994; Thetmeyer et al., 1999). El coste energético de las adaptaciones cardio-respiratorias provocado por un descenso en la concentración de OD del agua, se cobra en detrimento del crecimiento (Randall, 1982). Las oscilaciones diarias de la concentración de oxígeno en el agua no son raras en la naturaleza, debidas, fundamentalmente al ciclo de la luz y la fotosíntesis. Stewart et al. (1967), Whitworth (1968) y Thetmeyer (1999) comprobaron que el crecimiento era menor en peces sometidos a niveles fluctuantes de oxígeno, comparado con los grupos control mantenidos a un nivel constante de oxígeno. Es más, una exposición a niveles subcríticos de oxígeno durante un periodo de tiempo es suficiente para reducir la tasa de crecimiento comparable al obtenido con un nivel bajo de oxígeno pero constante, a pesar de que se suministre una buena alimentación durante el período de oxígeno alto.



Como cualquier otro tipo de proceso vital en animales poiquilotermos, el crecimiento se ve afectado por la temperatura. Cada especie tiene su propio rango de temperatura para un crecimiento óptimo. En general, a medida que la temperatura aumenta también se incrementa la capacidad de crecimiento del pez, hasta alcanzar un valor óptimo, por encima del cual el crecimiento disminuye. Un incremento en la temperatura sólo provocará un aumento en la tasa de crecimiento si va acompañado por un incremento en el consumo de alimento. Esto parece ser debido a que a altas temperaturas los requerimientos nutricionales para el mantenimiento son mayores, de tal forma que hasta que estos no estén cubiertos los nutrientes no van a poder ser empleados para el crecimiento. Todavía no está clara cuál es la ruta fisiológica que media en la relación temperatura-crecimiento, aunque algunos autores hablan de un control de tipo hormonal (Weatherley et al, 1987).

Por otra parte, las variaciones en el recambio proteico, que se traducen en variaciones en la tasa de crecimiento del animal, son de mayor o menor magnitud según el tejido considerado y de la función que éste desempeñe en el metabolismo global (Fauconneau et al, 1985).

La temperatura óptima de crecimiento aumenta a medida que la especie está más adaptada a aguas más calientes y viceversa. En el caso de ciprínidos, la temperatura óptima es de 20°C o más, oscilando en dorada y lubina alrededor de los 20-22°C, mientras que en salmónidos oscila entre los 12-17°C (Jobling, 1994). A su vez, dentro de cada especie, se dan una serie de cambios a lo largo del desarrollo que disminuyen la temperatura óptima a medida que aumenta la edad y el tamaño corporal del animal (Brett, 1979; Pedersen y Jobling, 1989; Fonds et al., 1992).

El efecto de la temperatura sobre el tipo de crecimiento muscular es también dependiente de la especie. De hecho, durante el desarrollo embrionario y larvario del arenque (Vierira y Johnston, 1992; Johnston et al., 1995), la estimulación del crecimiento por la temperatura se traduce en una mayor hiperplasia y una reducción del crecimiento por hipertrofia.

Por el contrario, en otras especies, como el salmón, (Sticklan et al., 1988; Usher et al., 1994) y bacalao (Galloway et al., 1998) la respuesta es diametralmente opuesta. El motivo de esta aparente contradicción no está del todo claro, aunque una posible explicación podría ser que la temperatura tiene un mayor efecto sobre la replicación del ADN, que sobre la síntesis de proteínas (Van der Have y de Jong, 1996).

A su vez, la temperatura puede reducir la disponibilidad de oxígeno, disminuyendo así el crecimiento por hiperplasia (Matschak et al., 1997; Matschak et al., 1998). En cualquier caso, dada la estrecha relación entre la temperatura e ingesta, es difícil desligar los efectos de una u otra variable sobre el mecanismo o modo de crecimiento muscular. En condiciones de alimentación restringida, larvas de diferentes especies de peces suelen mostrar una disminución del crecimiento hiperplásico (Alami-Durante et al., 1997; Galloway et al., 1999), mientras que el crecimiento hipertrófico se ve menos afectado (Galloway et al., 1999). Sin embargo, los efectos sobre la hiperplasia e hipertrofia no son siempre opuestos, y hay casos en peces donde la temperatura afecta de modo similar al crecimiento por hiperplasia e hipertrofia (Brooks y Johnston, 1993).



La temperatura es una de las variables más importantes en un cultivo de peces ya que, disponer de la temperatura idónea para un crecimiento más rápido permite la reducción del tiempo de producción y una mejor eficacia alimenticia, con el consecuente ahorro en pienso, etc.

La luz (o fotoperiodo) puede actuar de múltiples maneras (calidad, cantidad y periodicidad) sobre el crecimiento, interaccionando a la vez con otros factores ambientales, particularmente con la temperatura y los ritmos internos de los peces (diarios y estacionales). La luz estimula la respuesta pituitaria y consecuentemente el sistema endocrino y simpático. Su periodicidad natural induce la producción de la hormona de crecimiento y otros esteroides anabólicos, y puede influenciar en la actividad locomotora asociada a la estimulación tiroidea.

Por otro lado, el fotoperiodo puede ser manipulado en la smoltificación de salmónidos o para la inducción temprana a la maduración sexual (por estimulación de las vías neuroendocrinas relacionadas con la excreción de sodio o la producción de gonadotropinas), con las respuestas de crecimiento adicionales ya que estas vías son parcial y temporalmente antagónicas con la producción de la hormona del crecimiento (Brett, 1979).

En algunas especies, se ha observado que los cambios estacionales de la tasa de crecimiento están más relacionados con la longitud del día que con los cambios de temperatura, con un desfase de un mes (Hogman, 1968). El consumo de alimento aumenta con el fotoperiodo largo y la eficacia de conversión es más elevada.

La presencia de sustancias tóxicas, generalmente procedentes de fuentes externas, y la concentración de catabolitos excretados por el propio pez, pueden también afectar a su tasa de crecimiento. Existen numerosos datos en la literatura que analizan el efecto de tóxicos, tales como pesticidas, herbicidas y detergentes sobre el crecimiento del pez. Uno de los experimentos más relevantes fue el realizado con disulfoton (O, O dietil S-2-etiltioetil fosforoditioato) (Zahn et al, 1996). En cuanto a los productos excretados por el propio animal, el más ampliamente estudiado ha sido el ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), cuyo poder tóxico e inhibidor del crecimiento ha sido ampliamente demostrado en la literatura. Hay dos factores que afectan a la concentración de catabolitos en el agua: la biomasa, es decir la cantidad de animales mantenidos en el estanque, y el tiempo de acumulación de esta sustancia en el agua (Colt y Tchobanoglous, 1978).

La disponibilidad de alimento y composición de la dieta son otros de los factores que afectan al crecimiento en peces. Los peces son animales que llevan un ritmo de vida especialmente azaroso, viéndose a menudo obligados a sufrir largos periodos de ayuno, lo cual puede provocar alteraciones en el crecimiento y deposición de proteínas.

La ración máxima que conlleva un máximo crecimiento depende de factores relacionados con la frecuencia y la cantidad de alimento: duración de la toma de alimento (tiempo de saciación), cantidad de comida individual (capacidad estomacal), tiempo entre comidas (frecuencia de alimentación), y la interacción de todos ellos (Brett, 1979).



La demanda de alimento viene impuesta por los requerimientos básicos del pez. A partir de ahí, la demanda adicional viene dictada por su capacidad potencial de crecimiento (influenciada por la hormona del crecimiento (GH)). El tiempo de saciación es muy variable según la especie y puede depender o no del peso del animal. Por el contrario, la cantidad de alimento a suministrar, sea en una toma o varias, está muy influenciada por el peso: los peces pequeños consumen cantidades relativamente más grandes; y por la temperatura: la tasa de digestión aumenta con la temperatura y, por lo tanto, la ingestión diaria también (Elliott, 1975).

Esta premisa se aplica en la elaboración de las tablas de alimentación artificial por parte de los fabricantes de piensos compuestos. Posiblemente, la forma más significativa y simple para indicar que una dieta o nivel de ración, es el adecuado para un organismo, es la capacidad de convertir el alimento en masa corporal: el índice de eficacia alimentaria,  $EA = (G/R)$ , donde G es el índice de crecimiento en peso y R la ración diaria de alimento, puede ser expresado en términos de peso húmedo, peso seco o contenido calórico (Brett y Groves, 1979), o multiplicado por 100, como porcentaje.

Pocas relaciones metabólicas son independientes del tamaño del animal (peso). Los procesos anabólicos del crecimiento no son la excepción. A medida que un animal crece en tamaño, las actividades metabólicas disminuyen su tasa (Kleiber, 1961). El tamaño tiene un efecto continuo sobre la tasa de crecimiento a lo largo de la vida, sin una fase independiente. Con el aumento de peso, la ración de mantenimiento desciende y la tasa de pérdida de peso también. Lo mismo sucede con el metabolismo proteico: la retención de nitrógeno respecto al nitrógeno consumido es peso-dependiente, por lo que se acompaña de un descenso en los requerimientos proteicos de mantenimiento (Gerking, 1971). La capacidad potencial de crecimiento disminuye con el peso: la ración máxima disminuye más rápidamente que la ración de mantenimiento.

Cuando se considera la influencia de los factores abióticos sobre el crecimiento, es conveniente asumir que cada pez no responde como una entidad independiente. En la realidad, la interacción del comportamiento puede tener un gran impacto enmascarando y confundiendo los resultados estrictamente fisiológicos. La interrelación entre los peces (competencia) está influenciada por el número, espacio, tamaño y especie. La relación de estos factores con el crecimiento y sus interacciones entre ellos está influenciada, básicamente, por la disponibilidad de alimento (Refstie y Kittelsen, 1979).

Los comportamientos agresivos y territoriales requieren de un gasto energético, aumentando los requerimientos de mantenimiento y la supresión del crecimiento en los individuos más pequeños (Magnuson, 1962). Cuando estas interacciones afectan el crecimiento, la diferencia relativa del peso de los miembros de una población generalmente aumenta, los más grandes crecen más rápido mientras que los más pequeños se retrasan. Es decir, aumenta la varianza de la frecuencia de distribución de los pesos con el tiempo y se evalúa con el coeficiente de variación ( $CV = 100 \times (SD/media)$ , en %) (Yamagishi, 1969). En la dorada, el coeficiente de variación aumenta con el peso y está asociado a la agresividad y canibalismo.



### 1.4.3. Recambio proteico en peces

El recambio de proteínas en un animal, tejido u órgano tiene dos funciones principales, por un lado, mantiene los niveles de proteínas enzimáticas necesarias en cada sistema estudiado y, por otro, permite que existan en cada momento los precursores necesarios para llevar a cabo los procesos de crecimiento de cada sistema orgánico ya sea del animal completo, tejido u órgano.

El crecimiento, entendido como un incremento en la masa de proteínas, es el resultado del balance positivo entre las velocidades de síntesis y degradación, procesos simultáneos y antagónicos. Sin embargo, el concepto de crecimiento implica además, el de desarrollo, asociados ambos con los cambios en la composición y tamaño relativo de los reservorios de proteínas específicos (Riis, 1983).

Las proteínas, como el resto de constituyentes, están siempre sujetas a un proceso simultáneo y dinámico de síntesis y degradación, cuyo balance global es su recambio continuo. Este proceso celular es muy importante, tanto para el control de la masa total de proteínas tisulares, como para el de los niveles de enzimas específicos del metabolismo intermediario.

Las velocidades fraccionarias de síntesis ( $K_s$ ) y degradación ( $K_D$ ), consideradas como el porcentaje diario de aminoácidos que se incorporan o eliminan de la masa de proteínas tisular del o al almacén intracelular aminoácidos libres, son considerablemente mayores que el flujo neto a través del ciclo del recambio proteico. La relación entre la velocidad de crecimiento o acumulación de proteínas ( $K_G$ ) y la velocidad de síntesis ( $K_s$ ) es un índice de la eficacia de retención de proteínas (ERP) del tejido reflejando la cantidad de proteínas sintetizada que es acumulada en el tejido como crecimiento propio.

Los valores de  $K_s$  en un tejido, son en gran medida proporcionales a la concentración de RNA total cuando se expresa como la relación RNA/proteína ( $C_s$ ) (Garlick et al., 1980). Del almacén celular de RNA, la fracción correspondiente al RNA ribosómico (RNAr) constituye el 85% del total, mientras que las correspondientes al RNA de transferencia (RNAt) y al RNA mensajero (RNAm) constituyen alrededor del 10 y 3% del total respectivamente (Sugden y Fullen, 19991). Gracias a esto, se puede considerar a la capacidad de síntesis proteica (Foster et al., 1993) ( $C_s$ ) como reflejo del número de ribosomas por célula, indicando la capacidad de un tejido para sintetizar proteínas (Millward et al., 1973, Millward et al., 1981; Preedy et al., 1988). La relación entre la  $K_s$  y la  $C_s$ , se denomina eficacia de síntesis o traducción (KRNA) y refleja la cantidad de proteína sintetizada por unidad de RNA, indicando la síntesis proteica media por ribosoma. A su vez, cambios en la cantidad total y en la actividad funcional de los tipos de RNA pueden determinar la tasa de síntesis proteica (Houlihan, 1991).

La velocidad del recambio proteico de un tejido está relacionada con la función que dicho tejido. De esta forma, el hígado, cuyo papel principal es mantener un equilibrio homeostático, y adaptarse de forma rápida y continua a todos aquellos cambios que pueden afectar al normal desarrollo del animal, como la temperatura (Fauconneau et al, 1985), o el aporte externo de



nutrientes a través de la dieta, presenta una tasa de recambio metabólico rápido, con un valor de  $K_S$  de 8-10%/día (Peragón et al, 1998). El músculo blanco, con una función principalmente mecánica, tiende a reaccionar, en términos metabólicos, más lentamente que el hígado, presentando una velocidad de recambio proteico mucho menor, del orden de 1-2%/día (Peragón et al, 2001).

Existen muchos factores que pueden afectar a la tasa de recambio proteico y al crecimiento de un determinado tejido, entre los cuales los más importantes son probablemente el etapa del desarrollo que se considere y la disponibilidad de un aporte de nutrientes esenciales adecuado para la actividad celular.

Los estadios tempranos del desarrollo de un animal, están caracterizados por un ritmo metabólico especialmente alto, con el fin de sintetizar todos aquellos componentes estructurales y enzimáticos necesarios para el crecimiento. En el hígado, esto se traduce en una tasa de síntesis y degradación proteica elevada, manteniéndose constante su propia tasa de acumulación de proteínas ( $K_G$ ) a lo largo del desarrollo, lo cual indica que el crecimiento del hígado adquiere una importancia secundaria respecto al crecimiento del animal completo. A medida que el animal adquiere su estado adulto, las tasa de síntesis y degradación proteica del hígado va disminuyendo, puesto que la demanda de proteínas exportables es cada vez menor, lo cual va acompañado de un aumento en la eficacia de retención de proteínas (ERP) por parte de este tejido (Peragón et al, 1998).

En cuanto al músculo blanco, aunque su tasa fraccionaria de síntesis proteica es la menor de la de todos los tejidos, es el que acumula más eficientemente la proteína sintetizada. Su velocidad de acumulación de proteínas ( $K_G$ ) cae de forma significativa en la etapa adulta del animal debido a una reducción de su velocidad fraccionaria de síntesis ( $K_S$ ) y a un aumento en la velocidad fraccionaria de degradación ( $K_D$ ). Ésta es una diferencia esencial con respecto al hígado, y que evidentemente está relacionada con la función que ambos tejidos desempeñan en el organismo (Peragón et al, 2001).

La composición y la cantidad de dieta ingerida son capaces de modificar significativamente muchos de los parámetros implicados en el recambio proteico y en el crecimiento. Así, una dieta pobre en proteínas provoca una significativa disminución de la eficiencia de retención de proteínas (ERP) y por tanto de la velocidad de crecimiento ( $G_R$ ), lo que se traduce tanto en un aumento de la velocidad de recambio proteico ( $K_S$ , velocidad fraccionaria de síntesis y  $K_D$ , velocidad fraccionaria de degradación) como de la eficacia de la síntesis o traducción ( $K_{RNA}$ ) (Peragón et al, 1993, Peragón et al., 1994, Peragón et al., 1998).

De esto se deduce, que el mecanismo que dispara estos cambios está relacionado específicamente con cambios en la traducción de proteínas. Por otra parte, cuando los carbohidratos de la dieta disminuyen existe una disminución en los valores de ERP y  $K_G$  (velocidad de acumulación de proteínas) concomitante con un aumento en los valores de recambio proteico y de la  $C_S$  (capacidad de síntesis), indicando en este caso que los cambios son debidos a modificaciones de los procesos de transcripción. Se confirma así que las variaciones en el recambio proteico ante situaciones diferentes son provocadas por mecanismos moleculares distintos (Peragón et al, 1998).



La tasa de recambio en los tejidos se puede relacionar con las concentraciones de ácidos nucleicos. La concentración de RNA, expresada como la razón RNA/proteína, a menudo se ha utilizado como un indicador de la capacidad de síntesis proteica ( $C_s$ ) (Foster et al, 1993), y la tasa de síntesis de proteínas por unidad de RNA ( $K_{RNA}$ ) es considerada como un buen índice de la eficiencia de la síntesis. Cambios en la cantidad total y en la actividad funcional de los tipos de RNA pueden determinar la tasa de síntesis proteica (Houlihan, 1991).

El estudio de las velocidades de síntesis y degradación proteica se inició en mamíferos (Waterlow et al., 1978). Los primeros estudios que se realizaron en peces, fueron en peces antárticos, *Notothenia corriceps* (Haschemeyer, 1983) y en “toadfish”, *Opsanus tau* (Porcunjic et al., 1983), aplicando la técnica descrita por Garlick et al. (1980), con algunas modificaciones. Los resultados que encontraron fueron de una  $K_s$  del 10-14% y 0,37-0,2% para hígado de *Notothenia corriceps* y músculo blanco de *Opsanus tau*, respectivamente. Fauconneau et al. (1981) demuestran que el hígado, tracto intestinal y branquias son tejidos con un metabolismo proteico muy activo, cuyo recambio se adapta a las variaciones de temperatura.

En el músculo blanco de la trucha arco iris, la mayoría de la proteína sintetizada es depositada. A pesar de la baja tasa de síntesis (2%), el músculo blanco tiene una alta eficacia de depósito (superior al 70%), a diferencia de lo que ocurre en homeotermos donde la  $K_G$  y  $K_S$  son muy parecidas (Waterlow et al., 1978). Este comportamiento, junto al hecho de ser el principal tejido, en peso y contenido supone el 40% del crecimiento del pez. El músculo es, por tanto, el almacén propio corporal, y en determinadas circunstancias, actúa de reservorio energético.

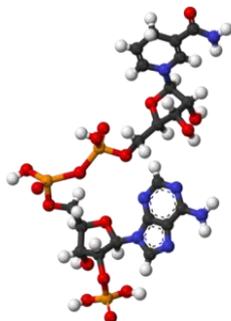
En trucha arco iris se han seguido realizando estudios de recambio proteico, en situaciones de ayuno y realimentación (Peragón et al., 1999b), en donde se observó que el ayuno disminuía el contenido proteico hepático y en RNA, así como la velocidad absoluta de síntesis de proteínas ( $A_s$ ). Cuando se realimentaban a las truchas, las velocidades de síntesis proteica, fraccionaria,  $K_s$  y absoluta,  $A_s$ , la eficiencia proteica y la  $K_{DNA}$  aumentaban considerablemente.

También se ha visto en truchas el efecto de adicionar aditivos nutricionales, como es el ácido maslínico sobre el recambio e proteínas (Fernández-Navarro et al., 2006; Fernández-Navarro et al., 2008). En el hígado de trucha alimentada con 250 mg de ácido maslínico/kg de dieta se observó un mayor crecimiento, una mayor concentración de DNA, indicativo de procesos de hiperplasia, una mayor velocidad de síntesis fraccionaria y absoluta de proteínas, a su vez que, una mayor capacidad y eficacia de síntesis proteica. El aumento del conjunto de todos estos parámetros se traduce en un mayor crecimiento del animal completo de las truchas que se alimentaron con ácido 250 mg de ácido maslínico/kg de dieta, en comparación con sus controles (Fernández-Navarro et al., 2006). En el músculo, estos mismos autores, estudiaron el efecto del ácido maslínico sobre los parámetros del recambio proteico y concentración de ácidos nucleicos. Se observó una mayor acumulación de proteínas muscular para aquellos grupos de truchas que habían sido alimentadas con ácido maslínico, una mayor cantidad de DNA y RNA y mayor  $K_s$  y  $A_s$ .



#### 1.4.4. Enzimas relacionadas con el crecimiento en peces

Uno de los factores bioquímicos más importantes relacionados con los procesos de crecimiento y proliferación celular, lo constituye la disponibilidad de moléculas de equivalentes de reducción en forma de NADPH, así como de un conjunto adecuado de nucleótidos, por parte de diferentes tejidos



**Figura 1.8.** Estructura 3D de la molécula de nicotinamín andenín dinucleótido fosfato reducido, NADPH<sup>+</sup>.

(Barroso, 1993). El NADPH (**Figura 1.8**) es uno de los principales productos finales de algunos procesos metabólicos, siendo al mismo tiempo sustrato indispensable de importantes reacciones metabólicas. Cabe destacar entre ellas las correspondientes a los procesos metabólicos de biosíntesis de ácidos grasos y colesterol, elongación e insaturación de ácidos grasos. Todos ellos implicados, entre otras funciones, en la formación de los diferentes elementos de membrana. También participan en la actividad de hidroxilasas microsomales y en el sistema glutatión reductasa/peroxidasa en procesos de detoxificación y eliminación de los radicales libres de oxígeno generados durante el metabolismo celular (Eggleston y Krebs, 1974; Orrenius et al., 1983). Por otra parte, se sabe gracias a estudios previos llevados a cabo por un gran número de investigadores que la actividad de los enzimas productores de NADPH experimenta cambios de magnitud considerable

según el estado metabólico, nutricional y hormonal en el que se encuentren los peces, y que estos cambios se traducen en diferencias en la velocidad global de crecimiento (Sánchez-Muros et al., 1998; Barroso et al., 1998; Barroso et al., 2001). Por todo ello, podemos deducir que la producción de NADPH está íntimamente relacionada con el crecimiento celular y por tanto con el del organismo entero, siendo éste uno de los objetivos más interesantes del campo de la acuicultura, al relacionarse directamente con la producción animal y por consiguiente con la rentabilidad comercial.

Desde un punto de vista molecular, la relación que presentan las moléculas de NADPH con los procesos de crecimiento celular es doble. En primer lugar, porque participan de una forma directa en los procesos de síntesis y posterior transformación de la gran mayoría de los constituyentes lipídicos de membrana, tales como ésteres de colesterol y los diferentes fosfolípidos y esfingolípidos, así como la propia replicación de las moléculas de DNA y transcripción del RNA, a través de su papel en la formación de ribosa fosfato y por tanto de nucleótidos. En segundo término, porque participan de forma indirecta al actuar como un importante metabolito activador de la propia síntesis de proteínas (Gross et al., 1988; Kan et al., 1988), el otro constituyente mayoritario en las membranas celulares.

##### 1.4.4.1. Enzimas productoras de NADPH

La formación de poder reductor NADPH se lleva a cabo, principalmente, por las actividades deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), y en menor medida por las actividades del enzima málico (EM) e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>).



La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49) es una enzima con estructura dimérica presente en todos los seres vivos. Cataliza la primera reacción del ciclo de las pentosas fosfato, la ruta metabólica que supe a la célula de NADPH y de pentosas para la síntesis de ácidos nucleicos. La reacción catalizada por la G6PDH es la reducción del NADP<sup>+</sup> a expensas de las deshidrogenación de la glucosa 6-fosfato, en 6-fosfogluconato.

Para actuar, además de presencia de NADP<sup>+</sup> requiere un pH óptimo de entre 7,5 y 8,5 (Corpas, 1987), iones Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> (Nagayama et al., 1972; Nicholls et al.; 1976, Shimeno, 1982). Por otro lado, se inhibe por el Hg<sup>2+</sup>, y, en menor medida, por el PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. La actividad G6PDH ha sido detectada casi en la totalidad de tejidos de diferentes especies de peces, mostrando siempre el mayor nivel de actividad en el hígado (Shimeno, 1982), también se ha detectado en riñón de seriola, aunque siempre en menor magnitud que en hígado (Shimeno, 1982).

Si comparamos la actividad de la G6PDH en peces, con la existente en mamíferos, observamos que esta actividad es mayor del orden de entre 4-7 veces en peces, que en mamíferos. Tanto es así, que en hígado parece predominar frente a la glucolisis, asociándose a la formación de NADPH y ribosa fosfato, que serán transportados a otros tejidos diana, mientras que en el músculo blanco parece predominar la glucolisis, que va a proporcionar la energía necesaria para el movimiento (Liu et al., 1970; Shimeno, 1982).

En general, la actividad de la G6PDH del hígado de los peces, aumenta con la disponibilidad de alimento (Storebakken y No., 1992; Bastrop et al., 1992) y el crecimiento (Walzem et al., 1991). Por el contrario, condiciones como el ayuno reducen claramente esta actividad en hígado de trucha arco iris y dorada (Barroso et al., 1993, Barroso et al., 1999; Metón et al., 1999) obedeciendo a un descenso de la concentración intracelular de la enzima.

La realimentación produce el efecto contrario, un aumento en la actividad G6PDH en dorada (Bonamusa et al., 1991; Metón et al., 1999), siendo este incremento dependiente del nivel de carbohidratos de la dieta (Metón et al., 1999; Borrebaek y Christofersen, 2000).

Barroso et al., 1994 observaron que dietas con un alto contenido proteico presentaban una mayor actividad del enzima en hígado de truchas arco iris; sin embargo estas variaciones no se observaron para la misma especie (Sánchez-Muros et al., 2003). Las dietas con un alto contenido en grasas llevan por su parte una situación lipolítica, con la disminución de la síntesis lipídica hepática, por lo que el descenso d la actividad G6PDH debe ser evidente, efecto que se confirma en el hígado de diferentes especies (Suárez et al., 1993; Sánchez-Muros et al., 1998; Shimeno et al., 1996).

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44) es el enzima que cataliza la descarboxilación y deshidrogenación del 6 fosfogluconato. Junto con la G6PDH, son las dos enzimas productoras de NADPH en el CPP. Los requerimientos de pH, cationes y coenzimas son similares a los de la G6PDH (Shimeno, 1982). También el patrón de distribución del enzima en los distintos tejidos



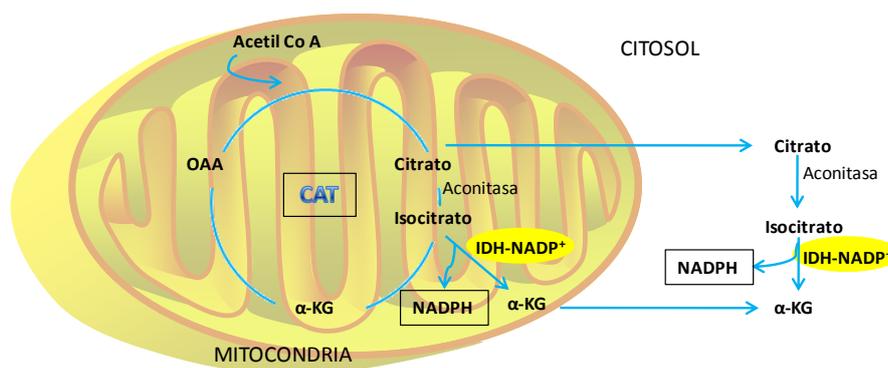
es similar al de la G6PDH (Nagayama et al., 1972), de tal modo, que presenta una actividad considerablemente alta en hígado, riñón, bazo, tejido adiposo, etc., y, relativamente baja en músculo blanco.

El enzima málico (EM, EC 1.1.1.40) cataliza la descarboxilación y oxidación reversible de malato para formar piruvato, utilizando como coenzima  $\text{NADP}^+$  y en presencia de cationes positivos como  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Milne y Cook, 1979). El L-malato es uno de los principales metabolitos implicado en el metabolismo intermediario de los procesos bioenergéticos en peces.

El hecho de que este enzima esté presente en las células de los tejidos metabólicamente más activos, junto con la presencia de las formas moleculares del enzima, dos isoformas en la mitocondria (una forma específica para  $\text{NADP}^+$  como coenzima, y conocida como enzima málico deshidrogenasa  $\text{NADP}^+$  dependiente y otra forma que puede utilizar ambas coenzimas, pero prefiriendo al  $\text{NAD}^+$ , conocida como enzima málico deshidrogenasa  $\text{NAD(P)}^+$  dependiente) y una tercera isoforma en el citoplasma (enzima málico deshidrogenasa  $\text{NADP}^+$  dependiente), diferente en sus propiedades físico-químicas, y en las afinidades por el coenzima y, también, en la razón de descarboxilación del malato frente a la carboxilación del piruvato (Skorskowski y Storey, 1988).

Se trata de una proteína homotetramérica. La masa molecular de la proteína nativa y de sus subunidades se ha estimado en torno a 65 kDa y 260 kDa, respectivamente (Nevaldine et al., 1974). Esta enzima ha presentado altos niveles de actividad en tejido hepático, donde actúa para suplir de  $\text{NADPH}$  al hígado en la biosíntesis de ácido grasos (Fitch y Chaikoff, 1960).

La enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  ( $\text{IDH-NADP}^+$ , EC 1.1.1.42) cataliza la oxidación y posterior descarboxilación de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), localizándose tanto en la fracción citoplasmática, como mitocondrial; aunque la localización preferentemente es citosólica (Moon, 1972). Esta enzima ha sido estudiada en levaduras, plantas, mamíferos, etc. El papel que juega en peces es similar al que presenta en mamíferos. (Figura 1.9).



**Figura 1.9.** Papel de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  ( $\text{IDH-NADP}^+$ ), diferenciando las actividades de la subunidad mitocondrial y la citoplasmática.



#### 1.4.4.2. Enzimas relacionadas con el metabolismo proteico

Las proteínas y lípidos son las principales fuentes de energía de los peces. Las proteínas son utilizadas, en su mayor parte como combustible energético, pudiendo llegar a aportar el 70% de las calorías de la dieta utilizables (Phillips, 1969). Un menor porcentaje es utilizado con fines estructurales.

Además del aporte de aminoácidos plasmáticos procedentes de la dieta, los relativamente reservorios tisulares de aminoácidos libres cuentan con otra fuente muy importante, los aminoácidos procedentes de la degradación de proteínas tisulares que se encuentran en un recambio continuo.

Después de la ingesta de alimento, el aporte de aminoácidos a los tejidos supera sus capacidades biosintéticas (proteínas, hormonas, neurotransmisores, cofactores...) y los excedentes son catabolizados. El principal centro catabólico es el hígado, donde el primer paso consiste en la eliminación del grupo amino en forma de amonio, y la formación de un  $\alpha$ -cetoácido que puede oxidarse vía ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), o convertirse en glucógeno o triglicéridos y almacenarse como tales. Este primer paso está catalizado por transaminasas y desaminasas específicas.

Las dos aminotransferasas descritas más frecuentemente y más estudiadas en peces son la aspartato-aminotransferasa (Asp-AT ó GOT), y la alanina-aminotransferasa (Ala-AT ó GPT). La tirosina-aminotransferasa (Tyr-AT) y la serina-deshidratasa (Ser-DH), son otros dos conocidos enzimas que participan en la regulación de la degradación de sus respectivos sustratos, tirosina y serina.

La alanina aminotransferasa (Ala-AT, EC 2.6.1.2.) cataliza la transferencia reversible del grupo amino de la alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar piruvato y glutamato. Este enzima ha sido ampliamente estudiado en peces, está presente tanto en la fracción mitocondrial como en la citosólica del hígado en una proporción semejante y requiere de la presencia de piridoxina para que la reacción transcurra favorablemente (Walton, 1985).

La actividad de esta transaminasa se encuentra acoplada a la de otro enzima, la glutamato deshidrogenasa (GDH), formando las reacciones de transdesaminación, y jugando un papel central en el metabolismo de los aminoácidos canalizando adecuadamente la ruta principal del nitrógeno de estos compuestos; de este modo, la actividad Ala-AT puede ser utilizada como marcador/indicador de la utilización proteica (Sánchez-Muros et al., 1998).

La alanina, por su parte, es un aminoácido especialmente abundante en el músculo de los peces y un excelente sustrato gluconeogénico (Walton y Cowey, 1979; French et al., 1981) pudiendo ser indicador del flujo gluconeogénico (Korsgaard y Mommsen, 1993). Este aminoácido se puede incorporar a la ruta gluconeogénica por medio de la actividad del enzima Ala-AT. (**Figura 1.10**).

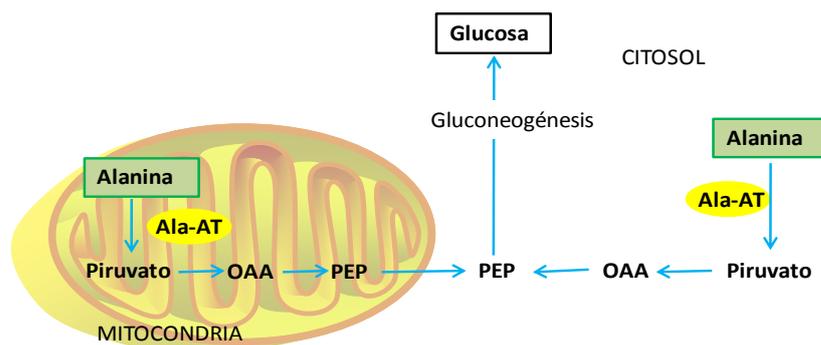


Figura 1.10. Papel gluconeogénico de la alanina en la mitocondria y citosol por acción del enzima Ala-AT.

Las condiciones nutricionales que más afectan a la Ala-AT son el contenido proteico de la dieta y el ayuno. Se ha visto que en truchas alimentadas con dietas hiperproteicas y carentes de carbohidratos, la actividad Ala-AT fue un 65% mayor que la de los peces control (Sánchez-Muros et al., 1998). En doradas, con dietas de este tipo, también se observó un aumento en su actividad, demostrando que los aminoácidos, cuando están en exceso, se utilizan tanto para crecimiento, como para fines gluconeogénicos (Metón et al., 1999). En situaciones de ayuno se han obtenido resultados dispares, por un lado, en trucha arco iris y salmón atlántico se produce un aumento de la actividad, y por otro, en dorada se produjo una disminución, con un aumento de la GPT (Metón et al., 1999).

La Ser-DH (L-serina hidrolasa desaminante, EC 4.2.1.13) es el enzima que cataliza la desaminación dependiente de piridoxal fosfato (PLP) de la serina y treonina, para producir piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato, respectivamente. Es característica su relativa alta vida media, aproximadamente de 20 horas (Jost et al., 1968).

Se considera un enzima clave en la gluconeogénesis. Su actividad está regulada por la composición de la dieta y el estado hormonal a que se ve sometido el animal (Snell, 1984). Su actividad es fundamentalmente hepática y se ve incrementada en situaciones gluconeogénicas, como el ayuno, una dieta rica en proteínas, diabetes, etc. (Pitot y Peraino, 1963; Nakagawa, 1971), pero disminuye en situaciones de acidosis metabólica (López-Flores et al., 2006) y es capaz de provocar alteraciones en el tejido hepático por ingestión de tioacetamida (López-Flores et al., 2005).

Algunos cambios en la actividad de la Ser-DH parecen estar regulados por los genes que codifican al enzima, es decir por los niveles de RNA mensajero (Ogawa et al., 1991). La estimulación de la expresión de los genes de la Ser-DH está mediada por AMP cíclico (Kanamoto et al., 1991) y presenta un máximo de actividad en presencia de glucocorticoides (Haas y Pitot, 1999).

Se han encontrado 3 tipos de Ser-DH en diferentes especies, así, en algunas bacterias es de tipo monomérica y específica de la D-serina; en levaduras, plantas, hongos, y otras bacterias, se presenta en forma de tetrámero y en el hígado de mamíferos es dimérica (Ogawa, 2000). La Ser-DH es



importante en el metabolismo de la serina, en ratas y en otras especies como humanos, reptiles, anfibios, así como en peces que presentan una baja actividad (Ogawa, 2000).

La Tyr-AT (L-tirosina 2-cetoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.5.) es un enzima específico del hígado, y es clave en el control del catabolismo del aminoácido, tirosina (Tanaka et al, 1975). De este modo, previene de la acumulación de niveles tóxicos de tirosina y provee de sustratos cetogénicos y gluconeogénicos cuando los niveles de glucosa son limitados y las proteínas son las que proveen de energía a las células (Peragón et al., 2008).

El enzima presenta una vida media de 1-2 horas (Hardgrove y Granner, 1985) y su actividad cambia durante la maduración del hepatocito y se ve influenciada por cambios en el recambio (Ciechanover et al., 1997) la acción hormonal por glucocorticoides (Granner y Beale, 1985; Schimid et al., 1987) y factores nutricionales (Csanyi et al, 1967; Watanabe et al, 1968). El glucagon y el AMP cíclico también estimulan la actividad de la Tyr-AT con un aumento en los niveles de RNA mensajero en la transcripción (Hashimoto et al., 1984; Schimid et al., 1987; Moore y Koontz, 1989).

El ayuno induce un incremento en la actividad de este enzima en ratas (Rodríguez et al., 1996; Ciechanover et al., 1997). En peces, algunos estudios realizados en trucha arco iris y otras especies, muestran un doble aumento en la actividad de la Tyr-AT en respuesta al cortisol (Whiting y Wiggs, 1977; Lipsky et al., 1986; Devaux et al., 1992) y a la hormona responsable del estrés metabólico en peces (Mommsen et al., 1999).



## 1.5. Ácido maslínico

### 1.5.1. El ácido maslínico como triterpeno. Generalidades

El ácido maslínico (ácido 2- $\alpha$ , 3- $\beta$ -dihidroiolean-12-en-28-oico), también llamado ácido crataególico, es un compuesto natural presente en algunas especies vegetales. Se trata de un metabolito producido por la propia planta capaz de generar una respuesta beneficiosa para la misma, probablemente de defensa frente al ataque de algún microorganismo patógeno.

Entre las plantas en la que se encuentra el ácido maslínico destacan, el olivo (*Olea europaea*), el rododendro (*Rhododendro colletianum*) (Ullah et al., 1997), el espino amarillo (*Hippophae rhamnoides*) (Yang et al., 2007), en especies ornamentales de la familia verbenáceas (*Junellia aspera*) (Pungitore et al., 2007), en el durián, plantas de la familia de las malváceas (*Durio zhibethinus* y *Durio kutejensis*) (Rudiyansyah y Garson, 2006), en *Galphimia glauca* (Nader et al., 2006), en *Cornus cousa* (Sultana y Lee, 2007), en la granada (*Punica granatum*) (Wang et al., 2006), el olmo (*Ulmus pumila*) (Wang et al. 2006), etc.

De todas ellas, en donde es más abundante el ácido maslínico, es en el olivo, encontrándose entre el 55-68% del total de compuestos presentes en la cera superficial que recubre el fruto y hojas de esta especie mediterránea (Bianchi et al., 1994, Frega et al., 1995. En la **Figura 1.11** se muestra la hoja y fruto típico del olivo.



**Figura 1.11.** Detalle de la hoja y fruto del árbol *Olea europea*, “el olivo”, de donde se extrae entre otros compuestos triterpénicos, el ácido maslínico en una concentración superior al 60%.

Este compuesto natural corresponde químicamente a un triterpeno pentacíclico de la familia de los oleano triterpenoides (derivados del oleanano). En el olivo, el ácido maslínico, aunque es el triterpeno más abundante, no es el único oleano triterpeno que se encuentra, sino que también están presentes el ácido oleanólico (31-44%), el eritrodiol, la  $\beta$ -amirina, la  $\beta$ -amirona..., además de triterpenos derivados del lupano (como lupeol, lupona...), derivados del ursano (ácido ursólico, uvaol...), derivados del taraxano (taraxerol...).



De todos estos triterpenos comentados, presentes en el olivo, el ácido maslínico y el ácido oleanólico son los más abundantes, siendo su concentración de  $681 \pm 63$  mg/kg y  $420 \pm 20$  mg/kg respectivamente (Bianchi et al., 1994).

Los triterpenos resultan un grupo interesante de moléculas naturales para químicos, farmacéuticos, bioquímicos y biólogos, no ya sólo por su relativa ubicuidad, fácil extracción y aislamiento, sino también por sus propiedades biológicas y aplicaciones. Tanto es así, que todos estos triterpenos constituyen un gran grupo de compuestos con una característica en común y es la gran cantidad de actividades biológicas en las que están implicados, de este modo se han descrito efectos analgésicos, hepatoprotectores, anti-tumorales, anti-inflamatorios, anti-oxidantes, pueden actuar como efectores del sistema inmunológico, son capaces de inhibir proteasas, etc.

Por ello están siendo estudiados exhaustivamente, y cada vez son más los trabajos científicos que encontramos sobre algunos de ellos (Bianchi et al., 1994; Saimaru et al., 2007; Stiti, Triki y Hartmann, 2007). Un considerable número de estudios realizados en gran cantidad de centros científicos, se han dedicado especialmente a algunos de los compuestos de este grupo como son, entre otros, el ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido betulínico, betulina, lupeol, etc. (Patočka, et al., 2003). El ácido maslínico, como miembro del grupo, está adquiriendo mayor relevancia, en los últimos cinco años, sobre todo en relación con procesos de crecimiento, ya sea éste un crecimiento normal o acelerado/descontrolado, como ocurre en el caso del cáncer.

Los triterpenos constituyen una amplia familia de terpenos que contienen 30 átomos de carbono procedentes de la incorporación biosintética de seis unidades de isoprenilo. Han sido descritos más de 40 triterpenos cíclicos con fórmula  $C_{30}H_{50}$ , alrededor de 150 con fórmula  $C_{30}H_{50}O$  y, además, numerosos compuestos relacionados. La mayoría de autores, piensan que tienen un origen biosintético resultado de la ciclación enzimática del escualeno, o por el óxido escualeno.

En la biosíntesis de los terpenoides se dan reordenaciones de las unidades de isoprenilo llevadas a cabo por varias ciclaciones y reagrupamientos del esqueleto carbonado; aunque el precursor directo de los triterpenos, no es el isopreno, sino el ácido mevalónico que se convierte a isopentenil difosfato, que es el precursor de cinco átomos de carbono de los terpenoides.

Los triterpenos pertenecen al grupo de los terpenoides. Los terpenoides pueden ser considerados como sustancias con un considerable significado práctico. Diariamente, nos encontramos con varios terpenos de forma directa o indirecta. Terpenos de todos los tipos están presentes en plantas superiores, tales como los mono-terpenos y sesqui-terpenos, que contribuyen a su aroma, tetra-terpenos carotenoides que son abundantes en los vegetales de nuestra alimentación, así como los politerpenos, siendo el látex el más conocido.

Los terpenos son utilizados por las plantas como metabolitos secundarios en la biosíntesis de muchos de sus compuestos tales como alcaloides, flavonoides, oligosacáridos etc. La mayoría de los terpenos poseen actividad biológica, jugando un papel muy significativo, desde antaño, en la



medicina. Desde este punto de vista el grupo más importante es el de los triterpenos y sus derivados, representando una de las clases más numerosa de compuestos naturales (Sigler, et al., 1998).

El aislamiento del ácido maslínico y del ácido oleanólico, se lleva a cabo a partir de subproductos de molturación de la aceituna durante el proceso de fabricación del aceite (García-Granados et al., 2000). Estos autores, actualmente, extraen estos compuestos, con valores de rendimiento muy elevados; en el caso del ácido maslínico, lo producen en dos calidades: al 85% de pureza, siendo el 15% restante correspondiente a otros terpenos, sobre todo ácido oleanólico, y por encima del 97% de pureza.

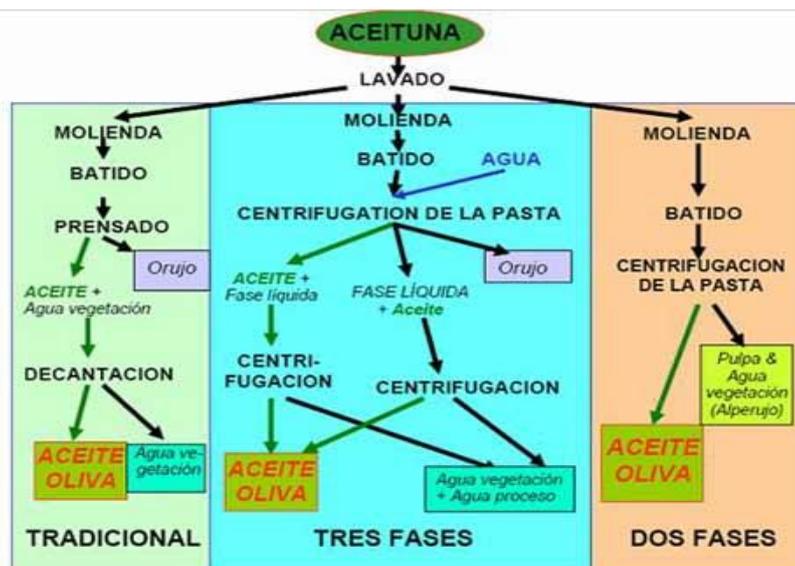


Figura 1.12. Esquema del proceso de producción de aceite de oliva a partir de la aceituna. Se distinguen los métodos de extracción que existen, el tradicional, el tres fases y el dos fases.

La Figura 1.12 muestra los procedimientos clásicos de molturación de la aceituna y la producción del aceite. Son los denominados “tres fases”, en los que además de aceite, se obtienen subproductos tales como el alpechín, fracción acuosa de la aceituna con o sin adición de agua, y los orujos de diversos tipos, que son generalmente extraídos para un adicional aprovechamiento del aceite. En la actualidad, además de los procedimientos de tres fases, se utiliza el de “dos fases”, en el que, además de aceite, se obtiene una masa que contiene los restos de la pulpa y, el hueso de la aceituna, mezclados con agua de vegetación, dando lugar al “alpeorujo” (García-Granados et al., 1998).

Pese a que la extracción del aceite refinado de oliva, libera una cantidad superior de triterpenos pentacíclicos que la obtenida en la extracción del aceite de oliva virgen, la mayoría de estos compuestos continúan formando parte de los subproductos de molturación de la aceituna y de



obtención del aceite (García-Granados et al., 2000). Entre estos subproductos se encuentran el alpechín, fracción acuosa de la aceituna con o sin adición de agua, orujos de diversos tipos, extraídos para el mejor aprovechamiento del aceite y en el caso de la extracción de aceite en dos fases se obtiene una masa o bagazo que contiene los restos de la pulpa, el hueso de la aceituna que junto con el agua de vegetación da lugar al subproducto conocido como alpeorujo (García-Granados et al., 1998). Estos autores han desarrollado un proceso de extracción de los ácidos oleanólico y maslínico, con valores de rendimiento muy elevados llegando a purezas superiores al 98% para cada uno de los compuestos. Las cantidades de ácido maslínico obtenidas por este procedimiento son considerables, permitiendo la explotación industrial del mismo (García-Granados et al., 1998).

El aislamiento del ácido maslínico, fue descrito inicialmente por Bianchi et al., (1994), por extracción metanólica, principalmente con hexano, de olivas previamente lavadas con cloroformo. La separación de estos ácidos se describió mediante cromatografía en contracorriente de alta velocidad (Du et al., 1995). Actualmente, los métodos de extracción de compuestos triterpénicos es más precisa y avanzada (Sánchez-Ávila et al., 2008). Estos autores, para el aislamiento de compuestos triterpénicos, entre los que se encuentra el ácido maslínico, utilizan extracciones, de cinco minutos en microondas, con etanol. El hecho de usar microondas acorta los tiempos de lixiviación, comparado con los antiguos procesos de maceración, en los que se requerían mínimo 5 horas. Una vez extraídos los compuestos, la determinación se llevó a cabo por cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS). A su vez, la identificación selectiva de los triterpenos se confirmó con una reacción de monotorización múltiple (MRM) usando como precursores representativos, diferentes productos iónicos.

La proporción de ácido maslínico y oleanólico extraída y purificada es bastante menor que en el fruto (Pérez-Camino et al., 1999), y, a su vez, depende de la calidad del aceite. En aceite de oliva virgen extra, con una acidez menor del 1%, el contenido del ácido maslínico es de  $64,2 \pm 8,1$  mg/kg y de ácido oleanólico  $57,3 \pm 7,4$  mg/kg, dependiendo de la variedad del fruto. Estos valores incrementan hasta  $193,9 \pm 14,0$  mg/kg para el ácido maslínico y  $244,0 \pm 28,1$  mg/kg en el ácido oleanólico en el aceite virgen extra, esto se debe al proceso hidrolítico que tiene lugar durante su extracción, favoreciendo la eliminación de estos triterpenos de la piel. Mientras que el aceite de orujo contiene aproximadamente 721 mg/kg de ácido maslínico y 5.592 mg/kg de ácido oleanólico.

El mayor incremento en triterpenos según disminuye la calidad del aceite se debe a que estos compuestos se encuentran sobre todo en la capa cerosa externa del fruto de la oliva, por lo que los sucesivos prensados y extracciones favorecen su eliminación. Este es el motivo por el que los compuestos triterpénicos se encuentran en mayor concentración en el aceite de orujo que en el aceite oliva virgen, siendo por tanto el aceite de orujo una rica fuente de ácidos triterpénicos y compuestos esteroídicos. (Pérez-Camino et al., 1999).

Otros autores (Márquez-Martín et al., 2006a), describen que los principales triterpenos pentacíclicos presentes en la fracción no saponificable del aceite de orujo de oliva son el ácido oleanólico, maslínico, eritrodíol y uvaol. Todos estos compuestos poseen un grupo hidroxilo



funcional en el C-3 en su estructura química, así como una función carboxílica o metanólica en la posición C-17. Según estos autores la proporción de ácido oleanólico y maslínico en el aceite de orujo es de un 0.1 % y de un 0.4 % respectivamente, estando las concentraciones de los triterpenos oleanólico, maslínico y eritrodioleol entre 300-500 ppm.

Como muestran los datos aportados por Pérez-Camino (1999), el ácido maslínico se encuentra a concentraciones elevadas, en la fracción no glicérica de aceite refinado de oliva, también llamado aceite de orujo. Este aceite es una mezcla de aceite refinado del bagazo de la oliva (residuo sólido obtenido después del primer prensado o centrifugación de la oliva, constituido por los residuos de las olivas, pieles y semillas) y aceite virgen. El aceite de orujo es el consumido de forma habitual en España y otros países mediterráneos (Pérez-Camino et al., 1999).

El consumo diario de estos triterpenos en aceitunas de mesa y en aceite de oliva podría ser de 34 mg de ácido maslínico y 25 mg de ácido oleanólico (Juan et al., 2006). La biodisponibilidad de este tipo de compuestos es de un 2,3%, lo que ha sido confirmado para el ácido 23-hidroxiobetulínico (Yang et al, 2005). Por tanto, el epitelio intestinal se vería expuesto a concentraciones elevadas de estos compuestos. Asumiendo que el 30% de los mismos no son absorbidos en el intestino delgado la concentración de ácido maslínico y oleanólico en el colon sería, respectivamente, de 86  $\mu\text{M}$  y 66  $\mu\text{M}$ .

Por otro lado, un consumo diario de 33 g de aceite de oliva virgen proporcionaría 6 mg de ácido maslínico y 8 mg de ácido oleanólico (Juan et al., 2006), mientras que un consumo diario de 33 g aceite de orujo proporcionaría 24 mg de ácido maslínico y 184 mg de ácido oleanólico. La determinación de la biodisponibilidad en plasma de estos compuestos sería difícil de predecir, pero basándose en la biodisponibilidad del hidroxitirosol del aceite de oliva (Vissers et al., 2004), las concentraciones en plasma podrían ser de entre 1 a 5.5  $\mu\text{M}$  (Márquez-Martín et al., 2006a).

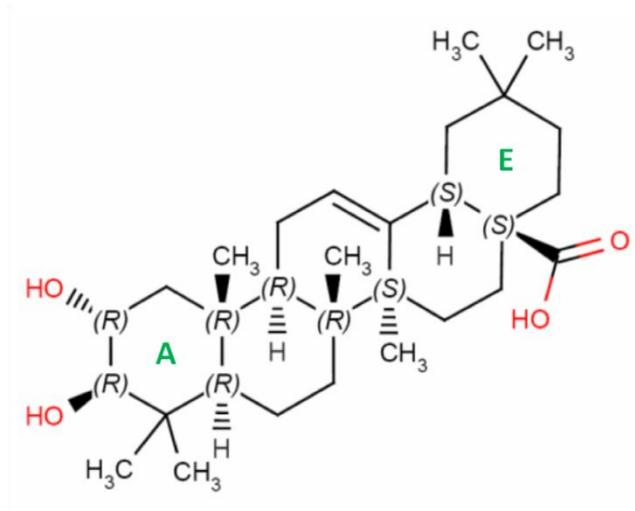
### 1.5.2. Estructura del ácido maslínico

La estructura del ácido maslínico corresponde a un triterpeno de 5 anillos con 6 elementos (**Figura 1.13**); posee dos sustituyentes hidroxilo (OH) en los carbonos C-2 y C-3; un grupo carboxilo ( $\text{COO}^-$ ) en el carbono C-28, y un doble enlace sobre los carbonos C-12 y C-13.

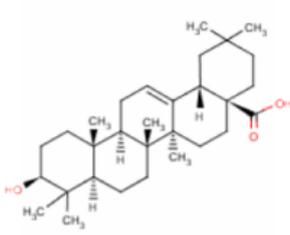
El ácido maslínico (AM), es un derivado del ácido oleanólico, con el que comparte estructura, a diferencia del grupo OH en el C-2. Una característica común a todos los triterpenos, que relaciona sus estructuras con actividades biológicas, es la importancia del grupo  $\text{COO}^-$  en el C-28 y el grupo OH en C-3 (Serra et al., 1994). El grupo OH en el C-2, que presenta el ácido maslínico, y no el oleanólico, parece ser que está relacionado con la capacidad antioxidante de este compuesto, aunque ésta sea indirectamente (Márquez-Martín et al., 2006a). El AM presenta una masa molecular de 472,7 g/mol, un punto de fusión de 269-271°C (Wen et al., 2005); una actividad óptica de +34° a una concentración de 0,20 g/100 mL en metanol (Yamagishi et al., 1988), y una solubilidad en agua pura a pH=7 y 25° C de 1,1. 10<sup>-5</sup> mol/L. Es una estructura estable tanto química, como físico-químicamente.



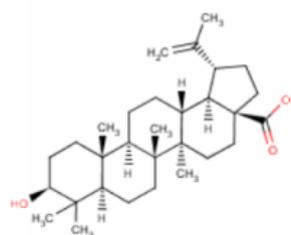
En la **Figura 1.13**, se aprecia la estructura del ácido maslínico, del ácido oleanólico, betulínico y ursólico.



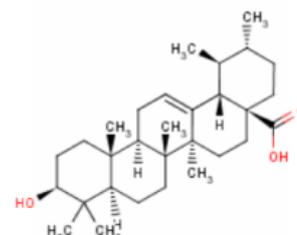
**Ácido maslínico**



**Ácido Oleanólico**



**Ácido Betulínico**



**Ácido Ursólico**

**Figura 1.13.** Estructura del ácido maslínico y otros tres triterpenos pentacíclicos estudiados.

El interés suscitado por el ácido maslínico no abarca tan sólo a estudiar sus propiedades, y actividades biológicas, sino que también a sintetizar derivados de él, con un gran potencial bioactivo. El grupo del Dr. Andrés García Granados (García-Granados et al., 2007), ha llevado a cabo la oxidación continuada de sustituyentes presentes en la molécula de ácido maslínico, por ejemplo el grupo gem-dimetil en C-4, obteniendo sesquiterpenos y nor-sesquiterpenos; y a partir de la apertura oxidativa del anillo C de estos oleanotrienos, se generan diferentes sintones quirales, importantes para la síntesis de productos con actividades biológicas (García-Granados et al., 2004). Uno de estos derivados, obtenido a partir de la oxidación del ácido maslínico, ha sido el ácido 24-hidroxi-maslínicoo ácido hiptático-A ( $2\alpha, 3\beta, 24$ -trihidroxiolign-12-en-28-oico) aislado previamente en *Hiptis capitata*. La regioselectividad de esta reacción se debe al grupo metilo axial sobre el C-4 del ácido maslínico y a la presencia del sustituyente C-2-OR., dando lugar al grupo C-24 hidroximetileno.



También, se han sintetizado derivados del ácido maslínico añadiendo grupos sulfitos, sulfato y epóxidos al anillo A; otros, aislados de forma natural presentan el anillo A contraído, siendo particularmente abundantes en la formación de sintones para la semisíntesis de derivados con el anillo A modificado, un claro ejemplo de estos últimos es el finastérido (García-Granados et al., 2003).

### 1.5.3. Importancia del ácido maslínico: bioactividades

Al ácido oleanólico se le han atribuido propiedades antibacterianas, antialérgicas, anticarcinogénicas, antiedémicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antisépticas, antitumorales, cardiotónicas, inmunomoduladoras y sedativas, entre otras (Liu et al, 1995a; Liu et al, 1995b; Shon et al, 1995; Zhang et al, 1995).

En la **Tabla 1.14** se muestran las diferentes aplicaciones atribuidas al ácido maslínico.

**Tabla.1.14. Descripción breve de las bioactividades del ácido maslínico**

Propiedad	Autor	Líneas celulares, organismos	
<b>Efecto anticancerígeno</b>	Reyes et al., 2006	HT29 y Caco-2	
	Juan et al., 2006	HT29	
	Reyes-Zurita et al., 2009a	HT29	
	Reyes-Zurita et al., 2009b	HT29	
	Martín et al., 2007	Células de astrocitoma	
	Kim et al., 2000	A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF49, HCT-15	
	Taniguchi et al., 2002	HSC-2, HSG, HGF	
<b>Efecto antiproliferativo</b>	Wang R, et al., 2006		
	Reyes-Zurita et al., 2009b	HT29	
	Juan et al., 2006	CCRF-CEM, HeLa, A375, MCF-7	
	Wang et al., 2006	HepG2, MCF7	
<b>Capacidad antioxidante</b>	He et al., 2007		
	Montilla et al., 2003	Rata	
<b>Efecto inmunomodulador</b>	Márquez-Martín et al., 2006a	Macrófagos de mamíferos	
	Márquez-Martín et al., 2006b	PBM	
<b>Efecto vaso-modulador</b>	Rodríguez-Rodríguez et al., 2006	Produce dilatación en la aorta de ratas hipertensas	
<b>Previene estrés oxidativo</b>	Márquez Martín et al., 2006	Inhibe la producción de NO inducido por LPS	
<b>Efecto sobre actividades enzimáticas</b>			
	Inhibición colesterol acil transferasa	Kim et al., 2005	
	Inhibición glucógeno fosforilasa	Wen et al., 2005/2006	
	Inhibición DNA topoisomerasa y DNA polimerasa	Pungitore et al., 2007	Músculo de conejo
<b>Inhibición elastasas</b>	Sultana y Lee, 2007		
<b>Capacidad antimicrobiana o antiparasitario</b> relacionada con la capacidad de inhibir serín-proteasas	Xu et al., 1996	Virus del sida (Vih-1)	
	García-Granados et al., 1998	Cryptosporidium parvuum	
	Vlietnick et al, 1998	Toxoplasma	
	Braca et al., 2000	Tripanosoma cruzi Leishmanisa donovani Bacterias Gram + y hongos	
<b>Aditivo alimentario</b>	Guillen et al., 2008	Ratones	
	Fernández-Navarro et al., 2006	Trucha arco iris	
	Fernández-Navarro et al., 2008	Trucha arco iris	



### 1.5.3.1. Actividad anticancerígena

Muchos triterpenos inducen apoptosis y poseen propiedades antitumorales. El ácido maslínico es uno de ellos; conociéndose su efecto antitumoral (Reyes et al., 2006; Juan et al., 2006); en estos trabajos se demuestra que el ácido maslínico presenta propiedades de diferenciación y antiproliferación en líneas celulares, HT29 y Caco-2, de cáncer de colon en humanos, induciendo una parada en la fase G0/G1 del ciclo celular y muerte celular por apoptosis mediante la activación de caspasa-3 y fragmentación del DNA.

Este efecto también se ha estudiado en células de astrocitoma (Martín et al., 2007) en donde se demostró la inhibición del crecimiento celular, precedida de alteraciones morfológicas relacionadas con la apoptosis, concluyendo que la exposición de las células, al ácido maslínico o al ácido oleanólico, provoca una inducción de apoptosis, incrementando los niveles de ROS (especies oxígeno reactivas intracelulares).

Se ha descrito, a su vez, la inducción de citotoxicidad por el ácido maslínico, aislado de *Physocarpus intermedius* (Kim et al., 2000) sobre las siguientes líneas tumorales humanas: A549 (cáncer de pulmón), SK-OV-3 (cáncer de ovario), SK-MEL-2 (melanoma), XF-498 (sistema nervioso central) y HCT-15 (cáncer de colon).

A partir de tejido en cultivo de la especie *Eriobotria japonica*, se aislaron una serie de triterpenos, entre los que se encontraba el ácido maslínico (Taniguchi et al., 2002). Todos ellos produjeron citotoxicidad en líneas celulares de carcinoma oral escamoso humano (HSC-2), en la línea de fibroblastos gingivales (HGF) y en líneas tumorales de la glándula salivar (HSG).

La actividad antiproliferativa del ácido maslínico, aislado de la raíz de *Ulmus pumila*, se observó por presentar éste un efecto citotóxico en células de melanoma epiteliales humanas (HeLa, A375 y MCF-7). A partir de la piel de la manzana (*Malus pumila*) se aislaron un total de 13 triterpenos, los cuales presentaron efectos antiproliferativos frente a la línea celular de cáncer hepático HepG2 y MCF-7. Los valores de EC50 (50% de actividad antiproliferativa) para el caso del ácido maslínico, tras 96 h de incubación con éste, superaron la concentración de 70  $\mu$ M en HepG2 y MCF-7 (He et al., 2007).

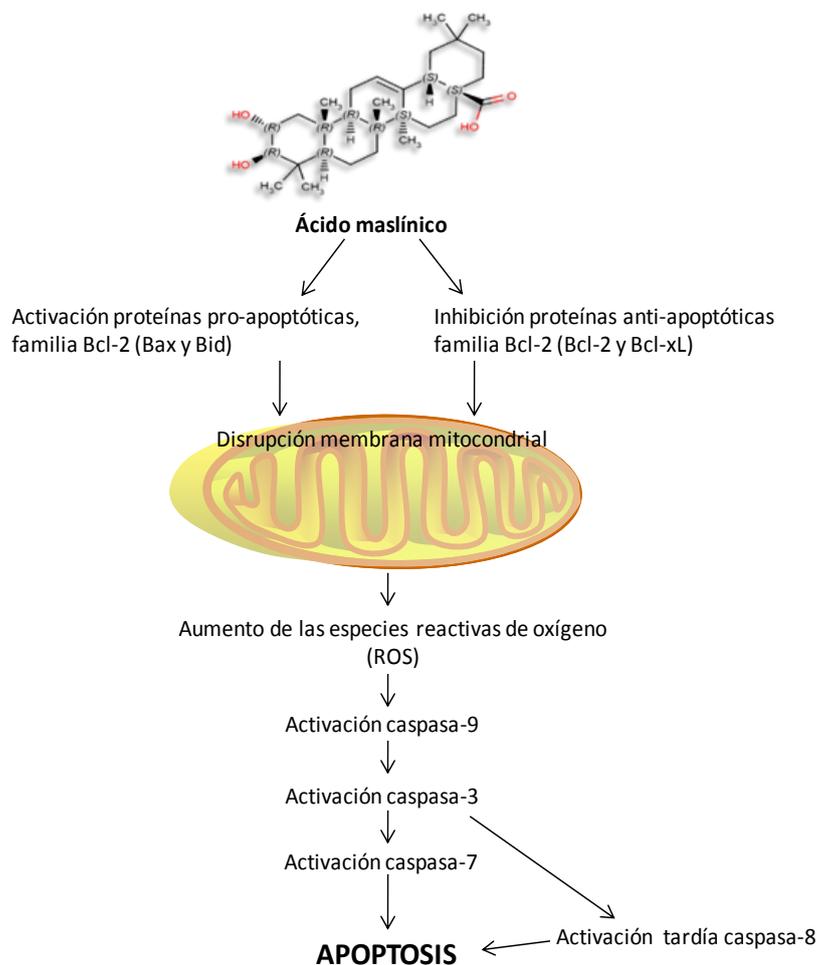
Se puede observar que son múltiples los trabajos que hablan del efecto anticancerígeno del AM, ahora bien, también se conoce la ruta molecular por la que induce apoptosis en células HT29 (Reyes-Zurita et al., 2009).

La **Figura 1.15** muestra el mecanismo molecular proapoptótico del AM. De este modo, este compuesto natural produce la activación del mecanismo intrínseco mitocondrial de apoptosis mediado por la quinasa JNK y activación de p53. En este tipo de células el mecanismo molecular caracterizado, continúa con la activación de la familia proapoptótica de proteínas Bcl-2 (Bax y Bid) e inhibición de las proteínas anti-apoptóticas de esta familia (Bcl-2 y Bcl-xL), produciendo finalmente,



la disrupción de la membrana mitocondrial, incremento de ROS (especies oxígeno reactivas), liberación de citocromo-c, activación de caspasa-9, caspasa-3 y caspasa-7, así como, la activación tardía de la caspasa-8.

En este sentido, el ácido maslínico puede jugar un papel importante como quimioterapéutico y quimiopreventivo en el tratamiento de carcinoma de colon.



**Figura 1.15.** Esquema simplificado del mecanismo molecular intrínseco, por el que el ácido maslínico induce apoptosis en células HT29 (Reyes-Zurita et al., 2009).

### 1.5.3.2. Actividad antioxidante

El efecto del ácido maslínico como antioxidante también se ha estudiado. En este sentido, Montilla et al., (2003) estudiaron el efecto del ácido maslínico sobre la susceptibilidad del plasma o membrana de hepatocitos a la peroxidación lipídica (LPO), inducida respectivamente por el radical



hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ). Estos autores demuestran que ratas tratadas con ácido maslínico presentan unos niveles endógenos más bajos de radicales en plasma y en las membranas de los hepatocitos, por lo que la co-incubación con ácido maslínico previene de la peroxidación de la membrana, mostrando la reducción de TBARS. De este modo, este compuesto podría mostrar algunas ventajas en la resistencia al estrés oxidativo en animales.

Este efecto también ha sido estudiado por otros autores, Márquez-Martín et al., (2006a) han demostrado el efecto del ácido maslínico en condiciones de estrés oxidativo y producción de citoquinas usando como modelo celular, macrófagos de mamíferos. Concluyeron que el ácido maslínico producía la inhibición de la actividad radicalaria de óxido nítrico (NO) inducida por el lipopolisacárido (LPS), cuando ésta se medía por la producción de nitrito con una inhibición en la concentración del 50%, es decir en con una  $\text{IC}_{50}$  de 24,5 mM. Este efecto podría ser consecuencia de la inhibición de la expresión de de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible, iNOS, más que una inhibición directa sobre este enzima. Estos mismos autores, en macrófagos de ratón, estimulados con LPS, midieron las concentraciones de interleuquina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral ( $\text{TNF}\alpha$ ), y observaron una clara disminución de los mismos, con concentraciones de ácido maslínico comprendidas entre 50-100 mM. Cuando medían las especies oxígeno reactivas (ROS), previa estimulación con 12-miristato-13-acetato-forbol (PMA), no se apreciaron cambios en el anión superóxido debido al ácido maslínico; aunque, el pre-tratamiento con ácido maslínico sí fue capaz de producir una disminución en la generación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), de una forma dosis dependiente con una  $\text{IC}_{50}$  de 43,6 mM. Sin embargo no se vio efecto inhibitorio en el radical superóxido,  $\text{O}^-$ , medido a través de la reducción de ferricitocromo c. Con todos estos resultados, Márquez-Martín et al.( 2006a), concluyen que el ácido maslínico presenta un potencial biofarmacéutico, ya que previene el estrés oxidativo y la generación de citoquinas pro-inflamatorias.

A su vez, se ha demostrado (Márquez-Martín et al., 2006a) que el ácido maslínico puede reducir el estrés oxidativo y modular la liberación de ROS, por ejemplo de NO y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y  $\text{TNF}\alpha$  en macrófagos. El NO está implicado en la fagocitosis como respuesta fisiológica. Sin embargo, el NO, puede aumentar la inflamación y lesiones en los tejidos cuando se produce en altas cantidades (Márquez-Martín et al., 2006a). El tratamiento con LPS hace que las células presenten hasta 36 veces más altos los niveles de NO, que las células no tratadas con LPS. Este hecho lo han estudiado varios investigadores (Márquez-Martín et al., 2006a).

El AM suprime la formación de NO de una forma dosis-dependiente con una  $\text{IC}_{50}$  de 25,4  $\mu\text{M}$ . Existen datos que describen que la inhibición de NO producida por el ácido maslínico en macrófagos puede deberse a una inducción del enzima iNOS, en lugar de a la propia actividad del enzima. En este sentido, el comportamiento del ácido maslínico es similar a compuestos como la dexametasona que a L-NAME. El inicio de la producción de NO inducida por el LPS requiere la activación del factor nuclear  $\text{NFK}\beta$ , y seguidamente se expresa iNOS. El efecto del ácido maslínico sobre iNOS podría ser a través de la activación de  $\text{NFK}\beta$ , al igual que ocurre en otros triterpenos (Márquez-Martín et al., 2006b).



### 1.5.3.3. Efecto inmuno-modulador

Los triterpenos pentacíclicos presentan propiedades anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, y la mayor o menor capacidad inflamatoria depende de la propia estructura del triterpeno y de la dosis empleada de cada uno de ellos (Márquez-Martín et al., 2006b).

Para demostrarlo, estos autores, investigaron el efecto de los triterpenos presentes en la fracción no glicérica del aceite de orujo de oliva sobre la producción de citoquinas (glicoproteínas solubles, que participan en la inicialización, mantenimiento y regularización de la respuesta inflamatoria, homeostasis y en los propios procesos inflamatorios) en células mononucleadas de sangre periférica (PBM), y los resultados que obtuvieron fueron una disminución en la producción del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), en la concentración de citoquinas y de quimioquinas.

### 1.5.3.4. Efecto vaso-modulador

Recientemente, también se ha estudiado la capacidad vaso-moduladora que presentan los compuestos triterpénicos. En este sentido, se ha analizado el efecto del ácido oleanólico, maslínico, eritridiol y uvaol sobre la vaso-relajación en la aorta de ratas hipertensas (SHR) (Rodríguez-Rodríguez et al., 2006), y se pudo comprobar que todos los triterpenos aislados produjeron vaso-relajación dosis dependiente.

### 1.5.3.5. Efecto sobre actividades enzimáticas

El ácido maslínico no es sólo capaz de inhibir la acción de serín-proteasas, sino que también la de otras enzimas, es por ello por lo que diferentes autores en los últimos años han dirigido sus estudios en este campo.

La enzima colesterol acil transferasa hACAT-1 cataliza la acilación del colesterol para dar ésteres de ácidos grasos de cadena larga. El ácido maslínico es capaz e inhibir la acción de esta enzima (Kim et al., 2005). En el aislamiento de compuestos de alta actividad biológica a partir de *Campsis grandiflora*, se obtuvieron un total de siete triterpenos, entre ellos el ácido maslínico. Éste mostró a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  una actividad inhibitoria del  $46,2 \pm 1,1\%$  del enzima hACAT-1 y del  $17,3 \pm 1,1\%$  de hACAT-2, respecto a los valores controles encontrados para los mismos enzimas. La inhibición de las colesterol acil transferasas es un hecho importante desde el punto de vista del tratamiento de enfermedades como la hipercolesterolemia y la arterioesclerosis, donde los inhibidores clásicos presentan inconvenientes por su biodisponibilidad oral y su toxicidad renal o hepática.

Recientemente, se ha comprobado que los triterpenos, ácido corosólico y ácido maslínico son inhibidores de la glucógeno fosforilasa (Wen et al., 2005). Estos autores afirman que estos compuestos inhiben, en ratones diabéticos, el incremento de glucosa sanguínea inducida por adrenalina, probablemente a través de la inhibición de la actividad de la enzima glucógeno



fosforilasa, y, por tanto, de la degradación de glucógeno hepático. A su vez, estos mismos autores sintetizaron derivados del ácido maslínico, determinando sus efectos sobre la enzima glucógenos fosforilasa de músculo de conejo (Wen et al., 2006).

Se han aislado a partir de *Tetracera boliviana*, tres triterpenos, entre ellos dos derivados del ácido maslínico, el ácido 3-cis-p-coumaroil maslínico, y el ácido 3-trans-p-coumaroil maslínico (Pungitore et al., 2007). Ambos, presentaron capacidad de inhibición sobre las DNA topoisomerasas y DNA polimerasas. Estas enzimas juegan un papel crucial en la replicación, transcripción, recombinación y segregación de cromosomas durante la mitosis. Inhibidores de estas enzimas podrían tener un papel importante como antitumoral.

Sultana y Lee, (2007), aislaron ácido maslínico, entre otros triterpenos, a partir de un extracto de *Cornus kousa* y lo probaron frente a las elastasas (hidrolizan la elastina de los tejidos). Observaron que el ácido maslínico presentó una  $IC_{50}$  de 21,21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En este sentido el ácido maslínico podría jugar un papel importante para la industria cosmética por inhibir la acción proteolítica sobre la elastina.

### 1.5.3.6. Efecto anti-microbiano

Varios grupos de investigación, entre los cuales destaca el grupo del Dr. García Granados, han comprobado que el ácido maslínico actúa como un potente inhibidor de proteasas, en concreto de serín-proteasas. Esta propiedad ha sido empleada en el tratamiento de determinadas enfermedades, como por ejemplo aquellas enfermedades causadas por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) (Xu et al, 1996; García-Granados et al, 1998b; Vlietinck et al, 1998) y aquellas otras provocadas por parásitos del género *Cryptosporidium* (García-Granados et al, 1998c).

*Cryptosporidium parvum* es un parásito oportunista que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. En condiciones normales, el organismo es capaz de resistir su acción invasiva. Sin embargo, es capaz de desarrollarse rápidamente, solo o en compañía de otros agentes infecciosos oportunistas, en organismos inmunodeprimidos, siendo el caso típico el de los individuos afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estos parásitos producen ciertos enzimas que les permiten atravesar la pared celular de las células huésped, iniciando así su proceso de invasión del organismo. Un grupo de enzimas que juega un papel importante en estos procesos son las proteasas (Mc Kerrow et al, 1993).

La invasión de células por las especies del género *Cryptosporidium* se realiza mediante la apertura de la membrana de la célula a invadir utilizando serín-proteasas. Muchos de los agentes terapéuticos empleados actúan como inhibidores de las mismas para el control de la infección, con resultados bastante modestos, puesto que incluso a altas concentraciones la reducción de la infección no alcanza el 50%. El tratamiento con ácido maslínico es capaz de inhibir la infección de células MDCK por el parásito *Cryptosporidium parvum* en un 92,3% a una concentración de 37  $\text{mg}/\text{mL}$  (García-Granados et al., 1999). Es capaz de inhibir la infección de *Toxoplasma* en células



Vero, en un porcentaje del 87% a 30 mg/mL. Y, también, se han mostrado efectos inhibidores sobre los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani*. La capacidad de inhibitoria del ácido maslínico sobre la infección de estos agentes microbianos se debe a su posible inhibición de las serín-proteasas que utilizan estos parásitos para abrirse paso hacia las células hospedadoras.

La capacidad inhibidora sobre microorganismos también se ha observado en derivados del ácido maslínico (Braca et al., 2000). Los derivados, 3 $\beta$ , O-trans-caumaroil maslínico y el 3 $\beta$ ,O-cis-caumaroil-maslínico, mostraron actividad antimicrobianda frente a bacterias gram positivas y hongos, aunque en bacterias gram negativas no se vio tal efecto.

### **1.5.3.7. Efecto anti-viral**

---

El ácido maslínico ha sido utilizado en el tratamiento de diversas patologías, una de ellas es la causada por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Han sido diversos autores los que han estudiado este hecho, (Xu et al., 1996; García-Granados et al., 1998c y Vlietinck et al., 1998) y todos ellos han descrito que el ácido maslínico (AM) es un inhibidor de la serín-proteasa HIV-1, de tal manera que, *in vitro*, el AM impedía la replicación de este virus, aunque no se presupone si el compuesto es capaz de actuar en el ámbito intracelular, y de si hay margen entre la dosis terapéutica y la concentración admisible según su toxicidad.

Lo que sí es alentador es que al tratarse, el AM, de una sustancia de origen natural, su grado de toxicidad es mucho menor que el producido por otras sustancias sintetizadas en el laboratorio (García-Granados et al, 1998c). El tratamiento de las enfermedades causadas por el HIV es aún, hoy día, un reto para los científicos. Estos retrovirus RNA portan en su cápside enzimas proteolíticas que interaccionan con las proteínas de membrana de la célula huésped.

La terapia frente al HIV se basa actualmente en tres tipos de agentes, análogos de nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa e inhibidores de la proteasa. Esta última es un componente esencial en el ciclo replicativo de los virus HIV. Su inhibición conduce a progenies virales no infecciosas, por lo que previene la expansión de la infección. La proteasa es un dímero de dos cadenas con 99 aminoácidos cada una. Se postula que se trata de una aspartato proteasa, bastante diferente a las proteasas aspárticas humanas, por lo que su tratamiento selectivo es factible (Moyle y Gazzard, 1996).

### **1.5.3.8. Aditivo alimentario**

---

El ácido maslínico puede ser utilizado como aditivo alimentario en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). En un artículo reciente, Fernández-Navarro et al., (2006), concluyeron que el ácido maslínico puede actuar como un factor estimulante del crecimiento en el hígado de la trucha arco iris. Este órgano es clave en la regulación del metabolismo energético y en el transporte de nutrientes a otros tejidos.



El ácido maslínico, cuando se añade a la dieta en una concentración de 25 y 250 mg/kg, estimula la velocidad de síntesis hepática de proteínas, los procesos de hiperplasia, y los niveles de glucógeno celular, en el hígado. En este estudio, partieron de peces con un peso inicial de 20 g, siendo alimentados durante 225 días con una dieta que contenía 0, 1, 5, 25 y 250 mg de ácido maslínico por kg de dieta. Al final, se determinó el peso total, el peso del hígado y el coeficiente de crecimiento siendo mayor en truchas alimentadas con el ácido maslínico que en las truchas controles.

El peso final en las truchas alimentadas con 250 mg/kg de ácido maslínico fue un 30% superior al control. Además, el DNA total hepático, utilizado como marcador de hiperplasia, fue superior en un 37% con la dosis de 25 mg/kg y un 68% a la de 250 mg/kg respecto al control. La velocidad de síntesis de proteína hepática fraccional y absoluta fue significativamente superior respecto al control. Este incremento se produjo también de forma significativa en la capacidad de síntesis de proteínas.

Los estudios de microscopía, óptica y electrónica, mostraron que los hepatocitos de truchas alimentadas con 25 y 250 mg/kg de ácido maslínico, parecían ser más compactos, con mayor cantidad de retículo endoplasmático rugoso y un mayor almacenaje de glucógeno que en truchas control. Todos estos resultados están, en última instancia, relacionados con el crecimiento del animal completo, por lo que el ácido maslínico puede actuar como un factor de crecimiento cuando es adicionado en la dieta.

En otro trabajo, realizado en dentón (*Dentex dentex*), cuando se añadió ácido maslínico a la dieta en una concentración de 0, 20, 40 y 80 mg/kg durante 49 días, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de estos peces (Hidalgo et al., 2006).

Resultados semejantes, que en el hígado, fueron encontrados en el músculo blanco de la trucha arco iris (Fernández-Navarro et al., 2008). El músculo blanco es el tejido más abundante en peces, y su tasa de crecimiento es muy similar a la de todo el cuerpo (Weatherley y Gill, 1989), por lo que determina en gran medida el crecimiento y el tamaño de los peces (Weatherley y Gill, 1984).

En el músculo blanco de trucha, la velocidad de síntesis y la de degradación fraccionaria de proteínas son más bajas que en otros tejidos, mientras que la eficacia de retención de proteínas es mayor (Houlihan et al., 1988). Por lo tanto, en este tejido, la práctica totalidad de la proteína sintetizada se acumula en crecimiento. En el músculo blanco, la tasa de recambio proteico determina la tasa de crecimiento durante el desarrollo (Peragón et al., 2001).

En la acuicultura, la incorporación de nuevas sustancias a la dieta estándar de los peces se ha convertido en un factor importante en la tasa de crecimiento y por lo tanto, en la mejora de las tasas de producción, disminuyendo los costos y el tiempo invertido. En este sentido, las sustancias como las algas (Mustafa et al., 1995), esteroides (Rodnick y Farrar, 2001), antibióticos (Negro et al., 1991) o



inmunoestimulante (Cook et al., 2003) se han utilizado, aunque problema particular a todos los presentes motivos.

Estos compuestos pueden acumularse en los peces y se convierten en peligrosas para el consumo humano de este pescado. Por lo tanto, algunos, como los antibióticos promotores del crecimiento, han sido prohibidos en algunos países. El ácido maslínico es un producto natural obtenido a partir de aceite de oliva que podría tener importantes aplicaciones como aditivo para alimentación animal en la acuicultura, o incluso en la nutrición de otros organismos, incluidos los seres humanos.



## 1.6. Introducción a la proteómica en peces

### 1.6.1. Generalidades de proteómica

La secuenciación del genoma completo de un alto número de especies ha conducido a lo que muchos autores llaman la era de la post-genómica. Otros autores prefieren referirse, a estudios como la parte de la genómica funcional que estudia las proteínas. En 1994, Wilkins acuñó el término proteoma como equivalente lingüístico al concepto de genoma (Simpson 2005).

Hasta la fecha, se ha secuenciado el genoma completo de más de 400 especies distintas, número que no deja de aumentar. Una vez secuenciado el genoma humano se estimaron en más de 30.000 los genes existentes. Sin embargo, los procesos de edición del RNA, las modificaciones postraduccionales y las variaciones en la expresión, hacen que se estimen en varios cientos de miles las proteínas existentes. Esta divergencia entre genes y proteínas ha estimulado el desarrollo de técnicas directas que permitan el estudio de las proteínas a gran escala. Por otro lado, el desarrollo espectacular de las técnicas de análisis químico de las proteínas ha jugado un papel crucial en el desarrollo de estos estudios. El desarrollo de técnicas de ionización suave (MALDI o electrospray) ha abierto el campo de la espectrometría de masas a las macromoléculas.

El proteoma se define como el conjunto de proteínas codificadas por el genoma en una célula, tejido u órgano, y expresadas en un momento dado (Wilkins et al., 1995). Éste, a diferencia del genoma, es dinámico y está directamente afectado por factores ambientales y fisiológicos como el estrés, agentes tóxicos y/o fármacos (Isaaq et al., 2001; Chen et al., 2002). El proteoma de un organismo determinado en un momento dado es la expresión de su fenotipo característico en dicho momento. Las diferencias entre el proteoma de un organismo, tejido, célula, etc., puede asignarse con propiedad a los cambios sufridos en la expresión y funcionalidad de sus proteínas.

Existe una gran cantidad de información biológica que no se puede obtener exclusivamente del estudio de los genes (Graves et al., 2002), ya que son las proteínas, y no los genes, los responsables del fenotipo. Es imposible elucidar los efectos del medio ambiente, entre otros sucesos biológicos, estudiando exclusivamente el genoma. Además, es necesaria la anotación funcional del genoma debido a la dificultad de predecir los genes con exactitud a partir exclusivamente de datos genómicos, ya que existen errores en la predicción de intrones y exones de muchos genes. Para evitar todos estos problemas, es necesario que la información genómica sea integrada a los datos provenientes del estudio de las proteínas. Por otro lado, las proteínas se encuentran entre las moléculas más estudiadas en una gran variedad de especies animales y vegetales, incluyendo determinación de estructura, propiedades y función biológica (Chambers et al., 2000). Las enzimas son un grupo muy importante dentro de las moléculas de naturaleza proteica, ya que catalizan la mayoría de reacciones necesarias para el correcto funcionamiento de las células. La proteómica y el estudio de variaciones cualitativas y cuantitativas en los patrones de expresión de proteínas han supuesto un gran avance en la identificación de proteínas y enzimas implicadas en procesos moleculares y rutas metabólicas que se desarrollan en los organismos vivos.



De forma general, la proteómica puede dividirse, según numerosos autores, en proteómica de expresión y proteómica funcional. En función del objetivo que se quiera alcanzar, se pueden utilizar un tipo u otro de análisis proteómico. La definición clásica de proteómica incluye el análisis a gran escala de la expresión e identificación de todas las proteínas de células y tejidos. Cuando un estudio se ciñe a esa definición, podemos decir que se trata de un estudio descriptivo del proteoma.

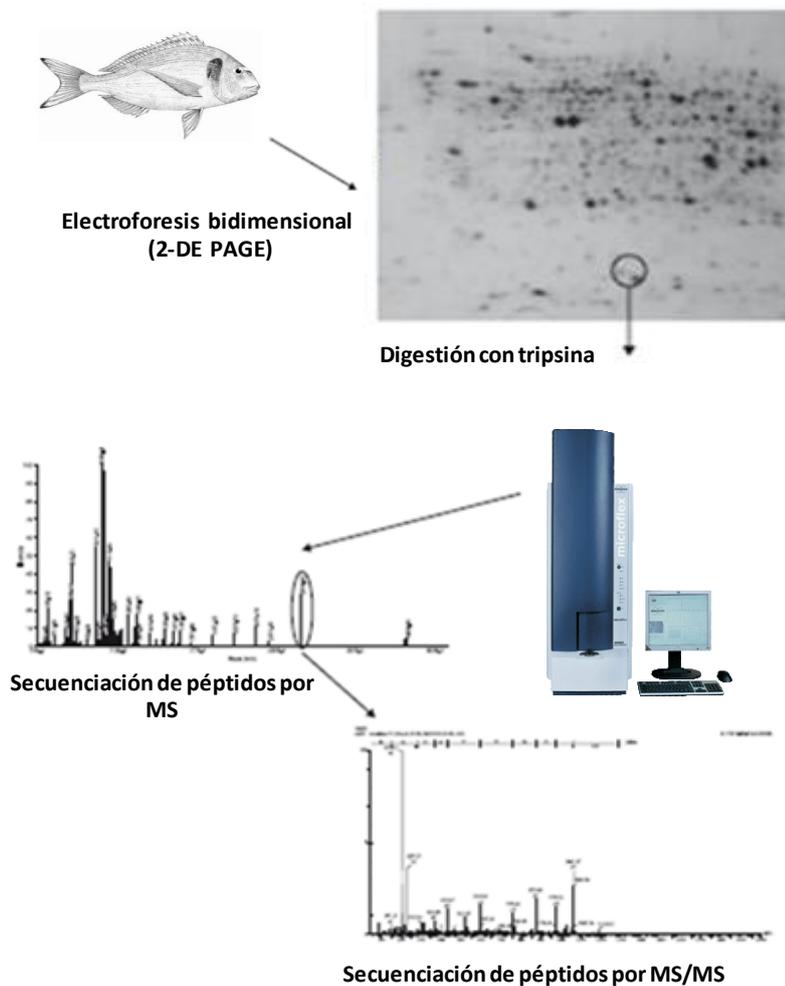
De este modo, la proteómica descriptiva incluiría el análisis a gran escala de la expresión de proteínas de células o tejidos, la identificación de las mismas y la construcción de mapas bidimensionales y/o bases de datos de los mismos (Celis et al., 1995; Blackstock et al., 1999; Pandey et al., 2000).

Sin embargo, la expansión de la proteómica hacia otras áreas más allá de la pura descriptiva, ha permitido la aparición de la proteómica de expresión diferencial, la proteómica funcional (o de interacciones), los estudios de modificaciones post-traduccionales y los análisis de perfiles proteicos. La proteómica de expresión diferencial requiere la comparación, cuantificación e identificación de patrones de expresión proteicos entre diferentes estados fisiológicos de un mismo tejido o tipo celular. En este tipo de abordaje lo más frecuente es utilizar la electroforesis bidimensional (Righetti et al., 2004; Westermeier, 2005).

La proteómica comparativa permite detectar en ocasiones posibles variaciones de las proteínas que deberán ser caracterizadas mediante el análisis de modificaciones post-traduccionales, como fosforilaciones, acetilaciones, glicosilaciones, ubiquitinaciones y nitrosilaciones entre otras (Mann et al., 2003). En cuanto a la proteómica funcional, una gran parte de las investigaciones se centra en las interacciones proteína-proteína de complejos proteicos específicos (Figeys et al., 2002), siendo posible también estudiar las interacciones con otras moléculas.

Uno de los principales obstáculos a los que se ha enfrentado la investigación proteómica es la dificultad que supone identificar todas las proteínas presentes dentro de una muestra biológica compleja. Esta dificultad se ve agravada por el limitado rango dinámico de concentración que las técnicas actuales son capaces de resolver (Archakov et al., 2007). Otros problemas están asociados a la evaluación de la enorme cantidad de información que genera esta tecnología, que complica la selección e interpretación de los datos potencialmente útiles de entre todos los obtenidos.

Un estudio de proteómica (**Figura 1.16**) se basa en una serie de técnicas y herramientas para la extracción y separación de componentes del proteoma, herramientas para el análisis individual de los componentes del proteoma y técnicas para la interpretación de resultados. La naturaleza de los estudios proteómicos dependerá en gran medida de la tecnología usada en la separación de proteínas (2-DE o cromatografía, principalmente), así como de la tecnología elegida para la identificación. Las técnicas de identificación de proteínas son conocidas y denominadas según el sistema de ionización utilizado (por ejemplo MALDI o ESI) y el tipo de análisis de masas empleado (TOF, trampa iónica, entre otros).



**Figura 1.16.** Visión general de un enfoque clásico en un estudio proteómico en peces. En primer lugar, un extracto de proteínas (crudo o fraccionado) del tejido elegido es sometido a electroforesis bidimensional (2-DE). Una vez la proteína de interés ha sido identificada, es cortada del gel y se degrada con tripsina. Los péptidos resultantes se analizan por espectrometría de masas (MS). En muchos casos, estos péptidos se disocian en otros más pequeños, por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), para mejorar su identificación.

El primer paso para elaborar un estudio proteómico, con el fin de evaluar las alteraciones producidas a nivel del proteoma celular en condiciones específicas, es preciso separar las proteínas que constituyen dicho proteoma. La electroforesis en gel bidimensional (2-DE) es una de las técnicas más utilizadas para realizar dicha separación. Esta técnica de separación (Klose, 1975; O’Farrell, 1975) permite el análisis de mezclas proteicas complejas generalmente extraídas de células, tejidos, fluidos y de otras muestras biológicas; a su vez, permite visualizar de forma paralela los mapas proteicos de distintas situaciones experimentales.



Esta técnica combina una primera separación proteica de las proteínas en función de su punto isoelectrónico (primera dimensión), con una segunda separación en la que las proteínas se separan en función de su tamaño (segunda dimensión). La 2-DE es el método de separación más utilizado en las aproximaciones proteómicas ya que permite visualizar de forma paralela los mapas proteicos de distintas situaciones experimentales.

Muchas de las limitaciones de la técnica se han ido corrigiendo con los años, haciéndola más adecuada a los requerimientos de la proteómica (Görg et al., 2004). Así, pues el uso de anfolitos inmovilizados para el isoelectroenfoco (IEF) produce separaciones de alta resolución y muy reproducibles, lo que ha permitido generar bases de datos de geles 2-DE de muchos organismos y tejidos. El estudio de las proteínas con pI extremos se ha ido también mejorando con el uso de estos nuevos soportes de trabajo para IEF y mediante la optimización de protocolos. Por otro lado, la detección de las proteínas de muy baja concentración puede mejorarse utilizando métodos de prefraccionamiento y enriquecimiento de la muestra inicial.

Tras la separación de las proteínas, es necesario visualizar las proteínas en los geles. Para ello se utilizan métodos de tinción de los geles visibles (tinción con nitrato de plata, azul coomassie...), fluorescentes (SPYRO) o radiactivos. Actualmente, los métodos fluorescentes están tomando más importancia ya que son tinciones de punto final y presentan un rango dinámico más alto (tres órdenes de magnitud) (Görg et al., 2004).

Las imágenes obtenidas después del proceso de tinción muestran el conjunto de proteínas separadas como diferentes manchas (spots) distribuidas en un espacio bidimensional (gel). Estas proteínas, una vez reconocidas y estudiadas, se recortan directamente del gel y se digieren con una proteasa (normalmente tripsina), produciéndose un conjunto de péptidos, que se estudian mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time OF Flight) particularmente útil para la obtención de la "huella peptídica" (PMF).

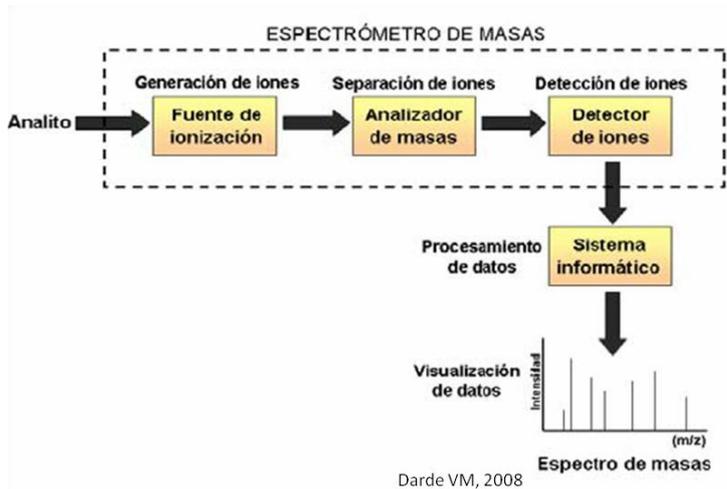
La identificación de las proteínas por espectrometría de masas (mass spectrometry-MS) se basa en la producción de iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, la clasificación de los mismos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ) y la cuantificación de su intensidad. Con esta información se puede determinar el peso molecular ( $P_m$ ) (Mann et al., 2001) y la abundancia de los componentes de una mezcla y tener una idea de su estructura química.

Un espectrómetro de masas consta, generalmente, de 3 componentes (**Figura 1.17**): la fuente de iones que ioniza y vaporiza las muestras, el analizador de masas, y el detector de iones. Las muestras se introducen en la fuente de iones donde las moléculas son convertidas en iones en fase gaseosa.

A continuación, estos iones pasan al analizador donde son acelerados y separados en función de la relación  $m/z$ , y finalmente el detector determina el número de iones para cada valor de  $m/z$ . Existen distintos tipos de fuentes de ionización y analizadores. Los diferentes espectrómetros disponibles son el resultado de la combinación de estos dos elementos. En proteómica, los sistemas



de ionización más utilizados son la ionización por desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI) (Karas et al., 1988) y electrospray (ESI) (Fenn et al., 1989). En los últimos años, se han desarrollado varios espectrómetros de masas de diseños híbridos que complementan a los analizadores de masas en tándem convencionales, como el Qq-TOF (Svevchencko et al., 2000), Q-TRAP (Le-Blanc et al., 2003), entre otros.



**Figura 1.17.** . Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas. Existen tres componentes esenciales: La fuente de ionización (MALDI o ESI), el analizador de masas (TOF, Q, IT o una combinación de los anteriores en el caso de los espectrómetros híbridos) y el detector de iones. Las señales captadas por el detector son integradas en un sistema informático (externo al espectrómetro de masas) que genera gráficos conocidos de los espectros de masas.

La espectrometría de masas proporciona medidas muy precisas de la masa molecular y carga de proteínas en una muestra. Las medidas de masas de las proteínas intactas pueden proporcionar información rápida y valiosa sobre el perfil proteico de una muestra, aunque a la hora de identificar una proteína no es práctico basarse únicamente en su relación  $m/z$ , ya que existen múltiples factores (procesamientos postraduccionales) que pueden variar la masa molecular real de una proteína respecto a la masa teórica de los datos.

Además, cuanto mayor es la masa de una proteína, menor es la exactitud de la medida. Por ello, se han desarrollado estrategias complementarias para la identificación de proteínas, como la "huella dactilar peptídica". Esta técnica se basa en las medidas de las masas de los péptidos obtenidos tras la digestión enzimática de una proteína. La tripsina es la proteasa más comúnmente utilizada, ya que su corte altamente reproducible en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina permite identificar la proteína mediante comparación de los valores de masa peptídica medidos (reales) con los valores calculados (teóricos) en la digestión virtual de todas las proteínas en las bases de datos (Clauser et al., 1999; James et al., 1994).

La fiabilidad de este método depende de varios factores, entre ellos la precisión en la medida de los péptidos (Clauser et al., 1999), el número de proteínas presentes en la muestra digerida, el



tamaño de la proteína digerida (las proteínas con mayor peso molecular generan un mayor número de péptidos por lo que es más probable identificarlas respecto a las pequeñas) y la calidad de las bases de datos empleada.

En el caso de especies cuyo genoma se conoce, generalmente las proteínas son identificadas por mapeo peptídico utilizando MALDI-TOF. En esta técnica, la ionización de péptidos (producto de la digestión previa de las proteínas con tripsina) por MALDI se lleva a cabo mediante la irradiación de la muestra con pulsos de luz láser de longitudes de onda en el IR o UV. En la ionización por MALDI se generan iones monocargados derivados de la protonación o desprotonación de las moléculas, a pesar de observar también iones con 2 ó más cargas en el caso de proteínas con  $P_m > 5000$  Da.

El método estándar para el análisis de péptidos y proteínas es la combinación de MALDI con el analizador de tiempo de vuelo (TOF). En un espectrómetro de masas MALDI-TOF los iones formados son acelerados tras aplicar un campo eléctrico. Estos iones adquieren la misma energía cinética durante la aceleración con lo cual los iones con distinta masa presentan “velocidades de vuelo” distintas. Mediante este análisis se consigue determinar el  $P_m$  de los péptidos tripticos de una determinada proteína. El resultado es lo que se conoce como huella peptídica, y es característica de cada especie proteica.

En los casos en los que las proteínas no han podido ser caracterizadas por MALDI-TOF, se recurre a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en la que se obtiene más información que lo que es la  $m/z$ , por ejemplo, la estructura o secuencia de aminoácidos que constituyen el péptido. Mediante esta técnica un ión generado en la fuente de ionización es aislado (ión precursor) y sometido a procesos energéticos que lo fragmentan. El análisis de los iones fragmentados proporciona información estructural del ión precursor. El patrón de fragmentación de un péptido analizado por MS/MS depende del tipo de rotura que sufre el ión precursor.

Además, este patrón es característico de la secuencia aminoacídica específica del péptido, de forma que la secuencia puede deducirse del análisis del correspondiente espectro MS/MS. En teoría a partir de un espectro de fragmentación se podría determinar de forma manual la secuencia lineal de dicho péptido (secuenciación “de novo”) o al menos de una parte de la secuencia. Para ello basta con calcular las pérdidas de masa molecular entre dos iones consecutivos de cada serie, este valor debe coincidir con la masa molecular del residuo de aminoácido al que pertenece.

No obstante, no siempre son fáciles de interpretar las señales de fragmentación, ya que pueden existir modificaciones postraduccionales que modifiquen el valor de masa de los residuos de aminoácidos. También puede ocurrir que falte alguna señal de alguna de las series, ya que la química de los aminoácidos hace que no todos los enlaces se fragmenten con la misma eficacia. Además, los sistemas de alto rendimiento que utilizan instrumentos capaces de generar miles de espectros por minuto, hacen inviable la interpretación manual.

Para resolver estos problemas se han desarrollado diferentes programas informáticos capaces de secuenciar de “de novo” a partir de espectros de fragmentación. Luego se realiza una búsqueda



por homología de secuencia en las bases de datos existentes para finalmente identificar a la proteína. Si la proteína en estudio pertenece a una especie no secuenciada, o de la que no se tienen datos de su genoma, entonces se realiza una búsqueda por homología en otras especies o familias cercanas (Carrascal y Palomino., 2002).

Tras la adquisición de los datos, estos son enfrentados a las bases de datos de secuencia de modo automático (Shevchenko et al., 1996) o interpretados manualmente (Biemann et al., 1988; Clauser et al., 1995). Los diferentes programas informáticos que existen en la actualidad para el análisis de los datos generados por espectrometría de masas (Mascot (Perkins et al., 1999), ProFound (Zhang W. et al., 2000), etc.) comparan las medidas generadas con las bases de datos, evaluando y ordenando los resultados de acuerdo con un sistema de puntuación (el más utilizado es el algoritmo denominado “Molecular Weight Search” o “NOWSE”). La calidad de los resultados depende de la pureza de la muestra, exactitud de las masas y del instrumento y el número de péptidos obtenidos (Lin et al., 2002). La fiabilidad de estos resultados dependerá también de la base de datos y el algoritmo empleados. Las diferentes bases de datos que existen fueron revisadas por Steen y Mann (Steen y Mann, 2004).

### 1.6.2. Aplicaciones de la proteómica a peces

Los estudios de proteómica se vienen utilizando desde hace relativamente poco tiempo. En los últimos años, las investigaciones sobre proteómica en peces y productos marinos, así como en la fisiología de los peces, han sufrido un auge en los últimos años, como se apunta en revisiones recientes (Parrington y Coward, 2002; Piñeiro et al., 2003).

Hasta la actualidad las tecnologías de los análisis de expresión diferencial de proteínas de las especies de peces, ya sean salvajes o cultivadas, han sido escasas, y principalmente se han centrado en peces, conocidos como organismos modelo, como son el pez gato (*Danio rerio*, Link et al., 2006), trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*, Russell et al., 2006; Martín et al., 2003), y otras especies, en menor profundidad, como el salmón atlántico (*Salmon salar*, Provan et al., 2006) o lubina (*Dicentrarchus labrax*, Monti et al., 2006).

Otras áreas de investigación, diferentes a la expresión proteica, relacionadas con los peces también presentan ventajas con los avances de las técnicas de proteómica, como la ecología marina (López et al., 2007), la descripción de alérgenos en peces, la identificación de especies dentro de familias (por ejemplo, *Merluccius sp.*) o en el control de la calidad de los peces (Carrera et al., 2006; Martínez et al., 2004; Piñeiro et al., 2003).

Respecto a los estudios relacionados con el control de la calidad de los peces, los estudios recientes y futuros en peces y productos marinos, están relacionados con cuestiones que conciernen al mejor procesamiento de los peces y otras consideraciones relacionadas con la calidad de los mismos, de tal manera que se presta especial interés al estudio proteómico de la calidad de los



tejidos, células justo antes de la muerte del animal, “antemorten”, para beneficiar el estado después de su muerte, “postmorten” (Vilhelmsson et al., 2005). Un problema persistente en la industria del pescado, es la pérdida de textura de la carne, produciéndose un músculo más blando de lo normal, aunque el pez haya sido debidamente congelado y almacenado.

Este fenómeno se cree que es debido a la degradación proteica que sufre el músculo “postmorten”, aunque los detalles de esta autólisis aún no están del todo clarificados (Vilhelmsson et al., 2005). Sin embargo, esta acción se atribuye principalmente a la degradación de las miofibrillas por calpaínas y catepsinas (Ladrat et al., 2000; Ogata et al., 1998) y la degradación de la matriz extracelular por metaloproteasas y serín-proteasas de la matriz, son capaces de degradar fibras de colágeno, proteoglicanos y otros componentes de la matriz (Lodemel y Olsen, 2003; Woessner 1991).

Cualquiera que sea el mecanismo, es evidente que estas variaciones influyen en la calidad de las especies (Papa et al., 1996; Verrez-Bagnis et al., 1999) y, además, muestran variaciones estacionales (Ingolfsdottir et al., 1998; Ladrat et al., 2000). Por ejemplo, mientras que la proteína desmina sufre una degradación “postmorten” en la sardina y rodaballo, no lo hace en lubina y trucha marrón (Verrez-Bagnis et al., 1999). La cadena pesada de la miosina en bacalao puede degradarse durante el proceso de salado del mismo (Thorarinsdottir et al., 2002).

Problemas de este tipo, donde las diferencias ocurren en el número, masa molecular y pH de las proteínas de los tejidos, se pueden solventar con estudios de electroforesis bidimensional (2-DE) basados en la proteómica. Vale la pena resaltar que las proteínas con actividad proteolítica, ya sean codificadas por genes estructurales o por modificaciones postraduccionales, por regla general presentan un peso molecular y pH característico, distinguiéndose así en el gel 2-DE. De este modo, muchas de las miofibrillas relacionadas con la textura de los productos marinos, pueden identificarse por métodos proteómicos (Martínez et al., 1990; Piñeiro et al., 2003).

Se han realizado estudios serios que se refieren a los cambios “post-morten” que sufre la carne de los peces (Kjaersgard y Jessen, 2003; Martínez y Jakobsen Friis, 2004) y han demostrado la importancia y complejidad de la proteólisis que se da en los peces durante su almacenamiento y procesamiento. Por ejemplo, Martínez et al. (2002) utilizó una electroforesis bidimensional (2-DE) para demostrar la diferente composición de proteínas en el bacalao comparando la situación “pre-rigor” con la “post-rigor” y obtuvieron como resultado que ambas tenían un patrón de proteína diferente. Kjaersgard y Jessen (2003), emplearon 2-DE para estudiar los cambios producidos en las proteínas del músculo durante el almacenamiento del bacalao (*Gadus morhua*) y también se observaron diferencias en los patrones de expresión proteica.

La calidad del pescado depende de la calidad de la dieta empleada y de las condiciones de cría, durante su vida (review Huss et al., 1995). Para comprender las interacciones entre los parámetros fisiológicos, variables ambientales y calidad de la dieta sobre la calidad de los peces de consumo, se necesita de disponer de técnicas moleculares, como la proteómica. En un estudio reciente, sobre la



viabilidad de sustituir la harina de pescado de la dieta estándar de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) por proteínas de origen vegetal, se han empleado técnicas de proteómica (Martín et al., 2003a; Martín et al., 2003b; Vilhelmsson et al., 2004).

Al mismo tiempo, se ha estudiado en esta misma especie, la calidad del pescado (De Francesco et al., 2004; Parisi et al., 2004). Las conclusiones obtenidas en estos estudios fueron que las truchas alimentadas con la dieta a base de proteína vegetal (soja) presentaron una mayor dureza, peor jugosidad y un olor intenso que las truchas alimentadas con la dieta a base de harina de pescado. Además, la cantidad y composición de aminoácidos libres en la carne de los peces se vieron significativamente afectadas por la dieta y por el desarrollo “post-mortem”.

Así, cambios en la composición de la dieta con la que se alimentaron a las truchas, cambió el patrón de expresión de proteínas. Se analizó la expresión de unas 800 proteínas se analizaron los patrones de expresión, algunas de ellas, vieron aumentadas su expresión, otras disminuida, en respuesta al cambio nutricional. Estos resultados demuestran como la proteómica, ayuda a entender las respuestas fisiológicas y metabólicas que se dan en los peces, cuando estos son alimentados con dietas diferentes.

Parte de los estudios proteómicos realizados en peces han sido encaminados a estudiar el proteoma del hígado, por ser éste el principal tejido regulador de las rutas metabólicas en peces. El hígado controla una gran variedad de procesos bioquímicos a través de la expresión de multitud de proteínas. El hecho que el hígado esté implicado en multitud de reacciones metabólicas dificulta la comparación directa del proteoma del hígado con características relacionadas con la calidad del pescado (Vilhelmsson et al., 2005); sin embargo, algunas observaciones interesantes en cuanto a expresión proteica se refiere pueden hacerse pueden hacerse.

Existen estudios de proteómica en relación con las proteínas expresadas durante los estadios del proceso de maduración. Uno de estos estudios se ha llevado a cabo en oocitos del pez cebra y de dorada (Tamar Ziv et al., 2007) y se ha visto que existen patrones de expresión proteico diferentes en ambas especies, y en momentos puntuales del desarrollo diferentes. De este modo, la proteómica supone un gran avance para la acuicultura ya que se puede controlar la expresión durante el desarrollo y, por tanto, las herramientas control para la fertilización *in vitro*.

Un reto importante de la acuicultura comercial es el producir un mayor crecimiento de peces, manteniendo al mismo tiempo un elevado nivel en la calidad de la carne. Un obstáculo para ello es conocer el papel de los genes que sustentan los mecanismos celulares y moleculares responsables del crecimiento muscular y el desarrollo de especies de peces. Conociendo la expresión de los genes que dan lugar a las proteínas subyacentes obtendremos una valiosa información para la cría de selección de valores y estrategias para la mejora del rendimiento muscular de los peces.

El crecimiento de un músculo es el resultado de un equilibrio entre la acumulación de proteínas (anabolismo) y la degradación (catabolismo). Actualmente, existe desinformación sobre los acontecimientos que ocurren sobre el crecimiento del músculo (Reddish et al., 2008). En peces, se



conoce que el crecimiento muscular es el resultado de la combinación de fenómenos de hiperplasia (aumento del número de miofibrillas durante toda la vida) y la hipertrofia (aumento del tamaño de las miofibrillas (Greenlee et al., 1995).

Las especies individuales de peces presentan alteraciones entre procesos de hiperplasia e hipertrofia muscular durante el crecimiento posnatal. Por ejemplo, en teleósteos, como el besugo, un pez relativamente grande, el crecimiento se da por hipertrofia; mientras que el pez cebra, más pequeño, crece por fenómenos de hiperplasia (Reddish et al., 2008). En este estudio, se estudiaron las proteínas/péptidos, separadas electroforéticamente, asociadas a un mayor o menor crecimiento muscular en la perca amarilla (*Perca flavescens*).

La variabilidad del crecimiento en peces puede deberse a causas fenotípicas y genotípicas del músculo. Este hecho resulta especialmente interesante para la acuicultura, ya que mayor crecimiento muscular, se traduce en mayor crecimiento del animal completo. El crecimiento muscular está afectado por varios factores, la variedad de pez o especie (Wheatherley et al., 1979), por el ejercicio (Jhonston et al., 1980) y por la nutrición (Kliessling et al., 1991).

Un problema en la comprensión de las causas de variación consiste en la falta de información acerca de los productos génicos y/o productos proteolíticos asociados con los mecanismos de crecimiento muscular y desarrollo de la cría de especies por parte de la acuicultura con fines comerciales (Jhonston et al., 1999). Los resultados del estudio de Reddish et al. (2008) han contribuido a la comprensión por identificación de proteínas estructurales, contráctiles y metabólicas que se asocian con diferencias en el crecimiento en el músculo de la perca amarilla.

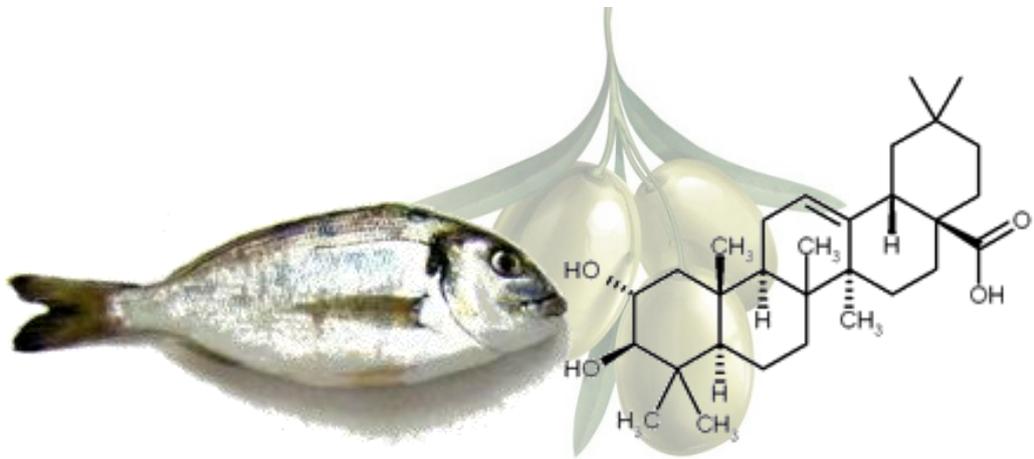
Recientemente, también se han hecho estudios de proteómica en el cazón (Lee et al., 2006). En ellos se han comparado el patrón de expresión de proteínas de los tejidos con función osmorreguladora, con los que no la tienen, y se ha visto que existen proteínas que se expresan en los tejidos osmorreguladores únicamente, otras que se expresan en tejidos no osmorreguladores, y las que se expresan en ambas situaciones.

En general, se comprobó que en los tejidos con función osmorreguladora (riñón, intestino, branquias y glándula rectal) se producía un aumento de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, el ciclo de la urea y la ruta Rho-GTPasa/citoesqueleto, si las comparamos con los tejidos no osmorreguladores (corazón y cerebro).



# *Material y Métodos*

---







## 2. Material y Métodos

### 2.1. Diseño experimental

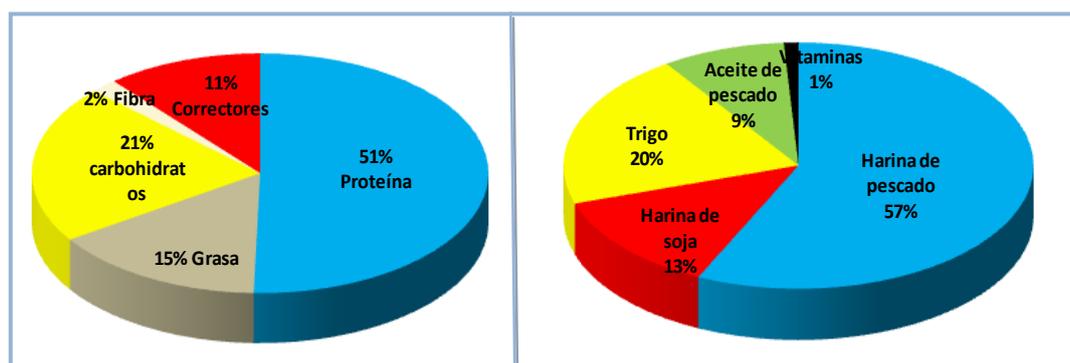
#### 2.1.1. Dietas experimentales

Para evaluar los efectos del ácido maslínico sobre el crecimiento y desarrollo de la dorada, se formularon y elaboraron tres dietas experimentales, que diferían únicamente en la cantidad añadida de ácido maslínico. Las cantidades de este compuesto que se adicionaron a las dietas fueron las siguientes:

- 0 mg de ácido maslínico por kg de dieta (control)
- 50 mg de ácido maslínico por kg de dieta (AM<sub>50</sub>)
- 100 mg de ácido maslínico por kg de dieta (AM<sub>100</sub>)

Las cantidades de ácido maslínico utilizadas en este estudio fueron seleccionadas en base a las que previamente se utilizaron en los estudios sobre el crecimiento y desarrollo de la trucha (Fernández-Navarro et al., 2006, Fernández-Navarro et al., 2008). En aquellos estudios se observó que con cantidades de 25 a 250 mg de ácido maslínico por kg de dieta se conseguía un máximo crecimiento sin que aparecieran signos de toxicidad para la trucha. A la vista de estos resultados, nos planteamos, en este nuevo estudio, valorar cantidades intermedias (50 y 100 mg por kg) para analizar los posibles efectos de la concentración del producto.

La composición general de una dieta control para la dorada, según Vergara et al., 1996, se establece en proporciones del 49% de proteína, 15% de lípidos y 21% de carbohidratos. Las dietas empleadas en este estudio experimental se han basado en estas proporciones. En la **Figura 2.1 y Tabla 2.1**, se recoge la composición detallada de las dietas tanto en macronutrientes, como en materias primas, expresadas en g/100 g de dieta.



**Figura 2.1.** Composición específica de la dieta empleada en el ensayo experimental de dorada alimentada con ácido maslínico. Se detallan los porcentajes (%) del contenido en macronutrientes, a la izquierda y las materias primas



La principal fuente proteica empleada fue la harina de pescado. Como fuente de lípidos se utilizó el aceite de pescado, rico en ácidos grasos  $\omega^3$ . Como fuente hidrocarbonada se usó la harina de soja y de trigo. La composición y proporción del suplemento vitamínico y mineral, se recoge en el pie de la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1. Composición general de las dietas utilizadas en el ensayo de crecimiento de la dorada**

	Control	AM <sub>50</sub>	AM <sub>100</sub>
<b>Ingredientes (g/100g)</b>			
Harina de pescado	57	57	57
Harina de soja	13	13	13
Harina de trigo	20,5	20,5	20,5
Aceite de pescado	8,5	8,5	8,5
Suplementos vitamínico y mineral	1	1	1
<b>Ácido maslínico</b>	<b>0</b>	<b>0,005</b>	<b>0,01</b>
<b>Análisis de las dietas (% materia seca)</b>			
Humedad	9,24	9,10	9,17
Proteína	49,84	50,28	51,51
Lípidos	13,96	14,67	14,84
Ceniza	11,09	11,19	10,95
MELN	25,11	23,86	22,70
<b>Contenido energético</b>			
Energía bruta (MJ kg <sup>-1</sup> )	19,6	19,7	19,8
P/E (g/kJ)	2,54	2,55	2,60
EP/ENP	0,99	0,99	1,03

Las nomenclaturas Control, AM<sub>50</sub> y AM<sub>100</sub> corresponden a las dietas, no adicionada con ácido maslínico, adición de 50 y 100 mg/kg dieta respectivamente. El suplemento vitamínico contenía (g/300g) tiamina 0,6, riboflavina 0,9, piridoxina 0,45, pantotenato cálcico 2,25, ácido nicotínico 3,75, ácido fólico 0,225, inositol 15, colina 75, biotina 0,045, cianocobalamina 0,10, ácido ascórbico 15, vitamina A 0,00225, vitamina D 0,001125, vitamina E 3,75, vitamina K 0,375 y sacarosa hasta 300 g de mezcla. El suplemento mineral contenía (g/800 g mezcla): fosfato monobásico de calcio 480, carbonato cálcico 104, cloruro potásico 40, cloruro sódico 64, sulfato magnésico 3,2, sulfato férrico 24, cloruro magnésico 73,6, yoduro potásico 0,32, sulfato cúprico 0,8, sulfato de zinc 3,2, sulfato de cobalto 0,8, selenito sódico 0,0348, sulfato aluminico 0,16 y sacarosa hasta 800 g de mezcla. Se asumió que el valor energético de la proteína, lípidos y carbohidratos fue 19,6, 39,5 y 17,2 KJ/g respectivamente. P/E=Proteína/Energía. EP/ENP= Energía Proteica/Energía No Proteica.

Las dietas fueron analizadas siguiendo los Métodos de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (2000) y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2.1**.

El contenido energético de las dietas se calculó asumiendo que el valor energético de la proteína, lípidos y carbohidratos eran, 19,6 kJ·g<sup>-1</sup>, 39,5 kJ·g<sup>-1</sup> y 17,2 kJ·g<sup>-1</sup> respectivamente (Brett y Groves, 1979). La relación Proteína/Energía era prácticamente la misma en las 3 dietas ensayadas; al igual que ocurrió con la relación Energía Proteica/Energía No Proteica.

El tamaño de grano empleado varió entre 1 y 2,5 mm y para adecuarlo al tamaño de los peces. El periodo de utilización de cada tamaño de grano dependió de la velocidad de crecimiento de los



peces ensayados. Estas dietas experimentales fueron elaboradas por el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia, a quienes se les proporcionó, el ácido maslínico.

El ácido maslínico fue aislado y purificado por el grupo del Dr. Andrés García Granados del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.

### 2.1.2. Condiciones experimentales

Los experimentos se llevaron a cabo en acuarios experimentales situados dentro de las instalaciones de tierra de la piscifactoría “Azucarera del Guadalfeo” S.A., División de Acuicultura Marina, Salobreña, Granada, durante el primer semestre del año 2007 (Figura 2.2.).



Figura 2.2. Situación geográfica de la piscifactoría donde se llevó a cabo el ensayo experimental.

Los peces utilizados en el presente estudio fueron inicialmente seleccionados a partir de alevines de dorada (*Sparus aurata*) con un peso inicial de  $12,00 \pm 0,50$  g. El suministro de los mismos, lo llevó a cabo la propia piscifactoría, cuando tenían una edad de aproximadamente 2 meses. La selección de las doradas se hizo a partir de diferentes tanques industriales de producción, de  $50\text{m}^3$  de capacidad, en donde se desarrollaban unos 300.000 peces.

Los peces utilizados en nuestros experimentos se pescaron con salabar y se pesaron individualmente, desechándose las denominadas colas de peso, para favorecer la homogeneidad de la población inicial; posteriormente fueron distribuidos al azar, en 10 cubas diferentes. Cada una de estas cubas contenía un total de 150 peces; a su vez, cada 2 cubas formaron un lote experimental. Las cubas eran redondas y de poliéster y la capacidad de las mismas era de un  $1\text{ m}^3$  (Figura 2.3).



El abastecimiento de agua se dio en circuito abierto y con flujo continuo de  $5 \text{ L min}^{-1}$ , ésta procedía directamente de agua de mar debidamente filtrada, para evitar contaminaciones y presentaba una salinidad del 36‰. Al realizar los ensayos en régimen de piscifactoría, el fotoperíodo fue natural y la temperatura osciló entre  $15^{\circ}\text{C}$  y  $21^{\circ}\text{C}$  a lo largo del experimento. La concentración media de oxígeno en los tanques fue de  $6,9 \text{ mg L}^{-1}$ , y además, estos disponían de soplantes manuales, que mantenían esta concentración de oxígeno.

Una vez que los peces se adaptaron a su nuevo hábitat, comenzó el ensayo. La duración del experimento fue de 210 días. Todos estos parámetros (temperatura, oxígeno, caudal de agua, salinidad...), además de la alimentación y mortalidad, se controlaban diariamente. En la **Figura 2.3** podemos observar los acuarios experimentales que se emplearon en el ensayo.



**Figura 2.3.** Detalle de las instalaciones y cubas experimentales en los que se llevó a cabo el ensayo.

### 2.1.3. Alimentación

Las 10 cubas se distribuyeron en 5 grupos experimentales, a dos cubas por grupo. De estos 5 grupos, 2 se alimentaron a saciedad (*ad libitum*, AL) y 3 con ración restringida al 1,5% del peso de la biomasa del tanque (restringida, R). De los grupos AL, uno se alimentó con dieta control (control AL) y otro con dieta suplementada con 100 mg de ácido maslínico por kg de dieta (AM<sub>100</sub> AL). En los grupos R, uno se alimentó con dieta control (control R), otro con dieta adicionada con 50 mg de ácido maslínico por kg de dieta (AM<sub>50</sub> R), y otro con dieta suplementada con 100 mg de ácido maslínico por kg de dieta (AM<sub>100</sub> R).

La ración de alimento se preparaba y controlaba diariamente. Para los grupos que se alimentaban *ad libitum*, se estimaba una ración hipotética entorno al 2% de la biomasa del acuario



experimental y en función de la demanda, así se aumentaba o no. A los grupos alimentados con ración restringida, se les preparaba la ración al 1,5% del total de biomasa en todos los casos y éstas se calculaban y revisaban en cada muestreo de peso.

La alimentación se realizó manualmente y a la misma hora a todos los acuarios, y se cesaba cuando los peces se iban al fondo de la cuba. Por regla general, las tomas diarias de alimento fueron dos, una por la mañana, y otra por la tarde. La alimentación se hacía 6 días a la semana, de lunes a sábado; y se sometían a ayuno los días en los que se realizaba el muestreo de peso y/o toma de muestras para posteriores análisis.

#### 2.1.4. Toma de muestras

Cada 15 días, desde el día 0 hasta el día 210, se pesaba el lote completo de doradas correspondientes a cada cuba y situación nutricional. Además, cada mes, se pesaban individualmente 20 peces de cada cuba. Con estos datos, se construyó la curva de crecimiento en peso del animal completo y se determinó la ración diaria a suministrar a los tratamientos con alimentación restringida.

A tiempo 0 y 210 se tomaron muestras de hígado y músculo blanco de cada tratamiento para la determinación de la concentración de proteínas de cada tejido. Se tomaron 3 peces al azar de cada cuba (6 por tratamiento) y se realizó la disección correspondiente. Con los resultados obtenidos se determinó la velocidad fraccionaria de acumulación de proteínas ( $K_G$ ).

A los 0, 105 y 210 días de iniciado el experimento se tomaron 4 peces de cada cuba (8 por tratamiento) y se determinó el porcentaje en materia seca correspondiente a la proteína, grasa, ceniza, materia libre de nitrógeno (MELN) y humedad para determinar la composición corporal a lo largo del tiempo.

El índice de mortalidad expresado como porcentaje de supervivencia, se determinó considerando y contabilizando el número de bajas diarias de cada una de las diferentes situaciones nutricionales ensayadas.

A los 190 días de iniciado el experimento se realizó la toma de muestras para la determinación de las velocidades de recambio proteico y concentración de ácidos nucleicos. Para esto se utilizaron 10 peces de cada tratamiento, a 5 peces por cuba seleccionados al azar.

El estudio histológico de tejido hepático, músculo blanco y miocardio, se realizó a los 195 días, para ello se utilizaron 6 peces por lote experimental, y estos mismos peces fueron empleados para la determinación de actividades enzimáticas así como para los estudios de expresión por la técnica "western blotting" de esas mismas proteínas y electroforesis bidimensional. Para ello se guardaron 6 muestras de tejidos representativas de cada situación nutricional, en nitrógeno líquido, hasta su traslado a una cámara frigorífica de  $-80^{\circ}\text{C}$ , donde permanecieron hasta su posterior procesamiento.



## 2.2. Índices biológicos del crecimiento, utilización nutritiva de la dieta y composición corporal

### 2.2.1. Crecimiento y eficacia alimentaria

El **incremento de peso** ( $\Delta$ Peso, %) se determinó como incremento en porcentaje del peso medio inicial y se calculó mediante la siguiente expresión matemática:

$$\Delta \text{Peso} (\%) = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Peso inicial (g)}} \times 100$$

La **eficacia alimentaria (EA)** es uno de los índices que refleja la utilización de la dieta ingerida así como la capacidad de aprovechamiento de ésta por parte del animal. También se utiliza su inverso, denominado en este caso **índice de conversión (IC)**. EA se calcula según la siguiente expresión:

$$EA = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Alimento ingerido (g)}}$$

La **tasa de crecimiento instantáneo (TCI)** se define como el crecimiento neto por unidad de tiempo y se expresa en porcentaje por día. TCI se calcula según la siguiente expresión:

$$TCI (\%) = \frac{\text{Ln Peso Final (g)} - \text{Ln Peso inicial (g)}}{n^{\circ} \text{ días}} \times 100$$

El **coeficiente de crecimiento térmico (CCT)** es un índice que predice el crecimiento de los peces cuando existen diferentes temperaturas. Este índice puede ser usado para predecir el crecimiento y producción bajo una variedad de condiciones aunque hay que tener en cuenta que tiene limitaciones (Alamar et al., 2001). CCT se calcula según la siguiente expresión:

$$CCT = \frac{\sqrt[3]{\text{Peso final (g)}} - \sqrt[3]{\text{Peso inicial (g)}}}{\sum (\text{°C} \times \text{día})}$$

### 2.2.2. Utilización de la proteína y los lípidos

El **coeficiente de eficacia del crecimiento (CEC)** expresa la relación entre el incremento de peso y la proteína ingerida. Es un índice de calidad proteica o de eficacia de uso de la proteína de la dieta para crecimiento. CEC se calcula según la siguiente expresión:



$$CEC = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

La proteína de la dieta puede utilizarse con fines energéticos y/o estructurales. Su utilización con fines estructurales se traducirá en un incremento de peso. Los lípidos también contribuyen al incremento de peso del animal por acumulación de grasa corporal no sólo con fines energéticos sino también plásticos. Es por ello, por lo que es necesario conocer en qué medida proteína y lípidos de la dieta son utilizados por el animal.

Así, se define el **valor productivo de la proteína (VPP)** como el porcentaje entre la ganancia de nitrógeno corporal y el nitrógeno ingerido. VPP se calcula según la siguiente expresión matemática:

$$VPP (\%) = \frac{N \text{ corporal final (g)} - N \text{ corporal inicial (g)}}{N \text{ ingerido (g)}} \times 100$$

Y el **valor productivo de los lípidos (VPL)**, establece una relación porcentual entre los lípidos corporales y los lípidos ingeridos. VPL se calcula según la expresión:

$$VPL (\%) = \frac{\text{Lípidos corporales finales (g)} - \text{Lípidos corporales iniciales (g)}}{\text{Lípidos ingeridos (g)}} \times 100$$

### 2.2.3. Índices biométricos

El **índice de nutrición (IN)** se calcula como la relación entre el peso y la longitud de los animales de acuerdo con la siguiente expresión:

$$IN (g \text{ cm}^{-3}) = \frac{\text{Peso (g)}}{(\text{Longitud total (cm)})^3}$$

La **relación hepatosomática (RHS)** indica la relación porcentual existente entre el peso del hígado y el peso corporal. Una variación de los valores normales puede ser indicativo de alteraciones fisiológicas o metabólicas. RHS se calcula según la expresión:

$$RHS (\%) = \frac{\text{Peso hígado (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \times 100$$

La **relación miosomática (RMS)** se calcula igual que la RHS, pero teniendo en cuenta el peso del músculo blanco:

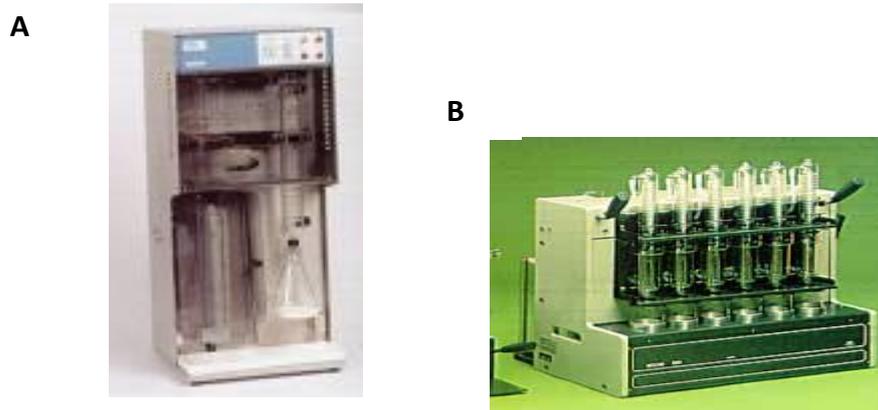
$$RMS (\%) = \frac{\text{Peso músculo (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \times 100$$



#### 2.2.4. Análisis de composición corporal

Los análisis de composición química de las dietas y animales se realizaron siguiendo el método oficial de análisis publicado por la "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 2000), para los siguientes análisis:

- **Determinación de humedad:** el análisis comenzó con el troceado y pesada de las doradas en cápsulas de porcelana de peso conocido. A continuación se introducían las muestras en una estufa a 105°C hasta conseguir peso constante. La cantidad de humedad de la muestra se determinaba por la diferencia de peso.
- **Determinación de cenizas:** las mismas muestras que se utilizaban para humedad, se aprovechan para determinar los minerales totales presentes en las mismas. Se llevaban a una placa quemadora durante, aproximadamente, 20 minutos (hasta que la muestras dejen de echar humo, periodo en el que gran parte de la materia orgánica habrá desaparecido). Posteriormente se incineraban en un horno Mufla a 500°C, entre 12-24 horas, hasta peso constante.
- **Determinación de proteína:** la determinación cuantitativa de proteínas se llevó a cabo mediante el análisis del contenido de nitrógeno total en las muestras utilizando el método Kjeldhal (AOAC, 2000). Se procedió a la digestión de la proteína de la muestra en una placa calefactora empleando para ello, ácido sulfúrico (96%), 2 bolitas de vidrio y un catalizador (sulfato potásico, sulfato cúprico y selenio, en proporciones 100:6:1). Como consecuencia de la digestión, se forma sulfato amónico. Una vez enfriada la muestra, se llevó a un matraz de 100 mL enrasando con agua destilada, y se procede a la destilación (destilador Selecta, como el que aparece en la **Figura 2.5**) de un volumen de muestra junto con hidróxido sódico al 40%; el sulfato amónico reacciona con el hidróxido de sodio y se forma amoníaco libre. Éste es atrapado en una solución (indicador Buchi) colocada a la salida del destilador. Este indicador se preparó a partir de una solución madre mezcla de otras dos, la primera de ellas a base de rojo de metilo en alcohol al 0.1% y la segunda compuesta por verde de bromocresol disuelto en alcohol y agua destilada (50/50) al 0.2%. A partir de esta solución madre (35 mL), se prepara una solución hija (2 L), que a su vez lleva 20 g de ácido bórico disuelto, que es la que se coloca a la salida del destilador. Por último, se valora el amoníaco formado con HCl 0.01 M tomando como referencia el viraje de color. El volumen de HCl gastado en la valoración nos proporciona el valor del nitrógeno total presente en la muestra analizada. Para los cálculos correspondientes se utilizó el valor de 6,25 como factor de conversión de nitrógeno en proteínas.
- **Determinación de grasa:** los lípidos totales se determinaron gravimétricamente, tras extracción continua con éter dietílico según el método Soxhlet (AOAC, 2000), utilizando un extractor Buchi 810 (**Figura 2.4**). Las muestras desecadas se colocaron en unos cartuchos de papel de filtro, mezcladas con sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de humedad y facilitar la extracción lipídica. La grasa se cuantificó pesando los matraces de recogida del solvente con la grasa, tras la evaporación de éter.



**Figura 2.4.** Detalle del destilador Selecta que se utilizó para determinar la concentración de proteína corporal (panel A) y extractor de grasas modelo Buchi 810 (panel B).

- **Determinación de material extractivo libre de nitrógeno (MELN):** El cálculo de MELN se obtuvo por diferencia a partir del resto de valores (proteínas, lípidos y cenizas). Este índice corresponde mayoritariamente a los carbohidratos. MELN se calcula según la siguiente expresión:

$$\% \text{ MELN} = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cenizas})$$



### **2.3. Determinación de las velocidades de recambio de proteínas en el hígado y músculo blanco de la dorada**

#### **2.3.1. Fundamento**

La determinación del recambio proteico a partir de las velocidades fraccionarias de síntesis ( $K_s$ ) y degradación ( $K_b$ ) de proteínas del hígado y músculo blanco de la dorada se realizaron según la técnica descrita en primer lugar por Garlick et al. (1980) aplicada por primera vez a estudios con peces por Houlihan et al., 1988, y posteriormente modificada por Peragón et al. (1998) para adaptarla a nuestras condiciones experimentales.

La medida de  $K_s$  está basada en la determinación de la velocidad de incorporación de fenilalanina (Phe) tritiada al conjunto de las proteínas tisulares después de inyectar en la vena caudal de la dorada una dosis masiva de Phe radiactiva y dejar que ésta se equilibre con el almacén de aminoácidos tisulares, precursores de la síntesis. Los tiempos utilizados para la medida de esta velocidad fraccionaria fueron de 2 min, tomado como tiempo inicial una vez equilibrada la dosis, y 45 min tras la inyección del aminoácido.

La radiactividad específica de la Phe unida a la proteína en el hígado y músculo blanco muestra incrementos lineales durante los primeros 45 min después de la inyección; esto permite determinar de forma exacta la velocidad de síntesis proteica utilizando medidas entre dos tiempos (2 y 45 min) de ese intervalo (Peragón et al., 1999). El corto periodo de tiempo necesario para la incorporación elimina los posibles errores debidos a la reutilización de aminoácidos marcados, procedentes de la degradación de proteínas con un recambio metabólico rápido.

#### **2.3.2. Técnica**

Se anestesiaba a las doradas con etilenglicol monofenil éter (0,2 mL/L) durante 2 minutos, y, posteriormente, se les inyectaba en la vena caudal, una solución que contenía una mezcla de L-[2,6- $^3\text{H}$ ] Phe (37 MBq/mL, 100  $\mu\text{Ci/mL}$  y radiactividad específica 1640 dpm/nmol) y Phe 150 mM. La dosis administrada fue de 0,5 mL/100 g de peso corporal, y representa entre el 5 y el 12,5% del volumen sanguíneo total, asumiendo que el volumen de sangre de un pez representa entre el 10 y el 40% de su volumen corporal (Jones y Randall, 1978).

Inmediatamente después de la inyección con una dosis masiva de fenilalanina, se devolvían los peces al agua aireada para su rápida recuperación (se eliminaban aquellos peces de la muestra que no se recuperaban con facilidad). Los tiempos de sacrificio de las doradas utilizados fueron a los 2 y 45 min de la inyección. El número de doradas usadas fue de 10 para cada tratamiento, así, dos de ellos fueron sacrificados a los 2 min, y los ocho restantes a los 45 min. Una vez sacrificados los peces, se anotan los pesos y se procede a la extracción del hígado completo y el músculo blanco completo de cada animal una vez eviscerado en su totalidad, cuyos pesos también se anotaron de manera



individual. La muestra de músculo blanco se tomó en todos los casos de la zona por debajo de la aleta dorsal. Después de pesar los tejidos, se preparaba un pulverizado en nitrógeno líquido, con la ayuda de un mortero y utilizando el menor tiempo posible para evitar posteriores transformaciones metabólicas.

A partir del pulverizado de cada tejido, se preparaban extractos con un volumen total de 10 mL formado de homogenado en ácido perclórico 0,2 N y en una proporción 1:10 (p/v), utilizando homogenizadores manuales. Posteriormente estos 10 mL de homogenado, se dividen en dos alícuotas de 5 mL cada una; a partir de una de ellas se determinará la velocidad fraccionaria de síntesis de proteínas ( $K_s$ ), e indirectamente la velocidad fraccionaria de degradación de proteína ( $K_D$ ), mientras que la otra alícuota se utilizará para la determinación de la concentración celular de RNA, necesaria para calcular los valores de eficiencia de síntesis de proteína ( $K_{RNA}$ ).

Las muestras correspondientes a la determinación de la velocidad fraccionaria de síntesis de proteínas,  $K_s$ , se centrifugaron a 2800g, durante 15 min a 4°C con objeto de facilitar la precipitación de la fracción proteica ácido insoluble unida a proteína (denominada en adelante como  $S_B$ -precipitado) y su separación de la fracción proteica ácido soluble no unida a proteína (denominada en adelante como  $S_A$ -sobrenadante). A partir de este momento se trabajará con ambas fracciones de forma individual y por separado.

A la fracción no unida a proteína,  $S_A$  se le adiciona 2,5 mL de citrato potásico a saturación con objeto de eliminar el ácido perclórico presente en la muestra, y se vuelve a centrifugar a 2800 g, durante 15 min a 4°C. Se desecha el nuevo precipitado, que contiene perclorato potásico, mientras que el nuevo sobrenadante, con los aminoácidos libres (entre ellos la Phe marcada radiactivamente), se comprueba que tiene el pH adecuado (pH = 6,3), para ser sometido a la posterior incubación con la Tyr Descarboxilasa (Tyr-DC).

La fracción unida a proteína,  $S_B$  es sometida a diferentes lavados consecutivos, un lavado con ácido perclórico 0,2 N, dos lavados con etanol 95% y, finalmente, uno con éter dietílico. La finalidad de estos lavados es facilitar la precipitación de las diferentes macromoléculas presentes en la muestra (DNA, RNA, lípidos) que pudieran interferir con las posteriores medidas de radiactividad específica. Tras los diferentes lavados, la fracción ácido insoluble se incuba con 5 mL de HCl 6 N a 110°C en un bloque calefactor durante una noche (aproximadamente 12h) utilizando bolas de vidrio para evitar pérdidas durante la hidrólisis proteica.

De este modo, la proteína es hidrolizada hasta sus unidades fundamentales, los aminoácidos, haciéndola accesible a la acción de la Tyr-DC. Pero para ello hace falta eliminar el exceso de HCl por sequedad en un rotavapor acoplado a una bomba de vacío, y resuspender a los aminoácidos resultantes en 3 mL de citrato sódico 2 M, que proporciona el pH óptimo para la posterior incubación con Tyr-DC.

Un resumen completo del método y procedimiento analítico seguido se esquematiza en la **Figura 2.5**.

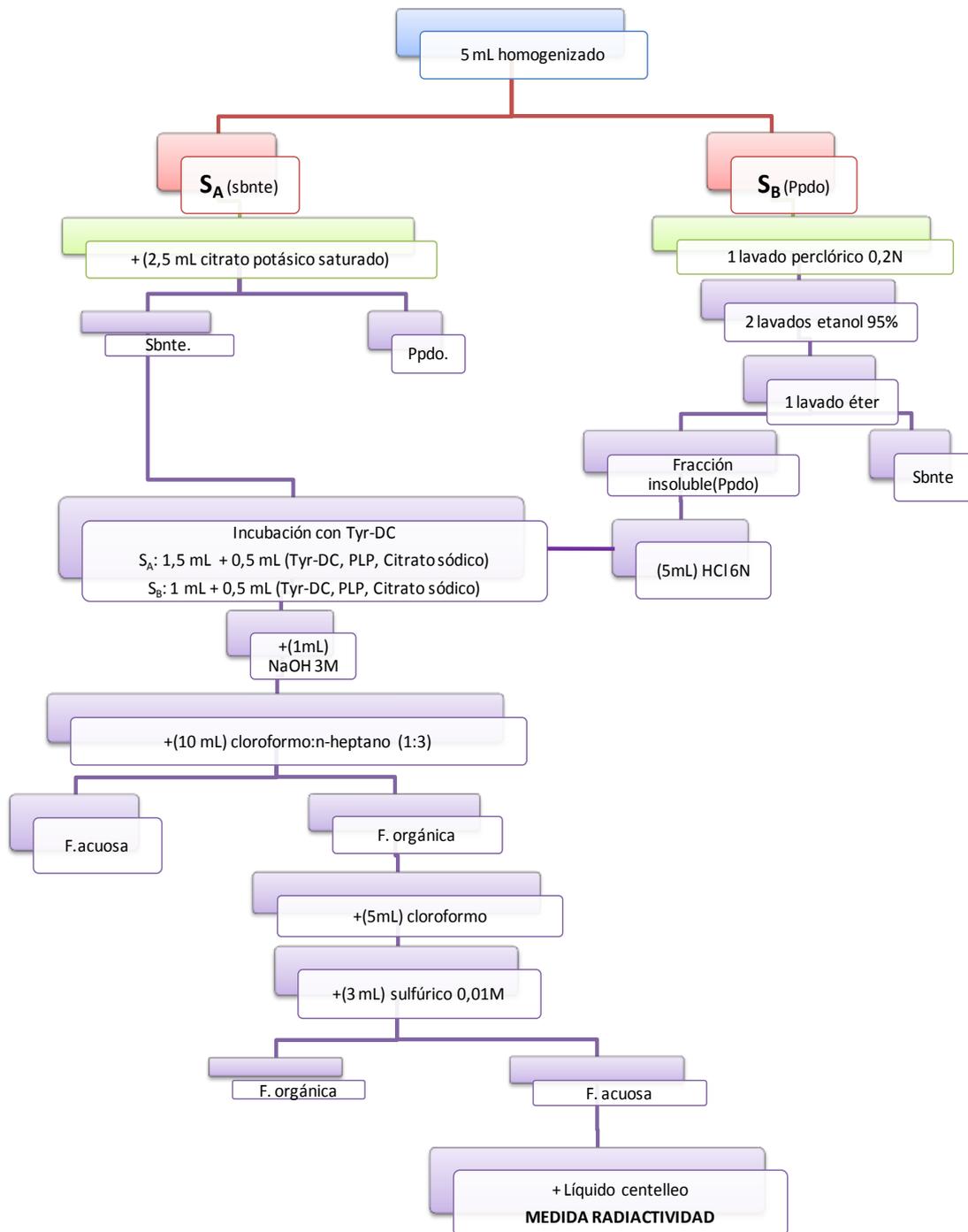


Figura 2.5. Esquema general del procesamiento de las fracciones SA y SB; protocolo de actuación para la incubación con Tyr-decarboxilasa, y posterior medida de radiactividad.



Las muestras procedentes de  $S_A$  y  $S_B$  se someten a la acción de la enzima Tyr-DC, con la finalidad de asegurar que la radiactividad que se está midiendo corresponde a la Phe marcada y no a la Tyr que haya podido originarse a partir de ella. Esto es debido a que en nuestras condiciones experimentales, hay un enzima activo, la fenilalanina hidroxilasa que cataliza la transformación de la fenilalanina (Phe) en tirosina (Tyr). Para la medida de Phe se debe transformar ambos aminoácidos en sus aminas biógenas, aprovechando la capacidad descarboxilante de la Tyr-DC, medida a pH 6,3 y 50°C (Garlick et al., 1980). La amina biógena de la fenilalanina es la  $\beta$ -feniletilamina ( $\beta$ -PEA), mientras que la amina de la tirosina es la tiramina.

De ambas aminas biógenas formadas a partir de la Phe y Tyr, sólo la  $\beta$ -PEA se puede extraer con una mezcla de cloroformo: n-heptano, propiedad que será empleada para separarla de la tiramina, la cual será desechada, y por ello nuestra medida de radiactividad corresponderá exclusivamente a la  $\beta$ -PEA. El pH 6,3 es esencial para que la fenilalanina se separe de los aniones  $Cl^-$  y se pueda llevar a cabo la descarboxilación con el máximo rendimiento y efectividad.

Posteriormente, un volumen de 1,5 mL de la mezcla de aminoácidos procedentes de la fracción  $S_B$  y 1 mL de los procedentes de la  $S_A$  son incubados en un baño durante 12 horas a 50°C con 0,5 mL de una solución mezcla formada por cantidades específicas de Tyr-DC (0,5 U/mL para  $S_B$  y 1 U/mL para  $S_A$ ) y piridoxal fosfato (PLP 5 mg/mL) resuspendidos en citrato sódico 0,5 M.

Transcurrido ese tiempo se procede a la separación y extracción de la  $\beta$ -PEA resultante por adición de 1 mL de NaOH 3 M tras agitación intensa de cada uno de los tubos durante 1 minuto. A continuación, se añaden 10 mL de la mezcla cloroformo: n-heptano (1:3 v/v), se vuelve a agitar y tras la aparición de dos fases, una acuosa y otra orgánica, se retira la fase orgánica, que es la que contiene la fracción de tiramina. A la fase acuosa se le añade cloroformo y  $H_2SO_4$  0,01 M y se agita vigorosamente durante otro minuto.

Finalmente, para medir la radiactividad específica de la  $\beta$ -PEA procedente de las dos fracciones se mide la radiactividad en un contador de centelleo líquido y la concentración de  $\beta$ -PEA mediante espectrofluorimetría. La medida se llevó a cabo en viales de centelleo. De la capa acuosa obtenida de las fracciones  $S_A$  y  $S_B$ , se cogió 1 mL y 2 mL, respectivamente y se le añadieron 10 mL de líquido de centelleo especial para muestras acuosas (Ecoscint-A). Las muestras se agitan suavemente por inversión para evitar formación de espuma y se depositan en unos soportes especiales para la posterior lectura de la radiactividad en el contador de centelleo líquido (Beckman LS6500).

### **2.3.3. Determinación de la concentración de $\beta$ -feniletilamina total**

#### **2.3.3.1. Fundamento**

Una parte esencial de este método consiste en la determinación de la concentración de  $\beta$ -PEA generada a partir de la fenilalanina tras su descarboxilación catalizada por la Phe descarboxilasa. La determinación de la concentración de  $\beta$ -PEA total se realizó según una modificación propuesta por



Peragón, 1993, del método inicial de Suzuki y Yagi (1976). Se trata de un método simple, rápido, específico y sensible para la  $\beta$ -PEA. La  $\beta$ -PEA a pH básico y a una temperatura aproximada de  $60^{\circ}\text{C}$  reacciona con la ninhidrina para dar lugar a un compuesto fluorescente. La adición de L-leucil-alanina (L-Leu-Ala) a la mezcla provoca un incremento de la fluorescencia de unas 20 veces, lo que permite estimaciones de pequeñas cantidades en tejidos animales. En la **Figura 2.6**, se detalla esquemáticamente el procedimiento seguido para la medida de  $\beta$ -PEA total.



**Figura 2.6.** Esquema general de la técnica empleada para la medida de  $\beta$ -feniletilamina.

### 2.3.3.2. Técnica

Las muestras problema se preparaban con  $600\ \mu\text{L}$  de la fase acuosa superior de las muestras  $S_A$  o  $20\ \mu\text{L}$  de la fase acuosa superior de  $S_B$  mas  $580\ \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,001\ \text{M}$ . Paralelamente, se prepara una recta patrón de  $\beta$ -PEA en  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,001\ \text{M}$ , cuyas concentraciones fueron  $0, 0,1, 0,5, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0$  y  $40,0\ \mu\text{M}$ .

A todas las muestras, incluidos los patrones, se les añadía  $300\ \mu\text{L}$  de L-Leu-Ala  $2\ \text{mM}$ ,  $600\ \mu\text{L}$  de ninhidrina  $50\ \text{mM}$  y  $1,5\ \text{mL}$  de tampón fosfato sódico  $1\ \text{M}$  y pH  $8$ , incubándose durante  $1\ \text{h}$  a  $60^{\circ}\text{C}$  en un baño con agua y agitación moderada. Transcurrido ese tiempo, se introducían en los tubos en una mezcla de agua y hielo  $15\ \text{min}$ , y posteriormente, se mantienen a temperatura ambiente otros  $15\ \text{min}$  hasta el momento de su medida. En todo momento, los tubos tienen que estar protegidos de la luz, ya que se trata de una reacción de fluorescencia. La medida de fluorescencia se realiza en un



espectrofluorímetro (Perkín-Elmer LS 50B) excitando con una luz de 390 nm y midiendo la emisión a 495 nm de longitud de onda a la cual se observa el máximo de fluorescencia. Esta medida se realiza en cubetas de cuarzo de 3 mL. El contenido en  $\beta$ -PEA se obtiene por interpolación con los valores obtenidos de la recta patrón.

#### 2.3.4. Cálculo de las velocidades de recambio proteico

Los resultados experimentales se expresan como radiactividad específica de la L-Phe libre (dpm/nmol) en el caso de  $S_A$ , y radiactividad específica unida a proteínas (dpm/nmol) para  $S_B$ . Con estos valores se calculan las velocidades fraccionarias y absolutas de síntesis de proteínas.

El valor de la **velocidad fraccionaria de síntesis de proteínas,  $K_S$  (%/día)**, se determinó conociendo la radiactividad específica de la Phe unida a proteína (dpm/nmol) y la radiactividad específica media de la Phe libre en relación a los tiempos utilizados y expresados en minutos, para ello se aplicó la siguiente ecuación matemática:

$$K_S(\%/día) = \frac{S_B(t_2) - S_B(t_1)}{S_A(t_2 - t_1)} \times \frac{1440}{(t_2 - t_1)} \times 100$$

donde:

**$S_B(t_2)$** : radiactividad específica unida a proteína a los 45 minutos de la inyección del marcaje.

**$S_B(t_1)$** : radiactividad específica unida a proteína a los 2 minutos de la inyección del marcaje.

**$S_A(t_2-t_1)$** : radiactividad específica media libre en el periodo (t2-t1).

**1440**: número de minutos en un día.

**t2 - t1**: diferencia de los tiempos de experimentación (43 min).

La **velocidad absoluta de síntesis de proteínas ( $A_S$ )** se calculó como el cociente de  $K_S$ : 100 multiplicado por el contenido total de proteínas del tejido, expresando el resultado como mg de proteína sintetizada por día.

$$A_S(\text{mg proteína/día}) = \left[ \frac{K_S}{100} \times \frac{\text{mg proteína}}{\text{g tejido}} \right] \times \text{peso tejido}$$

La **velocidad de acumulación de proteínas ( $K_G$ , %/día)** se calculó como la diferencia entre el contenido final e inicial de proteínas tisulares dividido entre el tiempo transcurrido y multiplicado por 100. Para ello se aplicó la siguiente ecuación:

$$K_G(\%/día) = \frac{\text{Ln Prot } (f) - \text{Ln Prot } (i)}{\text{Tiempo}} \times 100$$



La **velocidad absoluta de acumulación de proteínas ( $A_G$ )** se calculó como el producto de  $K_G$ : 100 por el contenido total de proteínas del tejido, expresando el resultado como mg de proteína sintetizada por día.

$$A_G \text{ (mg proteína/día)} = \left[ \frac{K_G}{100} \times \frac{\text{mg proteína}}{\text{g tejido}} \right] \times \text{peso tejido}$$

La **velocidad fraccionaria de degradación de proteínas ( $K_D$ , %/día)**, se expresó como el porcentaje de proteína degradado por día y se calculó por diferencia entre la velocidad de síntesis ( $K_S$ ) y la velocidad de acumulación de proteínas del tejido ( $K_G$ ), según la siguiente expresión:

$$K_D \text{ (%/día)} = K_S - K_G$$

La **velocidad absoluta de degradación ( $A_D$ )** se calculó como el producto de  $K_D$ : 100 por el contenido total de proteínas del tejido, expresando el resultado como mg de proteína sintetizada por día.

$$A_D \text{ (mg proteína/día)} = \left[ \frac{K_D}{100} \times \frac{\text{mg proteína}}{\text{g tejido}} \right] \times \text{peso tejido}$$

El **cálculo de la eficiencia de retención proteica (ERP)** se define como la relación existente entre la proteína depositada en el tejido y la sintetizada. Este índice se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$ERP = \frac{K_S}{K_D} \times 100$$

### 2.3.5. Determinación de la concentración de DNA

#### 2.3.5.1. Fundamento

La determinación de la concentración de DNA se fundamenta en el uso del reactivo H $\ddot{o}$ chst 33258 (2-[2-(4-hidroxifenil)-6-benzimidazolil]-6-(1-metil-4-piperazil)-benzimidazol 3 HCl), cuya característica principal es la permeabilidad y afinidad por unirse de forma selectiva a la pareja de bases adenina-timina (A-T), de manera que el marcaje se realiza sobre el DNA de las células, pudiéndose, de este modo, determinar cuantitativamente el DNA del material biológico (Labarca y Paigen, 1979). Se trata de un método simple, sencillo y muy sensible basado en la intensificación de la fluorescencia originada por la unión del reactivo al DNA. La muestra problema consiste en un extracto de tejido en tampón fosfato salino. En este extracto se ha disociado la estructura de la cromatina para que el DNA quede accesible al reactivo.



### 2.3.5.2. Técnica

A partir de 1 gramo de tejido obtenido por trituración de una mezcla de 3 hígados procedentes de doradas diferentes se preparó un homogenado en tampón fosfato salino (tampón fosfato sódico 0,05 M, NaCl 2 M y EDTA 0,002 M pH 7,4) en proporción 1/10. En el caso del músculo blanco se siguió un procedimiento similar para preparar un homogenado en proporción 1/20. Posteriormente estas muestras se diluyeron a la mitad en agua destilada, y se preparó una recta patrón de DNA de hígado de salmón en tampón fosfato salino (TFS), con concentraciones correspondientes a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , usando una dilución inicial de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A cada muestra se le añadió 0,2 mL de reactivo H $\ddot{o}$ chst 33258 (Sigma) a una concentración de 240  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A partir de ahora todas las muestras se protegen de la luz. Se esperó 10 min, transcurridos los cuales, se procedía a la medida en un espectrofluorímetro (Perkín-Elmer LS 50B) a 350 nm de excitación y 450 nm de emisión. Con los resultados obtenidos se calculó la **cantidad de DNA** (mg/g tejido), los **mg totales de DNA** en el hígado y músculo blanco, y la **cantidad de proteína sintetizada por unidad celular ( $K_{\text{DNA}}$ )**, expresada como g de proteína sintetizada/día x g DNA.

### 2.3.6. Determinación de la concentración de RNA

#### 2.3.6.1. Fundamento

La técnica fue descrita por Munro y Fleck (1966) y modificada por Peragón (1993). Se basa en la precipitación inicial de los ácidos nucleicos con ácido perclórico y la posterior hidrólisis básica selectiva del RNA, lo cual permite su estimación cuantitativa.

El ácido perclórico favorece la precipitación de los ácidos nucleicos y de las proteínas, separándolos de otras sustancias que quedan disueltas o en suspensión en el sobrenadante (nucleótidos libres, coenzimas, azúcares, fosfato inorgánico, lípidos, etc.) y que pueden interferir en las reacciones químicas para la estimación del contenido de RNA. Posteriormente, el RNA es separado del DNA por medio de una hidrólisis básica. La presencia del grupo hidroxilo (-OH) del C<sub>2</sub> de la ribosa en el RNA da lugar a la formación de un triéster cíclico en un medio alcalino, lo que origina la hidrólisis espontánea de los enlaces en los que participan estos grupos -OH y la consecuente transformación del RNA en ribonucleótidos. Ni el DNA, ni las proteínas contienen este grupo -OH, permaneciendo intactos frente a la acción de la base.

#### 2.3.6.2. Técnica

La determinación se realizó en las mismas muestras en las que se determinó la  $K_5$ . La segunda alícuota de 5 mL de homogenado en ácido perclórico 0,2 N se centrifugó a 2800g durante 15 min y 4°C, se descartó el precipitado y se utilizó el sobrenadante. Se preparó una recta patrón de RNA en ácido perclórico 0,2 N con concentraciones crecientes desde 0,1 hasta 1,0 mg/mL.



Tanto patrones como muestras problema se someten a hidrólisis alcalina con KOH 0,3 N, a 37°C durante 1 h en un baño. Para parar la reacción, las muestras se enfrían en agua y hielo. A continuación, se les añade 2,5 mL de ácido perclórico 1,2 N para facilitar la precipitación del DNA y las proteínas. Tras mantener las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugan a 1000g, 5 min y 4°C. Se recoge el sobrenadante donde se encuentran los ribonucleótidos en suspensión y el precipitado se lava 2 veces con ácido perclórico 0,2 N, añadiendo los sobrenadantes resultantes al sobrenadante inicial.

El ión  $K^+$  del KOH se asocia con el ácido perclórico para formar perclorato potásico, que es insoluble a temperatura entre 0-4°C, y que se puede hacer precipitar con ácido perclórico 0,6 N, consiguiendo retirar dichos iones de la fracción RNA. En las muestras resultantes se determinó la concentración de RNA midiendo la absorbancia a 260 nm e interpolando con los valores obtenidos en los patrones.

Los datos de concentración de RNA permiten calcular la **capacidad de síntesis de proteínas ( $C_s$ , mg RNA/g proteína)** como el cociente entre la cantidad de RNA y de proteínas presentes en el tejido. Este parámetro es un reflejo del número de ribosomas por célula e indica la capacidad de un tejido para sintetizar proteínas.

Con el valor de concentración de RNA del tejido y los valores de  $K_s$  y  $C_s$  obtenidos, se calculará también la **eficacia de la síntesis de proteínas ( $K_{DNA}$ )**, que refleja la cantidad de proteína sintetizada por unidad de DNA, indicando la síntesis proteica media por ribosoma. La **eficacia de la síntesis proteica ( $K_{RNA}$ )** (g proteína sintetizada/día x g RNA) se calculó por medio del cociente entre velocidad fraccionaria de síntesis ( $K_s$ ) y la capacidad de síntesis ( $C_s$ ) multiplicado por 10.

#### 2.4. Determinación enzimática de metabolitos en hígado y músculo blanco de dorada

El sobrenadante de la segunda alícuota de 5 mL de tejido en ácido perclórico, también se empleó para la determinación de la concentración de metabolitos. Estos metabolitos se calcularon tanto en hígado como en músculo blanco en todas las condiciones nutricionales.

El estudio de metabolitos consistió en la determinación de la concentración de glucosa 6-fosfato, 6-fosfogluconato, fructosa6-fosfato, L-malato, L-lactato y glucógeno.

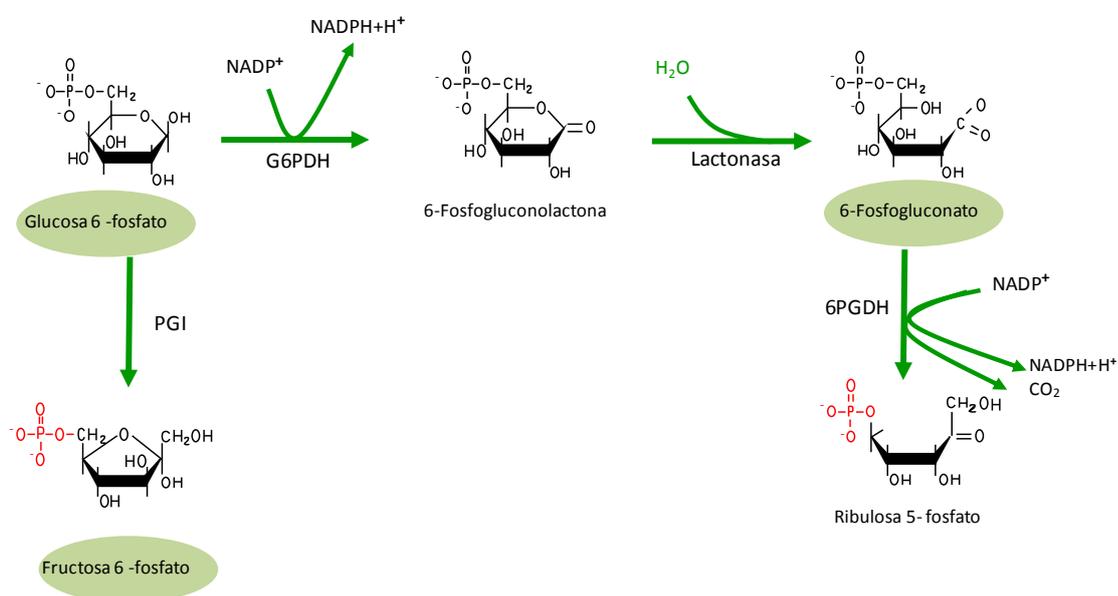
La determinación de la concentración de los metabolitos analizados se realizó mediante lectura espectrofotométrica a 340 nm de la absorbancia y variación de absorbancia por minuto. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos y se utilizó un lector de microplacas PowerWave, de Bio-tek Instruments. Las condiciones de temperatura se establecieron en torno a la temperatura ambiente, en todos los casos, y se preparó un volumen final de 200  $\mu$ L. La dilución más apropiada del extracto de tejido se estableció en base a análisis preliminares. La descripción completa de la metodología para la determinación de la actividad de estos metabolitos se encuentra recogida a continuación.



### 2.4.1. Determinación de la concentración de glucosa 6-fosfato, 6-fosfogluconato y fructosa 6-fosfato

#### 2.4.1.1. Fundamento

Las determinaciones de las concentraciones de glucosa 6-fosfato (G6P), 6-fosfogluconato (6PG) y fructosa 6-fosfato (F6P) de la muestra se basan en la determinación de las variaciones de densidad óptica por la formación de NADPH paralela a la oxidación de la glucosa 6-fosfato, del 6-fosfogluconato y de la fructosa 6-fosfato debida a las adiciones de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y fosfoglucosa isomerasa (PGI) (**Figura 2.7**). Las determinaciones se llevaron a cabo a un pH 7,5 según el método inicial descrito por Lang y Michal (1983).



**Figura 2.7.** Esquema de las reacciones metabólicas implicadas en la determinación de los metabolitos, glucosa 6-fosfato, 6-fosfogluconato y fructosa 6-fosfato.

#### 2.4.1.2. Técnica

Se prepararon las muestras para el ensayo siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 2.2**. Primero, se mide la absorbancia a punto final, al añadir la muestra al medio de ensayo (D.O. b), ésta se resta posteriormente a los demás valores finales de absorción. La reacción se dispara con la adición del enzima 6PGDH, la densidad óptica ( $E_1$ ) corresponde a la concentración de 6PG de la muestra. Se añade a continuación, G6PDH y se mide la densidad óptica ( $E_2$ ); la relación  $E_2/2$



corresponde a la concentración de G6P. Finalmente, se añade el enzima PGI y medimos la densidad óptica ( $E_3$ ). La  $E_3/2$  corresponde a la concentración de F6P de la muestra.

**Tabla 2.2. Preparación del medio de ensayo para la determinación de G6P, 6PG y F6P**

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo ( $\mu$ L)
Tampón trietanolamina 0,2 M pH 7,5	100	100
Mg $Cl_2$ 0,01 M	1	2
NADP <sup>+</sup> extemporáneo 0,02 M	5	5
H <sub>2</sub> O destilada	--	31
Muestra	--	50
6PGDH comercial	400mU/mL	4
G6PDH comercial	400mU/mL	4
PGI comercial	400mU/mL	4

### 2.4.1.3. Cálculos

Las concentraciones de 6PG, G6P y F6P se expresaron en nmoles/g tejido y se calcularon de acuerdo con la siguiente expresión matemática:

$$\text{Concentración metabolitos (nmoles/g tejido)} = \frac{\Delta E \times Vt \times 10^9}{\epsilon \times d \times Vm \times g}$$

donde:

- $\Delta E$ : D.O.m – D.O.b
- $Vt$ : volumen total de medio de ensayo (0,2 mL)
- $\xi$ : coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm:  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$
- $d$ : longitud de paso de luz. Para microplacas de 96 pocillos es 0,6 cm
- $Vm$ : volumen de muestra (mL de extracto)
- $g$ : mg tejido/mL de extracto. En nuestro caso, 0,1 mg/mL
- $10^9$ : factor de conversión a nanomoles

### 2.4.2. Determinación de la concentración de L-malato

#### 2.4.2.1. Fundamento

La concentración de L-malato se determinó transformándolo en oxalacetato mediante la reacción catalizada por la malato deshidrogenasa a pH 9,5 (**Figura 2.8**). Se siguió el protocolo descrito por Gutmann y Wahlefed, 1983.

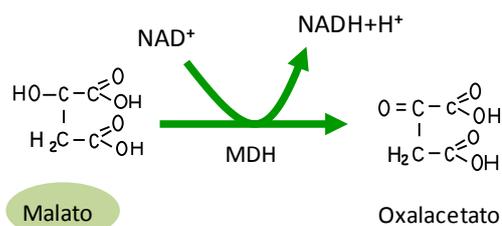


Figura 2.8. Esquema de la reacción en la que se basa la medida de L-malato.

#### 2.4.2.2. Técnica

Para la determinación de L-malato en cada uno de los tejidos estudiados, se han utilizado cubetas de 96 pocillos, con un volumen final de 0,2 mL y preparadas según el protocolo descrito en la siguiente **Tabla 2.3**.

**Tabla 2.3. Preparación del medio de ensayo para la determinación de L-malato**

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
Tampón hidracina/glicina (0,4 M/0,5 M) pH 9,5	585	130
NAD <sup>+</sup> extemporáneo 0,04 M	4	20
H <sub>2</sub> O destilada	--	16
Muestra	--	30
MDH comercial	--	4

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm y a T<sup>a</sup> ambiente, anotando la variación de D.O. debida a la formación de NADH que tiene lugar durante el consumo de malato. Tras la adición del enzima se mantiene la reacción hasta alcanzar una absorción constante.

#### 2.4.2.3. Cálculos

La concentración de L-malato se expresa en nmoles/g tejido. Para su determinación cuantitativa se ha utilizado la misma ecuación que la del apartado anterior 2.6.1.3.

### 2.4.3. Determinación de la concentración de L-lactato

#### 2.4.3.1. Fundamento

La concentración de L-lactato se determinó espectrofotométricamente utilizando una reacción catalizada por el enzima láctico deshidrogenasa (LDH) a pH 9,5, según protocolo de Gutmann y Wahlefed, 1983. Se basa en la conversión del lactato en piruvato y la consecuente formación de NADH+H<sup>+</sup> (**Figura 2.9**).

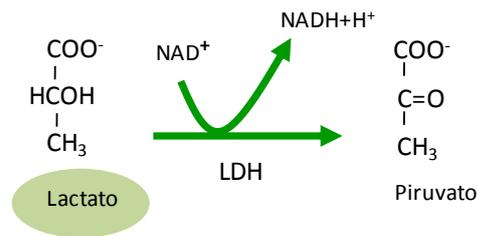


Figura 2.9. Conversión del lactato a piruvato por acción de la enzima LDH.

### 2.4.3.2. Técnica

Se prepararon los pocillos de la placa añadiendo tampón glicina/hidracina,  $\text{NAD}^+$ , agua destilada y la muestra (Tabla 2.4); en este punto se midió la densidad óptica y esta medida correspondió al blanco (D.O.b). La adición del enzima LDH dispara la reacción, oxidándose el lactato a piruvato, y reduciéndose el  $\text{NAD}^+$  a NADH; esta segunda medida de densidad óptica (D.O.m) menos la del blanco (D.O.b), corresponde al  $\text{NADH} + \text{H}^+$  producido por la oxidación del lactato presente en la muestra.

Tabla 2.4. Preparación del medio de ensayo para la determinación de lactato

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo ( $\mu\text{L}$ )
T. hidracina/glicina (0,9/1 M) pH 9,5	1140	120
$\text{NAD}^+$ 0,05 M extemporánea	8	32
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	--	6,4
Muestra	--	40
LDH comercial	--	1,6

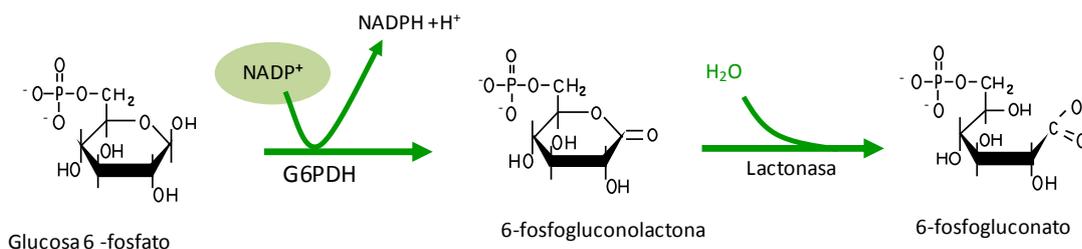
### 2.4.3.3. Cálculos

La concentración de lactato de cada una de las muestras se expresa en nmoles/g tejido. Al igual que en los casos anteriores, para su determinación cuantitativa se ha utilizado la misma ecuación que la del apartado anterior (2.6.1.3.) ya que el coeficiente de extinción molar del NADH es igual al NADPH.

## 2.4.4. Determinación enzimática de la concentración de $\text{NADP}^+$

### 2.4.4.1. Fundamento

La determinación de la concentración de  $\text{NADP}^+$  citosólico se basa en la formación de NADPH paralela a la oxidación de la glucosa 6-fosfato en la primera reacción de la fase no oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato (CPP) (Figura 2.10). Se utiliza para ello una adaptación a nuestras condiciones experimentales del método inicial descrito por Lang y Michal (1983).



**Figura 2.10.** Esquema de las reacciones metabólicas en las que se basa la medida de NADP<sup>+</sup>.

En la **Tabla 2.5**, se detalla la técnica seguida para la preparación del medio de ensayo empleado para la determinación de NADP<sup>+</sup>.

#### 2.4.4.2. Técnica

La determinación tisular de NADP<sup>+</sup> se realizó a 340 nm y a T<sup>a</sup> ambiente y volumen final de 0,2 mL. La ΔD.O.b aparecida antes de adicionar la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la D.O.m tras la adición del enzima hasta absorción constante corresponderá al contenido de NADP<sup>+</sup> presente en la muestra.

**Tabla 2.5. Preparación del medio de ensayo para la determinación de NADP<sup>+</sup>**

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
T. Hepes 0,05 M pH 7,6	35	138
MgCl <sub>2</sub> 2 mM	0,2	20
Glucosa 6-fosfato 5 mM	0,5	20
Muestra	--	20
G6PDH comercial	--	2

#### 2.4.4.3. Cálculos

La concentración de NADP<sup>+</sup> presente en la muestra se expresa en nmoles/g tejido, y se determina tal y como se expresa en el apartado 2.6.1.3.

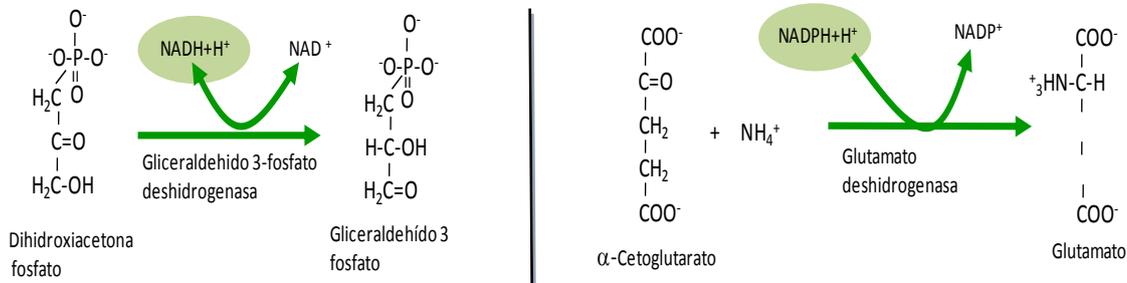
#### 2.4.5. Determinación simultánea de las concentraciones de NADH y NADPH

##### 2.4.5.1. Fundamento

La concentración de NADPH se determina conjuntamente con la de NADH a partir del mismo extracto (Bergmeyer, 1975). La técnica consiste en acoplar dos reacciones catalizadas por enzimas diferentes, a una misma muestra (**Figura 2.11**). La medida de NADH se basa en la oxidación de NADH



por la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La determinación de NADPH se mide en una reacción acoplada a la glutamato deshidrogenasa (GDH), de tal manera que el  $\alpha$ -KG pasa a glutamato, oxidándose el NADPH a NADP<sup>+</sup>.



**Figura 2.11.** Reacciones en las que intervienen las enzimas GAPDH a la izquierda; y GDH a la derecha. La GAPDH oxida el NADH y forma GAP. La GDH actúa produciendo glutamato y oxidando NADPH.

### 2.4.5.2. Técnica

Para la medida de la concentración de NADH y NADPH, se preparó el medio de ensayo como se indica en la **Tabla 2.6**.

**Tabla 2.6. Preparación del medio de ensayo para la determinación de las concentraciones de NADH y NADPH**

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo ( $\mu$ L)
Tampón de ensayo	800	160
Mezcla de sustratos:		5
DHAP 20 mM	0,5	
NH <sub>4</sub> Cl 0,2 M	5	
$\alpha$ -KG 0,1 M	2,5	
NAD <sup>+</sup> 1mM	0,1	20
Muestra		10
GAPDH comercial	900 mU/mL	2,5
GDH comercial	200 mU/mL	2,5

El tampón de ensayo utilizado contenía trietanolamina 0,5 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,8

La absorbancia obtenida al añadir la muestra ( $E_1$ ) se utiliza como referencia. La absorbancia obtenida tras la adición de GAPDH se denomina  $E_2$ . El valor de  $E_2 - E_1$  es proporcional a la concentración de NADH presente en la muestra. Finalmente, al añadir GDH se obtiene la absorbancia  $E_3$ ;  $E_3 - E_1$  es proporcional a la concentración de NADPH de la muestra.



### 2.4.5.3. Cálculos

Los valores de concentración de NADH y NADPH en hígado y músculo blanco, se expresan en nmoles/g tejido y se determinan del mismo modo que en el apartado 2.6.1.3.

## 2.4.6. Determinación de la concentración de NAD<sup>+</sup>

### 2.4.6.1. Fundamento

La medida de NAD<sup>+</sup> se realizó según una modificación de la técnica original propuesta por Gutmann y Wahlefed, 1983. Está basada en la actuación de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) que cataliza la conversión de malato a oxalacetato, con la consecuente reducción del NAD<sup>+</sup> (Figura 2.12).

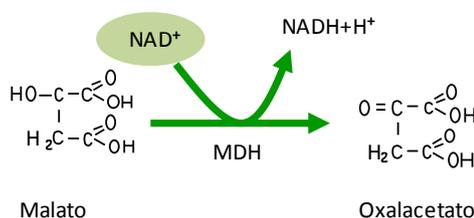


Figura 2.12. Esquema de actuación de la enzima malato deshidrogenasa (MDH).

### 2.4.6.2. Técnica

La concentración de NAD<sup>+</sup>, se determinó según el protocolo que se detalla en la **Tabla 2.7**. Se mide la densidad óptica, cuando se adiciona la muestra a los pocillos (D.O.b) considerada como blanco, y posteriormente se añade la enzima MDH y se mide la D.O.m hasta absorción constante; la diferencia entre ambas variaciones de densidad óptica corresponde a la cantidad de NAD<sup>+</sup> presente en la muestra.

**Tabla 2.7. Preparación del medio de ensayo para la determinación de NAD<sup>+</sup>**

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
Tampón Tris-HCl 100 mM pH 8	80	160
MgCl <sub>2</sub> 1 mM	0,09	18
Malato 10 mM	1	20
Muestra		10
MDH comercial	200 mU/mL	2



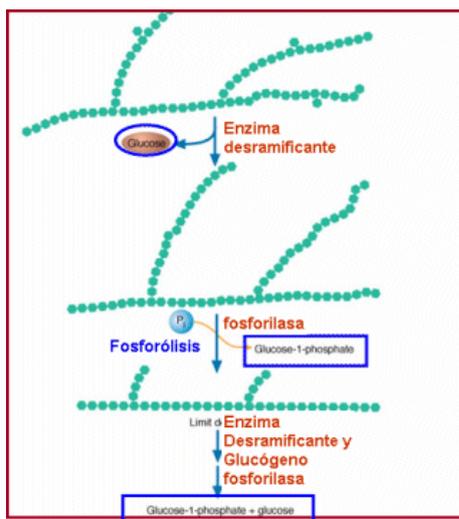
### 2.4.6.3. Cálculos

Siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 2.6.1.3., se calculó la concentración de  $\text{NAD}^+$  citosólico expresándola en nmoles/g tejido, y a partir de los valores experimentales encontrados en las diferentes muestras se calcularon las relaciones existentes entre las parejas de coenzimas oxidadas y reducidas. De esa manera se obtuvieron los valores de las razones  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ .

### 2.4.7. Determinación de la concentración de glucógeno tisular

#### 2.4.7.1. Fundamento

La técnica empleada para la determinación de la cantidad de glucógeno fue una modificación de la propuesta originalmente por Roehrig y Allred (1974). El fundamento de la misma se encuentra en la hidrólisis del glucógeno de la muestra catalizada por la  $\alpha$ -amilo- (1 $\rightarrow$ 6) glucosidasa que actúa a nivel de los enlaces  $\alpha$ -D glucosas (1 $\rightarrow$ 4) y  $\alpha$ -D glucosas (1 $\rightarrow$ 6), generando como producto de la reacción glucosa libre (**Figura 2.13**). La degradación total del glucógeno presente en las diferentes muestras permite determinar su concentración por medio de la medida directa de la cantidad de glucosa libre final generada durante el proceso enzimático.



**Figura 2.13.** Esquema de actuación de la actividad desramificante y fosforilasa del enzima amilo-glucosidasa en la degradación del glucógeno.

#### 2.4.7.2. Reactivos

- Tampón acetato 0.05 M pH 4.5.
- Amilo-glucosidasa: 35 UI/mL en tampón acetato 0.05 M pH 4.5.
- Test comercial para determinación de glucosa (Dipal, 28.160).
- Estándar de glucosa (concentración original 1 mg/mL).



### 2.4.7.3. Procedimiento

#### **1. Hidrólisis del glucógeno**

En tubos de ensayo se añade lo siguiente:

▪ *Hígado:*

50  $\mu$ L extracto + 850  $\mu$ L agua destilada + 100  $\mu$ L amilo-glucosidasa.

Para la recta patrón de hígado: 0, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu$ L de estándar de glucosa más agua destilada hasta 1000  $\mu$ L.

▪ *Músculo:*

200  $\mu$ L extracto + 700  $\mu$ L agua destilada + 100  $\mu$ L amilo-glucosidasa.

Para la recta patrón de músculo: 0, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu$ L estándar glucosa más agua destilada hasta 1000  $\mu$ L.

Tras la agitación de los tubos, fueron introducidos en un baño a 55 °C durante 10 min. Pasado este tiempo se dejaron enfriar y se centrifugaron a 1000g durante 15 min.

#### **2. Determinación del contenido en glucosa**

Con el sobrenadante obtenido del paso anterior se determinó la concentración de glucosa mediante el método enzimático-colorimétrico glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD). Según fuese el tejido, las cantidades empleadas para el análisis fueron las siguientes:

▪ *Hígado:*

10  $\mu$ L sobrenadante de los extractos + 1000  $\mu$ L del reactivo del test glucosa.

10  $\mu$ L sobrenadante del estándar de glucosa + 1000  $\mu$ L del reactivo del test glucosa.

10  $\mu$ L agua destilada + 1000  $\mu$ L del reactivo del test glucosa.

▪ *Músculo:*

100  $\mu$ L sobrenadante de los extractos + 1000  $\mu$ L del reactivo del test glucosa.

10  $\mu$ L sobrenadante del estándar de glucosa + 1000  $\mu$ L del reactivo del test glucosa.

10  $\mu$ L agua destilada + 1000  $\mu$ L del reactivo del test glucosa.

Posteriormente, se incubaron todos los tubos a 37°C durante 10 min. Se determinó la absorbancia a 505 nm.

### 2.4.7.4. Cálculos

La concentración de glucógeno tisular fue calculada a partir de los resultados del análisis de glucosa, considerando las concentraciones finales de los patrones de glucosa empleados en cada caso (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg/mL para el hígado y 0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 y 0,05 mg/mL para el músculo) y los volúmenes de los extractos de los distintos tejidos añadidos al inicio del proceso. Los resultados se expresan en mg glucosa/g de tejido.



## **2.4.8. Determinación cuantitativa de proteínas en hígado y músculo blanco**

---

### **2.4.8.1. Método de Lowry**

---

#### **2.4.8.1.1. Fundamento**

Para la determinación cuantitativa de proteínas se utilizó el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Se trata de un método colorimétrico. A la muestra se añade secuencialmente dos reactivos, el reactivo de Biuret y el reactivo de Folin. El método se desarrolla en dos etapas:

1. Reacción de la proteína en solución con el cobre alcalino (reactivo del Biuret).
2. Reducción del fosfomolibdato del reactivo de Folin debido al poder reductor de la tirosina presente en los complejos proteína-Cu generados en la primera etapa.

#### **2.4.8.1.2. Técnica**

Se prepara una recta de calibrado con albúmina sérica bovina (BSA) (0,5 mg/mL) en concentraciones conocidas y crecientes. Los extractos de hígado (1/10 en tampón de homogenización.) y músculo (1/5 en tampón de homogenización) se diluyeron 1/100 en todos los casos, para que tomasen valores dentro de la recta patrón, y se pudiesen cuantificar adecuadamente.

A todos los tubos (patrones y extractos diluidos) se le añaden 5 mL de Reactivo de Biuret; se agitan y se espera 15 min. Transcurrido ese tiempo se añaden 0,5 mL de Reactivo de Folin diluido a la mitad, se agitan nuevamente y se espera 20 min. Se mide la densidad óptica a 640 nm, en un espectrofotómetro, para obtener las concentraciones de las proteínas solubles de los extractos, por extrapolación con los resultados en la recta patrón, y teniendo en cuenta las diluciones que se realizan de las muestras. Los resultados se expresaron en mg/mL.

### **2.4.8.2. Método de Bradford**

---

#### **2.4.8.2.1. Fundamento**

La determinación cuantitativa de proteínas por el método de Bradford (1976) está basada en el cambio de color que se produce cuando el Azul Brillante de Coomassie G250, en disolución ácida, se une a las proteínas. La forma protonada de este colorante presenta un color rojo-anaranjado. Cuando está unido a las proteínas, interactúa con los grupos hidrofóbicos y en los grupos cargados positivamente, se suprime la protonación y se observa un color azul. En estas condiciones, la absorbancia a 595 nm es directamente proporcional a la concentración de proteína existente en la muestra.



#### 2.4.8.2.2. Técnica

Se prepara una recta patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones crecientes a partir de una disolución inicial de 0,05 mg/mL. La dilución de las muestras de hígado fue inicialmente 1/10, y a partir de ahí se diluyeron 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400, para que se incluyesen en la recta patrón; y las de músculo, inicialmente 1/8, y posteriormente se utilizaron las mismas diluciones que en hígado, incluyéndose los valores obtenidos a lo largo de toda la recta patrón obtenida.

A cada una de las muestras se le añadía 0,2 mL de reactivo de Bradford concentrado y se agitaba suavemente para mezclar. Tras 10 min a temperatura ambiente, se leía la absorbancia a 595 nm. La determinación de proteínas en cada muestra se realizó por extrapolación de los valores de absorbancia obtenidos en la recta patrón.



## 2.5. Determinación de actividades enzimáticas en hígado y músculo blanco

### 2.5.1. Preparación de las muestras para las determinaciones enzimáticas

Se parte de muestras de hígado y músculo blanco congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para la preparación del extracto inicial se descongela el tejido, se prepara una mezcla de dos hígados, y otra de dos músculos, y se le añade tampón de homogenización en proporciones 1/10 (p/v) para el hígado, y 1/5 (p/v) para el músculo blanco.

El **tampón de homogenización (TH)**, pH 7,8 contiene:

- **Tris-HCl** 100 mM
- **EDTA** (ácido etilendiaminotetraacético) 0,1 M
- **Tritón X-100** 0,1% (v/v)
- **PMSF** (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 50 mM (en etanol). Se añade 1mL de PMSF por cada litro de TH en el momento de hacer los diferentes extractos
- **DTE** (di-tio eritritol) 1 mM (sólo para la actividad SER-DH)

En todos los casos la homogenización del tejido se llevó a cabo con la ayuda de un homogenizador mecánico (se utilizó en todos los casos la misma velocidad y tiempo). Una vez preparados los homogenizados y con objeto de obtener la fracción citosólica se centrifugan en una ultracentrífuga Beckman L8-70M, a una velocidad de 105000g, durante 1 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para las diferentes determinaciones de las actividades enzimáticas se toma de cada muestra el sobrenadante resultante de la centrifugación. Este sobrenadante se guarda en diferentes alícuotas de 0,5 mL a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso posterior.

Se determinó la actividad de las enzimas que constituyen los sistemas celulares de producción de NADPH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44), enzima málico (EM, EC 1.1.1.40) e isocitrato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  (IDH-NADP, EC 1.1.1.42); y las enzimas relacionadas con el metabolismo proteico: serina deshidratasa (Ser-DH, EC 4.2.1.13), alanina aminotransferasa (Ala-AT ó GPT, EC 2.6.1.2) y tirosina aminotransferasa (Tyr-AT, EC 2.6.1.5).

La determinación de la actividad de los enzimas analizados se realizó mediante lectura espectrofotométrica de los cambios de absorción de una "mezcla de reacción", según el enzima a analizar. Para ello se utilizó un lector de microplacas PowerWave, de Bio-tek Instruments. Las condiciones de temperatura se establecieron en  $25^{\circ}\text{C}$  para los enzimas analizados, y, en todos los casos, un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . La concentración óptima de sustrato, así como la dilución más apropiada del extracto de tejido, se establecieron en base a análisis preliminares. La descripción completa de la metodología para la determinación de la actividad de estos enzimas se encuentra recogida a continuación.



### 2.5.2. Cálculos

La actividad específica se expresa en miliunidades (mU) de enzima por mg de proteína (mU/mg), o bien, en nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteína. Se define una miliunidad de enzima como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 nmol de NADP<sup>+</sup> en 1 min y a una temperatura de 25°C, y viene dada por la siguiente expresión:

$$AE(mU/mg) = \frac{\Delta DO / \text{min} \times Vt \times 10^9}{\epsilon \times d \times v \times P}$$

donde:

- **ΔDO/min**: incremento o disminución de densidad óptica por minuto.
- **Vt**: volumen total de cubeta (0,2 mL)
- **ε**: coeficiente de extinción molar. El coeficiente es distinto según la enzima, así para:
  - G6PDH, 6PGDH, IDH-NADP<sup>+</sup> y EM → ε (NADPH: 6,22 x10<sup>6</sup> cm<sup>2</sup>/mol)
  - Ala-AT y Ser-DH → ε (NADH: 6,22 x10<sup>6</sup> cm<sup>2</sup>/mol)
  - Tyr-AT → ε (pHBA: 24900 M<sup>-1</sup>/cm)
- **d**: espesor de disolución que tiene que atravesar la luz. Para microplacas de 96 pocillos: 0,6 cm.
- **v**: volumen de extracto en mL
- **P**: concentración de proteínas del extracto (mg/mL)
- **10<sup>9</sup>**: factor de conversión de mol a nanomoles

### 2.5.3. Parámetros cinéticos

Una vez obtenidos los distintos valores de actividad específica para las diferentes concentraciones de sustrato, se calcularon los parámetros cinéticos **constante de Michaelis (K<sub>m</sub>)** y velocidad **máxima (V<sub>max</sub>)** utilizando el programa de análisis de datos y gráficas GraFit (M.Mouse) que permite la realización de ajustes no lineales.

La **eficiencia catalítica** definida como la eficacia que presenta un enzima para transformar su sustrato, es obtenida mediante la razón entre la actividad del enzima y la K<sub>m</sub>, se mide en mU/mg de proteína·mM y fue determinada a concentración saturante de sustrato (**V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>**). Este parámetro relaciona la concentración del enzima total con la interacción entre el enzima y el sustrato.

La **razón de actividad** se define como la relación entre la actividad del enzima a concentración subsaturante y la velocidad máxima (**V<sub>subsat</sub>/V<sub>max</sub>**).

La **actividad total** corresponde al número de Unidades de enzima presentes en un determinado tejido completo. Se expresa en Unidades totales del tejido y se calcula según la siguiente expresión:

$$\text{Actividad total} = A.E. \times \text{mg prot/mL} \times \text{mL extracto} \times \text{peso tejido}$$



Otra forma de expresar los diferentes parámetros cinéticos tales como actividad enzimática total, velocidad máxima, actividad específica (A.E.) y eficiencia catalítica, es refiriéndolos a la unidad celular. Para ello se tiene en cuenta que la cantidad de DNA total es un indicador idóneo y universalmente admitido del número de núcleos (Jacob et al., 1952; Waterlow et al., 1978; Peragón, 1993). De esta forma los diferentes parámetros referidos por unidad celular se definen y determinan de la siguiente forma:

La **actividad enzimática total por unidad celular** representa la actividad del enzima existente en una célula; se expresa en Unidades totales de enzima/mg DNA y se calcula según la expresión:

$$\text{Actividad enzimática/unidad celular} = \text{Actividad total /mg DNA}$$

La **velocidad máxima por unidad celular**, indica la velocidad del enzima a concentraciones saturantes de sustrato por célula y determinada siempre en las mismas condiciones de ensayo; se expresa en mUnidades/mg DNA y se calcula según la siguiente expresión:

$$\text{Velocidad máxima /unidad celular} = V_{max} / \text{mg DNA}$$

La **actividad específica por unidad celular**, refleja la actividad específica del enzima existente en cada célula; se expresa en mUnidades /mg proteína mg DNA y se calcula según la siguiente expresión:

$$\text{Actividad específica /unidad celular} = \text{Actividad total /mg prot} \times \text{mg DNA}$$

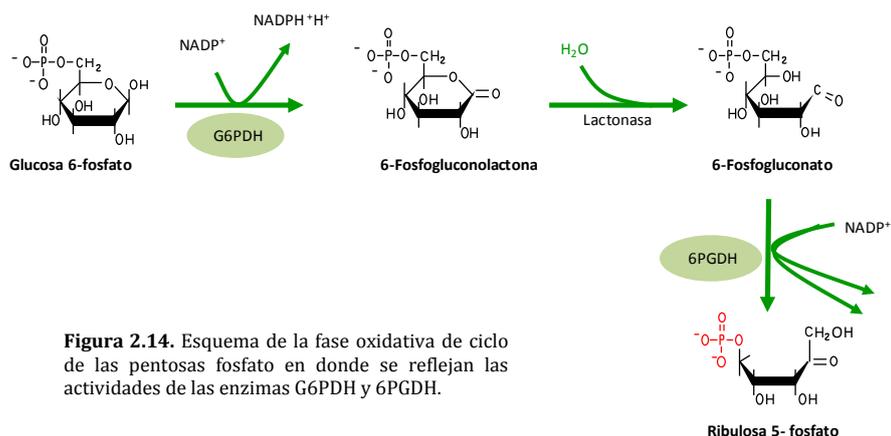
La **eficiencia catalítica por unidad celular** corresponde a la eficiencia catalítica por célula; se expresa en mUnidades /mg DNA·mM y se calcula según la siguiente expresión:

$$\text{Eficiencia catalítica/unidad celular} = (V_{max} / U \text{ celular}) / K_m$$

## 2.5.4. Determinación de las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)

### 2.5.4.1. Fundamento

Se trata de dos enzimas que intervienen secuencialmente en la fase oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato (CPP) (**Figura 2.14**). La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) cataliza una reacción de oxido-reducción, y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) una reacción de descarboxilación y oxidación. En ambas reacciones se generan equivalentes de reducción en forma de NADPH, los cuales pueden ser determinados midiendo la absorbancia a 340nm.



**Figura 2.14.** Esquema de la fase oxidativa de ciclo de las pentosas fosfato en donde se reflejan las actividades de las enzimas G6PDH y 6PGDH.

### 2.5.4.2. Técnica

Para la determinación de estas actividades se utilizan dos soluciones de sustrato:

- Sustrato A que contiene 6PG.
- Sustrato B, que contiene una mezcla de 6PG y G6P en la misma concentración.

La actividad de la 6PGDH se determina directamente a partir del sustrato A, mientras que la actividad G6PDH es el resultado de la diferencia de los valores obtenidos en la medida con el sustrato B menos los obtenidos con el sustrato A (Lupiáñez et al., 1987; Peragón et al., 1989). Las concentraciones utilizadas de ambos sustrato fueron 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,025 mM.

**Tabla 2.8. Preparación del medio de ensayo para la determinación de G6PDH y 6PGDH**

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
T. Hepes 58,8 mM pH 7,6	50	110
Mg Cl <sub>2</sub> 20 mM	2	20
NADP <sup>+</sup> 8 mM	0,8	20
H <sub>2</sub> O destilada	-	H: 20/M: 10
Extracto	-	H: 10/M: 20
Sustrato A (6PG)	Variable	20
Sustrato B (6PG+G6P)	Variable	20

El MgCl<sub>2</sub>, NADP<sup>+</sup>, y los sustratos A y B se prepararon en T. Hepes y se tuvieron en cuenta a la hora de calcular la concentración de éste en pocillo.

La reacción comienza con la adición del sustrato A, y se mide la variación de absorbancia por minuto. En otro pocillo se añade el sustrato B y se vuelve a leer la variación de densidad óptica por minuto. En la **Tabla 2.8** se puede observar con detalle la preparación del medio de ensayo para la determinación de ambas actividades. Con los valores obtenidos y siguiendo el protocolo del apartado 2.8.3.2., se calcula la actividad de G6PDH y 6PGDH en mU/mg proteína.



## 2.5.5. Determinación de la actividad del enzima málico (EM)

### 2.5.5.1. Fundamento

El enzima málico (EM) cataliza la reacción cataplerótica que supone la descarboxilación y oxidación del malato para dar piruvato en presencia de  $\text{NADP}^+$  (Figura 2.15). La reacción es reversible actuando, en este caso, como una ruta anaplerótica más, generando malato a partir de piruvato a través de una carboxilación reductora.

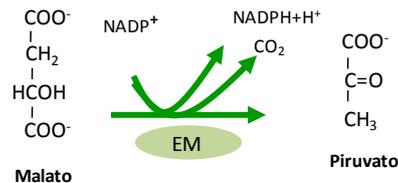


Figura 2.15. Transformación de malato en piruvato por la acción del enzima málico (EM).

### 2.5.5.2. Técnica

Es una técnica basada en el método empleado por Singer y Mc Daniel, 1982, con algunas modificaciones para adaptarlas a nuestras condiciones experimentales. Se basa en la medida espectrofotométrica, a 340 nm y temperatura ambiente, de la aparición de NADPH producido por la descarboxilación del malato.

Tabla 2.9. Preparación de los medios de ensayo para la medida de la actividad EM

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
T.Imidazol 71,4 mM pH 7,4	50	120
Mg Cl <sub>2</sub> 100 mM	5	10
NADP <sup>+</sup> 8 mM	0,4	10
H <sub>2</sub> O destilada	-	H: 30/M: 20
Extracto	-	H: 10/M: 20
Malato	Variable	20

El MgCl<sub>2</sub> y NADP<sup>+</sup> se prepararon en tampón. imidazol y se tuvieron en cuenta a la hora de calcular la concentración de éste en pocillo.

Para el estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática se emplearon las concentraciones 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,025 mM de malato. El sustrato se añade a los demás componentes justo antes del inicio de la reacción. Debe comprobarse antes la ausencia de actividad basal. El protocolo de preparación de los medios de ensayo se detalla en la **Tabla 2.9**.



## 2.5.6. Determinación de la actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (IDH- NADP<sup>+</sup>)

### 2.5.6.1. Fundamento

La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>) cataliza la oxidación descarboxilante del isocitrato para producir α-cetoglutarato en presencia de NADP<sup>+</sup>. Constituye la principal fuente de NADPH mitocondrial, aunque existe la isoforma citosólica. Utiliza el mismo mecanismo que la dependiente de NAD<sup>+</sup> (Figura 2.16).

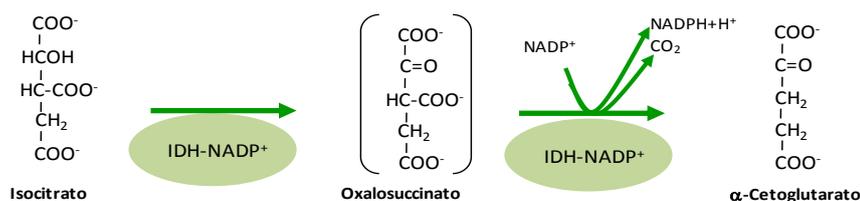


Figura 2.16. Obtención de α-cetoglutarato a partir de isocitrato mediante la acción de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>).

### 2.5.6.2. Técnica

La técnica empleada para la medida de la actividad IDH-NADP<sup>+</sup> está basada en el método descrito por Berner y Bergmeyer, 1983, con algunas modificaciones para adecuarse a nuestras condiciones experimentales y medida en placa de 96 pocillos.

Tabla 2.10. Preparación del medio de ensayo para la medida de IDH-NADP<sup>+</sup>

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
T.Hepes 111,11 mM pH7,6	50	90
Mg Cl <sub>2</sub> 5 mM	0,25	10
NADP <sup>+</sup> 8 mM	0,8	10
H <sub>2</sub> O destilada		H: 60/M: 65
Extracto		H: 10/M: 5
Isocitrato	Variable	20

En la **Tabla 2.10** se describe el protocolo empleado para la preparación de los medios de ensayo en la medida de este enzima productor de NADPH. Las concentraciones de isocitrato fueron: 25; 10; 1; 0,1; 0,05; 0,01 y 0,005 mM. La reacción se inicia con la adición de sustrato al conjunto de demás componentes y se mide mientras duren las condiciones de velocidad inicial.



## 2.5.7. Determinación de la actividad serina deshidratasa (Ser-DH)

### 2.5.7.1. Fundamento

El aminoácido L-serina (Ser) es capaz de eliminar el grupo amino mediante una desaminación deshidratante, catalizada por la serina deshidratasa (Ser-DH), enzima que requiere piridoxal fosfato (PLP) para producir piruvato. A esta primera reacción se le acopla la actividad lactato deshidrogenasa (LDH), por la cual el piruvato se transforma en lactato, con desaparición de NADH (**Figura 2.17**). Esta reacción es mayoritaria para este aminoácido cuando se compara con la pérdida del grupo amino por transaminación

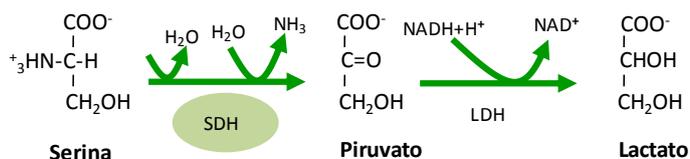


Figura 2.17. Reacción acoplada de la serina deshidratasa (Ser-DH) y la lactato deshidrogenasa (LDH).

### 2.5.7.2. Técnica

El método de determinación de la actividad Ser-DH se basa en el descrito por Sandoval y Sols (1974), con algunas modificaciones (Peragón et al., 2008) y acoplada a este diseño experimental (**Tabla 2.11**). Se preparaba un medio de ensayo formado por tampón, Mg Cl<sub>2</sub>, ditioeritritol (DTE), piridoxal fosfato (PLP), agua y NADH; se mantenía a 25°C y se añade a los pocillos.

Tabla 2.11. Preparación del medio de ensayo para la determinación de la Ser-DH

Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo (μL)
T. Hapes 100 mM pH 7,6	50	90
Mg Cl <sub>2</sub> 5 mM	0,25	10
DTE 20 mM	1	10
PLP 4 mM	0,1	5
NADH 4 mM	0,2	10
H <sub>2</sub> O destilada		H/M:25
LDH		0,22
Extracto		30
L-serina	Variable	20

El MgCl<sub>2</sub> se preparó en T. Hapes y se tuvo en cuenta a la hora de calcular la concentración de éste en pocillo.

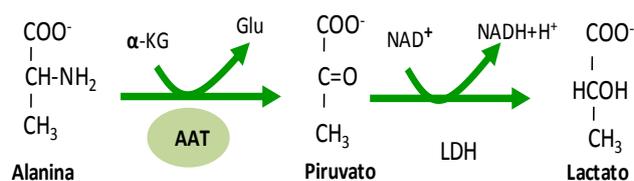
Posteriormente se añadió el resto de componentes hasta un volumen de 0,2 mL. La adición del sustrato disparó la reacción. Se utilizaron las concentraciones 0,025; 0,05; 0,1 y 0,4 M de L-serina y la actividad se determinó según el apartado 2.8.2.



## 2.5.8. Determinación de la actividad alanina aminotransferasa (Ala-AT ó GPT)

### 2.5.8.1. Fundamento

La alanina aminotransferasa (Ala-AT), o también denominada como glutamato piruvato transaminasa (GPT), cataliza la transferencia del grupo amino de la L-alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), que se transforma en glutamato mientras que la alanina se transforma en piruvato. Este enzima que requiere piridoxal fosfato (PLP) para su mecanismo de acción a través de la base de Schiff que se forma con el sustrato. El piruvato termina transformándose en lactato oxidándose el NADH por acción de la LDH. El esquema de estas dos reacciones asociadas se detalla en la **Figura 2.18**.



**Figura 2.18.** Reacción catalizada por la alanina aminotransferasa (Ala-AT).

### 2.5.8.2. Técnica

La determinación de la actividad Ala-AT se realizó siguiendo el mismo protocolo que para los anteriores enzimas. La medida espectrofotométrica a 340 nm y temperatura ambiente se utilizó para calcular la velocidad de la reacción. Los pocillos se prepararon según muestra la **Tabla 2.12** Las concentraciones de L-alanina que se utilizaron para la determinación de la actividad Ala-AT fueron 100; 25; 10; 5; 1; 0,5 mM.

**Tabla 2.12. Preparación del medio de ensayo para la determinación de Ala-AT**

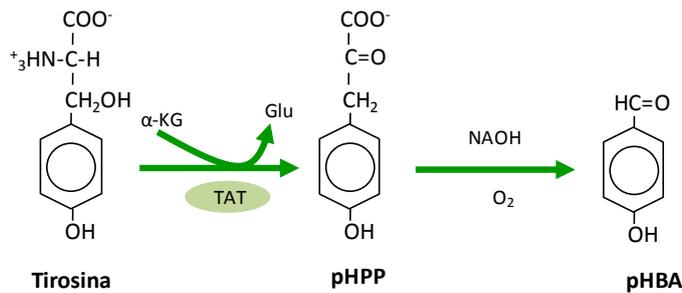
Reactivos	Concentración en pocillo (mM)	Volumen de reactivo ( $\mu\text{L}$ )
T. imidazol 83,3 mM pH7,4	50	120
NADH 4 mM	0,2	10
$\alpha$ -KG 200 mM	10	10
PDP 1 mM	0,05	10
LDH	2U/mL	0,15
Extracto		H/M: 10
H <sub>2</sub> O destilada		20
L-alanina	Variable	20



## 2.5.9. Determinación de la actividad tirosina aminotransferasa (Tyr-AT)

### 2.5.9.1. Fundamento

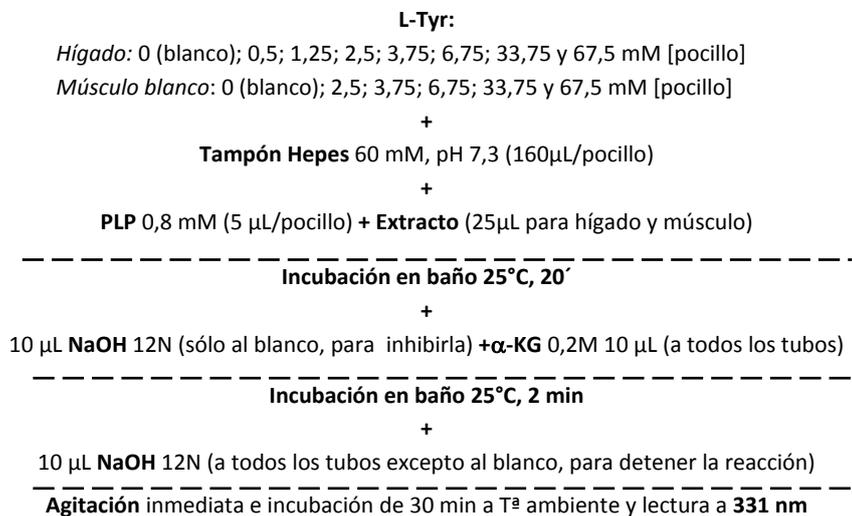
La tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) cataliza la transaminación de la tirosina (L-Tyr), que se transforma en p-hidroxifenilpiruvato (pHPP). Para la realización del ensayo se produce una segunda reacción acoplada por la cual el oxígeno molecular cataliza la oxidación del pHPP para producir hidroxibenzaldehído (pHBA) que absorbe a 331 nm (**Figura 2.19**).



**Figura 2.19.** Fundamento de la determinación de la actividad Tyr-AT.

### 2.5.9.2. Técnica

Se realizó el ensayo siguiendo la técnica de Diamondstone y Litwack, 1963, modificada por Peragón et al., 2008 y adaptada a la lectura en placa. Para llevar a cabo la determinación se siguió el protocolo descrito en la **Figura 2.20**. Los cálculos se realizaron de acuerdo con el apartado 2.8.2., teniendo en cuenta que el  $\epsilon$  del pHBA es  $24900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 2.20.** Protocolo de actuación para la determinación de la actividad tirosina aminotransferasa (Tyr-AT).



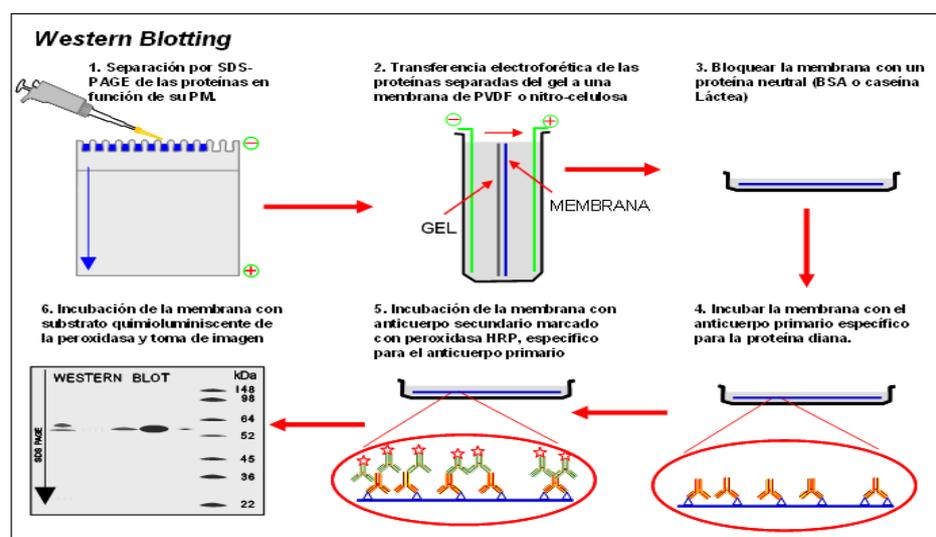
## 2.6. Determinación de los niveles de expresión de proteínas por “Western blotting”

Se determinaron los niveles de expresión de la G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup>, EM, Ser-DH, Ala-AT y Tyr-AT en extractos citosólicos de hígado y músculo blanco de doradas mediante ensayos de “Western blotting” utilizando anticuerpos específicos frente a cada una de esas proteínas.

### 2.6.1. Fundamento

La técnica de “Western blotting” consiste en la detección de la proteína de interés del total de proteínas del tejido en cuestión. Combina el poder de resolución superior de la electroforesis en gel, la especificidad de los anticuerpos y la sensibilidad de las pruebas enzimáticas. Se realiza en una serie de etapas sucesivas (**Figura 2.21**):

- 1) Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)
- 2) Transferencia de las proteínas separadas desde el gel a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno).
- 3) Detección inmunológica de la proteína específica mediante la incubación con anticuerpos específicos
- 4) Revelado por autorradiografía



**Figura 2.21.** Procedimiento completo de la técnica “Western blot”, en el que se hace hincapié en los pasos determinantes del proceso: transferencia, bloqueo, hibridación con los anticuerpos primario secundario y revelado.



## 2.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

### 2.6.2.1. Fundamento

El método de separación electroforética de las proteínas se basa en la migración diferencial de las moléculas en solución a través de un campo eléctrico. Este método es de amplia aplicación en la biología molecular, especialmente en la purificación y caracterización de proteínas. La velocidad de migración o movilidad electroforética de las proteínas depende de la intensidad del campo eléctrico aplicado, del tamaño, forma y carga de las proteínas, y también de la fuerza iónica y temperatura del medio en que se desplazan. Inicialmente, el sistema fue desarrollado por Laemmli, 1970 y modificado por Thomas y Koemberg (1978).

Las proteínas pueden separarse en función de sus masas moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Las condiciones desnaturizantes se consiguen utilizando un detergente aniónico, el dodecil sulfato sódico (SDS) junto con un agente reductor, el 2-mercaptoetanol, y calor. Con ello se consigue disociar y desnaturizar las proteínas antes de cargarlas en el gel. El SDS, a pH básico, impone una fuerte carga negativa que enmascara la carga intrínseca de las proteínas, separándose las proteínas en base a su masa molecular debido a la selección de tamaños impuesta por los poros del gel. La movilidad relativa de la proteína varía linealmente con el logaritmo de su masa molecular y no está afectada por su carga original.

Los geles de poliacrilamida se forman con facilidad mediante la polimerización de largas cadenas de monómeros de acrilamida unidas covalentemente en presencia de bisacrilamida que actúa como agente entrecruzador. La polimerización se inicia por la presencia de radicales libres que se forman al reaccionar el persulfato de amonio (APS) con el catalizador N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamida (TEMED). Estos radicales libres actúan como transportadores de electrones para activar monómeros de acrilamida o bisacrilamida, proporcionando un electrón no apareado para convertir los monómeros de acrilamida en radicales libres. Así, los monómeros activados reaccionan con monómeros inactivos para iniciar la elongación de la cadena del polímero. Las cadenas de polímeros elongadas están unidas al azar entre ellas, formando bucles cerrados y un complejo polimerizado de forma que el tamaño de poro disminuye conforme aumenta la relación entre bisacrilamida: acrilamida.

La SDS-PAGE se ha realizado con un sistema discontinuo, con dos geles y dos tampones que difieren en su pH y fuerza iónica. Los dos geles (gel superior o concentrador y gel inferior, separador o de desarrollo) se disponen como una lámina delgada situada verticalmente. Los complejos SDS-proteínas de las muestras aplicadas en el gel son conducidos por un frente móvil creado al aplicarse un campo eléctrico entre los electrodos. Después de la migración a través del gel concentrador de alta porosidad, los complejos se sitúan, apilados por capas, en una zona muy delgada sobre la superficie del gel separador, ordenados en bandas de peso molecular creciente. A medida que los



complejos penetran en el gel separador, su movimiento se hace más lento como consecuencia de los impedimentos estéricos generados por el tamaño de poro del gel y se separan unas de otras según su masa molecular.

### 2.6.2.2. Reactivos y disoluciones

- Acrilamida: N,N'-metilén-bisacrilamida (29:1), disolución no polimerizada al 30% (Bio-Rad)
- SDS al 10% (p/v) en agua ultrapura
- TEMED: N,N,N',N'tetrametiletilendiamina
- Persulfato amónico (PSAM) en agua ultrapura al 10% (p/v)
- Patrones de masa molecular de amplio y bajo rango preteñidos ("Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range", Bio-Rad)
- Tampón del gel superior (4X): Tris 0,5 M pH 6,8 y SDS 0,4%
- Tampón del gel inferior (4X): Tris 1,5 M pH 8,8 y SDS 0,4%
- Tampón de electroforesis (10X): 25 mM Tris, 192 mM glicina y SDS 0,1%
- Tampón de muestra 2X: SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 10 mM DTT, y tampón gel superior Tris 0,15 M. Se añadía 0,09 mM 2-mercaptoetanol 5% justo antes de utilizarlas.
- Disolución de proteína pura G6PDH de conejo, SIGMA A-9521.
- Disolución de proteína pura IDH-NADP<sup>+</sup> de corazón de cerdo, SIGMA I-2516.
- Disolución de proteína pura EM de hígado de pollo preparada a una concentración de 0,81 mg/mL en tampón de muestra SB 2X, SIGMA M5257.
- Disolución de proteína Ala-AT de corazón de cerdo, SIGMA G-8255.
- Solución de tinción: 0,5 g Azul Comassie G-250, 100 mL ácido acético glacial, 212 mL isopropanol 95% y 688 mL agua destilada.
- Solución de decoloración: 450 mL metanol, 100 mL ácido acético glacial y 450 mL agua destilada.

### 2.6.2.3. Técnica

Los geles fueron preparados para electroforesis vertical de tipo discontinuo en un sistema de montaje del tipo Mini-Protean Tetra cell (Bio-Rad). Primero se preparaba el gel inferior de 1,5 mm de grosor añadiendo los volúmenes apropiados de reactivos, en el mismo orden y tal como se recoge en la **Tabla 2.13**. El porcentaje de acrilamida varió según la proteína a determinar, así, se empleó el 10% de acrilamida para la detección de G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup>, EM, Ser-DH y el 12% para la detección de la Ala-AT.

Antes de añadir el PSAM y TEMED se desgasificaba la disolución, para que el oxígeno disuelto que pudieran contener no retrasase la polimerización. Después de desgasificar, se añadía PSAM y TEMED, se agitaba la mezcla rápidamente y se vertía por el espacio que queda entre los dos cristales. Se dejaba polimerizar, poniéndole un frente de aproximadamente 0,5 mL de isopropanol para evitar



deformaciones, y concluida la polimerización del gel separador, se retiraba el isopropanol y se añadía el gel concentrador al 4%, inmediatamente se colocó un peine de plástico, con cuidado que no queden burbujas de aire atrapadas, para formar los pocillos donde se añadiría la muestra. Una vez polimerizado, se retira el peine con cuidado y se lavaban los pocillos.

**Tabla 2.13. Protocolo para la preparación de geles para la SDS-PAGE de tejido hepático y muscular de doradas**

	<b>Gel Inferior 10%</b>	<b>Gel Inferior 12%</b>	<b>Gel Superior 4%</b>
<b>H<sub>2</sub>O miliQ</b>	8,07mL	6,75 mL	2,995 mL
<b>Tampón (4X) gel inferior</b>	5 mL	5 mL	--
<b>Tampón (4X) gel superior</b>	--	--	1,25 mL
<b>Acrilamida 30%</b>	6,67 mL	8,028 mL	0,67 mL
<b>SDS (10%)</b>	200 µL	200 µL	50 µL
<b>Desgasificar</b>			
<b>PSAM (10%)</b>	80 µL	80 µL	25 µL
<b>TEMED</b>	50 µL	50 µL	10 µL

Los datos que se recogen en la tabla son para preparar 2 geles de 1,5 mm de grosor.

Las muestras correspondientes a los extractos de hígado y músculo, se mezclaban con tampón de muestra "SB 2X" en proporción 1:1 (v/v) y se sometían al baño maría a 95°C durante 5 minutos. Después de sacar las muestras del agua deben conservarse a 4°C hasta su carga.

Se calculaba el volumen de muestra a cargar en cada pocillo con el fin de que en todas las muestras cargadas en un mismo ensayo hubiese la misma cantidad de proteínas.

En cada gel se cargaba en una de las calles patrones de proteínas de pesos moleculares conocidos y en otra se cargaba proteína pura, para G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup>, EM y Ala-AT; o muestra de mamífero para Ser-DH, que se utilizaban de referencia. En la sección de reactivos y disoluciones se describe detalladamente la preparación de estas muestras. En el caso de las G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup> y EM, en nuestros experimentos se cargaba del orden de 50 µg en el pocillo correspondiente.

En el resto de pocillos se carga el volumen de muestra apropiado, dejándolo caer suavemente. En esta carga de las muestras, se realiza una normalización para cargar la misma cantidad de proteína en todas las muestras desarrolladas por el gel. En el caso de G6PDH, IDH-NADP<sup>+</sup>, EM, se puso un volumen correspondiente a una cantidad de proteína de 50 µg para hígado y músculo; del orden de 5 µL para hígado y 2,5 µL para músculo. En la detección de la Ser-DH se necesitó 200 µg (20 µL) en hígado y 250 µg (15 µL) en músculo.

Una vez cargadas las muestras en los pocillos, dentro de la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis, se conecta la cubeta a la fuente de alimentación. La electroforesis se desarrolla a voltaje constante empezando con 100 V hasta que el frente de electroforesis penetra totalmente en el gel inferior subiendo a 200 V hasta el final de la electroforesis. Cuando el frente del colorante llegaba aproximadamente a 1 cm del final del gel, se detenía la electroforesis. Todo el proceso se desarrollaba a temperatura ambiente.



### 2.6.3. Tinción del gel

Una vez terminada la electroforesis, se tiñe un gel con Azul Coomassie (R 250) para colorear todas las proteínas. El gel se incuba con la solución de tinción durante 10 min con agitación constante. Posteriormente se incuba con la solución decolorante hasta que el gel quede transparente y se aprecien bien las proteínas. Esto corrobora que la electroforesis se ha desarrollado correctamente.

### 2.6.4. Transferencia

Una vez se ha completado la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno o PVDF a la cual se quedaban unidas. De esta manera se inmovilizaban las proteínas y se facilitaba la accesibilidad a dichas proteínas por parte de los reactivos de detección. Los anticuerpos reaccionan específicamente con epítopos antigénicos de la proteína inmovilizada en el soporte. Esta técnica es muy útil para la identificación y cuantificación de proteínas específicas a partir de mezclas complejas. Además, al llevarse a cabo la separación electroforética en condiciones desnaturizantes, se eliminan los problemas de solubilización, agregación y coprecipitación de la proteína que nos interesa con otras inespecíficas.

La transferencia de las proteínas del gel a la membrana se llevaba a cabo mediante una técnica de electrotransferencia semiseca usando un equipo de Bio-Rad. Mediante esta técnica las proteínas se transferían, desde el gel a la membrana, impulsadas por la acción de una corriente eléctrica que atraviesa un “sándwich” formado por el gel, la membrana y, a ambos lados, papel de transferencia humedecido en tampón de transferencia.

#### 2.6.4.1. Material y reactivos

- Tampón de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% (v/v) metanol.
- Papel absorbente “Whatman 3MM” o equivalente
- Membrana de PVDF (“Hybond” de Amershan-Pharmacia).
- Metanol 100%.

#### 2.6.4.2. Técnica

La transferencia se llevó a cabo mediante un sistema de electrotransferencia semiseca, utilizando equipos “semi-dry Trans blot SD” de Bio-Rad.

En primer lugar se equilibra el gel con el correspondiente tampón de transferencia durante 5 min, separando el gel concentrador del gel separador. Las membranas, antes de ser utilizadas, tienen que activarse en metanol 100% (para hacerlas hidrofílicas) durante 15 segundos y posteriormente se sumergen en agua miliQ durante 2 minutos; finalmente, se pasan a tampón de transferencia, hasta su colocación en el equipo.



Para montar la transferencia se colocaba sobre la placa del equipo de transferencia (ánodo), el “sandwich” compuesto por papel Whatman, membrana, el gel y otro papel Whatman, en ese orden. Se evitaban las burbujas, pasando un rodillo sobre los papeles de transferencia. Se conectaba la fuente a la corriente y se llevaba a cabo la transferencia a 60 mA por membrana (8,5x6 cm), durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se desconectaba la fuente de alimentación y se desensambla el montaje cuidadosamente. Se marcaba la orientación de la membrana en el mismo sentido en que estaba marcado el gel, p.e. haciendo un corte en el extremo inferior derecho, con el fin de identificar posteriormente el orden de las muestras. Puede identificarse cada una de las membranas que se están transfiriendo con un número en el extremo superior derecho en una zona que no intervenga en la separación.

### 2.6.4.3. Eficacia de la transferencia

Para comprobar que la transferencia había ocurrido con éxito, se tiñe la membrana con Rojo Ponceau (Sigma Aldrich, St Louis, MO (USA)). Para ello activamos la membrana en metanol 100% 15 segundos y de ahí a agua miliQ durante 2 minutos. Teñimos con rojo y desteñimos con agua miliQ hasta que se observen las calles de proteínas claramente, si la transferencia se ha desarrollado adecuadamente.

## 2.6.5. Inmunoblotting

### 2.6.5.1. Fundamento

Las proteínas específicas van a ser detectadas al incubarlas con anticuerpos que reaccionan específicamente con la proteína-antígeno inmovilizada en la membrana. Esta detección inmunológica se lleva a cabo en varias etapas. En primer lugar, se utiliza un anticuerpo específico de la proteína a detectar o anticuerpo primario, posteriormente un anticuerpo secundario conjugado que reconoce al anticuerpo primario y además está unido a peroxidasa. La peroxidasa hace posible la detección y localización del complejo antígeno-anticuerpo por autorradiografía después de la incubación con un sustrato (“Lumigen PS-3”) que al ser transformado por la enzima, genera un compuesto quimioluminiscente.

### 2.6.5.2. Reactivos y disoluciones empleadas

- Tampón de lavado TBS (1X): 132 mM NaCl, 20 mM Tris a pH 7,5.
- Tampón de lavado TBS-T (1X): TBS con 0,1% (v/v) Tween-20.
- Solución de bloqueo: TBS-T y 5% (p/v) leche desnatada en polvo (La Asturiana).
- Disolución de incubación con anticuerpo primario:
  - Anticuerpo policlonal de conejo anti-G6PDH de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (SIGMA, St. Louis, USA, ref. A9521) diluido 1/5000 en TBS-T (0,1%)-leche (5%).

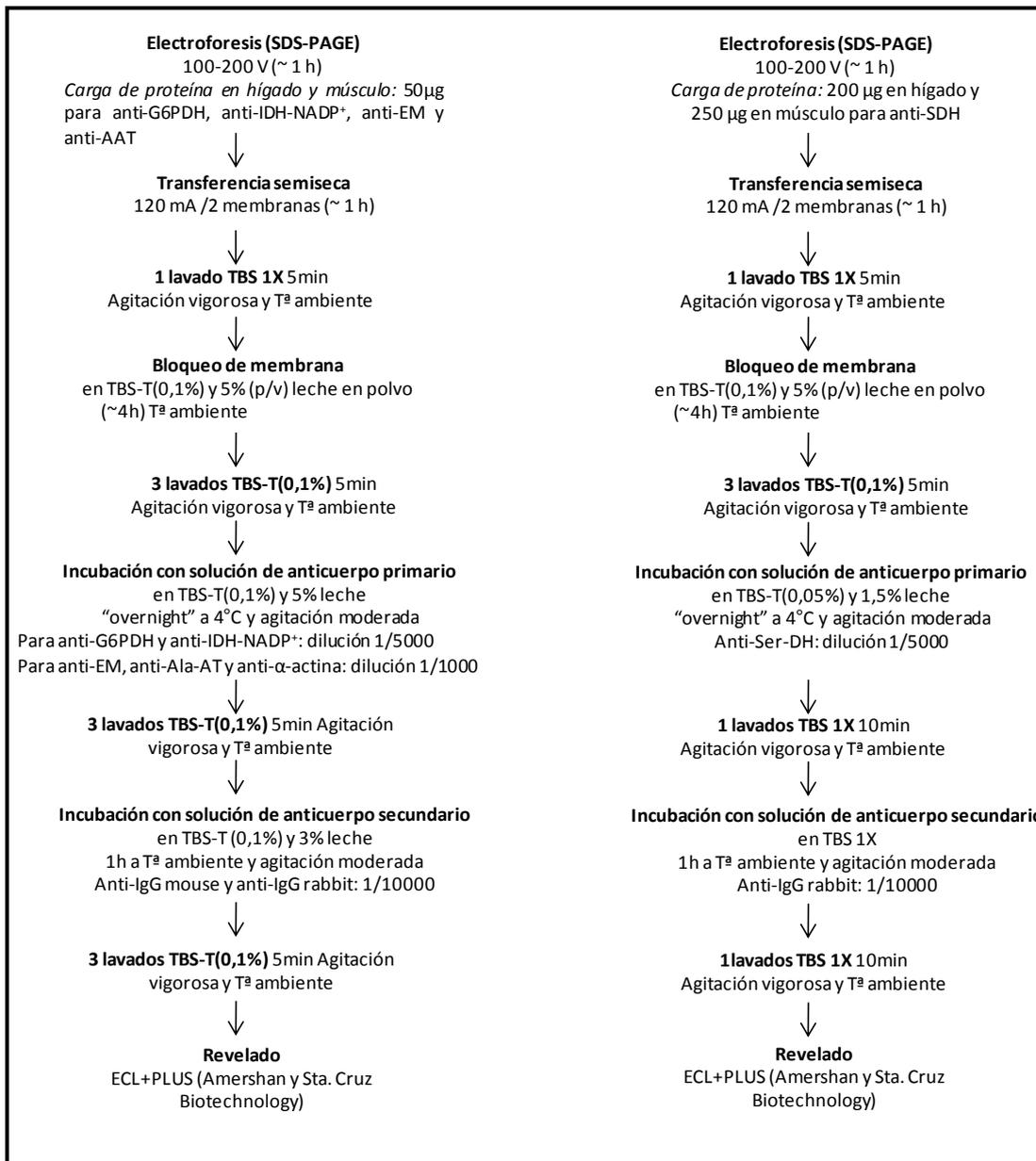


- Anticuerpo policlonal de conejo anti-IDH<sub>c</sub> citosólica de hígado de rata diluido 1/5000 en TBS-T (0,1%)-leche (5%). El anticuerpo fue cedido por el Dr. Sadaki Yokota, Biology Laboratory, Yamanashi Medical university, Yamanashi, Japón.
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-EM citosólica de cerebro de vaca diluido 1/1000 en TBS-T (0,1%)-leche (5%). El anticuerpo fue cedido por el Dr. Ben Hamprecht, Interfaculty Institute for Biochemistry, University of Tuebingen, Alemania).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-Ala-AT (Abnova). Diluido 1/1000 en TBST- (0,1%)-leche (5%).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-Ser-DH de rata diluido 1/5000 en TBS-T (0,05%)-leche (1,5%). El anticuerpo fue cedido por el Dr. Hirofumi Ogawa, Department of Biochemistry, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Faculty of Medicine, Toyama, Japón.
- Anticuerpo de conejo anti- $\alpha$  actina de músculo de pollo (SIGMA, A 2668) diluido 1/1000 en TBS-T (0,1%) y anticuerpo
- Las incubaciones con actina eran de origen contrario a las incubadas con el resto de anticuerpos, para evitar las posibles interferencias.
- Disolución de incubación con anticuerpo secundario:
  - Anticuerpo de cabra anti-Ig G de conejo (SIGMA, A 4416) diluido 1/10000 en TBS-T
  - Anticuerpo de cabra anti-Ig G de ratón (Abnova, PAB0096) diluido 1/10000 en TBS-T(0,1%) ó TBS 1X (Ser-DH)

### 2.6.5.3. Técnica

Después de la transferencia, se procedía al bloqueo de las membranas. Se añadía un volumen de solución de bloqueo que recubría la membrana. La solución de bloqueo estaba constituida por TBS-T y leche desnatada al 5% (p/v). Se mantenía en agitación suave a temperatura ambiente durante 4 horas.

A continuación se eliminaba el tampón de bloqueo y se lavaban las membranas con TBS 1X durante 10 min. Después de eliminar el tampón de lavado se incubaban las membranas con la solución de anticuerpo primario. Ésta fue diferente en función de la proteína a detectar, así para anti-G6PDH y anti-IDH-NADP<sup>+</sup> se empleó una dilución 1/5000 en TBS-T (0,1%) y 5% de leche; para anti-EM, Ala-AT y anti- $\alpha$ -actina la dilución utilizada fue 1/1000 en TBST (0,1%) y 5% leche; y para Ser-DH se utilizó una dilución de anticuerpo primario 1/5000 en TBS-T (0,05%) y 1,5% de leche. Todas las incubaciones con anticuerpo primario se realizaron durante toda la noche en la cámara fría (4° C).



**Figura 2.22.** Esquema del protocolo de “western blotting” realizado en este trabajo. A la izquierda se representa el protocolo seguido, en muestras de hígado y músculo, para las detecciones de las proteínas anti-G6PDH, anti-IDH-NADP<sup>+</sup>, anti-EM, anti-Ala-AT y anti-α-actina. A la derecha se observa el protocolo seguido para la detección de anti-Ser-DH en hígado y músculo blanco.



Acabada la incubación, se recuperaba el anticuerpo primario y se lavaban las membranas 3 veces con TBS-T (0,1%) durante 5 minutos. Para anti-Ser-DH se realizó 1 único lavado de 10 minutos en TBS 1X. La agitación era vigorosa y a temperatura ambiente. Se eliminaba el tampón de lavado y se añadía la solución de anticuerpo secundario a una dilución 1/10000 en TBS-T (0,1%) y 3% de leche, a excepción de la Ser-DH que la solución no llevaba Tween-20, ni leche. La incubación se realizó en agitación suave y a temperatura ambiente durante 1 hora.

Se eliminaba el anticuerpo secundario y se hacían 3 lavados en TBS-T (0,1%) de 5 minutos cada uno de ellos. Para la detección de Ser-DH, este lavado fue único y se realizó en TBS 1X durante 10 minutos. A continuación se procedía al revelado de las membranas.

La señal detectada en la proteína de interés se normalizó respecto a la dada por una proteína constitutiva, en concreto en nuestro caso, como proteína constitutiva se usó la  $\alpha$ -actina. Por ello, paralelamente a la inmunodetección con cada anticuerpo, se incubaban las mismas membranas con el anticuerpo policlonal anti- $\alpha$ -actina (Sigma, A 2668) en TBS-T (0,1%) y leche al 5% (p/v) a una dilución de 1:1000. En la **Figura 2.22** se describe el procedimiento seguido para la detección de las diferentes proteínas descritas anteriormente.

## 2.6.6. Revelado

El revelado de las muestras se llevó a cabo bajo las condiciones que se detallan en los siguientes apartados.

### 2.6.6.1. Fundamento

El anticuerpo secundario está unido a peroxidasa. La peroxidasa cataliza la oxidación del luminol que pasa a un estado excitado, el cual emite energía luminosa cuando vuelve a su estado inicial. Esta luminiscencia puede ser captada por autorradiografía, en una película fotográfica.

### 2.6.6.2. Reactivos

- Sistema de detección mediante quimioluminiscencia: Kit de intensificación “ECL+Plus” de Amershan y Santa Cruz Biotechnology; ambos estaban compuestos por una solución A y B. La cantidad empleada de cada uno de ellos era la misma. Para cada membrana se empleaba 1,5 mL (0,75 mL de A y 0,75 mL de B).

Un sistema análogo también se empleó en el revelado. Éste se preparaba a partir de unos ingredientes, tal y como se detalla en la **Tabla 2.14**.

**Tabla 2.14. Protocolo de preparación de la disolución para la detección de quimioluminiscencia**

	<b>Solución A</b>	<b>Solución B</b>
<b>Preparación</b>	50 mg de Luminol en 200 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,6. Conservar protegido de la luz a 4°C	11 mg de ác. P-coumárico en 11 mL de DMSO. Conservar protegido de la luz a temperatura ambiente

Al utilizar, mezclar 3 mL de Solución A con 30  $\mu$ L de solución de solución B y con 0,9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% por cada membrana a revelar

- Disolución de revelado: Revelador de películas autorradiográficas de ILFORD en proporción (1/9) (v/v) en agua destilada
- Disolución de fijación: Fijador marca ILFORD, en proporción ¼ (v/v) en agua destilada. El revelador y el fijador deben mantenerse en oscuridad, si están diluidos.

### 2.6.6.3. Técnica

Las membranas se escurrían y se disponían sobre una superficie de cristal limpia y plana. Sobre ellas se aplicaba una mezcla de detección preparada previamente tal y como se indica en la sección de reactivos que las recubría por completo. La incubación se mantenía 5 minutos. Se eliminaba el exceso de solución de revelado y se pasaban a un "cassette" de autorradiografía, entre un plástico transparente. Sobre las membranas se colocaba una película sensible y se mantenían en contacto un tiempo de exposición variable dependiendo de la intensidad luminosa, que en nuestro caso variaba entre 5 y 60 minutos.

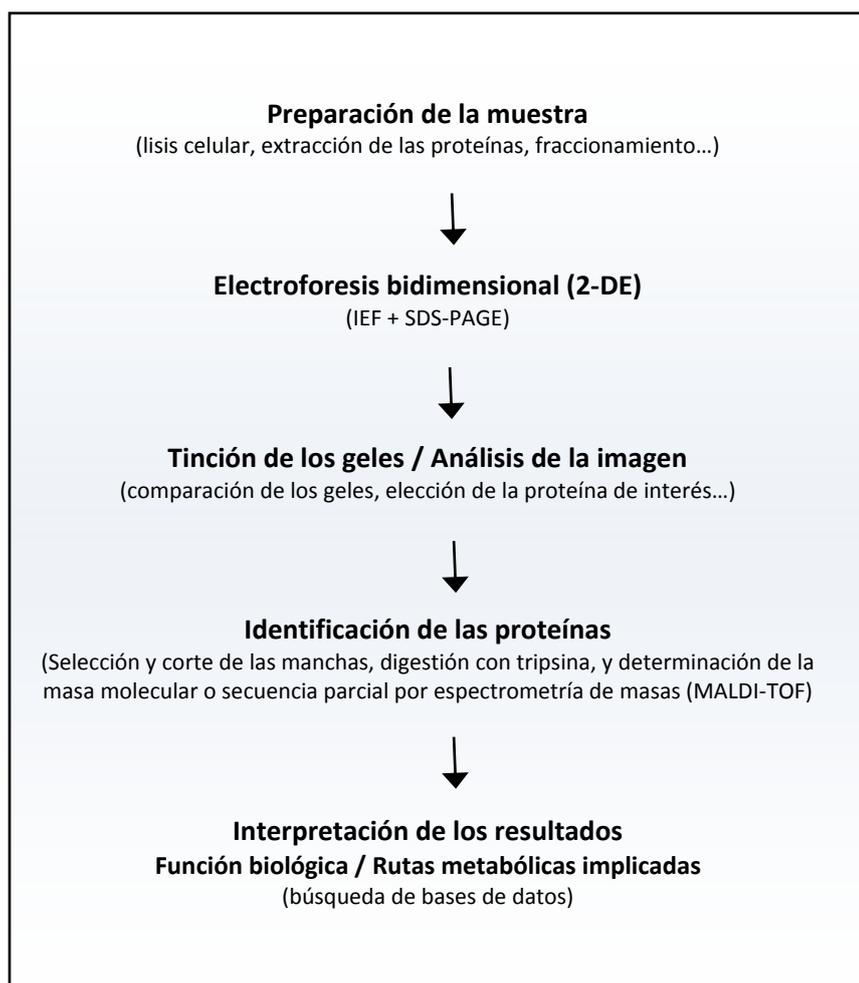
El revelado de la película, se realiza sumergiendo la película en revelador, hasta que aparezcan las bandas. Se pasa la película al fijador, y, por último, se lava con agua miliQ y se deja secar.

Las imágenes se escanearon y fueron analizadas y cuantificadas utilizando el programa Multi Gauge (Fuji Film Europe, TK Tilburg, Holanda). Todos los westerns fueron cuantificados mediante el procedimiento "Profile" del programa, restando el fondo de la película. La intensidad de cada banda fue normalizada por la intensidad de la actina correspondiente. El estudio de activación o inducción de las distintas proteínas se realizó refiriendo las intensidades normalizadas de cada una de las muestras respecto a la intensidad normalizada de la banda control,  $\alpha$  actina. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de densidad óptica (U.A.)



## 2.7. Análisis del patrón global de expresión de proteínas (proteoma) de hígado de dorada mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MALDI-TOF)

El procedimiento seguido en este trabajo para el análisis del proteoma del hígado de dorada puede dividirse en cinco etapas: 1) Preparación de las muestras, 2) Separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE), 3) Tinción de los geles, análisis de las imágenes y elección de las proteínas de interés, 4) Digestión con tripsina de las proteínas seleccionadas y determinación de la masa molecular o secuencia parcial de espectrometría de masas (MS), y, por último, 5) Identificación de las proteínas analizadas e interpretación de los resultados (**Figura 2.23**).



**Figura 2.23.:** Esquema del procedimiento experimental seguido en el estudio de proteómica realizado basado en 2-DE y HPLC-MS.



## 2.7.1. Preparación de la muestra

### 2.7.1.1. Fundamento

La preparación de la muestra es el paso más importante para la obtención de geles bidimensionales donde es posible identificar un elevado número de proteínas de forma individualizada. La finalidad de la optimización de los protocolos de extracción de proteínas es visualizar el mayor número de proteínas posible, para lo cual es necesario separar físicamente cada una de las proteínas que forman parte de los complejos y agregados presentes en las células. Durante el proceso de preparación de las muestras es importante eliminar el mayor número posible de compuestos que puedan provocar algún tipo de interferencia o fenómeno indeseado, como sales, polisacáridos, fenoles (Rabilloud et al., 1997).

### 2.7.1.2. Reactivos

- Tampón de extracción de las proteínas, pH 8:
  - Urea 8 M
  - DTT 20 mM
  - Tris-HCl 100 mM
  - SDS 1%(p/v)
  - PMSF 0,75 mM en isopropanol
- 2-D Clean-up Kit de GE Healthcare, ref.: 80-6484-51
- Sistema para la determinación de la concentración de proteínas: CB-X Assay de GBiosciences.

### 2.7.1.3. Técnica

Para el estudio de proteómica se utilizó tejido hepático intacto congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , desde el día de la extracción del hígado del pez, a los 195 días de ensayo experimental. El tampón de extracción de la proteína consistía en urea 8 M, DTT 20 mM, Tris-HCl 100 mM, SDS 1% y PMSF 0,75 mM disuelto en isopropanol, pH 8. La cantidad exacta de hígado en el tampón fue de 0,1 mg de tejido por cada 1,5 mL de tampón de extracción de proteína. Se utilizaron 6 réplicas por tratamiento experimental. Las muestras disueltas en el tampón se mantuvieron 1 hora a  $T^{\text{a}}$  ambiente y en agitación moderada a intervalos de 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 10000g, a  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 minutos. El precipitado se desechó, y con el sobrenadante se prepararon alícuotas de 200  $\mu\text{L}$ . Con una de las alícuotas se determinó la concentración de proteínas mediante el sistema CB-X de GBiosciences (Ref. 786-12XT).

Para la realización de los estudios de proteómica se contó con la asistencia técnica de la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba que es miembro del "ProteoRed network" Instituto Nacional de Proteómica.



## 2.7.2. Electroforesis bidimensional (2-DE)

### 2.7.2.1. Fundamento

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución, capaz de resolver mezclas complejas de proteínas en un único evento experimental. Se trata de la técnica más eficiente para conseguir la separación e individualización de proteínas pudiendo separar incluso miles de proteínas en un único gel bidimensional. Esta técnica consiste en la aplicación sucesiva de dos técnicas de separación, un isoelectroenfoque (primera dimensión) y una SDS-PAGE (segunda dimensión). En la primera, las proteínas se separan de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI), y en la segunda, según su masa molecular. El desarrollo de gradientes inmovilizados y preestablecidos de pH (“IPG Immobilized pH gradient strips”) ha contribuido sustancialmente a la gran acogida de esta técnica (Görg et al., 1988a y b). Estos gradientes de pH inmovilizados han dado lugar a una gran reproducibilidad entre experimentos, permitiendo una mejor comparación entre los resultados obtenidos. En la actualidad es posible disponer de un amplio margen de gradientes de pH con extremos comprendidos entre pH 3,0 a pH 12,0. Esto permite al investigador incrementar mucho la capacidad de resolver el elevado número de proteínas presente en una determinada muestra. La aplicación de la técnica de electroforesis bidimensional en este trabajo ha permitido identificar un número elevado de proteínas involucradas en el metabolismo del hígado de dorada.

### 2.7.2.2. Reactivos

- Tiras de isoelectroenfoque, Immobiline DryStrip Gels pH 3-10, 18 cm, GE Healthcare (Ref: 17-6002-44)
- Tampón de rehidratación:
  - Urea 8M
  - CHAPS 4% (p/v)
  - Azul de bromofenol (trazas)
- Aceite mineral
- Acrilamida
- TEMED
- Persulfato amónico (PSAM)
- Tampón de equilibrado: Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; urea 6 M; glicerol 20% (v/v); SDS 2% (v/v), hasta 250 mL.
- Tampón de electroforesis:
  - Tris 25mM
  - Glicina 192 mM
  - SDS 0,1% (p/v)
- Agarosa de sellado 0,5% (p/v) en tampón de electroforesis



### 2.7.2.3. Técnica

Para el desarrollo de la electroforesis bidimensional (2-DE) se empleó el sistema Protean IEF System (BioRad Laboratories) y el sistema de Electroforesis-2D Plus Dodeca Cell Protean<sup>®</sup> (BioRad Laboratories).

Para la primera dimensión, las muestras se colocan en contacto con tiras de isoelectroenfoque (IPG, *strip*) de 18 cm de longitud, con gradiente lineal inmovilizado de pH 3-10. Para mejorar la separación de las proteínas de la zona básica, el IEF se realizó por *cup-loading*. Esta técnica consiste en la aplicación de la muestra directamente sobre el extremo básico de la tira previamente hidratada. Las tiras fueron hidratadas en tampón de rehidratación durante un periodo de 12-18 horas a 20°C. Posteriormente, se aplicaba el extracto proteico en la zona básica de la tira IEF y se recubría la tira con aceite mineral para evitar la evaporación y precipitación de la urea. El isoelectroenfoque se realizó a 20°C aplicando una corriente de 50  $\mu$ A/gel y según la rampa de voltajes descrita en la **Tabla 2.15**.

**Tabla 2.15. Programa de isoelectroenfoque de extractos de proteína total**

Paso	Voltaje (V)	Tipo gradiente	Duración (h:min)	Voltios-hora (Vh)
1	50	Rampa rápida	6:00	--
2	500	Rampa lineal	1:30	--
3	1000	Rampa lineal	1:30	--
4	2000	Rampa lineal	1:30	--
5	4000	Rampa lineal	1:30	--
6	8000	Rampa lineal	2:00	--
7	8000	Rampa rápida	--	60000

Los geles de acrilamida empleados para la segunda dimensión se realizaron a una concentración de acrilamida del 11% (p/v). A esta solución de acrilamida se le añadió los catalizadores TEMED y persulfato amónico para iniciar la polimerización de la acrilamida. A continuación, la mezcla de poli(acrilamida) se vertió en el recipiente de polimerización, donde previamente se habían colocado los casetes de vidrio de un tamaño aproximado de 180x245x1 mm, en el interior de los cuales se forman los geles. Para mantener el gel humedecido y obtener un frente recto se añadió 2 mL de agua miliQ durante 1 h, tiempo aproximado de polimerización de los geles en cámara fría.

Para una buena separación de las proteínas según su peso molecular es necesario tratar a las proteínas isoelectroenfocadas con agentes desnaturizantes, como el SDS, que al mismo tiempo que desnaturaliza y despliega las proteínas, se une a ellas de forma proporcional a su peso molecular dotándolas de carga negativa, con agentes reductores como el DTT que se encarga de reducir los puentes disulfuro y con agentes alquilantes como la iodoacetamida (IAA) que alquilará los grupos SH reducidos anteriormente y evitará su posterior oxidación. Estos tratamientos constituyen la fase de



equilibrado de las muestras (Thongboonkerd y Klein, 2004). De este modo, las tiras de IEF se pusieron en contacto con 5 mL de tampón de equilibrado conteniendo 2 g/100 mL de DTT durante 20 minutos en agitación y a continuación se equilibraron durante 20 minutos en agitación con 5 mL del mismo tampón de equilibrado, pero sustituyendo el DTT, por 2,5 g/100 mL de IAA.

Finalizada la polimerización de los geles y equilibrado de las tiras de IEF; hay que depositar las tiras de IEF equilibradas sobre la superficie de los geles de acrilamida. A continuación, en el extremo básico de la tira se colocó un aplicador impregnado con 5  $\mu$ L de marcadores de peso molecular que se usó como referencia para determinar la velocidad electroforética de las proteínas en el gel, y el conjunto se selló con agarosa al 0,5%. Posteriormente, se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis, se añadió el tampón de electroforesis. La separación electroforética se realizó en una etapa de 30 min. a 2,5 W/gel seguida de otra etapa de 5 horas a 12-17 W/gel, aproximadamente.

### **2.7.3. Análisis de la imagen**

#### **2.7.3.1. Fundamento**

Tras la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional, es necesario aplicar un método de tinción que sea capaz de revelar la presencia y posición de las diferentes especies proteicas en el gel de acrilamida.

Los geles bidimensionales, que contienen proteínas teñidas con alguno de los protocolos mencionados anteriormente, deben ser escaneados con la finalidad de obtener una imagen digital de los mismos. La obtención de esta imagen digital permite llevar a cabo una serie de análisis como son la detección de puntos (especies proteicas), eliminación del ruido de fondo, creación de geles promediados, estimación del punto isoelectrico y peso molecular de cada uno de los puntos presentes, determinación de la intensidad de los puntos, cuantificación y comparación del patrón de manchas generado por diferentes geles. Los resultados obtenidos con este tipo de análisis de las imágenes permiten la comparación cualitativa de los perfiles de expresión de proteínas e identificar los cambios en la expresión de proteínas como consecuencia de un tratamiento o condición experimental. Después del análisis de las imágenes escaneadas de geles teñidos y de los puntos presentes en el gel es necesario recuperar los puntos (proteínas) de interés recortándolos de cada uno de los geles bidimensionales elaborados con ayuda de un bisturí para su procesamiento posterior.

#### **2.7.3.2. Técnica**

Una vez acabado todo el proceso de electroforesis, se procedía a la tinción de los geles con SYPRO Ruby (BioRad Laboratories, Ref. 170-3125). El SYPRO Ruby es un fluorocromo que permite la detección de proteínas por fluorescencia. Es una técnica compatible con la espectrometría de masas y el revelado posterior con anticuerpos.



Los geles se depositan en cubetas de tamaño apropiado y se cubren durante 30 minutos con una disolución de fijación que contiene metanol 10% (v/v) y ácido acético 7% (v/v). A continuación los geles se incuban durante 3 horas con agitación en la disolución comercial de SYPRO Ruby. Los recipientes de incubación se cubren completamente con papel de aluminio para evitar el contacto con la luz durante todo el proceso. Posteriormente los geles se aclaran con metanol al 10% (v/v)-ácido acético 7% (v/v) durante 60 min. Finalmente se lavan con agua antes de su visualización en el Sistema Fluor-S MAX2 Multimager de BioRad.

Las imágenes de alta resolución generadas se almacenaron en formato tiff. Para asegurar la reproducibilidad de la técnica y un análisis de resultados apropiado se realizaron 3 geles por tratamiento. Las imágenes se normalizaron respecto a todas las proteínas (*spots*) detectadas en todos los geles analizados. Para el análisis de las proteínas se utilizó el programa informático PDQuest (v7.1, Bio-Rad). Inicialmente, las proteínas que se detectan corresponden a una “sobre-expresión” de al menos 3 veces con respecto a cualquier otro punto de muestreo considerado.

## 2.7.4. Identificación de las proteínas analizadas

### 2.7.4.1. Fundamento

Las recientes mejoras introducidas en las técnicas de espectrometría de masas y el desarrollo de herramientas bioinformáticas permiten la identificación satisfactoria de un gran número de proteínas presentes en los tejidos incluso a bajas concentraciones (femtomolar) basándose en la información en forma de espectros masas de péptidos (peptide mass fingerprint-PMF-) obtenidos por digestión triptica de las proteínas recuperadas de geles de acrilamida (Shevchenko et al., 1996a; Shevchenko et al., 1996b).

En la actualidad existen dos técnicas de espectrometría de masas ampliamente utilizadas para el análisis de las proteínas en los geles bidimensionales. La primera es la espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) y análisis de huellas peptídicas (PMF). La segunda técnica es la espectrometría de masas en tándem alimentada por un cromatógrafo de líquidos (LC/MS-MS). La ionización se realiza a presión atmosférica (API) mediante la generación de un electrospray (ESI).

El espectrómetro puede trabajar en modo masas-masas para fragmentar los péptidos ionizados previamente generados mediante digestión con tripsina en gel. Esta segunda fragmentación de péptidos parentales (secuenciación de novo) permite que las identificaciones de las proteínas de interés se realice en base a secuencias, que son más específicas que las huellas peptídicas (Taylor y Johnson, 1997; Taylor y Johnson, 2001). En este estudio se ha realizado la identificación de proteínas por huella peptídica utilizando un analizador de masas por MALDI/TOF-TOF.



La identificación de proteínas mediante la utilización de la técnica de MALDI-TOF y análisis del mapa peptídico resultante (peptide mass fingerprinting-PMF-) se ha convertido en una herramienta de trabajo fundamental y ampliamente aceptada en los estudios de identificación de proteínas y como complemento a la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional (Wilm et al., 1996). Las proteínas recuperadas de geles de acrilamida son digeridas mediante el empleo de proteasas, generalmente tripsina, que actúan sobre sitios de corte específicos.

A continuación, se determina mediante espectrometría de masas, las masas de los fragmentos (péptidos) generados en la digestión con tripsina. Posteriormente, mediante la utilización de herramientas informáticas que son capaces de comparar los listados de masas generados de forma experimental con las masas teóricas resultantes de digerir con tripsina las secuencias disponibles en bases de datos se logra identificar la proteína de interés.

Las bases de datos pueden ser secuencias de aminoácidos o bien las secuencias de nucleótidos que codifican para cada una de las proteínas. Se trata de una técnica que cuenta con una doble ventaja, su elevada sensibilidad y su elevado rendimiento para procesar un gran número de muestras en un breve espacio de tiempo.

Los componentes básicos del MALDI-TOF son cuatro: una fuente de iones que ioniza las muestras mediante la incidencia de un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nanómetros y genera iones en fase gaseosa en una cámara a vacío (MALDI), un analizador que separa los iones atendiendo a su ratio masa/carga ( $m/z$ ) (TOF), un detector encargado de detectar los iones y un sistema de datos que se encarga de convertir la señal recibida por el detector en una gráfica en la pantalla.

La determinación de los ratios masa/carga de los péptidos generados como consecuencia de la digestión enzimática de las proteínas a estudio constituye una excelente prueba de la estructura e identidad de las proteínas, siempre y cuando disponga de una base de datos suficientemente amplia para el organismo estudiado. En esta técnica, las muestras digeridas con tripsina son embebidas en una matriz de bajo peso molecular que es capaz de absorber la energía de un haz de luz láser que incide sobre la muestra y que induce el proceso de ionización de los péptidos.

Los diferentes iones generados se separarán con su ratio masa/carga ( $m/z$ ) en el interior de un tubo sometido a una diferencia de potencial. Los iones, en función de su relación  $m/z$ , alcanzarán una determinada velocidad que será proporcional al tiempo de vuelo del ión por el tubo. Esto es, los iones cuanto más pequeños, antes llegarán al detector. El detector situado al final del tubo de vuelo es capaz de medir el número de iones que alcanzan el detector en un momento determinado (intensidad).

Existen espectrómetros de masas que combinan dos analizadores TOF consecutivos separados por una cámara de fragmentación, son los MALDI/TOF-TOF. Estos equipos permiten hacer análisis de



masas en tándem, es decir, permiten que un determinado péptido que ha pasado por el primer analizador de masas (TOF) pueda fragmentarse a su vez y determinarse la masa de los péptidos secundarios generados (MS-MS). El análisis de los fragmentos completa la información inicial y puede incluso usarse para determinar la secuencia de determinados péptidos.

En nuestro caso, se han realizado fragmentaciones MS-MS de hasta doce péptidos de cada "spot", según la calidad del espectro. Una vez obtenido el perfil de masas se compara con bases de datos que contienen información acerca de la secuencia genética de los organismos estudiados y de las proteínas que codifican.

La identificación satisfactoria de una proteína analizada mediante este proceso depende en gran medida de la cantidad de información existente de las proteínas estudiadas, del algoritmo utilizado para la búsqueda (que permite asociar una probabilidad que mide la efectividad de cada una de las búsquedas) y de la reproducibilidad de los experimentos elaborados.

#### 2.7.4.2. Técnica

El procedimiento que se describe a continuación se empleó con aquellos "spots" que mostraron diferencias significativas entre tratamientos. En primer lugar, las proteínas de interés se recortaron o picaron del gel automáticamente en una estación Investigador ProPic (Genomic Solutions). Los fragmentos del gel resultante se digirieron con tripsina también de manera automática en una estación Progest (Genomic Solutions) con las siguientes condiciones:

- dos pasos de destinción de 30 minutos con 40% acetonitrilo/100 mM bicarbonato amónico;
- dos rondas de lavado con 25 mM bicarbonato amónico durante 5 minutos y 25 mM bicarbonato amónico/50% acetonitrilo durante 15 minutos, respectivamente;
- deshidratación con 100% acetonitrilo durante 5 minutos y secado de la muestra;
- hidratación con 10  $\mu$ L de tripsina a 12,5 ng/  $\mu$ L en 25 mM bicarbonato amónico durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- y posterior digestión en microondas durante 10 minutos.

La digestión se detuvo añadiendo a cada muestra 10  $\mu$ L de una solución de TFA al 0,5% en agua. Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina, se purificaron de manera automática en una estación Pro MS (Genomic Solutions), mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), eluyéndose directamente con una solución de matriz (5 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico en 70% acetonitrilo/0,1% TFA) sobre la placa MALDI en un volumen de 1  $\mu$ L.

Tras la cocrystalización sobre la placa, las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para obtener la huella peptídica (MS) en un espectrómetro 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) equipado con extracción retardada y reflector en modo positivo. Se



realizó calibración interna de los espectros utilizando las relaciones  $m/z$  de los péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina porcina ( $M+H^+=842,509$ ;  $M+H^+=2211,104$ ), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las  $m/z$  de  $\pm 20$  ppm. De cada muestra se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las 12  $m/z$  más intensas.

## 2.7.5. Interpretación de los resultados

### 2.7.5.1. Fundamento

La identificación de las proteínas, enzimas y sus funciones catalíticas necesariamente desemboca en una discusión sobre los procesos biológicos y mecanismos moleculares implicados. Los continuos y rápidos avances en las técnicas y herramientas informáticas utilizadas para el estudio de conjuntos de proteínas y de los procesos bioquímicos implicados han arrojado una gran cantidad de información valiosa acerca del origen de diferentes alteraciones que pueden sufrir los organismos vivos.

Esto ha originado que algunos autores hayan manifestado la posibilidad de un cambio de una “era genómica” a una “era proteómica”. Sin embargo, a pesar de que la identificación de proteínas utilizando análisis de manchas que proceden de geles bidimensionales mediante espectrometría de masas se ha establecido como una herramienta ampliamente utilizada, la cantidad (y calidad) de las identificaciones obtenidas utilizando estas técnicas depende en gran medida de la existencia previa de bases de datos con gran parte de la información genética del organismo (tejido, células...) estudiado.

Por esta razón, existe una necesidad de secuenciar el mayor número de organismos posible y de aumentar el nivel de conocimientos sobre la naturaleza de las proteínas que codifican (Larsen y Roepstorff, 2000).

### 2.7.5.2. Técnica

Para la identificación de proteínas mediante huella peptídica (PMF) los espectros obtenidos en el análisis de MALDI-TOF se trataron ajustando una línea base, eliminando el ruido y realizando un deisotipado de los picos para generar un listado de valores que correspondían con los iones monoisotópicos de cada péptido detectado. Posteriormente, se realizó la búsqueda en la base de datos NCBI no restringida (National Center for Biotechnology Information, USA).

La búsqueda se realizó combinando los resultados de la huella peptídica (MS) con las posteriores fragmentaciones (MS/MS). Se realizó una búsqueda combinada (MS + MS/MS). Si las fragmentaciones eran buenas, el programa las tenía en cuenta para la búsqueda aumentando así el éxito en la identificación. Si no eran buenas, buscaba sólo por huella peptídica. Como motor de



búsqueda se utilizó el programa MASCOT (Matrix Science, Londres, Reino Unido). Para realizar estas búsquedas se tuvieron en cuenta todos los grupos taxonómicos (no se pusieron límites en la categoría taxonómica), tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron carbamidometiladas y se tuvo en cuenta la oxidación de las metioninas, la formación de piroglutámico y la posible acetilación del extremo N-terminal.

En los informes obtenidos del motor de búsqueda aparecen los siguientes términos:

- "Protein score". Es una puntuación que da el motor de búsqueda (MASCOT) a cada identificación, según un sistema probabilístico basado en la distribución de las masas de los péptidos según la masa de la proteína a la que pertenecen (sistema Mowse).
- "Protein score C.I. %". Es el intervalo de confianza para el "protein score". Cuanto más cerca esté de 100, más fiable es la búsqueda, pero para tener seguridad debe estar por encima del 99%.
- "Peptide count". El motor de búsqueda busca coincidencias entre las masas de los péptidos experimentales y las masas de los péptidos teóricos. El número de péptidos que consigue emparejar es el denominado "peptide count".
- En el caso de que las fragmentaciones de péptidos por MS-MS hayan sido buenas y las haya usado en la búsqueda aparecen otros dos parámetros:
  - "Total Ion Score". Suma de los "protein score" de cada uno de los iones fragmentados.
  - "Total Ion Score C.I. %". Intervalo de confianza para el "total ion score". Por encima de un 95% ya sería significativo.



## 2.8. Estudio histológico

Una forma de conocer las modificaciones estructurales que se puedan producir en los tejidos de las doradas atribuibles a la acción de ácido maslínico consiste en determinar por medio de técnicas de microscopía óptica y electrónica la ultraestructura de estos tejidos.

El estudio histológico se realizó a los 195 días de duración del ensayo experimental. La toma de muestras se realizó en la piscifactoría "Azucarera del Guadalfeo". Se pescaban 4 doradas por lote experimental e inmediatamente se llevaban a hielo, para detener las reacciones metabólicas. Se diseccionaban los peces y se les extraía el hígado y músculo blanco. El corte de las muestras se hizo lo más limpio posible. Posteriormente estos tejidos eran fijados por inmersión y procesados según se detalla a continuación.

### 2.8.1. Microscopía óptica

#### 2.8.1.1. Reactivos

- Líquido de Bouin:
  - 15 partes de una solución acuosa saturada de ácido pícrico
  - 5 partes de formalina, neutralizada con  $MgCO_3$
  - 1 parte de ácido acético glacial
- Alcohol 70°, 90°, 96°, 100°
- Sulfato cúprico anhidro
- Benceno
- Parafina plastificada en pastillas
- Albúmina
- Hematoxilina de Harris:
  - Disolver 1 g de hematoxilina en 10 mL de alcohol absoluto (100°)
  - Diluir 20 g de alumbre potásico de hematoxilina y alumbre potásico al cabo de 24 horas
  - Añadir 0,5 g de óxido de mercurio
  - Calentar teniendo cuidado de que la nueva solución no hierva
  - Dejar enfriar
  - Filtrar
- Eosina:
  - Preparar una solución acuosa de eosina amarillenta al 1%
  - Añadir 1 gota de ácido acético por cada 100 mL de solución
- Xileno



### 2.8.1.2. Técnica

Las piezas de tejido que se empleaban para microscopía óptica correspondían a secciones de hígado, músculo blanco y corazón, de 1 mm de grosor aproximadamente. Estas piezas eran fijadas en líquido de Bouin durante 48 horas. En este periodo de tiempo, se trasladaban las muestras al Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada, en donde se llevó a cabo toda la parte procedimental.

Una vez concluido el proceso de fijación, se procedió a la inclusión en parafina. Se usó parafina plastificada en pastillas de punto de fusión 56-58°C. El proceso de inclusión consistía en una serie de etapas que se detalla a continuación:

1. Lavar en alcohol de 70°C (renovando dos veces como mínimo)
2. Deshidratar en alcohol 90°C (2 veces), alcohol 96°C (2 veces), alcohol 100°C (3 veces), con una duración de 30 minutos a 2 horas cada lavado de alcohol. Finalmente, se asegura la completa deshidratación de las muestras, sumergiéndolas en alcohol 100°C con sulfato cúprico anhidro (2 veces), durante un tiempo de 15 minutos a 1 hora.
3. Se someten las muestras a dos baños sucesivos de benceno terminando el segundo en estufa a 60°C, durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 1 hora, y se prosigue en estufa con dos baños más de una mezcla 1:1 de benceno-parafina (de 30 minutos a 1 hora).
4. Impregnar con parafina en estufa a 60°C, durante un tiempo comprendido entre 18-24 horas.
5. Confeccionar los bloques, colocando y orientando los tejidos adecuados según su tamaño. La orientación de los tejidos en los moldes siguió alguno de los tres planos de simetría (sagital, coronal o frontal y transversal u horizontal).

Una vez finalizado la inclusión en parafina, se realizan los cortes histológicos seriados de 5  $\mu$ m de grosor mediante utilización de un microtomo de parafina (Leyca RM 2135). A continuación las tiras de los cortes se estiraron en un baño de agua destilada a 45°C y después, con la ayuda de un pincel, se recogieron en portaobjetos previamente numerados y albuminados con albúmina de Mayer para asegurar su adhesión. Finalmente, se procedió al secado de los portaobjetos con las tiras de los cortes adheridos, en estufa a 37°C durante 12 horas.

Para poder observar las muestras, se realizaba una tinción con hematoxilina-eosina (Mallory, 1938) como método de rutina para el reconocimiento y estudio general de microscopía óptica de las diferentes estructuras presentes en cada uno de los grupos experimentales. El procedimiento seguido para la tinción consistía en desparafinar los cortes en xileno; hidratar con una serie de decreciente de alcoholes (100°, 96°, 90°, 70° y 50°); y se teñía con hematoxilina durante 2 minutos.



Posteriormente, se lavaba con agua corriente hasta que vire, adquiriendo una tonalidad azul-negruzca (5 minutos). El siguiente paso consistía en la tinción con eosina durante 7 minutos, seguidamente se deshidratava con alcohol de 70° y luego con alcohol de 90°; se terminaba de deshidratar con alcohol (96° y 100°), se aclaraba con xileno, y finalmente, se procedía al montaje para visualización a microscopio óptico.

## 2.8.2. Microscopía electrónica de transmisión

### 2.8.2.1. Reactivos

- Glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 1% (1:1) en tampón cacodilato 0,05 M, pH 7,4
- Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) 2 mM
- Tetróxido de osmio al 1%
- Etanol al 50%, 70%, 90% y 100%
- Azul de toluidina
- Acetato de uranilo
- Citrato de plomo
- Resina epoxi
- Ultramicrotomo ("Ultracut E", Leyca con cuchilla de diamante Diamond de 45°)
- Microscopio electrónico de transmisión (T.E.M.) "EM 902 Zeiss. 10 C" de 80 KV de aceleración.

### 2.8.2.2. Técnica

Las secciones, de 1-2 mm de grosor de hígado, músculo blanco y corazón se fijaban rápidamente con una solución 1:1 de glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 1% en tampón cacodilato 0,05 M, pH 7,4 y cloruro de magnesio 2 mM, durante 4 horas a una temperatura de 4°C. Transcurrido este tiempo se procedía al lavado de las muestras en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4 y cloruro de magnesio 2 mM repitiendo tres veces la operación, con una duración de cada lavado de 20 minutos.

Tras la fijación del tejido, éste se sumergía durante 2 horas en una solución de tetróxido de osmio al 1%, y a continuación se procedía a un nuevo lavado con el tampón cacodilato 0,1 M. Para llevar a cabo la deshidratación de la muestra, ésta se sometía a un gradiente creciente de etanol (50, 70, 90 y 100% de pureza), con un intervalo de 20 minutos entre cada uno. Los tejidos eran entonces sometidos a infiltración en una mezcla de etanol al 100% y resina epoxi durante 2 horas y en agitación continua.

Para la obtención de los bloques definitivos las muestras se mantenían en resina epoxi pura durante todo un día y eran polimerizadas a 60°C. A partir de los bloques que contenían las muestras infiltradas se efectuaba cortes semifinos de 1 µm de grosor, que se teñían con azul de toluidina. Los



cortes ultrafinos, de 700 Å de grosor, eran efectuados con un ultramicrotomo y eran teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Dichos cortes se colocaban en rejillas de cobre especiales de para su visualización al microscopio electrónico de transmisión.

Todo este proceso se realizó con la asistencia técnica de la Unidad de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.



## 2.9. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los efectos de las diferentes condiciones nutricionales a lo largo del tiempo sobre todos los parámetros estudiados se han examinado usando el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido por el test de Duncan y la *t*-Student para comparaciones entre medias. Este análisis estadístico se ha realizado usando el programa informático SPSS vs 14.0. Las diferencias fueron consideradas como significativas para  $p < 0,05$ .



## 2.10. Recursos técnicos e instrumentales

Para la realización del presente trabajo de investigación se han utilizado los recursos instrumentales, medios técnicos e informáticos existentes en:

- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad de Granada
- Departamento de Biología Animal, Universidad de Granada
- Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén
- Departamento de Biología Celular, Universidad de Granada
- Servicios Técnicos de Investigación, Universidad de Granada
- Servicio Central de Apoyo a la Investigación, Universidad de Córdoba
- Departamento de Biología Animal, Universidad de Valencia

Los ensayos *in vivo* de alimentación, mantenimiento y toma de muestras de las doradas se llevaron a cabo en las instalaciones de tierra de la piscifactoría "Azucarera del Guadalfeo" S.A., División de Acuicultura Marina, Salobreña, Granada.

El ácido maslínico ha sido suministrado por el Grupo de Investigación dirigido por el Dr. Andrés García-Granados del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.

Para la conservación de las muestras y reactivos se han utilizado frigoríficos Bauknech Designer Style y congeladores de -20°C y -80°C marcas Zanussi y Revco, respectivamente. Las pesadas de tejidos, reactivos y demás productos se han realizado en balanzas de precisión Mettler Toledo AG245 (rango de pesada 101 g  $\pm$  0,0001 g). Las centrifugaciones se llevaron a cabo utilizando una centrifuga refrigerada Kubota 5100 con un rotor RA/500, y una centrifuga Beckman TJB y una ultracentrífuga Beckman Optima™ LE-80K, U.S.A en un rotor de ángulo fijo TY-50.

Las determinaciones de composición corporal de doradas y dietas experimentales se han realizado en el Departamento de Biología Animal de la Universidad de Granada. Para la determinación de humedad corporal se empleó una estufa Heraeus, para la cuantificación de cenizas, un horno Mufla; en la determinación de proteínas, se utilizó un digestor NitroKjel Dra. Y un destilador marca Selecta; finalmente, para las determinaciones de lípidos corporales se usó un extractor de grasas marca Buchi 810.

La determinación de las velocidades de recambio proteico, concentración de ácidos nucleicos, metabolitos y actividades enzimáticas se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad de Granada. Para el estudio de recambio proteico y determinación del contenido en ácidos nucleicos, se ha empleado un Termoblock marca Selecta, un rotavapor Univeba-400 de Selecta acoplado a una bomba de vacío (Universal Vacuum System Plus) UVS400A de Savant. La radiactividad se midió empleando un contador de Centelleo, marca Beckman LS6500, y el resto de medidas espectrofluorimétricas en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B.



El lector multiplacas Powerwave Instruments utilizado era de marca Bio-Tek. Con él se midieron todos los análisis correspondientes a las concentraciones de metabolitos y actividades enzimáticas.

Los ensayos de “Western-blot” se realizaron en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad de Granada y en el Departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén. Las electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE) se ha realizado usando el sistema “Mini-Protean® 3 Cell” de Bio-Rad Laboratorios.

Las transferencias a membrana se hicieron con un equipo de electrotransferencia semiseca “Trans-blot® SD Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell”. Como fuentes de alimentación se usaron la PowerPac 200 y PowerPac 1000. Las incubaciones de las membranas se han llevado a cabo utilizando agitadores orbitales de la marca Heidolph Instruments, modelo Polimax 1040. Para el revelado por quimioluminiscencia se ha utilizado un “casete” de autorradiografía Hypercassette™ de Amershan Biosciences y películas para autorradiografía

En el estudio de proteómica, la electroforesis se realizó utilizando el sistema Proten IEF System de Bio-Rad Laboratories y el sistema de electroforesis 2D Plus Dodeca Cell Protean, también de Bio-Rad. La visualización de los geles se realizó en el Sistema Fluor-S MAX-2 Multimager de Bio-Rad. El software informático empleado para la visualización de las manchas proteicas fue el PDQuest.

Para el estudio histológico, se utilizaron los microscopios ópticos marca Olympus BX51 del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada, y la microscopía electrónica se realizó utilizando los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. El microscopio electrónico de transmisión empleado fue el ZEISS EM 10C de 80 KV de aceleración. Para hacer los cortes e inclusión en parafina, se emplearon los micrótomos de parafina, Leyca RM 2135, y ultramicrotomos (“Ultracut E”) con cuchilla de diamante Diamond de 45°.

### 2.10.1. Productos químicos

Todos los productos químicos usados fueron de alta calidad y de marcas comerciales de reconocido prestigio. Los reactivos y productos de laboratorio utilizados para la preparación de tampones, disoluciones, y medios de ensayo fueron suministrados por Sigma Aldrich Co. (USA), Panreac Química SA (España), Fluka Riedel-de Haën (Suiza), Amhersan Biosciences (España), Tebu-Bio (España) y Bio-Rad Laboratorios Inc. (USA).

En las **Tablas 2.16-2.21** siguientes se muestran los reactivos específicos utilizados en las determinaciones de composición corporal, de la concentración de metabolitos y coenzimas oxidados y reducidos, en las actividades enzimáticas, SDS-PAGE, “Western-blot”, electroforesis bidimensional e histología de tejidos.


**Tabla 2.16. Reactivos para composición corporal**

Nombre	Casa comercial	Referencia
Ácido clorhídrico	Probus	K2009
Ácido sulfúrico 96%	Probus	015020
Éter dietílico	Panreac	142770
Hidróxido de sodio	Probus	173620
Sulfato de sodio anhidro	Panreac	141716
Sulfato potásico	Panreac	131532
Sulfato cúprico	Probus	52920

**Tabla 217. Reactivos para recambio proteico y ácidos nucleicos**

Nombre	Casa comercial	Referencia
Ácido clorhídrico (HCl)	Probus	20 252.290
Acido perclórico 70% (HClO <sub>4</sub> )	Panreac	132175
Acido sulfúrico 96% (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Panreac	131058
Citrato sódico	Panreac	141655
Cloroformo	Scharlau	CL02032500
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac	131659
DNA de hígado salmón	SIGMA	D1626
EDTA	SIGMA	141085.1214
Etanol	Panreac	
Metanol	Panreac	361091.1612
Eter etílico	Panreac	141313
β-feniletilamina	SIGMA	P6513
N-Heptano	Prolabo	1206
Höchst	SIGMA	33258
Fosfato sódico	Panreac	141677
Hidróxido sódico (NaOH)	Panreac	141687
Leucil-alanina (Leu-Ala)	SIGMA	L4627
L-fenilalanina (L-Phe)	SIGMA	P8324
L- [2,6 <sup>3</sup> H] fenilalanina	Amersham International	
Líquido de centelleo	Ecoscint-A	
Ninhidrina	SIGMA	N4876
Piridoxal-5-fosfato	SIGMA	P9255
RNA de hígado bovino	SIGMA	R7250
L-Tyr descarboxilasa ( <i>S. faecalis</i> )	SIGMA	EC 4.1.1.25/ T7677

**Tabla 2.18. Reactivos para metabolitos y coenzimas**

Nombre	Casa comercial	Referencia
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	SIGMA	P0507
Cloruro de Magnesio	Panreac	131396
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	SIGMA	G6378
Fosfoglucoisomerasa	SIGMA	P9544
Glicina	SIGMA	3GH007615
Hidracina	SIGMA	H6628
LDH	Boehringer Mannheim	107077
MDH	SIGMA	M9004
NAD <sup>+</sup>	SIGMA	N6522
NADP <sup>+</sup>	SIGMA	N0505
Trietanolamina	SIGMA	T1377



Tabla 2.19. Reactivos para ensayos enzimáticos

Nombre	Casa comercial	Referencia
$\alpha$ -Cetoglutarato	SIGMA	K2000
Alanina	SIGMA	A7627
Albúmina sérica bovina (BSA)	SIGMA	A2153
Cloruro Magnesio ( $MgCl_2$ )	Panreac	141396
Ditioeritritol (DTE)	Boehringer Mannheim	197 777
EDTA	Panreac	131669
6-Fosfogluconato	Boehringer Mannheim	11105232
Glucosa 6-fosfato	SIGMA	G7250
Hepes	SIGMA	H3375
Hidróxido sódico (NaOH)	Panreac	141687
Imidazol	SIGMA	I0125
Isocitrato	SIGMA	I1252
Láctico deshidrogenasa (LDH)	Boehringer Mannheim	107077
L-Malato	SIGMA	M9004
NADH	SIGMA	N6005
NADP <sup>+</sup>	SIGMA	N0505
Piridoxal fosfato (PLP)	SIGMA	P9255
PMSF	SIGMA	P7626
Serina	Fluka	84960
Tirosina	SIGMA	T2269
Tris	SIGMA	T6606
Tritón-X100	SIGMA	T9284

Tabla 2.20. Reactivos para SDS-PAGE e inmunotransferencia

Nombre	Casa comercial	Referencia
Acrilamida: N,N'-metilen-bisacrilamida	Bio-Rad	161-0158
Antisuero anti- $\alpha$ actina	SIGMA	A 2668
Antisuero anti-Ala-AT	Abnova	07277
Antisuero anti-G6PDH	SIGMA	A 9521
Antisuero anti-EM	Cedido por el Dr. Ben Hamprecht, Interfaculty Institute for Biochemistry, University of Tuebingen, Alemania)	
Antisuero anti-IDH-NADP <sup>+</sup>	Cedido por el Dr. Sadaki Yokota, Biology Laboratory, Yamanashi Medical university, Yamanashi, Japón	
Antisuero anti-Ser-DH	Cedido por el Dr. Hirofumi Ogawa, Department of Biochemistry, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Faculty of Medicine, Toyama, Japón.	
Azul de Comassie	SIGMA	B0770-5G
Azida sódica	Panreac	162712
Dodecil sulfato sódico (SDS)	Bio-Rad	161-0301
"ECL+Plus System"	Amershan Sta.Cruz Biotechnology	RPN 2132
Fijador	AGFA	20-50I
Glicerol	SIGMA	G-6279
"Hyperfilm"	Amhersan	
Leche desnatada	La Lechera	
Luminol	SIGMA	A-8511
Membranas PVDF	Amershan	Hybond-PRPN2103K
B-mercaptoetanol	SIGMA	M6250
Metanol	Panreac	361091.1612



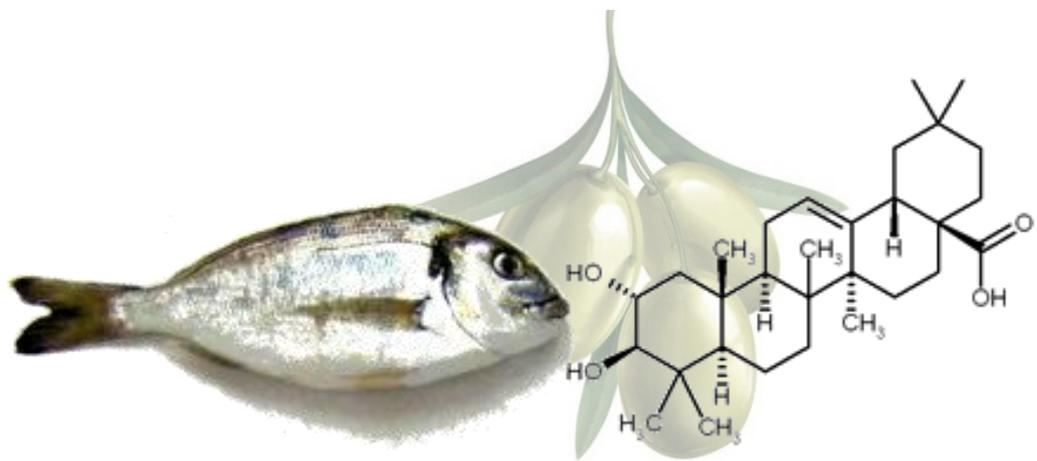
<b>N,N,N',N'-Tetrametaletilenodiamina (TEMED)</b>	Bio-Rad	161-9800
<b>Papel "Whatman" (3,46x57 cm)</b>	Bio-Rad	
<b>Persulfato amónico (PSAM)</b>	Bio-Rad	161-0700
<b>Revelador</b>	AGFA	
<b>Tween-20</b>	Bio-Rad	170-6531

**Tabla 2.21. Reactivos para estudio proteómica**

<b>Nombre</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>2-DE clean up</b>	GE Healthcare	80-6484-51
<b>Tiras IEF, Inmobiline Dry strip Gels pH 3-10, 18 cm</b>	GE Healthcare	17-6002-44
<b>urea</b>	SIGMA	H8627
<b>DTT</b>	SIGMA	D5545
<b>Kit CB-X Assay</b>	GBiosciences	

# Resultados

---







### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Influencia del ácido maslínico sobre el crecimiento, índices biométricos, parámetros nutricionales y composición corporal de la dorada en estadio juvenil.

##### 3.1.1. Crecimiento e índices biométricos

El análisis de los efectos del ácido maslínico sobre diferentes parámetros nutricionales y del crecimiento se realizó durante un tiempo experimental total de 210 días. Para ello se utilizaron los siguientes grupos experimentales: Control alimentados *ad libitum* (Control AL); +100 mg ácido maslínico/kg dieta alimentados *ad libitum* (AM<sub>100</sub> AL), control con ingesta restringida al 1,5% peso animal (Control R); +50 mg ácido maslínico/kg dieta restringida (AM<sub>50</sub> R) y +100 mg ácido maslínico/kg dieta restringida (AM<sub>100</sub> R). En la **Tabla 3.1** se muestran los resultados encontrados en el crecimiento animal e índices biométricos de las doradas alimentadas con las diferentes dietas.

**Tabla 3.1. Crecimiento e índices biométricos de las doradas alimentadas con ácido maslínico**

	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)		
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	50 mg/kg (AM <sub>50</sub> )	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>Peso inicial (g)</b>	11,93±0,03 <sup>a</sup> (300)	12,77±0,07 <sup>a</sup> (300)	12,63±0,08 <sup>a</sup> (300)	12,17±0,02 <sup>a</sup> (300)	12,70±0,01 <sup>a</sup> (300)
<b>Peso final (g)</b>	66,22±1,51 <sup>a</sup> (100)	76,31±1,67 <sup>b</sup> (100)	69,31±1,74 <sup>a</sup> (100)	71,11±0,98 <sup>a</sup> (100)	73,10±0,87 <sup>b</sup> (100)
<b>ΔPeso/día</b>	0,26±0,00 <sup>a</sup>	0,31±0,00 <sup>b</sup>	0,27±0,00 <sup>a</sup>	0,28±0,00 <sup>c</sup>	0,29±0,00 <sup>d</sup>
<b>ΔPeso (%)</b>	455,1±10,4 <sup>a</sup>	497,6±11,0 <sup>b</sup>	448,7±11,3 <sup>a</sup>	484,3±6,8 <sup>b</sup>	471,67±5,6 <sup>b</sup>
<b>TCI (%)</b>	0,82±0,02 <sup>a</sup>	0,85±0,02 <sup>a</sup>	0,81±0,02 <sup>a</sup>	0,84±0,01 <sup>a</sup>	0,83±0,01 <sup>a</sup>
<b>IN</b>	1,43±0,03 <sup>a</sup>	1,67±0,05 <sup>b</sup>	1,41±0,03 <sup>a</sup>	1,41±0,03 <sup>a</sup>	1,48±0,04 <sup>a</sup>
<b>RHS</b>	1,80±0,06 <sup>a</sup>	1,80±0,10 <sup>a</sup>	1,63±0,06 <sup>a</sup>	1,70±0,06 <sup>a</sup>	1,84±0,15 <sup>a</sup>
<b>RMS</b>	64,08±0,94 <sup>a</sup>	65,19±0,68 <sup>a</sup>	66,10±0,98 <sup>a</sup>	66,05±0,89 <sup>a</sup>	66,00±0,36 <sup>a</sup>

Los resultados son media ± SEM. El número de animales utilizado se expresa entre paréntesis. El ΔPeso/día en g/día; la tasa de crecimiento instantánea (TCI= (Ln Pf-Ln Pi/n días)\*100); el índice de nutrición (IN) en g/cm<sup>3</sup>; la relación hepatosomática (RHS) y miosomática (RMS) como (peso tejido/peso pez)\*100. Superíndices diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

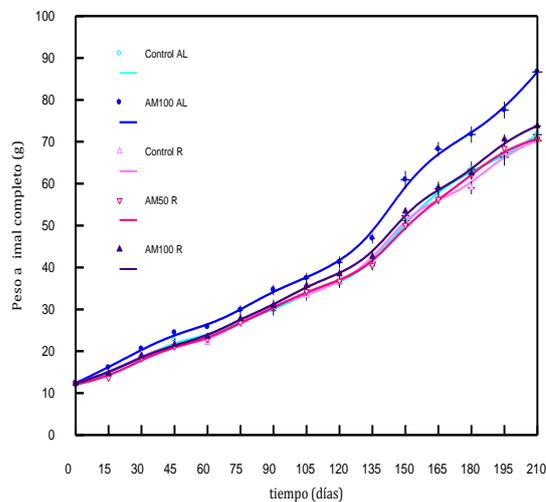
La alimentación con la dieta AM<sub>100</sub> AL proporcionó los mejores resultados en relación con el crecimiento animal medidos como el incremento de peso (por día y %), la tasa de crecimiento instantánea (TCI) y el índice de nutrición (IN). Al final del tiempo experimental, el peso final de los animales alimentados con las dietas suplementadas con ácido maslínico, aumentó un 15,5% para la dieta AM<sub>100</sub> AL y un 5,5% para la AM<sub>100</sub> R. Al mismo tiempo, el ΔPeso/día y el % de ΔPeso aumentaron significativamente. El ΔPeso/día del grupo AM<sub>100</sub> AL supuso un incremento del 19,2% respecto al

control AL mientras que el grupo AM<sub>100</sub> R un 7,5% por encima del control R. Por otra parte, el % de  $\Delta$ Peso de la dieta AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R supuso un aumento del 9,5% y un 5,1%, respectivamente. La tasa de crecimiento instantánea no difirió significativamente entre los distintos grupos experimentales, aunque para los alimentados con ácido maslínico, fue algo más elevada. El índice de nutrición (IN) resultó ser mayor para el grupo AM<sub>100</sub> AL, un 16,8% por encima del control AL. Se determinaron a su vez las relaciones hepatosomáticas (RHS) y miosomáticas (RMS) al final del ensayo, aunque no hubo diferencias para ambos parámetros.

En la **Figura 3.1** se puede observar las diferencias en el tamaño que alcanzaron las doradas a los 150 días del tiempo experimental. Las diferentes curvas de crecimiento que siguieron los animales sometidos a los 5 tratamientos, se muestran en la **Figura 3.2**; en ella podemos apreciar el crecimiento que ha seguido cada grupo, a través de cada uno de los puntos de muestreo de peso que se llevaron a cabo durante el ensayo; observando que el grupo alimentado con dieta AM<sub>100</sub> AL se separa del resto de grupos casi desde el inicio del ensayo experimental.

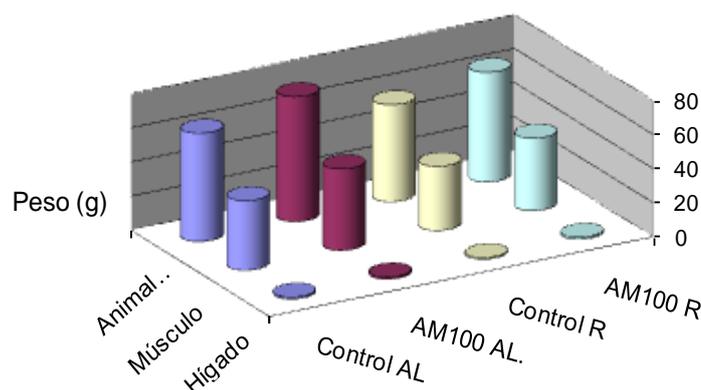


**Figura 3.1.** Diferencias en el tamaño medio aproximado de las doradas alimentadas con las dietas Control AL, AM<sub>100</sub> AL, Control R y AM<sub>100</sub> R a los 150 días del ensayo experimental.



**Figura 3.2.** Efecto del ácido maslínico sobre el peso medio del animal completo (g) a lo largo de los 210 días que duró el ensayo experimental.

Además del crecimiento del animal completo, se analizó la evolución del peso del hígado y músculo blanco (**Figura 3.3**). Para ello se escogió un grupo de doradas al azar y se pesó el animal completo, músculo e hígado, y se establecieron las relaciones correspondientes. En esta figura se pueden apreciar los efectos del ácido maslínico y de la restricción calórica, sobre el crecimiento del animal completo, y de ambos tejidos de la dorada. Hay que remarcar como especialmente importante la respuesta de los animales que fueron sometidos a la dieta restringida. En estos grupos se alcanzaron valores de crecimiento semejantes a los de los alimentados *ad libitum*.



**Figura 3.3.** Efecto del ácido maslínico sobre el peso del animal completo, hígado y músculo blanco (g) transcurridos los 210 días que duró el ensayo. El número de animales utilizados fue de 8 por cada situación nutricional.

### 3.1.2. Ingesta y utilización nutritiva del alimento

Los resultados de ingesta, absoluta (expresada en g/pez-día) y relativa (g/100g pez-día), así como los de la utilización nutritiva del alimento, incluyendo los valores de ingesta, en su caso, de ácido maslínico, expresándolos, también, como ingesta absoluta (ng/pez) y relativa (ng/g pez) diarias y totales, se encuentran reflejados en las **Tabla 3.2** y **Tabla 3.3**.

**Tabla 3.2.** Efecto del ácido maslínico sobre la ingesta y utilización nutritiva de la dieta

	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)		
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	50 mg/kg (AM <sub>50</sub> )	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>Ingesta absoluta (g/pez-día)</b>					
Dieta	0,50±0,01 <sup>a</sup>	0,53±0,01 <sup>a</sup>	0,45±0,01 <sup>b</sup>	0,40±0,01 <sup>b</sup>	0,39±0,00 <sup>b</sup>
Proteína	0,19±0,01 <sup>a</sup>	0,20±0,00 <sup>a</sup>	0,17±0,00 <sup>b</sup>	0,15±0,00 <sup>b</sup>	0,14±0,00 <sup>b</sup>
Grasa	0,06±0,00 <sup>a</sup>	0,06±0,00 <sup>a</sup>	0,05±0,00 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>b</sup>
Carbohidratos	0,08±0,01 <sup>a</sup>	0,08±0,01 <sup>a</sup>	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,06±0,00 <sup>b</sup>	0,06±0,00 <sup>b</sup>
<b>Ingesta relativa (g/100 g pez-día)</b>					
Dieta	1,23±0,05 <sup>a</sup>	1,13±0,05 <sup>a</sup>	1,11±0,06 <sup>a</sup>	0,97±0,03 <sup>b</sup>	0,91±0,03 <sup>b</sup>
Proteína	0,47±0,02 <sup>a</sup>	0,42±0,01 <sup>a</sup>	0,40±0,02 <sup>a</sup>	0,35±0,01 <sup>b</sup>	0,33±0,01 <sup>b</sup>
Grasa	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,12±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,01 <sup>b</sup>	0,10±0,01 <sup>b</sup>
Carbohidratos	0,20±0,02 <sup>a</sup>	0,18±0,02 <sup>ab</sup>	0,17±0,02 <sup>ab</sup>	0,15±0,01 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>b</sup>
<b>Índices nutricionales</b>					
EA (experimental)	0,68±0,02 <sup>a</sup>	0,75±0,02 <sup>b</sup>	0,76±0,02 <sup>b</sup>	0,97±0,01 <sup>c</sup>	1,01±0,01 <sup>d</sup>
EA (relativa)	1,00±0,00 <sup>a</sup>	1,11±0,00 <sup>b</sup>	1,12±0,00 <sup>b</sup>	1,43±0,00 <sup>c</sup>	1,49±0,00 <sup>d</sup>
CEC	1,81±0,05 <sup>a</sup>	2,15±0,06 <sup>b</sup>	2,53±0,08 <sup>cd</sup>	2,41±0,05 <sup>c</sup>	2,66±0,05 <sup>d</sup>
VPP	37,73±3,91 <sup>a</sup>	48,39±3,69 <sup>b</sup>	38,35±3,05 <sup>a</sup>	42,15±2,80 <sup>a</sup>	41,48±2,82 <sup>a</sup>
VPL	1,56±0,27 <sup>a</sup>	1,59±0,26 <sup>a</sup>	2,15±0,53 <sup>a</sup>	1,86±0,28 <sup>a</sup>	1,98±0,30 <sup>a</sup>

Los resultados son media ± SEM de al menos 100 peces. Para VPP y VPL se utilizaron 5 valores. EA=g crecimiento/g ingesta; EA (relativa) se calcula tomando como base 1 el valor de EA para el Control AL; CEC=g crecimiento/g proteína ingerida; VPP=proteína corporal final-proteína corporal inicial/proteína ingerida x 100; VPL=grasa corporal final-grasa corporal inicial/grasa ingerida x 100. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0,05).



**Tabla 3.3. Valores de ingesta absoluta y relativa de ácido maslínico**

	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)		
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	50 mg/kg (AM <sub>50</sub> )	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>Ingesta absoluta</b>					
ng/pez-día	0,00 <sup>a</sup>	39,62±0,34 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>	14,51±0,01 <sup>c</sup>	28,03±0,37 <sup>d</sup>
mg/pez	0,00 <sup>a</sup>	7,53±0,06 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>	2,76±0,02 <sup>c</sup>	5,33±0,07 <sup>d</sup>
<b>Ingesta relativa</b>					
ng/g pez-día	0,00 <sup>a</sup>	0,84±0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,35±0,00 <sup>c</sup>	0,66±0,02 <sup>d</sup>
mg/g pez	0,00 <sup>a</sup>	0,16±0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,07±0,00 <sup>c</sup>	0,13±0,00 <sup>d</sup>

Tiempo experimental=210 días. Todos los resultados se expresan como la media ± SEM de al menos 100 valores. Superíndices distintos indican diferencias significativas (p<0,05).

La ingesta diaria absoluta tanto de la dieta como del conjunto de macronutrientes, proteína, grasa y carbohidratos (g/pez) fue mayor para los grupos AL. Este aumento supuso un 24% de media con respecto a los grupos R. La ingesta diaria relativa (g/100 g pez) de la dieta fue significativamente menor para los grupos AM<sub>50</sub> R y AM<sub>100</sub> R, respecto a los grupos AL. Cabe resaltar que el grupo control R, se igualó a los dos grupos AL. El resto de macronutrientes presentó el mismo patrón estadístico que el de los valores de la ingesta.

La eficacia alimentaria (EA), entendida como la razón entre los g de crecimiento y los g de ingesta, resultó ser superior para las doradas que se alimentaban con las dietas AM<sub>50</sub> R y AM<sub>100</sub> R, lo cual resulta lógico, pues alcanzan casi el mismo crecimiento, con una menor ingesta de alimento. El grupo AM<sub>100</sub> AL presentó una EA 11% mayor que la encontrada en el grupo control, indicando el efecto positivo del ácido maslínico sobre este índice nutricional.

Por otra parte, los resultados obtenidos permiten destacar que la restricción calórica en su conjunto aumentó la eficacia alimentaria respecto a los alimentados *ad libitum*, aunque la del grupo control R fue peor, que la del resto de los grupos con restricción de alimento. Los valores de EA encontrados para los grupos AM<sub>50</sub> R y AM<sub>100</sub> R fueron, respectivamente, un 43% y un 49% mayor que el encontrado en su correspondiente control.

El coeficiente de eficacia de crecimiento (CEC) fue mayor para el grupo AM<sub>100</sub> AL respecto al control AL, esto nos indica que los animales alimentados *ad libitum* con ácido maslínico utilizaron mejor la proteína de la dieta para el crecimiento. Sin embargo, la restricción calórica indujo un aumento significativo de este coeficiente. Dentro de estos grupos, el que mostró un menor índice fue el grupo AM<sub>50</sub> R, mientras que en el resto no encontramos diferencias significativas.

El valor productivo de la proteína (VPP) fue un 37% superior para el grupo AM<sub>100</sub> AL, comparado con el grupo control AL. Esto nos indica que este grupo fue el que mejor incorporó la proteína de la dieta a su proteína corporal. Los otros grupos experimentales no mostraron diferencias en este parámetro. En el valor productivo de los lípidos (VPL) no se encontraron diferencias entre grupos alimentados AL o R, ni entre la adición o no de ácido maslínico a la dieta.



### 3.1.3. Efecto de la temperatura y supervivencia

Los resultados de temperatura media, coeficiente de crecimiento térmico (CCT) y supervivencia se expresan en la **Tabla 3.4**. La temperatura media estuvo controlada diariamente y fue de  $17,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ . Con los datos de temperatura y de los pesos inicial y final de los animales, se calcularon los coeficientes de crecimiento térmico, apreciándose un aumento significativo del 7% para el grupo AM<sub>100</sub> AL frente a su grupo control; el resto de grupos experimentales estudiados presentaron un coeficiente muy parecido sin diferencias significativas entre ellos. Hay que mencionar que la adición de AM aumentó el % de supervivencia en el grupo AL aunque este aumento no fue significativo. Por otra parte, la restricción de alimento produjo un efecto similar al encontrado en el grupo AM<sub>100</sub> AL.

**Tabla 3.4. Temperatura, coeficiente de crecimiento térmico y supervivencia**

	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)		
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	50 mg/kg (AM <sub>50</sub> )	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
Tª. media	17,12±0,08 <sup>a</sup>	17,46±0,10 <sup>a</sup>	17,56±0,10 <sup>a</sup>	17,52±0,26 <sup>a</sup>	17,18±0,09 <sup>a</sup>
CCT	0,57±0,01 <sup>a</sup>	0,61±0,01 <sup>b</sup>	0,54±0,01 <sup>a</sup>	0,56±0,00 <sup>a</sup>	0,57±0,00 <sup>a</sup>
Supervivencia	86,00±3,75 <sup>a</sup>	91,33±3,95 <sup>a</sup>	91,67±4,31 <sup>a</sup>	93,33±3,74 <sup>a</sup>	92,67±3,66 <sup>a</sup>

Temperatura media ( $^\circ\text{C}$ ), coeficiente de crecimiento térmico (CCT=  $\text{Peso final}^{1/3}(\text{g}) - \text{Peso inicial}^{1/3}(\text{g}) / \Sigma (^\circ\text{C} \times \text{día})$ ) y supervivencia (%) de los diferentes grupos experimentales. Los resultados son media  $\pm$  SEM de dos lotes experimentales. Diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4. Composición corporal

Los resultados de composición corporal para las doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales suplementadas con ácido maslínico se muestran en la **Tabla 3.5**.

**Tabla 3.5. Composición corporal de las doradas alimentadas con ácido maslínico**

	Tiempo ensayo (días)	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)		
		Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	50 mg/kg (AM <sub>50</sub> )	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
Proteína (% ss)	0	57,73±1,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	57,73±1,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	57,73±1,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	57,73±1,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	57,73±1,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	105	55,17±3,20 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	62,71±1,68 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	52,83±0,61 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	58,96±1,37 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	52,81±0,99 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	210	57,26±2,27 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	63,69±0,65 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	55,72±0,53 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	59,60±0,74 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	57,11±0,95 <sup>a</sup> <sub>ac</sub>
Grasa (% ss)	0	30,86±2,32 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	30,86±2,32 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	30,86±2,32 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	30,86±2,32 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	30,86±2,32 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	105	31,82±2,83 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	24,44±0,73 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	33,73±0,92 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	29,73±0,40 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	27,55±0,95 <sup>c</sup> <sub>x</sub>
	210	31,46±1,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	27,28±0,90 <sup>a</sup> <sub>z</sub>	31,15±3,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	28,41±1,15 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	27,71±1,20 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Cenizas (% ss)	0	11,21±0,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,21±0,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,21±0,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,21±0,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,21±0,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	105	12,81±0,15 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,81±1,33 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	12,25±0,19 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	12,62±0,33 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,68±0,41 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	210	12,71±0,19 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,95±0,38 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,74±0,14 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,55±0,42 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,56±0,28 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Humedad (%)	0	68,35±0,81 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	68,35±0,81 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	68,35±0,81 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	68,35±0,81 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	68,35±0,81 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	105	64,67±4,09 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	70,40±2,30 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	64,09±1,61 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	63,47±2,00 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	69,61±2,39 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	210	63,66±0,36 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	64,13±0,23 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	61,66±1,67 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	65,59±0,26 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	64,52±0,06 <sup>a</sup> <sub>y</sub>

Los resultados se expresan en % ss, y son media  $\pm$  SEM de 8 valores. Diferentes superíndices en una misma fila indican diferencias significativas entre dietas y diferentes subíndices en una misma columna indican diferencias significativas a lo largo del tiempo experimental ( $p < 0,05$ ).



A partir de los resultados obtenidos para el porcentaje de proteína corporal (% ss), se puede observar que el grupo AM<sub>100</sub> AL experimenta un incremento significativo de aproximadamente un 10% al final del tiempo de ensayo con respecto al resto de grupos experimentales. El porcentaje en grasa corporal a la mitad del ensayo (105 días) disminuyó significativamente en los grupos alimentados con ácido maslínico mientras que esta disminución no lo fue al final del ensayo. El porcentaje en grasa corporal del grupo Control AL resultó ser 30% superior al grupo AM<sub>100</sub> AL, y el del grupo Control R fue un 13,5 y 22,4% superior a los grupos AM<sub>50</sub> R y AM<sub>100</sub> R, respectivamente.

El porcentaje en cenizas (% ss) no mostró cambios significativos en ningún momento del ensayo, ni a lo largo del tiempo, ni entre los diferentes grupos experimentales. El porcentaje en humedad (% ss) no mostró diferencias entre las doradas alimentadas con las diferentes dosis de ácido maslínico, pero sí mostró diferencias significativas al final del ensayo, mostrando una disminución generalizada en todos los tratamientos en el porcentaje de humedad transcurridos los 210 días del ensayo.



### 3.2. Efecto del ácido maslínico sobre la velocidad y naturaleza del crecimiento y del recambio proteico en hígado y músculo blanco de la dorada

Una de las formas de comprobar los cambios y reconocer la naturaleza del crecimiento celular consiste en estudiar el proceso de recambio proteico, analizando las velocidades de síntesis y degradación de proteínas celulares, junto con el contenido celular de ácidos nucleicos y proteínas.

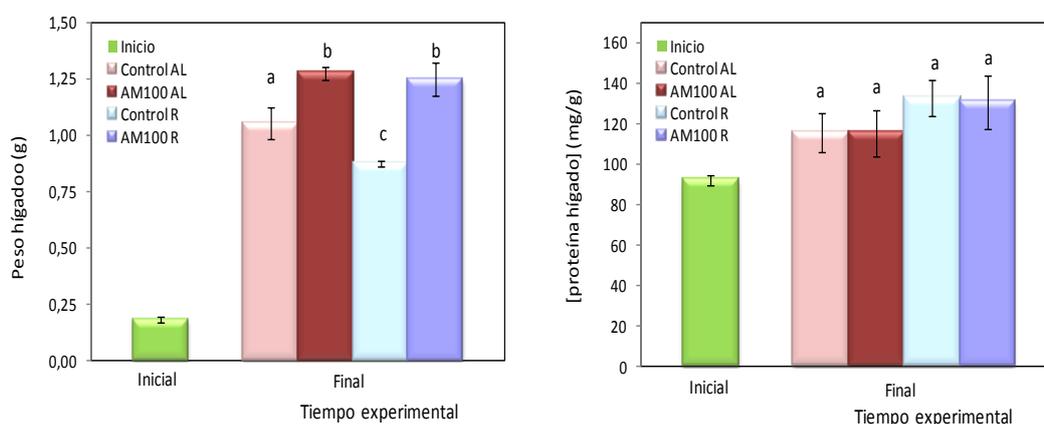
#### 3.2.1. Peso del hígado y concentraciones de proteínas, DNA y RNA de la dorada

En la **Tabla 3.6** y **Figura 3.4** podemos observar la evolución que presentó el peso del hígado de las doradas a lo largo del tiempo experimental, así como las concentraciones tisulares de proteína, DNA y RNA (expresadas en mg/g tejido), todas ellas, moléculas claves para el conocimiento de la naturaleza del crecimiento celular.

**Tabla 3.6.** Efecto del ácido maslínico sobre el peso, la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en el hígado de la dorada

	<i>Ad Libitum</i> (AL)			Restringida (R)	
	Inicio	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>Peso (g)</b>	0,18±0,01	1,05±0,07 <sup>a</sup>	1,27±0,03 <sup>b</sup>	0,87±0,02 <sup>c</sup>	1,25±0,05 <sup>b</sup>
<b>RHS</b>	1,54±0,07	1,66±0,04 <sup>a</sup>	1,74±0,05 <sup>a</sup>	1,53±0,05 <sup>a</sup>	1,94±0,14 <sup>b</sup>
<b>[Proteína]</b>	91,99±2,19	115,14±9,40 <sup>a</sup>	115,4±11,40 <sup>a</sup>	132,7±8,90 <sup>a</sup>	130,60±13,30 <sup>a</sup>
<b>[Proteína total]</b>	16,43±1,71	121,40±9,75 <sup>ab</sup>	147,02±10,06 <sup>a</sup>	115,71±8,19 <sup>b</sup>	163,25±14,46 <sup>ac</sup>
<b>[DNA]</b>	N.D.	2,57±0,09 <sup>a</sup>	3,52±0,08 <sup>b</sup>	2,41±0,12 <sup>a</sup>	3,07±0,16 <sup>b</sup>
<b>[RNA]</b>	N.D.	6,10±0,30 <sup>a</sup>	7,43±0,41 <sup>b</sup>	6,11±0,30 <sup>a</sup>	7,58±0,36 <sup>b</sup>

Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 datos. Tiempo final=210 días. La relación hepatosomática (RHS=peso hígado (g)/peso animal completo (g) x 100); la concentración de proteínas, DNA y RNA en mg/g tejido; y la concentración de proteína total en mg totales. Superíndices diferentes entre filas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). N.D. no determinada.



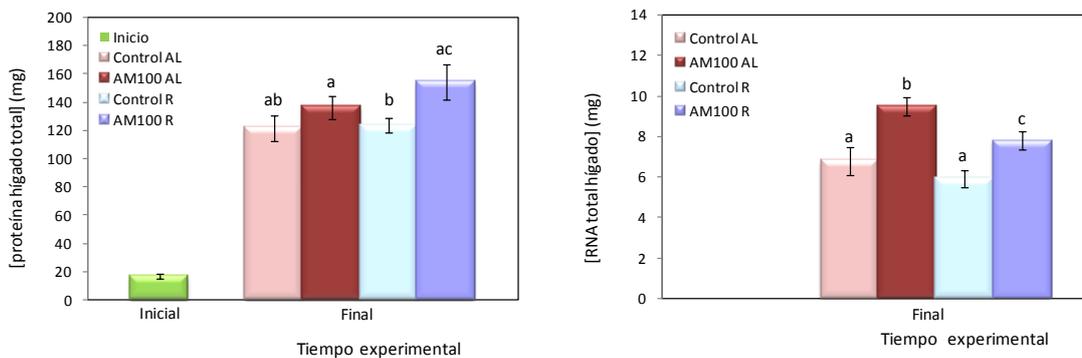
**Figura 3.4.** Efecto de la adición de ácido maslínico a la dieta de dorada sobre el peso del hígado (g) y la concentración de proteínas del hígado (mg proteína/g tejido). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 8 datos. Tiempo final=210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



En relación con el peso del hígado se pudieron observar diferencias significativas en los grupos de doradas alimentadas con las dietas suplementadas con ácido maslínico. El ácido maslínico produjo un aumento del 21,0% en los grupos alimentados *ad libitum*, mientras que este aumento fue del 43,7% en las doradas alimentadas con una dieta restringida, frente a sus controles respectivos. Por otra parte, la restricción supuso para el grupo control R una disminución significativa del 17,2% respecto al control AL. Por lo que respecta a la cantidad tisular de proteínas no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

Otros parámetros tales como los valores de la relación hepatosomática (RHS), que corresponden al porcentaje del peso del hígado con respecto al peso del animal completo; el contenido celular de proteína total (expresado en mg), DNA y RNA expresados, estos últimos, en mg/g hígado fueron determinados. Todos los grupos experimentales, presentaron valores parecidos de RHS, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. La concentración de DNA experimentó un aumento significativo en el hígado de los animales alimentados con ácido maslínico. Los valores del grupo AM<sub>100</sub>AL y AM<sub>100</sub>R fueron 37% y 27% superiores a los de sus respectivos controles. En estos mismos grupos también se incrementó las concentraciones de RNA, las diferencias significativas se alcanzaron para los alimentados *ad libitum* y para los que se les restringió la dieta (R), siendo un 24% y un 21% mayor para sus respectivos controles.

El contenido total de proteínas difirió significativamente en los grupos que se alimentaron con dieta restringida siendo el valor del grupo AM<sub>100</sub> R un 25,1% superior al control R. La representación gráfica de este parámetro se encuentra reflejada en la **Figura 3.5**. En ella, además, se puede observar la concentración de RNA total, expresada en mg, que presentó el hígado al final del tiempo experimental. La adición de ácido maslínico a la dieta produjo un aumento del contenido en RNA total (mg), siendo este aumento de un 46,6% para el grupo AM<sub>100</sub> AL con respecto al control AL, y de un 78,0% para AM<sub>100</sub> R con respecto al control R. Mientras que las doradas alimentadas con ácido maslínico no presentaron diferencias significativas.

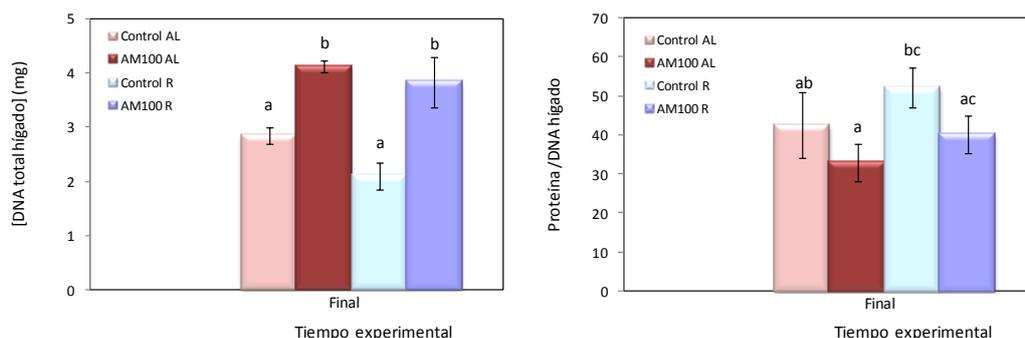


**Figura 3.5.** Influencia del ácido maslínico sobre la concentración de proteínas total (mg) y RNA total (mg) en el hígado de la dorada. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



### 3.2.2. Efecto del ácido maslínico sobre la naturaleza del crecimiento del hígado de la dorada

Los parámetros indicativos de la naturaleza del crecimiento de un tejido lo constituyen, fundamentalmente, el contenido total de DNA, denominado índice de *hiperplasia celular* mediante el cual, el crecimiento se debe a un aumento en el número de células y, por otra parte, la relación proteína/DNA a la que se le denomina índice de *hipertrofia celular*, indicativo de un aumento en el tamaño de las células. Ambos parámetros, se encuentran representados en la **Figura 3.6**.

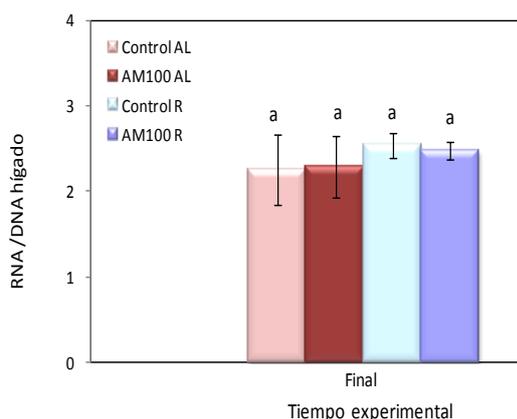


**Figura 3.6.** Efecto del ácido maslínico adicionado a la dieta de juveniles de dorada sobre la concentración de DNA total (mg) y la relación Proteína/DNA en el hígado. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por lo que respecta al contenido de DNA total, observamos un aumento significativo para ambos grupos de animales alimentados con ácido maslínico, este aumento fue del 44,5% y 82,4% para el grupo AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R, respectivamente, y referidos cada uno de ellos a sus grupos control (control AL y control R). Además, la restricción de alimento no supuso variaciones significativas en el contenido de DNA, ni en los animales controles ni en los alimentados con AM, cuando estos se comparan con los valores correspondientes al de los animales alimentados *ad libitum*.

En cuanto a la relación proteína/DNA se puede comprobar que el AM redujo los valores de este cociente, aunque no significativamente, en ambas condiciones de alimentación (AL y R), al mismo tiempo, la restricción calórica provocó un aumento, tanto en los controles como en los grupos AM, aunque tampoco este aumento fue significativo. Por todo ello, al existir un aumento en el contenido de DNA total, y no existir en la relación proteína/DNA, podemos pensar que el crecimiento que se estaba dando en las doradas que se alimentaron con ácido maslínico, era debido fundamentalmente a fenómenos de hiperplasia celular.

Otro de los índices que permiten conocer el estado actual de síntesis proteica lo proporciona la relación RNA/DNA. Los resultados de este índice se muestran en la **Figura 3.7**. Se observó que no hubo influencia directa del ácido maslínico sobre este cociente, ya que no se mostraron diferencias significativas para ninguno de los grupos experimentales.



**Figura 3.7.** Efecto de la adición de ácido maslínico sobre la relación RNA/DNA en el hígado de la dorada. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3. Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico del hígado de la dorada

En la **Tabla 3.7** se representan las velocidades relativas de acumulación ( $K_G$ ), síntesis ( $K_S$ ) y degradación ( $K_D$ ) de proteínas. De manera general, las velocidades de recambio proteico (síntesis y degradación) fueron mayores para aquellos grupos a los que se les adicionaba ácido maslínico a la dieta.

**Tabla 3.7. Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico en el hígado de la dorada**

Hígado	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
$K_G$	1,09 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,11 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,06 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,17 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
$K_S$	14,91 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	26,98 $\pm$ 1,22 <sup>b</sup>	10,67 $\pm$ 1,40 <sup>c</sup>	31,09 $\pm$ 3,66 <sup>b</sup>
$K_D$	13,82 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>	25,87 $\pm$ 2,03 <sup>b</sup>	9,61 $\pm$ 0,76 <sup>c</sup>	29,92 $\pm$ 2,41 <sup>b</sup>
$C_S$	52,90 $\pm$ 4,20 <sup>a</sup>	71,23 $\pm$ 3,72 <sup>b</sup>	43,17 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup>	61,45 $\pm$ 4,96 <sup>b</sup>
$K_{RNA}$	2,82 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	3,79 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	2,47 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	5,06 $\pm$ 0,50 <sup>c</sup>
$K_{DNA}$	6,83 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	9,32 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>	6,26 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	12,51 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>
ERP	7,31 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup>	4,11 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>	9,93 $\pm$ 1,25 <sup>a</sup>	3,76 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>

Los resultados son media  $\pm$  S.E.M de 7 datos. Tiempo = 210 días.  $K_G$  = Velocidad de acumulación (% día<sup>-1</sup>).  $K_S$  = Velocidad fraccionaria de síntesis (% día<sup>-1</sup>).  $K_D$  = Velocidad fraccionaria de degradación (% día<sup>-1</sup>).  $C_s$  = capacidad de síntesis (mg RNA·mg<sup>-1</sup> proteína).  $K_{DNA}$  (g proteína sintetizada·día<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> DNA).  $K_{RNA}$  = eficacia de la síntesis (( $K_S/C_s$ ) x 10). ERP = Eficacia de retención ( $K_G/K_S$ )x100. Los valores con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

La velocidad fraccionaria de acumulación ( $K_G$ , expresada en % x día<sup>-1</sup>) no mostró variaciones entre los diferentes grupos experimentales. La velocidad relativa de síntesis de proteína ( $K_S$ , expresada en % x día<sup>-1</sup>) resultó ser significativamente mayor para los dos grupos alimentados con ácido maslínico. En el caso del grupo AM<sub>100</sub> AL se observó un incremento del 80,9% con respecto al



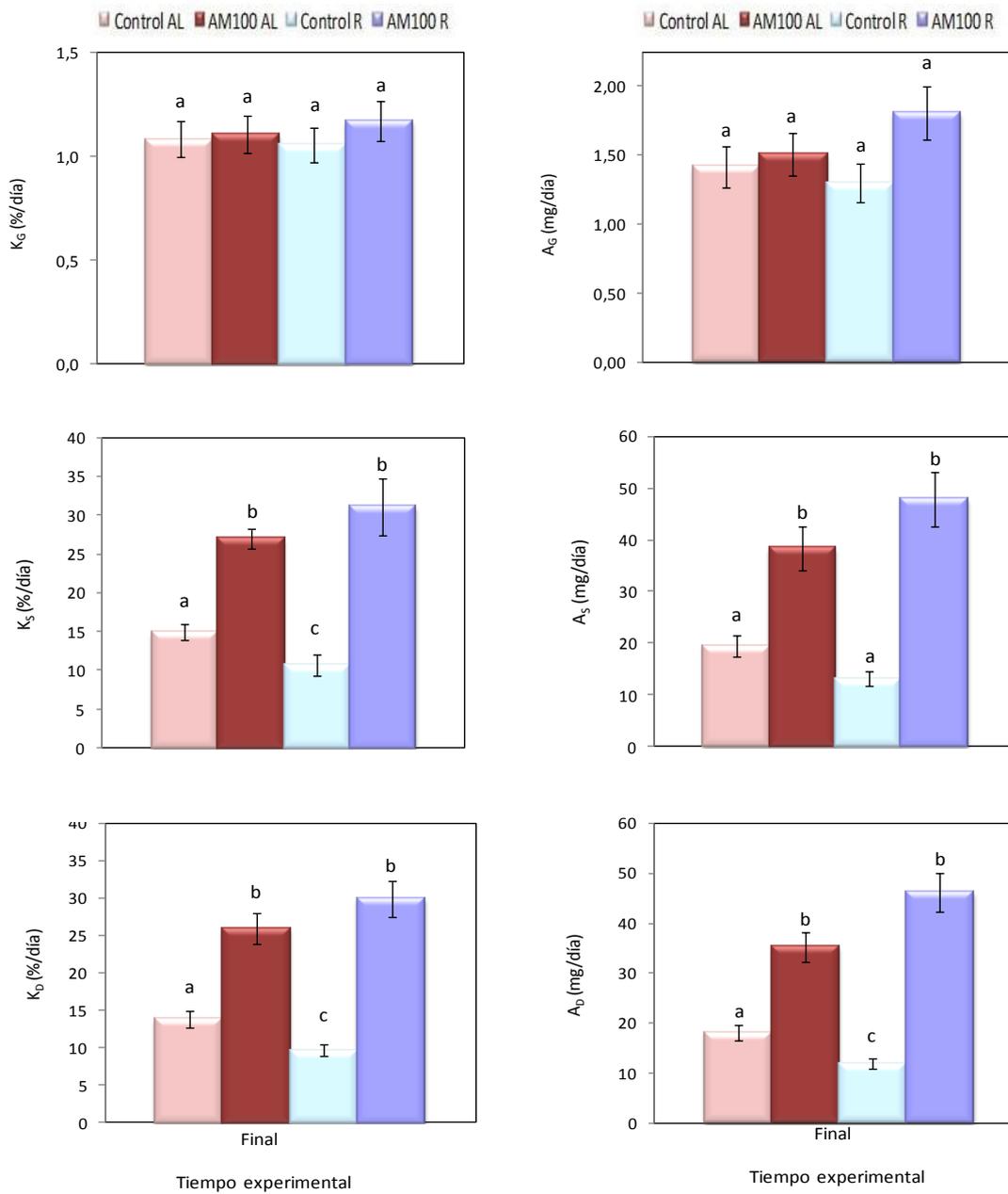
control AL, mientras que en el grupo AM<sub>100</sub> R el aumento fue de un 191,4% comparado con su control, siendo éste el valor más pequeño de todos los grupos. La velocidad fraccionaria de degradación ( $K_D$ , expresada en %  $\times$  día<sup>-1</sup>) del grupo AM<sub>100</sub> AL supuso un incremento del 86,5% con respecto al control AL, y la del grupo AM<sub>100</sub> R, un 211,6% comparado con el control R.

Otros parámetros del recambio de proteínas como capacidad de síntesis proteica ( $C_S$ ), eficacia en la síntesis proteica ( $K_{RNA}$ ), velocidad de síntesis por unidad celular ( $K_{DNA}$ ) y eficacia de retención proteica (ERP) se encuentran detallados en la **Tabla 3.7**. Los valores de  $C_S$  (mg RNA  $\times$  g<sup>-1</sup> proteína) aumentaron significativamente por el ácido maslínico. Este aumento fue de un 34,7% para el grupo AM<sub>100</sub> AL y de un 42,3% para AM<sub>100</sub> R frente a sus respectivos controles.

La eficacia en la síntesis proteica ( $K_{RNA}$ ) entendida como el cociente entre  $K_S$  y  $C_S$ , aumentó en los animales que se alimentaron con ácido maslínico. El valor alcanzado en el grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 34,4% superior al control AL, mientras que el del grupo AM<sub>100</sub> R fue de un 104,9% superior al Control R. Además, el valor de este último grupo fue significativamente mayor que el correspondiente al AM<sub>100</sub> AL en un 33,5%. Por otra parte, los valores de  $K_{DNA}$  (cantidad de proteína sintetizada por día y célula), resultaron ser diferentes significativamente, siendo superiores para los grupos alimentados con ácido maslínico. Los valores correspondientes a AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R fueron mayores en un 36,5% y un 99,8% respecto a sus controles. A su vez, los animales del grupo AM<sub>100</sub> R presentaron un aumento del 34,2% respecto al del grupo AM<sub>100</sub> AL. No se encontraron diferencias entre los grupos controles.

También se observaron diferencias en la eficacia de retención de proteínas, ERP; pero en este caso los grupos controles mostraron una mayor ERP que los grupos alimentados con AM en ambas condiciones alimentarias, obteniéndose un valor para AM<sub>100</sub> AL un 77,9% inferior al Control AL, y para AM<sub>100</sub> R un 164,1% menor que su control. Entre dietas, *ad libitum* y restringidas, tanto en controles como tratados, no se encontraron diferencias estadísticas.

Además de las velocidades fraccionarias, se determinaron las velocidades absolutas de acumulación ( $A_G$ ), de síntesis ( $A_S$ ) y de degradación ( $A_D$ ) de proteínas en el hígado de las doradas. Estos parámetros absolutos, junto a las correspondientes velocidades relativas, se representan en el **Figura 3.8** con el objetivo de obtener una visión global de todas ellas. Los valores absolutos de  $A_G$  (mg proteína acumulada por día), mostraron la misma tendencia que los relativos, no observándose diferencias significativas. El valor de  $A_S$  (mg de proteína sintetizada por día), correspondiente al grupo AM<sub>100</sub> AL aumentó un 97,2% respecto a su control, y el del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 257,6% superior al control R. Los valores de  $A_D$ , (mg de proteína degradada por día), mostraron la misma tendencia que los valores relativos, observándose una mayor velocidad de degradación para los grupos alimentados con AM. La  $A_D$  del grupo AM<sub>100</sub> AL supuso un incremento del 109,7% con respecto al control AL y la del grupo AM<sub>100</sub> R, un 289,1% comparado con el control R. A su vez, se observó que el grupo control AL fue un 29,4% superior al valor del grupo control R.



**Figura 3.8.** Velocidades relativas de síntesis ( $K_s$ ), degradación ( $K_d$ ), y acumulación ( $K_c$ ) y absolutas de síntesis ( $A_s$ ), degradación ( $A_d$ ), y acumulación ( $A_c$ ) de proteínas en el hígado de dorada tras la administración de ácido maslínico a la dieta. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



### 3.2.4. Efecto del ácido maslínico sobre el peso y las concentraciones de proteínas, DNA y RNA del músculo blanco de la dorada

Al igual que hicimos para el caso del hígado, estudiamos los efectos del AM sobre la evolución del peso y los niveles de proteínas, DNA y RNA del músculo blanco de la dorada. Los resultados de peso del músculo blanco (g), la relación miosomática (RMS), la concentración de proteínas (mg/tejido), proteína total (g) y la concentración de ácidos nucleicos, DNA y RNA (mg/g músculo blanco) al inicio y al final del experimento, se detallan en la **Tabla 3.8 y Figura 3.10**.

**Tabla 3.8. Efecto del ácido maslínico sobre el peso, la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en el músculo blanco de la dorada**

	Inicio	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
		Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>Peso (g)</b>	8,19±0,26	39,75±2,81 <sup>a</sup>	50,58±2,02 <sup>b</sup>	36,58±0,83 <sup>a</sup>	42,41±1,68 <sup>c</sup>
<b>RMS (%)</b>	67,58±1,82	63,66±0,90 <sup>a</sup>	65,51±0,72 <sup>a</sup>	66,08±1,12 <sup>a</sup>	66,00±0,36 <sup>a</sup>
<b>[Proteína](mg/g)</b>	86,7±3,9	213,8±11,3 <sup>a</sup>	213,1±8,7 <sup>a</sup>	226,1±10,0 <sup>a</sup>	220,6±22,1 <sup>a</sup>
<b>[Proteína total] (g)</b>	0,72±0,05	8,21±0,52 <sup>a</sup>	10,78±0,44 <sup>b</sup>	8,27±0,22 <sup>a</sup>	9,36±0,65 <sup>ab</sup>
<b>[DNA] (mg/g)</b>	N.D.	0,66±0,04 <sup>a</sup>	0,68±0,06 <sup>a</sup>	0,73±0,05 <sup>a</sup>	0,83±0,02 <sup>b</sup>
<b>[RNA] (mg/g)</b>	N.D.	5,97±1,00 <sup>a</sup>	8,17±1,05 <sup>b</sup>	9,44±0,69 <sup>b</sup>	10,02±0,47 <sup>b</sup>

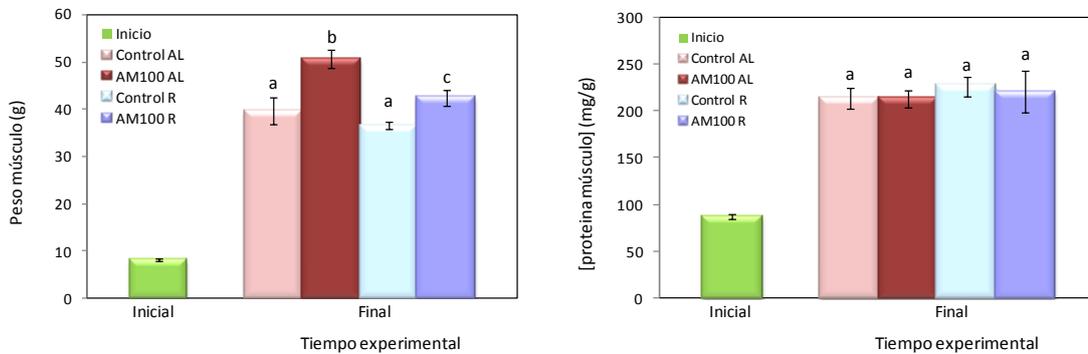
Los resultados son media ±SEM de al menos 6 datos. Tiempo = 210 días. La relación miosomática (RMS = peso músculo (g)/peso animal completo (g)\*100); la concentración de proteínas, DNA y RNA en mg/g tejido y la concentración de proteína total en g. Para cada parámetro, los valores que van seguidos de letras distintas son estadísticamente diferentes (p<0,05).

El peso del músculo blanco (g) mostró diferencias significativas en las doradas alimentadas con ácido maslínico. El peso del músculo blanco en el grupo AM<sub>100</sub> AL resultó un 27,3% superior a su control, mientras que el valor del peso del músculo en el grupo AM<sub>100</sub> R fue de un 15,9% respecto a su control. A su vez el valor del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 16,2% superior al del grupo AM<sub>100</sub> R. Por otro lado, la relación miosomática (RMS) expresada como el % de la relación g músculo blanco/g peso animal completo y la concentración de proteínas (mg/g músculo) no mostraron variaciones significativas entre los diferentes grupos experimentales. Por otro lado, la cantidad de proteína total (mg) fue un 25,8% superior en el grupo AM<sub>100</sub> AL, si lo comparamos con el valor del grupo control AL, estas diferencias no se vieron en los grupos restringidos, aunque el valor del AM<sub>100</sub> R alcanzó al del AM<sub>100</sub> AL.

El mayor aumento en la concentración de DNA (mg/g músculo) se encontró en los animales alimentados con dieta AM<sub>100</sub> R, este valor fue un 13,7% superior a los niveles de DNA del grupo control R; mientras que el resto de tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí. La concentración de RNA (mg/g músculo) fue significativamente mayor para el grupo alimentado con la dieta AM<sub>100</sub> AL, siendo este aumento de un 36,8% con respecto al control AL; esta diferencia también se observó en las doradas alimentadas con la dieta restringida, ya que mostraron el mismo nivel de significación que el del grupo AM<sub>100</sub> AL.

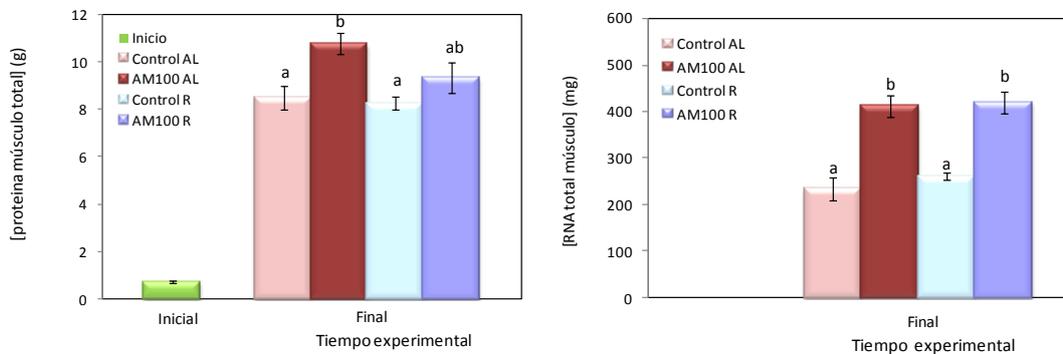


Asimismo, el peso del músculo (g) y la cantidad de proteínas, (mg proteína/g tejido), de las doradas alimentadas con las diferentes dietas puede observarse en la **Figura 3.9** en la que además se representan los valores a tiempo inicial y final (210 días).



**Figura 3.9.** Efecto de la adición de ácido maslínico a la dieta de dorada sobre el peso del músculo blanco (g) y la concentración de proteínas del músculo (mg proteína/g tejido). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la **Figura 3.10** se representan los efectos del AM sobre los contenidos totales de proteína y RNA muscular. Los niveles de totales de proteína mayores significativamente se encontraron en el grupo AM<sub>100</sub> AL. Por el contrario, los niveles de RNA total (mg) a tiempo final, fueron mayores significativamente para los grupos alimentados con ácido maslínico, de tal manera que el del grupo AM<sub>100</sub> AL supuso un 74,0%, y el del AM<sub>100</sub> R un 65,9% con respecto a sus controles.

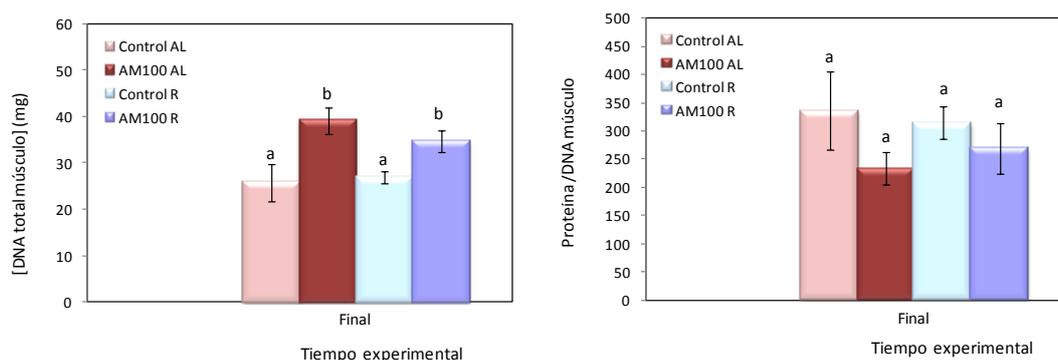


**Figura 3.10.** Influencia del ácido maslínico adicionado a la dieta de dorada sobre la concentración de proteínas total (mg) y RNA total (mg) en el músculo blanco. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



### 3.2.5. Efecto del ácido maslínico sobre la naturaleza del crecimiento del músculo blanco de la dorada

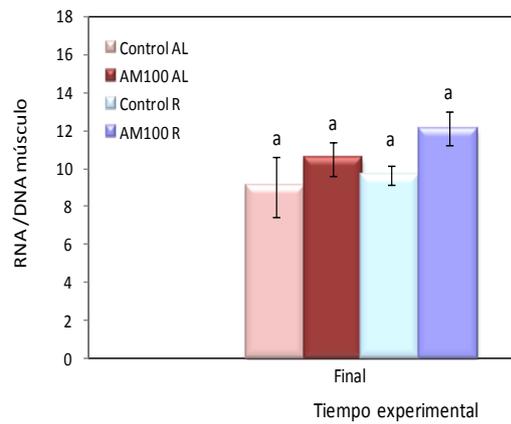
Al igual que se comentó anteriormente, los parámetros de DNA total (mg) y la relación proteína/DNA nos van a indicar, si el crecimiento del músculo blanco que se estaba produciendo en las doradas alimentadas con ácido maslínico se debía a fenómenos de hiperplasia, por un aumento del número de células (contenido total de DNA), o de hipertrofia celular representada por un aumento en el tamaño celular (proteína/DNA) (**Figura 3.11**).



**Figura 3.11.** Efecto del ácido maslínico adicionado a la dieta de juveniles de dorada sobre la concentración de DNA total (mg) y la relación proteína/DNA en el hígado de estos animales. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los resultados demuestran que el contenido total de DNA aumentó significativamente en los peces alimentados con ácido maslínico, tanto para la dieta AM<sub>100</sub> AL, como para la AM<sub>100</sub> R. En el primer caso este aumento supuso un 49,6% respecto a su control, mientras que el DNA total de los peces alimentados con AM<sub>100</sub> R fue de un 32,5% respecto al control R. A su vez, la relación proteína/DNA, no mostró diferencias significativas para ninguno de los grupos estudiados, aunque se pudo observar una disminución importante en aquellos grupos a los que se adicionó AM a la dieta. Estos resultados sugieren que el crecimiento del músculo blanco de las doradas alimentadas con ácido maslínico se debía más a fenómenos de hiperplasia que de hipertrofia, sin embargo, los mayores valores encontrados en la relación proteína/DNA de los animales controles parecen sugerir que su crecimiento se debe, además, a fenómenos de hipertrofia celular.

Los valores correspondientes al efecto del AM sobre la relación RNA/DNA se muestran en la **Figura 3.12**. Los resultados encontrados, no mostraron diferencias significativas para ninguno de los grupos experimentales.



**Figura 3.12.** Efecto del ácido maslínico sobre la relación RNA/DNA en el músculo blanco de dorada. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 8 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.6. Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico en el músculo blanco de la dorada

La **Tabla 3.9** recoge los valores de velocidad fraccionaria de acumulación ( $K_G$ ), síntesis ( $K_S$ ) y degradación ( $K_D$ ) de proteínas en el músculo blanco de la dorada, así como, los de capacidad de síntesis de proteínas ( $C_S$ ), eficacia en la traducción ( $K_{RNA}$ ,  $K_{DNA}$ ) y eficacia en la retención de proteínas (ERP). A su vez, en la **Figura 3.13** se observa el efecto comparativo del ácido maslínico sobre las velocidades fraccionaria y absoluta de síntesis ( $K_S$  y  $A_S$ ), de degradación ( $K_D$  y  $A_D$ ) y de acumulación de proteínas ( $K_G$  y  $A_G$ ) en el músculo de la dorada.

**Tabla 3.9.** Efecto del ácido maslínico sobre el recambio proteico en el músculo de la dorada

Músculo	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
$K_G$	1,19 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,21 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,18 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	1,22 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
$K_S$	1,20 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	1,85 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	1,81 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	1,95 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
$K_D$	0,01 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,64 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,63 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,73 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
$C_S$	27,94 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup>	38,32 $\pm$ 2,62 <sup>b</sup>	30,98 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	45,41 $\pm$ 4,41 <sup>b</sup>
$K_{RNA}$	0,43 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,48 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,58 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
$K_{DNA}$	1,98 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	1,63 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	2,10 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,11 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
ERP	99,44 $\pm$ 6,30 <sup>a</sup>	65,58 $\pm$ 5,91 <sup>b</sup>	65,15 $\pm$ 7,49 <sup>b</sup>	62,72 $\pm$ 6,83 <sup>b</sup>

Los resultados son media  $\pm$  S.E.M de 7 datos. Tiempo=210 días.  $K_G$ =Velocidad de acumulación (% día<sup>-1</sup>).  $K_S$ =Velocidad fraccionaria de síntesis (% día<sup>-1</sup>).  $K_D$  = Velocidad fraccionaria de degradación (% día<sup>-1</sup>).  $C_S$ =capacidad de síntesis (mg RNA·mg<sup>-1</sup> proteína).  $K_{DNA}$  (g proteína sintetizada día<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> DNA).  $K_{RNA}$ =eficacia de la síntesis (( $K_S/C_S$ ) x 10). ERP=Eficacia de retención de proteínas ( $K_G/K_S$ )x100. Los valores que van seguidos de letras distintas son diferentes estadísticamente ( $p < 0,05$ ).



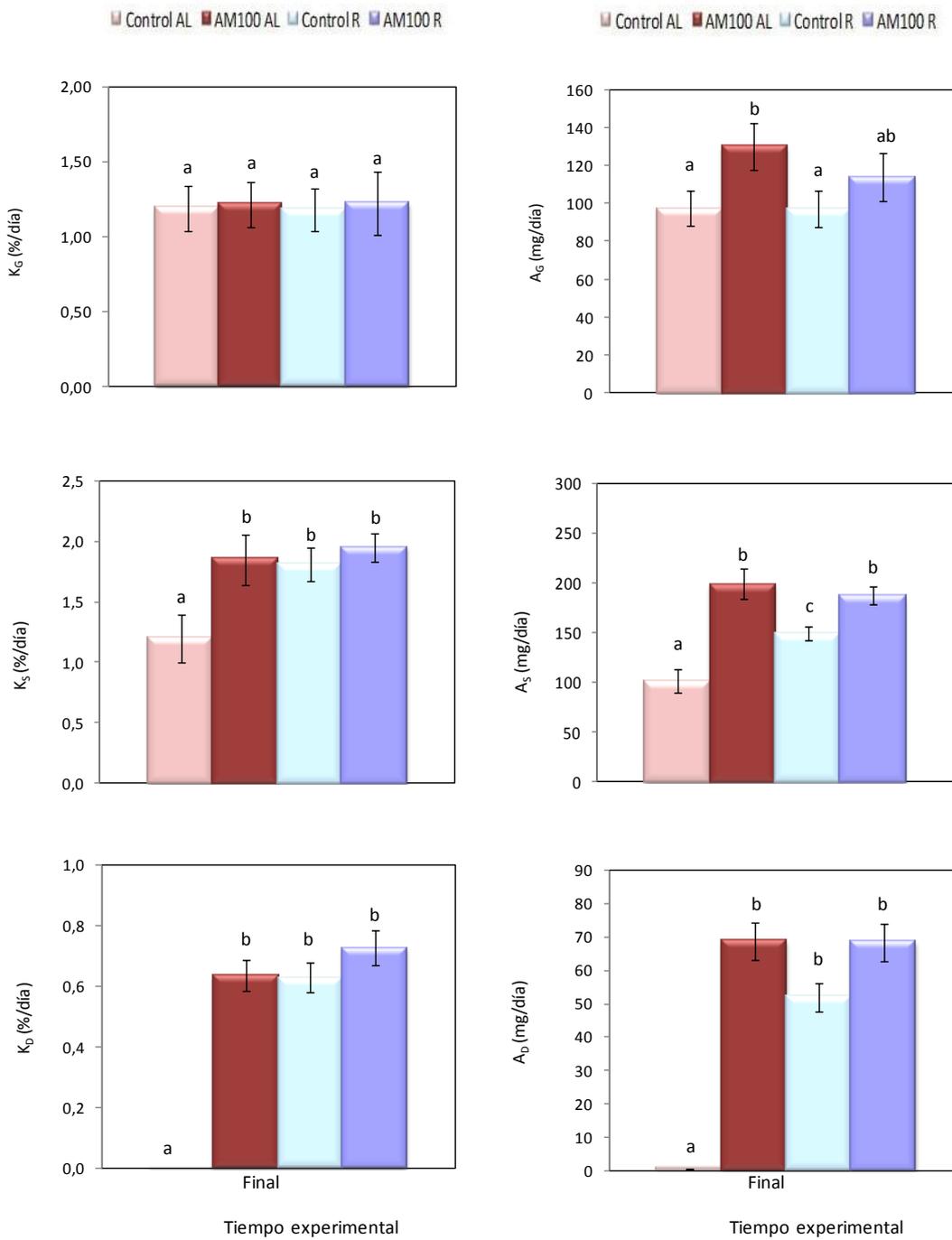
Los valores de velocidad fraccionaria,  $K_G$ , de acumulación de proteínas no presentaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, estas diferencias sí que se alcanzaron en los valores de velocidad absoluta,  $A_G$ . Se observó que el valor del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 33,5% superior al del control AL; estas diferencias no llegaron a ser significativas en los grupos alimentados con dieta restringida, observándose que el valor del grupo AM<sub>100</sub> R alcanzó al del AM<sub>100</sub> AL.

Por lo que respecta a la velocidad fraccionaria,  $K_S$ , y absoluta,  $A_S$ , de síntesis fueron significativamente mayores para los grupos alimentados con ácido maslínico (AL y R). Los valores de  $K_S$  correspondientes a los grupos AM<sub>100</sub> AL, control R y AM<sub>100</sub> R fueron, respectivamente un 54,2%, un 50,8% y un 62,5% superiores al control AL. Al mismo tiempo, los valores de velocidad absoluta de síntesis,  $A_S$ , fueron mayores en un 95,8% en el grupo AM<sub>100</sub> AL respecto al control AL y de un 25,5% en el grupo AM<sub>100</sub> R respecto al alcanzado en el grupo control R. Se observa, a su vez, que el valor del grupo control R fue significativamente mayor al encontrado en el grupo control AL.

Las velocidades fraccionarias y absolutas de degradación de proteínas,  $K_D$  y  $A_D$ , se modificaron significativamente por la presencia de AM. Los valores correspondientes a los grupos AM<sub>100</sub> AL, control R y AM<sub>100</sub> R fueron extraordinariamente superiores al encontrado en el control AL. Este comportamiento nos permite remarcar el efecto de la restricción calórica sobre ambos parámetros. De hecho los valores correspondientes al control R alcanzaron niveles semejantes a los encontrados en los grupos tratados con AM (AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R).

La capacidad de síntesis de proteínas,  $C_S$  en el músculo resultó ser superior significativamente para los grupos a los que se les adicionaba ácido maslínico (AM) a la dieta, así el valor de  $C_S$  del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 37,1% mayor que el del grupo control AL, y el del grupo restringido, AM<sub>100</sub> R, un 46,6% superior respecto al del grupo control R. No existieron, en cambio, diferencias entre los grupos alimentados a saciedad (AL) o sometidos a la restricción del alimento en un 1,5% (R).

Los otros parámetros del recambio proteico, tales como la eficacia de la síntesis de proteínas,  $K_{RNA}$  y  $K_{DNA}$  entendida esta última como la cantidad de proteínas sintetizada por unidad celular, no mostraron valores estadísticamente diferentes entre ninguno de los grupos experimentales y bajo ninguna de las situaciones nutricionales ensayadas. Por otra parte, los valores de la eficacia en la retención de proteínas, ERP, mostraron variaciones significativas dentro de los grupos *ad libitum*, siendo el valor del grupo AM<sub>100</sub> AL un 34,0% menor que el del control AL, sin embargo, cuando se analiza este parámetro en los grupos con alimentación restringida, no se observan diferencias significativas. Los valores encontrados en los grupos restringidos fueron similares al del grupo AM<sub>100</sub> AL y, por tanto, superiores significativamente al del grupo control AL.



**Figura 3.13.** Velocidades relativas de síntesis ( $K_S$ ), degradación ( $K_D$ ), y acumulación ( $K_G$ ) y velocidades absolutas de síntesis ( $A_S$ ), degradación ( $A_D$ ), y acumulación ( $A_G$ ) de proteínas en el músculo blanco de la dorada tras la administración de ácido maslínico a la dieta. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 7 datos. Tiempo final = 210 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



### 3.3. Efecto del ácido maslínico sobre los niveles de diferentes metabolitos y coenzimas redox en el hígado y músculo blanco de la dorada

#### 3.3.1. Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de G6P, 6PG, F6P, lactato, malato y glucógeno

##### 3.3.1.1. Hígado

Con objeto de estudiar la posible influencia del ácido maslínico sobre el estado estacionario de las células hepáticas, nos propusimos determinar los niveles celulares de los principales metabolitos intermediarios del ciclo de las pentosas fosfato, tales como, glucosa 6-fosfato, G6P; 6-fosfogluconato, 6PG, así como los niveles de malato, lactato, fructosa 6 fosfato, F6P y glucógeno en nuestros cuatro grupos experimentales, control *ad libitum* (AL), grupo adicionado con 100 mg ácido maslínico por kg de dieta y AL (AM<sub>100</sub> AL), control restringido (R) y AM<sub>100</sub> R. En la **Tabla 3.10** se muestran las concentraciones de estos metabolitos en cada uno de los tratamientos.

**Tabla 3.10. Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones de G6P, 6PG, F6P, lactato, malato y glucógeno en el hígado**

Hígado	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>G6P</b>	1,14±0,04 <sup>a</sup>	1,28±0,08 <sup>a</sup>	1,00±0,17 <sup>a</sup>	2,32±0,17 <sup>b</sup>
<b>6PG</b>	0,22±0,00 <sup>a</sup>	0,57±0,15 <sup>b</sup>	0,51±0,01 <sup>b</sup>	0,57±0,12 <sup>b</sup>
<b>F6P</b>	1,93±0,09 <sup>a</sup>	1,89±0,11 <sup>a</sup>	1,73±0,07 <sup>a</sup>	2,06±0,20 <sup>a</sup>
<b>Lactato</b>	12,28±1,35 <sup>a</sup>	7,47±1,29 <sup>b</sup>	6,43±0,22 <sup>b</sup>	6,48±1,53 <sup>b</sup>
<b>Malato</b>	3,77±0,49 <sup>a</sup>	3,98±0,40 <sup>a</sup>	2,87±0,20 <sup>a</sup>	4,02±0,82 <sup>a</sup>
<b>Glucógeno</b>	41,13±1,52 <sup>a</sup>	55,01±5,56 <sup>b</sup>	56,75±5,46 <sup>b</sup>	72,85±7,89 <sup>b</sup>

Las concentraciones de G6P, 6PG, F6P, lactato y malato se expresan en nmoles/g tejido y el glucógeno en mg glucosa/g tejido. Los resultados son media ± SEM de 9 valores. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0,05).

Los niveles de los metabolitos G6P, 6PG y F6P se expresaron en nmoles/g hígado. Se puede observar que los valores de G6P y F6P eran superiores a los de 6PG. La concentración de G6P del grupo alimentado con AM<sub>100</sub> R superó en un 132,0% al valor control R; mientras que las de los grupos que se alimentaron *ad libitum*, no presentaron estas diferencias. En el caso del 6PG, las diferencias significativas encontradas sólo se alcanzaron cuando se comparan los valores de AM<sub>100</sub> AL, Control R y AM<sub>100</sub> R con el grupo control AL (159,0%, 131,8% y 159,0%, respectivamente). Los valores de F6P, presentaron un comportamiento cualitativo semejante al de la G6P; así, el grupo alimentado AM<sub>100</sub> R aumentó respecto a su control un 19,1%, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo.

Los niveles de malato y lactato se expresaron en nmoles/g hígado. Una función del lactato en el hígado es producir glucosa mediante gluconeogénesis y, en general, sus niveles aumentan cuando la



demanda energética supera la disponibilidad de oxígeno. El nivel de lactato encontrado en el grupo control AL fue superior al del resto de los grupos, siendo éste alrededor de un 75% superior al encontrado en el resto de los grupos, AM<sub>100</sub> AL, control R y AM<sub>100</sub> R. Por otra parte, las concentraciones de malato, intermediario de las rutas anapleróticas del ciclo de Krebs, resultaron similares para los dos grupos que se alimentaron AL, mientras que para los restringidos existieron diferencias, pues la concentración de malato del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 40,1% superior a su control.

El glucógeno hepático es la principal fuente de glucosa sanguínea, sobre todo entre comidas. Se conoce que el ácido maslínico es un inhibidor de la glucógeno fosforilasa, enzima que participa en la glucogenolisis, catalizando la separación secuencial de restos de glucosa. Para estudiar el posible efecto del ácido maslínico sobre los niveles de glucógeno, bajo nuestras condiciones experimentales, lo determinamos en este tejido expresándolo como mg de glucosa/mg de tejido. Los resultados encontrados muestran que los dos grupos alimentados con ácido maslínico (AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R) presentan una mayor cantidad de glucógeno en relación con sus respectivos controles, siendo este aumento de un 33,8% para AM<sub>100</sub> AL y de un 28,4% para el grupo AM<sub>100</sub> R.

### 3.3.1.2. Músculo blanco

Al igual que para el caso del hígado, se determinaron los niveles de los metabolitos G6P, 6PG, F6P, lactato, malato y glucógeno en el músculo blanco de la dorada. En la **Tabla 3.11** podemos observar los valores de estos metabolitos en cada uno de los grupos experimentales.

**Tabla 3.11. Efecto del ácido maslínico sobre los metabolitos G6P, 6PG, F6P, lactato, malato y glucógeno en el músculo blanco**

Músculo	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>G6P</b>	1,27±0,06 <sup>a</sup>	1,25±0,05 <sup>a</sup>	1,45±0,10 <sup>a</sup>	1,86±0,06 <sup>b</sup>
<b>6PG</b>	1,79±0,09 <sup>a</sup>	2,16±0,11 <sup>b</sup>	2,35±0,11 <sup>b</sup>	3,16±0,15 <sup>c</sup>
<b>F6P</b>	2,61±0,20 <sup>a</sup>	2,09±0,19 <sup>a</sup>	3,02±0,33 <sup>b</sup>	3,89±0,20 <sup>c</sup>
<b>Lactato</b>	35,81±2,00 <sup>a</sup>	25,83±3,80 <sup>b</sup>	28,60±3,39 <sup>ab</sup>	36,43±2,84 <sup>a</sup>
<b>Malato</b>	3,43±0,70 <sup>a</sup>	2,96±0,45 <sup>a</sup>	2,71±0,88 <sup>a</sup>	2,11±0,15 <sup>a</sup>
<b>Glucógeno</b>	8,69±0,68 <sup>a</sup>	10,41±0,44 <sup>b</sup>	6,50±0,56 <sup>a</sup>	7,70±0,77 <sup>a</sup>

Las concentraciones de G6P, 6PG, F6P, lactato y malato se expresan en nmoles/g tejido y el glucógeno en mg glucosa/g tejido. Los resultados son media ± SEM de 9 valores. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0,05).

En el caso de la G6P, los valores encontrados para la situación nutricional AM<sub>100</sub> R fueron significativamente superiores al resto de las situaciones (28,3% respecto al control R, 46,5% frente al control AL y de un 48,8% respecto a AM<sub>100</sub> AL). Es interesante resaltar que el valor del grupo control restringido es un 14,2% mayor que el del grupo control AL aunque en nuestras condiciones no fue estadísticamente significativa. Esto nos hace pensar que el ácido maslínico ejerce alguna influencia sobre este parámetro en condiciones de restricción dietaria.



El contenido de 6PG resultó ser mayor en este tejido, que en el caso del hígado, y además se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales. El ácido maslínico produjo un incremento de 6PG del 20,6% en condiciones AL y del 34,4% en condiciones de restricción. La restricción, a su vez, incremento este valor en un 31,3% cuando se comparan los controles. Mientras que el incremento es de un 46,3% cuando se comparan la situación AM<sub>100</sub> R frente a AM<sub>100</sub> AL.

El ácido maslínico produjo un aumento significativo en los niveles de F6P, únicamente en condiciones de restricción calórica (28,8%). Además se pudo comprobar que la restricción “*per se*” elevó significativamente los niveles de F6P en un 15,7% en los peces del grupo control R frente a los del control AL.

Las cantidades de lactato expresadas en nmoles/g tejido fueron menores en un 27,9% para el grupo alimentado con dieta AM<sub>100</sub> AL frente a su control. Para el resto de los grupos, alimentados *ad libitum*, no se observaron diferencias. Por su parte, El contenido en malato en el músculo no resultó diferente en ninguno de los casos. En relación con el contenido en glucógeno se observa que el AM aumentó significativamente su nivel en un 19,8% en AM<sub>100</sub> AL, mientras que no los modificó en condiciones de restricción alimentaria. Una reducción (26%) de este nivel se observó cuando se comparan los controles y tratados R frente a los mismos AL.

### **3.3.2. Efecto del ácido maslínico sobre los niveles de los coenzimas de óxido-reducción, NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup> y NADPH y de sus respectivas relaciones.**

#### **3.3.2.1. Hígado**

En el metabolismo, el NAD<sup>+</sup> participa en las reacciones redox. En las células vivas, este coenzima se encuentra en dos formas, oxidada, NAD<sup>+</sup> y reducida, NADH. El NAD<sup>+</sup>, agente oxidante, acepta electrones de otras moléculas pasando a su forma reducida, NADH, que a su vez puede ser utilizado como agente reductor para donar electrones. La relación NAD<sup>+</sup>/NADH es un parámetro importante del metabolismo celular indicando el estado redox de la célula, reflejando el conjunto de las actividades metabólicas que caracterizan a un determinado estado estacionario e informando del estado de salud de estas células.

Además, algunas moléculas de NAD<sup>+</sup> se convierten en NADP<sup>+</sup>, cuya química es similar, aunque varía la función en el metabolismo. Éste actuaría como agente reductor en el anabolismo celular, intentando en todo momento que la razón NADP<sup>+</sup>/NADPH se mantenga más bien baja. De ahí, precisamente radica la importancia de medir estos coenzimas y la relación existente entre ellos. La **Tabla 3.12** muestra el efecto del ácido maslínico sobre los niveles intracelulares de los coenzimas oxidados y reducidos, así como las relaciones existentes entre ellos en el hígado de las doradas sometidas a nuestras condiciones experimentales. Los valores se expresan en nmoles/g tejido.



**Tabla 3.12. Efecto del ácido maslínico en el hígado de la dorada sobre los coenzimas de óxido-reducción, y la razón entre ellos**

Músculo	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
NAD <sup>+</sup>	0,39±0,02 <sup>a</sup>	0,79±0,07 <sup>b</sup>	0,30±0,03 <sup>c</sup>	0,44±0,06 <sup>a</sup>
NADH	0,60±0,06 <sup>a</sup>	0,62±0,06 <sup>a</sup>	0,32±0,04 <sup>b</sup>	0,51±0,04 <sup>a</sup>
NAD <sup>+</sup> /NADH	0,64±0,10 <sup>a</sup>	1,26±0,24 <sup>b</sup>	0,93±0,21 <sup>ab</sup>	0,87±0,18 <sup>a</sup>
NADP <sup>+</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>	0,44±0,05 <sup>b</sup>	0,31±0,10 <sup>ac</sup>	0,66±0,17 <sup>bc</sup>
NADPH	0,06±0,01 <sup>a</sup>	0,22±0,05 <sup>b</sup>	0,06±0,01 <sup>a</sup>	0,58±0,03 <sup>c</sup>
NADP <sup>+</sup> /NADPH	2,28±0,53 <sup>a</sup>	2,03±0,68 <sup>a</sup>	5,50±2,22 <sup>a</sup>	1,13±0,36 <sup>a</sup>

Las concentraciones de todos los coenzimas se expresan en nmoles/g tejido. Los resultados son media ± SEM de 9 valores. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0,05).

En general los datos obtenidos fueron relativamente bajos y sobretodo muy variables debido a que se está trabajando con compuestos muy inestables que se convierten unos en otros fácilmente. Los resultados encontrados en hígado, mostraron un aumento de la concentración de NAD<sup>+</sup> para aquellos grupos que se alimentaron con ácido maslínico. Este aumento fue del 102,6% para el grupo AM<sub>100</sub> AL y del 46,7% para el grupo AM<sub>100</sub> R. En la medida de NADH resaltó el grupo control R, que resultó ser un 37,3% menor que el del grupo AM<sub>100</sub> R. Por ello, la relación NAD<sup>+</sup>/NADH aumentó un 96,9% en el grupo AM<sub>100</sub> AL frente a su control, sin variaciones en los grupos R.

El ácido maslínico produjo un aumento de los valores de NADP<sup>+</sup> que osciló entre un 193,3% y 112,9% para AL y R respectivamente. Mientras que este aumento fue mayor para los valores de NADPH, alcanzándose aumentos de un 266,7% y 866,7% en estos mismos grupos. Como consecuencia de este comportamiento las relaciones NADP<sup>+</sup>/NADPH fueron menores aunque no alcanzaron diferencias significativas.

En general, la adición de ácido maslínico a la dieta hizo incrementar la relación NAD<sup>+</sup>/NADH y disminuir la proporción NADP<sup>+</sup>/NADPH, y aunque estas diferencias no fueran significativas, sí que son importantes, ya que en los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R predominan las formas NAD<sup>+</sup> y NADPH de los coenzimas estudiados.

### 3.3.2.2. Músculo blanco

El efecto del ácido maslínico sobre los coenzimas de óxido-reducción y de sus relaciones en el músculo blanco de la dorada se muestran en la **Tabla 3.13**.

El ácido maslínico sólo produjo un aumento significativo en los valores NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> en los animales alimentados *ad libitum*, siendo éste de un 169,2% y un 41,7% respectivamente, sin embargo no modificó los niveles de los coenzimas reducidos. La restricción dietaria y el ácido maslínico no modificaron las concentraciones de ninguno de los coenzimas estudiados.



**Tabla 3.13. Efecto del ácido maslínico en el músculo de la dorada sobre los coenzimas de óxido-reducción, y la razón entre ellos**

Músculo	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>NAD<sup>+</sup></b>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,35±0,02 <sup>b</sup>	0,23±0,04 <sup>c</sup>	0,27±0,04 <sup>bc</sup>
<b>NADH</b>	0,27±0,04 <sup>a</sup>	0,31±0,06 <sup>a</sup>	0,31±0,03 <sup>a</sup>	0,36±0,03 <sup>a</sup>
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH</b>	0,49±0,12 <sup>a</sup>	1,12±0,27 <sup>b</sup>	0,72±0,20 <sup>ab</sup>	0,76±0,17 <sup>ab</sup>
<b>NADP<sup>+</sup></b>	0,12±0,01 <sup>a</sup>	0,17±0,01 <sup>b</sup>	0,10±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,02 <sup>a</sup>
<b>NADPH</b>	0,14±0,02 <sup>ab</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>	0,10±0,01 <sup>b</sup>	0,12±0,01 <sup>ab</sup>
<b>NADP<sup>+</sup>/NADPH</b>	0,92±0,20 <sup>a</sup>	1,09±0,18 <sup>a</sup>	1,07±0,17 <sup>a</sup>	0,93±0,20 <sup>a</sup>

Las concentraciones de todos los coenzimas se expresan en nmoles/g tejido. Los resultados son media ± SEM de 9 valores. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (p<0,05).

La relación NAD<sup>+</sup>/NADH aumentó un 128,6% para el grupo AM<sub>100</sub> AL respecto a su control, mientras que no hubo cambios en la situación de restricción. Respecto a la relación NADP<sup>+</sup>/NADPH ni el ácido maslínico ni la restricción produjeron variaciones significativas.



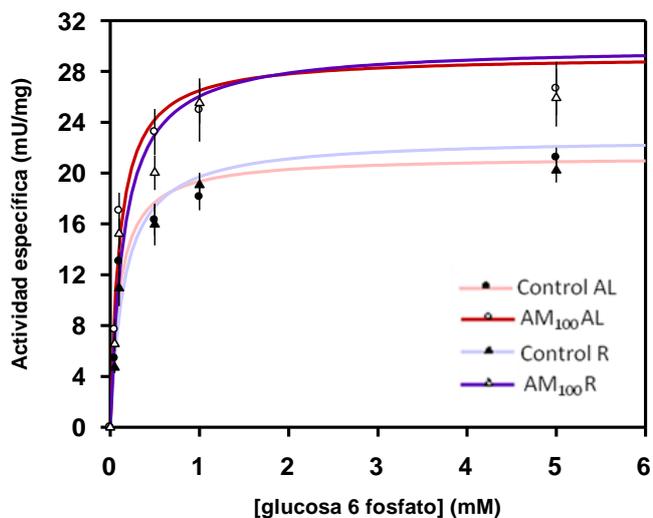
### 3.4. Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético de los sistemas de producción de NADPH y enzimas claves del metabolismo proteico en el hígado y músculo blanco de la dorada

En este apartado, se va a analizar la influencia que ejerce el ácido maslínico sobre el comportamiento cinético de los sistemas de producción de NADPH (G6PDH, 6PGDH, EM e IDH-NADP<sup>+</sup>) y de las principales enzimas implicadas en el metabolismo proteico (Ser-DH, Ala-AT y Tyr-AT) en el hígado y músculo blanco de la dorada. En primer lugar, veremos el comportamiento de todos estos enzimas en el tejido hepático, y posteriormente los analizaremos en el músculo blanco.

#### 3.4.1. Enzimas del hígado de la dorada

##### 3.4.1.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)

En la **Figura 3.14**, se puede observar el comportamiento cinético de la G6PDH hepática en las cuatro situaciones nutricionales estudiadas. Las curvas de saturación presentan un comportamiento hiperbólico típico de una cinética michaeliana, sin evidencia alguna de sigmoidicidad. El ajuste de los valores de concentración de sustrato y actividad específica, a esta curva de saturación se realizó mediante un ajuste no lineal utilizando el GraFit 3.0. Es evidente que el AM incrementa la actividad específica de la G6PDH a lo largo de la curva de saturación.



**Figura 3.14.** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en hígado de dorada. Los valores se presentan como la media ± SEM de al menos 6 valores.

Todos los parámetros cinéticos determinados durante la caracterización de la G6PDH para las cuatro condiciones nutricionales aparecen reflejados en la **Tabla 3.14**.

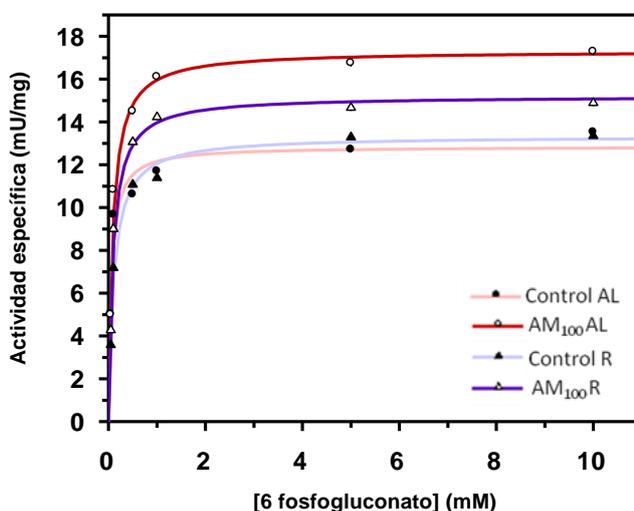


**Tabla 3.14. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la G6PDH del hígado de la dorada**

G6PDH hígado	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	21,33±0,89 <sup>a</sup>	29,25±2,65 <sup>b</sup>	22,80±1,07 <sup>a</sup>	29,98±1,71 <sup>b</sup>
V <sub>max</sub> (mU)	2,46±0,10 <sup>a</sup>	3,38±0,31 <sup>b</sup>	3,03±0,14 <sup>bc</sup>	3,92±0,22 <sup>c</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	0,10±0,01 <sup>a</sup>	0,10±0,00 <sup>a</sup>	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,15±0,01 <sup>b</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	23,97±0,99 <sup>a</sup>	32,54±2,95 <sup>b</sup>	19,04±0,89 <sup>c</sup>	25,84±1,47 <sup>a</sup>
Razón de actividad	0,26±0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,02 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>b</sup>	0,23±0,01 <sup>a</sup>
Actividad total(U)	2,58±0,11 <sup>a</sup>	4,29±0,39 <sup>b</sup>	2,63±0,12 <sup>a</sup>	4,89±0,28 <sup>b</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>0,5</sub>/V<sub>max</sub>), Act. Total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

La administración de ácido maslínico (AM) produjo, en el hígado de la dorada, un aumento significativo de la AE del 37,1% y 31,5% en los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R, respecto a sus controles. Estas diferencias se mantuvieron para la V<sub>max</sub> en los grupos AL, siendo el grupo AM<sub>100</sub> AL un 37,4% superior al control AL. En los grupos R, el valor de V<sub>max</sub> del control fue un 23,2% superior al del control AL. Del mismo modo, la restricción aumentó significativamente la K<sub>m</sub> en un 50,0%-60,0%. La eficiencia catalítica aumentó en los grupos AM, siendo superior en un 35,8% para el grupo AM<sub>100</sub> AL y un 35,7% para AM<sub>100</sub> R. Mientras que la restricción (control y AM) produjo una disminución de la eficiencia catalítica en un 20,6% respecto al control AL y al AM<sub>100</sub> AL. La razón de actividad disminuyó en el control R un 19,2% respecto al control AL. Por otra parte, la actividad total, presentó la misma tendencia que la AE. Así, la del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 66,3% mayor que la del control AL, y la del AM<sub>100</sub> R un 85,9% que la del control R.



**Figura 3.15.** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa en hígado de dorada. Los valores se presentan como la media ± SEM de al menos 6 valores.



En la **Figura 3.15**, observamos el efecto del ácido maslínico sobre las curvas de saturación de la 6PGDH. El comportamiento corresponde claramente con una cinética michaeliana, para las cuatro situaciones experimentales. Al igual que ocurría para la G6PDH, los grupos que se alimentaron con dietas que contenían AM, mostraron una mayor actividad específica.

La 6PGDH es el segundo enzima clave en el ciclo de las pentosas fosfato. Los parámetros cinéticos que obtuvimos en las cuatro dietas experimentales se recogen en la **Tabla 3.15**.

**Tabla 3.15. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la 6PGDH del hígado de la dorada**

6PGDH hígado	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
<b>AE (mU/mg proteína)</b>	12,85±0,73 <sup>a</sup>	17,32±1,18 <sup>b</sup>	13,34±0,84 <sup>a</sup>	16,21±0,86 <sup>b</sup>
<b>V<sub>max</sub> (mU)</b>	1,48±0,81 <sup>a</sup>	2,00±0,82 <sup>b</sup>	1,77±0,72 <sup>a</sup>	1,99±0,72 <sup>a</sup>
<b>K<sub>m</sub> (μM)</b>	57,03±2,06 <sup>a</sup>	84,83±3,15 <sup>b</sup>	107,00±8,20 <sup>c</sup>	89,10±6,10 <sup>d</sup>
<b>Eficiencia catalítica (μU·μM<sup>-1</sup>)</b>	26,00±0,85 <sup>a</sup>	23,56±0,74 <sup>a</sup>	16,55±0,67 <sup>b</sup>	22,29±0,73 <sup>a</sup>
<b>Razón de actividad</b>	0,83±0,03 <sup>a</sup>	0,84±0,03 <sup>a</sup>	0,83±0,03 <sup>a</sup>	0,86±0,03 <sup>a</sup>
<b>Actividad total (U)</b>	1,56±0,22 <sup>a</sup>	2,54±0,33 <sup>b</sup>	1,54±0,22 <sup>a</sup>	2,48±0,33 <sup>b</sup>

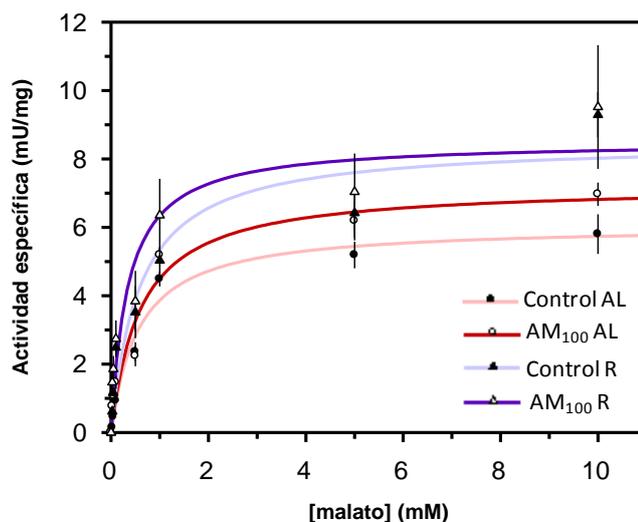
AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>0,5</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

La adición de AM a la dieta, dio lugar a un aumento en la actividad específica, de tal manera que la del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 34,8% superior a la del control AL, y la del AM<sub>100</sub> R un 21,5% mayor que la del control R; a su vez, debemos de destacar que la restricción en el grupo alimentado con AM, no se modificó con respecto al grupo AM<sub>100</sub> AL. La V<sub>max</sub> fue mayor para los grupos alimentados con AM, el AM<sub>100</sub> AL supuso un 35,1% con respecto al control AL y un 12,4% el AM<sub>100</sub> R, comparado con el control R. La restricción produjo un aumento en el grupo control R del 19,6% respecto al control AL. La K<sub>m</sub> resultó ser diferente para todos los tratamientos. La eficiencia catalítica, mostró un comportamiento anómalo, ya que para los animales alimentados con la dieta AM<sub>100</sub> AL no se modificó respecto a su control, y sin embargo, aumentó en el grupo AM<sub>100</sub> R frente a su control.

La razón de actividad no mostró diferencias significativas en ninguna de las dietas utilizadas. El valor de actividad total, llegó a ser diferente para todos los grupos. Éstas, aumentaban en los animales alimentados con AM, de tal manera que la del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 62,8% superior al control AL, y de un 61,0%, mayor para el grupo AM<sub>100</sub> R respecto al control R.

### 3.4.1.2. Enzima málico (EM)

El comportamiento cinético que presenta el enzima málico (EM) del hígado de doradas se muestra en la **Tabla 3.16** y **Figura 3.16**. De modo general, se vio que este enzima presentó un patrón similar al de los enzimas productores de NADPH ya comentados.



**Figura 3.16.** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima málico en hígado de dorada. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 valores.

En cuanto a los diferentes grupos, pudimos observar que sólo la restricción de la dieta provocaba una mayor actividad específica, de tal modo que la del grupo control R fue un 40,8% mayor que la del grupo control AL y la del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 18,3% mayor que la del grupo AM<sub>100</sub> AL.

**Tabla 3.16.** Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos del EM del hígado de la dorada

EM hígado	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	6,06 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	7,22 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	8,53 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	8,54 $\pm$ 0,92 <sup>b</sup>
V <sub>max</sub> (mU)	0,70 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,83 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	1,13 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	1,12 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	0,57 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,61 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,60 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	1,24 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,38 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,88 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	2,48 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>
Razón de actividad	0,15 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,29 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,32 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
Actividad total (U)	0,73 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	1,06 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	0,98 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	1,39 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>0,1</sub>/V<sub>max</sub>), Act, total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

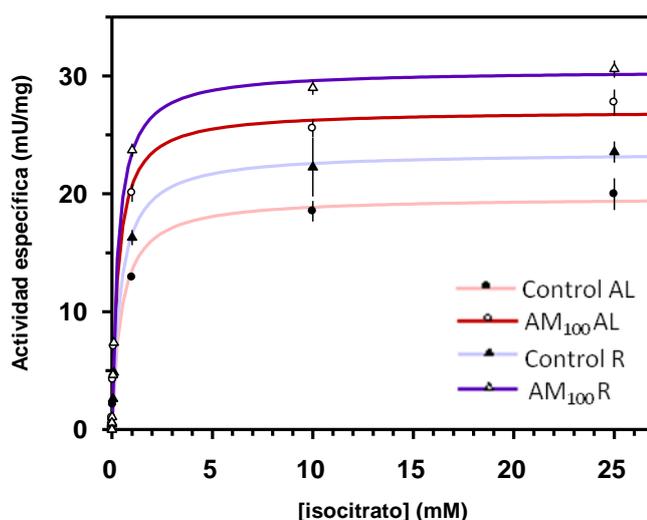
La velocidad máxima (V<sub>max</sub>) también se vio afectada por la restricción (alrededor de un 60%), aunque pudimos observar que la del grupo AM<sub>100</sub> AL se igualó a la de las condiciones restringidas, siendo un 18,6% superior a la del control AL. Los valores de K<sub>m</sub> no presentaron variaciones significativas por el AM y sí por la restricción (entre un 51,6% y un 78,3%). La razón de actividad, en este caso, cociente entre V<sub>0,1</sub>/V<sub>max</sub>, siguió el mismo patrón que la actividad específica, de tal modo que los grupos AL fueron menores que los R, así la del grupo control R fue un 93,3% comparado con la del control AL y la del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 60,0% superior a la del AM<sub>100</sub> AL. Por otro lado, la



actividad total que presentó valores menores fue la del grupo control AL, el resto de los grupos no mostraron variaciones significativas entre sí. Así, la del grupo AM<sub>100</sub> AL superó en un 45,2% al grupo control AL.

### 3.4.1.3. Isocitrato deshidrogenasa dependiente NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>)

El comportamiento cinético de la IDH-NADP<sup>+</sup> del hígado de las doradas sometidas a las cuatro situaciones nutricionales estudiadas, se refleja en la **Figura 3.17**. En ella, se puede comprobar que el ácido maslínico es capaz de incrementar la velocidad de este enzima tanto en condiciones de saciedad como de restricción alimentaria a lo largo de toda la curva de saturación.



**Figura 3.17.**: Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima IDH-NADP<sup>+</sup> en el hígado de dorada. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 valores.

El efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de este enzima se muestra en la **Tabla 3.17**. Se puede comprobar que tanto la restricción alimentaria como la administración de ácido maslínico incrementaron significativamente la actividad específica y  $V_{max}$  de este enzima. En cuanto a la actividad específica, la restricción aumentó un 29,6% el valor del grupo control R respecto al control AL y un 12,3% el valor del grupo AM<sub>100</sub> R frente al del AM<sub>100</sub> AL. Por su parte, el AM aumentó el valor del AM<sub>100</sub> AL en un 37,7% frente a su control y en un 19,9% el valor del AM<sub>100</sub> R frente a su control. Los efectos de la restricción y del AM sobre la  $V_{max}$  fueron cualitativamente semejantes a los encontrados en la actividad específica. Otro efecto interesante encontrado corresponde al comportamiento de la  $K_m$ . La administración de AM y la restricción disminuyen el valor de este parámetro. El ácido maslínico redujo en un 35,6% en los peces alimentados *ad libitum* y un 39,3% en los alimentados con restricción. A su vez, la restricción “*per se*” redujo significativamente la  $K_m$  del grupo control R en un 13,3% frente al control AL.



**Tabla 3.17.** Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la IDH-NADP<sup>+</sup> del hígado de la dorada

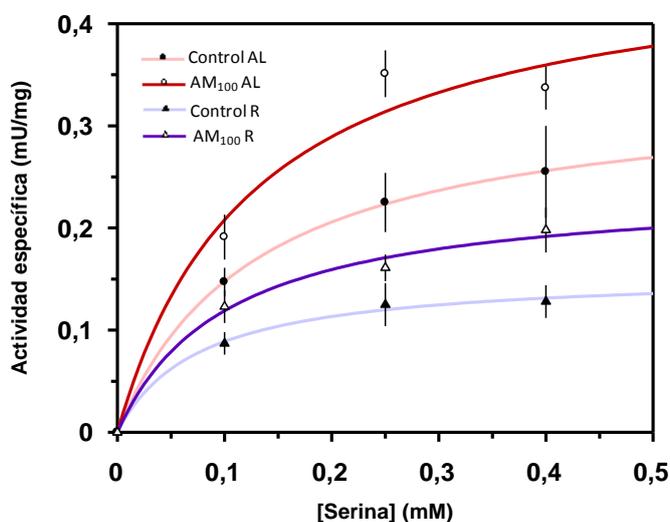
IDH-NADP <sup>+</sup> hígado	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	19,73±1,12 <sup>a</sup>	27,16±1,00 <sup>b</sup>	25,56±1,71 <sup>b</sup>	30,62±0,70 <sup>c</sup>
V <sub>max</sub> (mU)	2,28±0,13 <sup>a</sup>	3,13±0,12 <sup>b</sup>	3,13±0,23 <sup>b</sup>	4,00±0,09 <sup>c</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	0,45±0,01 <sup>a</sup>	0,29±0,02 <sup>b</sup>	0,39±0,04 <sup>c</sup>	0,28±0,01 <sup>b</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	5,04±0,29 <sup>a</sup>	10,82±0,40 <sup>b</sup>	7,94±0,52 <sup>c</sup>	14,11±0,32 <sup>d</sup>
Razón de actividad	0,22±0,03 <sup>a</sup>	0,26±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,02 <sup>a</sup>	0,24±0,01 <sup>a</sup>
Actividad total (U)	2,39±0,14 <sup>a</sup>	3,98±0,15 <sup>b</sup>	2,72±0,20 <sup>a</sup>	5,00±0,11 <sup>b</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>0,1</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

La restricción y la ingesta de AM modificaron los valores de la eficiencia catalítica, aunque el efecto fue mayor al disminuir los valores de Km. La razón de actividad no se modificó en ninguna de las situaciones nutricionales, corroborando que el aumento de actividad está relacionado con un aumento de la cantidad de enzima. La actividad total del enzima se afectó por la adición de AM a la dieta encontrándose aumentos del 66,5% y 83,8% en AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R respecto a sus controles.

#### 3.4.1.4. Serina deshidratasa (Ser-DH)

En la **Figura 3.18** se muestra la influencia de L-Ser sobre la actividad Ser-DH en el hígado de doradas alimentadas con diferentes dietas suplementadas con ácido maslínico.



**Figura 3.18.** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima serina deshidratasa (Ser-DH) en hígado de dorada. Los valores se presentan como la media ± SEM de al menos 6 valores.



En la **Tabla 3.18** se reflejan los parámetros cinéticos de la Ser-DH del hígado de la dorada. La AE y la  $V_{max}$  mostraron una disminución significativa en condiciones de restricción alimentaria. La actividad específica disminuyó un 52,9% respecto al control AL y un 50,0% respecto a  $AM_{100}$  AL. Variaciones parecidas se obtuvieron para la  $V_{max}$ .

**Tabla 3.18. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ser-DH del hígado de la dorada**

Ser-DH hígado	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg ( $AM_{100}$ )	Control	100 mg/kg ( $AM_{100}$ )
AE (mU/mg proteína)	0,34±0,07 <sup>ac</sup>	0,48±0,01 <sup>a</sup>	0,16±0,02 <sup>b</sup>	0,24±0,02 <sup>c</sup>
$V_{max}$ (mU)	0,12±0,02 <sup>a</sup>	0,16±0,00 <sup>a</sup>	0,06±0,00 <sup>b</sup>	0,09±0,00 <sup>b</sup>
$K_m$ (mM)	0,13±0,03 <sup>a</sup>	0,13±0,02 <sup>a</sup>	0,08±0,00 <sup>a</sup>	0,10±0,00 <sup>a</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	0,92±0,21 <sup>ab</sup>	1,26±0,04 <sup>a</sup>	0,82±0,12 <sup>b</sup>	0,91±0,07 <sup>b</sup>
Razón de actividad	0,43±0,14 <sup>a</sup>	0,40±0,06 <sup>a</sup>	0,56±0,15 <sup>a</sup>	0,51±0,11 <sup>a</sup>
Actividad total (U)	41,35±9,49 <sup>a</sup>	69,83±2,07 <sup>b</sup>	18,07±2,62 <sup>c</sup>	39,41±3,17 <sup>a</sup>

AE (Actividad específica),  $V_{max}$  (Velocidad máxima),  $K_m$  (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ), Razón de actividad ( $V_{0,1}/V_{max}$ ), Act. total (mU totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La  $K_m$ , no se modificó, ni el AM ni la restricción calórica afectaron este parámetro. La eficiencia catalítica y la razón de actividad no se modificaron, aunque los valores de eficiencia catalítica, aumentan ligeramente en los grupos AM. La actividad total aumentó significativamente por la adición de AM. Este aumento fue de un 68,9% para el grupo  $AM_{100}$  AL y del 118,1% para  $AM_{100}$  R. Al mismo tiempo, disminuyó significativamente con la restricción dietaria, en un porcentaje que se aproximó al 50% tanto para el control como para el tratado con AM.

#### 3.4.1.5. Alanina aminotransferasa (Ala-AT)

La **Figura 3.19** y **Tabla 3.19** muestran el efecto del AM y de la restricción alimentaria sobre el comportamiento cinético de la alanina aminotransferasa (Ala-AT) del hígado de la dorada. Los valores de actividad específica mostraron un claro aumento por acción del AM. En condiciones *ad libitum*, este aumento fue del 28,9% mientras que para condiciones de restricción fue del 39,2%. Por el contrario, cuando se comparan los efectos del ácido maslínico y restricción, comprobamos que la restricción redujo significativamente el valor de este parámetro en un 21,5% y 15,2% respectivamente para el grupo control y  $AM_{100}$  R. Por su parte, los valores de la  $V_{max}$  siguieron un patrón de comportamiento similar al encontrado en los de la actividad específica.

La constante de Michaelis ( $K_m$ ), por el contrario, no se vio afectada por el ácido maslínico en condiciones de alimentación a saciedad, sin embargo la restricción en peces controles la aumentó significativamente en un 18,3%, mientras que la adición de AM a la dieta restringida hizo posible que este valor volviese a los niveles alcanzados en los controles AL. Al determinar la eficiencia catalítica, vemos una clara influencia en las dietas que contenían ácido maslínico, de tal modo que el valor de



este parámetro aumentó en los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R e un 38,9% y 95,7% con respecto a sus controles.

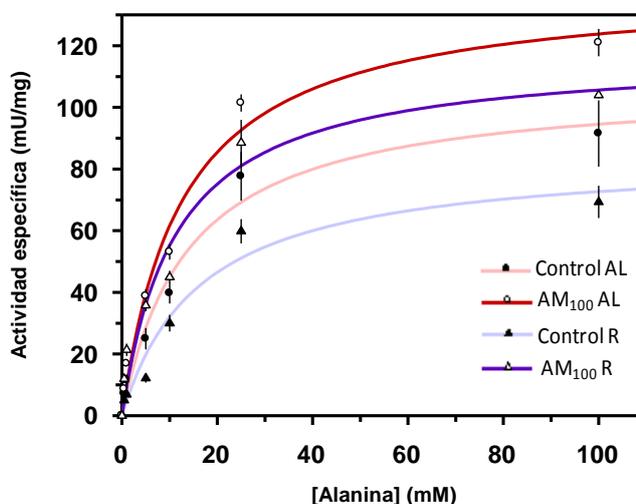


Figura 3.19.: Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima alanina aminotransferasa en hígado de dorada. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 valores.

La actividad total del enzima Ala-AT se determinó teniendo en cuenta el peso total del tejido hepático, y pudimos observar un claro aumento en condiciones de adición de AM. La actividad total para el grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 55,8% mayor respecto al control AL, y la del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 76,3% mayor que la del grupo control R. Asimismo, al ser menor el tamaño del hígado en los peces R, el valor para AM<sub>100</sub> AL fue mayor que la del grupo AM<sub>100</sub> R.

Tabla 3.19. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ala-AT del hígado de la dorada

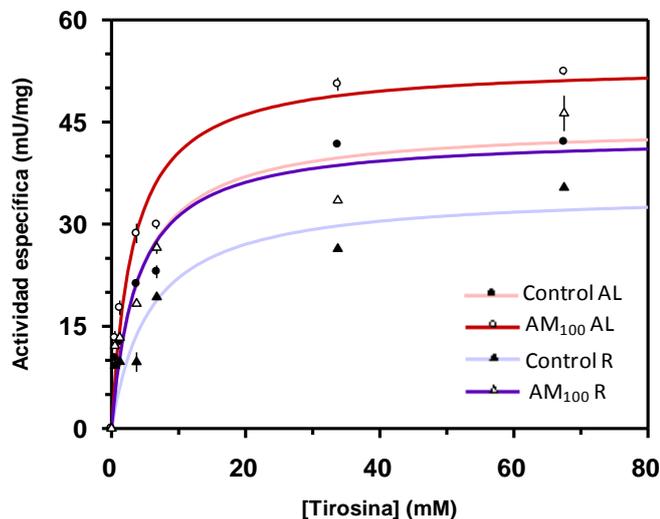
Ala-AT hígado	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	107,7 $\pm$ 10,5 <sup>a</sup>	138,8 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	84,56 $\pm$ 5,93 <sup>a</sup>	117,7 $\pm$ 1,3 <sup>ac</sup>
V <sub>max</sub> (mU)	12,42 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup>	16,01 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	11,22 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	15,37 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	13,85 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	12,63 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	16,38 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	11,37 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	0,90 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,69 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,35 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
Razón de actividad	0,23 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,28 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,14 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,30 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Actividad total (U)	13,05 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	20,34 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	9,76 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	17,21 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>s</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).



### 3.4.1.6. Tirosina aminotransferasa (Tyr-AT)

Los resultados referidos a los efectos del ácido maslínico y restricción alimentaria sobre el comportamiento cinético de la tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) en el hígado de la dorada se muestran en la **Figura 3.20**.



**Figura 3.20.**: Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) en hígado de dorada. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 valores.

El comportamiento cinético de este enzima en hígado de dorada corresponde a un comportamiento michaeliano clásico describiendo una perfecta hipérbola equilátera. Observamos, asimismo, que este comportamiento está más acentuado en el grupo que se alimentó con AM y dieta *ad libitum* (AM<sub>100</sub> AL), seguido del AM<sub>100</sub> R y control AL, grupos para los que no hubo diferencias; por debajo quedó el control R.

**Tabla 3.20.** Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Tyr-AT del hígado de la dorada

Tyr-AT hígado	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	44,44 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	53,40 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	34,80 $\pm$ 0,60 <sup>c</sup>	52,58 $\pm$ 1,45 <sup>d</sup>
V <sub>max</sub> (mU)	7,69 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	9,24 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	6,93 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>	8,34 $\pm$ 0,28 <sup>d</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	4,08 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	3,21 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	5,66 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	3,66 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	1,89 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	2,88 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,22 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	2,28 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>
Razón de actividad	0,29 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,33 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
Actividad total (U)	5,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	7,83 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	4,02 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	6,95 $\pm$ 0,24 <sup>d</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>1,25</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).



En la **Tabla 3.20** se muestran los efectos del AM y de la restricción dietaria sobre los diferentes parámetros cinéticos del enzima. La actividad específica del enzima aumentó por la presencia de AM. Este aumento fue del 20,2% para el grupo AM<sub>100</sub> AL respecto a su control y del 51,1% para el grupo AM<sub>100</sub> R respecto a control R. Sin embargo, el valor del grupo control R fue menor que el del control AL, aunque esta reducción se restituye cuando se adiciona el AM a la dieta restringida. Este comportamiento fue cualitativamente el mismo para los valores de  $V_{max}$ , aunque difieran cuantitativamente sus efectos ya que no superaron en ningún caso el 25%. La constante de Michaelis,  $K_m$ , se vio influenciada por la adición de maslínico, ya que resultó ser significativamente menor para estos grupos (el valor de la  $K_m$  del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 21,3% menor que la del control AL y la del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 35,3% menor que la del control R), no existiendo diferencias cuando se comparan entre sí los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R. La eficiencia catalítica aumentó significativamente cuando se administra AM, mientras que este parámetro cinético se redujo significativamente por la restricción calórica. Sin embargo, la razón de actividad no mostró diferencias significativas en ninguna de las situaciones nutricionales estudiadas.

Como era de esperar al aumentar el tamaño del hígado de las doradas por la presencia del AM, los valores de actividad total aumentaron significativamente bajo esta condición, siendo de un 45,5% para AM<sub>100</sub> AL y de un 72,9% para AM<sub>100</sub> R. Sin embargo, el menor tamaño del órgano en las doradas sometidas a restricción alimentaria provocó una disminución significativa de la actividad total en esta condición nutricional.

### 3.4.2. Enzimas del músculo blanco de la dorada

Los enzimas que se estudiaron en hígado, fueron los que también se analizaron en el músculo blanco de la dorada, para ver el efecto que presentaban tanto el ácido maslínico como la restricción alimentaria sobre su comportamiento cinético, máxime teniendo en cuenta que es en este tejido donde ocurre la mayor cantidad de procesos celulares relacionados con el crecimiento del animal.

En líneas generales, podemos destacar que la actividad que presentaron tanto los enzimas productores de NADPH como los relacionados con el metabolismo de proteínas, fueron algo más bajas que las encontradas en hígado. Sin embargo, cuando medimos parámetros en los que tenemos en cuenta, las actividades totales y cantidad de DNA (unidad celular), estas diferencias ya no se aprecian, pues el tamaño del tejido muscular es mucho mayor que el del hígado, permitiendo, por tanto, que se pronuncien de forma significativa estos parámetros.

#### 3.4.2.1. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH)

El ajuste no lineal de los valores de actividad específica obtenidos a diferentes concentraciones de glucosa 6-fosfato (descritas en el apartado de material y métodos), se realizaron con el programa GraFit y se detallan en la **Figura 3.21** En ella, observamos que los grupos que presentaron una mayor



actividad fueron los que se alimentaron con ácido maslínico tanto en condiciones *ad libitum* como de restricción alimentaria.

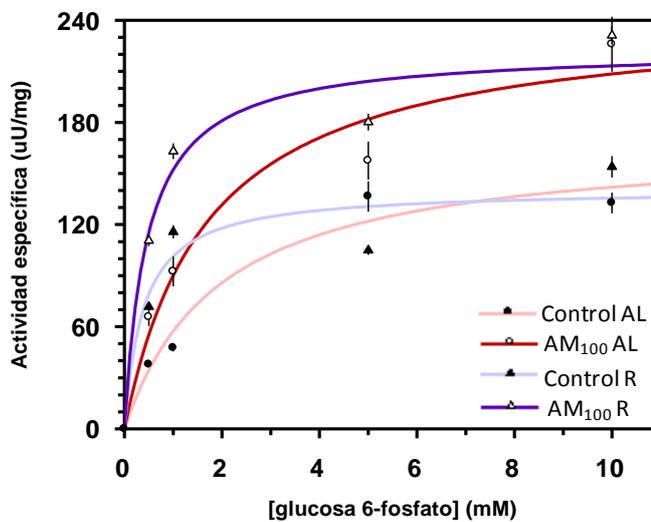


Figura 3.21. Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en músculo blanco de dorada. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 valores.

En la **Tabla 3.21** se reflejan los efectos de la adición de ácido maslínico y de la restricción dietaria sobre los diferentes parámetros cinéticos de la G6PDH de músculo blanco de la dorada. Se puede observar que la adición de ácido maslínico (AM) a la dieta de dorada produjo en este enzima del músculo blanco un aumento significativo en la actividad específica y  $V_{max}$ .

Tabla 3.21. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la G6PDH del músculo de la dorada

G6PDH músculo	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
AE ( $\mu$ U/mg proteína)	169,9 $\pm$ 9,1 <sup>a</sup>	244,2 $\pm$ 15,2 <sup>b</sup>	140,8 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	223,2 $\pm$ 5,5 <sup>b</sup>
$V_{max}$ ( $\mu$ U)	72,7 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	104,1 $\pm$ 6,5 <sup>b</sup>	63,7 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	98,5 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>
$K_m$ (mM)	1,96 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,71 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,39 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,47 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Eficiencia catalítica ( $nU \cdot \mu M^{-1}$ )	37,06 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	60,72 $\pm$ 3,80 <sup>b</sup>	164,0 $\pm$ 6,0 <sup>c</sup>	211,3 $\pm$ 5, <sup>d</sup>
Razón de actividad	0,22 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	0,51 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,50 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
Actividad total (U)	1,44 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	2,63 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	1,16 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	2,09 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>

AE (Actividad específica),  $V_{max}$  (Velocidad máxima),  $K_m$  (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ), Razón de actividad ( $V_{0,5}/V_{max}$ ), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

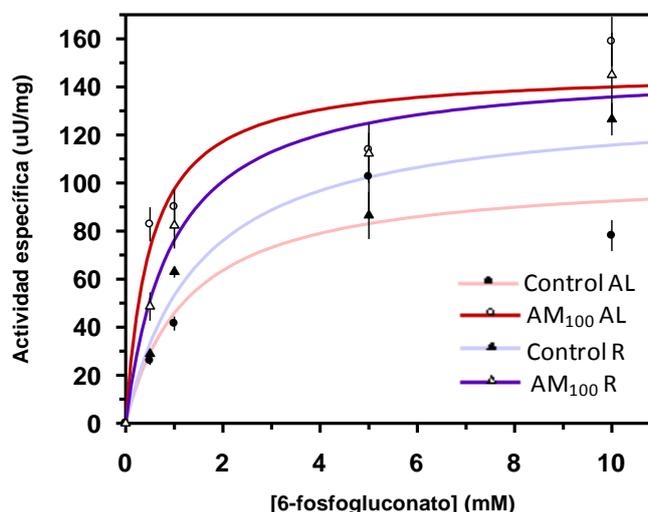
La actividad específica fue un 43,7% y un 58,5% superior en los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R comparados con los grupos control AL y control R, respectivamente, sin que la restricción alimentaria



modificara este parámetro. En estos mismos grupos, la  $V_{max}$  fue un 43,2% y un 54,6% superior a la de los controles. Por su parte, el ácido maslínico no afectó en condiciones AL, a la  $K_m$ , mientras que la restricción de alimento redujo su valor en un 80,1%. La eficiencia catalítica reflejó un aumento significativo en los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R, destacando un aumento de más del 400% en los grupos a los que se les restringió la alimentación. La razón de actividad aumentó aproximadamente en un 100% en los grupos restringidos respecto a la encontrada en los grupos *ad libitum*.

Por otro lado, la actividad total fue significativamente mayor en AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R, en relación con sus controles. Se observó un claro efecto del ácido maslínico sobre este parámetro, pues en AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R fueron un 82,6% y un 80,2% superiores a los controles AL y R, respectivamente. Además la restricción disminuyó significativamente este valor, siendo un 45,2% y 80,2% menor en el control R y AM<sub>100</sub> R respecto a los grupos AL.

Los resultados obtenidos para la 6-fosfogluconato deshidrogenasa se recogen en la **Figura 3.22**. Una vez más, se obtiene una curva de Michaelis típica en los cuatro grupos de estudio. Al igual que ocurría con la G6PDH, la actividad de la 6PGDH se incrementó por el ácido maslínico.



**Figura 3.22.** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en músculo blanco de dorada. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 valores.

En la **Tabla 3.22** se muestran los parámetros cinéticos de este enzima. La actividad específica aumentó significativamente en los grupos alimentados con dieta restringida, aunque cabe destacar que el grupo AM<sub>100</sub> AL igualó a los grupos R y supuso un 40% por encima de su control AL.

El ácido maslínico produjo un aumento del 40,3% en la  $V_{max}$  del grupo AM<sub>100</sub> AL, sin que afectara al grupo AM<sub>100</sub> R que presentaban niveles semejantes a los del grupo AM<sub>100</sub> AL. Los valores de  $K_m$  obtenidos para AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R fueron menores en un 41,4% y 37,1% respectivamente. La eficiencia catalítica y la razón de actividad mostraron un comportamiento similar a los encontrados



para la actividad específica, aumentado ambos parámetros por la presencia de AM. Por lo que respecta a la actividad total, el AM aumentó significativamente el valor de este parámetro (en AM<sub>100</sub> AL el aumento fue del 78,6%, y en AM<sub>100</sub> R del 26,4%), sin que se afectara por la restricción calórica.

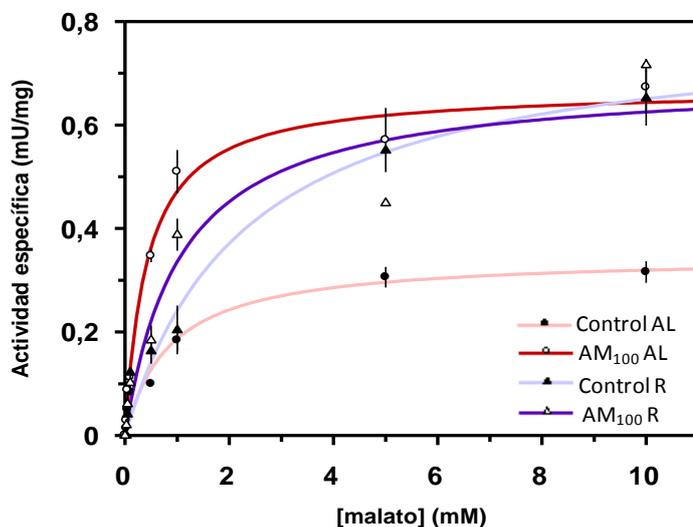
**Tabla 3.22. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la 6PGDH del músculo de la dorada**

6PGDH músculo	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )
AE (μU/mg proteína)	104,5±12,6 <sup>a</sup>	147,1±8,7 <sup>b</sup>	133,2±10,3 <sup>b</sup>	148,2±17,5 <sup>b</sup>
V <sub>max</sub> (μU)	44,7±5,4 <sup>a</sup>	62,7±3,7 <sup>b</sup>	60,3±4,7 <sup>b</sup>	65,7±7,7 <sup>b</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	1,28±0,06 <sup>a</sup>	0,51±0,03 <sup>b</sup>	1,51±0,04 <sup>c</sup>	0,95±0,01 <sup>d</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,12±0,01 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup>	0,07±0,01 <sup>b</sup>
Razón de actividad	0,93±0,11 <sup>a</sup>	1,44±0,08 <sup>b</sup>	1,05±0,08 <sup>a</sup>	1,25±0,15 <sup>ab</sup>
Actividad total (U)	0,89±0,11 <sup>a</sup>	1,59±0,09 <sup>b</sup>	1,10±0,09 <sup>a</sup>	1,39±0,16 <sup>b</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>0,5</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

### 3.4.2.2. Enzima málico (EM)

La **Figura 3.23** muestra el efecto del ácido maslínico y la restricción dietaria y su combinación sobre el comportamiento cinético del enzima málico del músculo blanco de la dorada. La representación de la actividad específica describe un comportamiento típicamente michaeliano. De los resultados obtenidos se deduce que el ácido maslínico modula la actividad de este enzima, en el músculo blanco, de los peces que se alimentaron con este triterpeno.



**Figura 3.23.:** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima málico (EM) en músculo blanco de dorada. Los valores se presentan como la media ± SEM de al menos 6 valores.



La **Tabla 3.23** muestra el efecto del ácido maslínico y de la restricción calórica sobre los parámetros cinéticos del enzima málico del músculo blanco de la dorada.

**Tabla 3.23. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos del EM del músculo de la dorada**

EM músculo	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	0,35±0,03 <sup>a</sup>	0,67±0,06 <sup>b</sup>	0,70±0,02 <sup>b</sup>	0,69±0,02 <sup>b</sup>
V <sub>max</sub> (mU)	0,15±0,01 <sup>a</sup>	0,29±0,03 <sup>b</sup>	0,33±0,01 <sup>b</sup>	0,31±0,01 <sup>b</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	0,87±0,02 <sup>a</sup>	0,42±0,04 <sup>b</sup>	2,30±0,34 <sup>c</sup>	1,08±0,29 <sup>d</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	0,17±0,02 <sup>a</sup>	0,68±0,12 <sup>b</sup>	0,15±0,03 <sup>a</sup>	0,30±0,03 <sup>b</sup>
Razón de actividad	0,67±0,08 <sup>a</sup>	1,22±0,12 <sup>b</sup>	0,45±0,05 <sup>a</sup>	0,62±0,07 <sup>a</sup>
Actividad total(U)	2,96±0,23 <sup>a</sup>	7,22±0,68 <sup>b</sup>	6,63±0,13 <sup>b</sup>	6,48±0,17 <sup>b</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>0,5</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

La actividad específica del enzima se afectó por el ácido maslínico, siendo un 91,4% superior al control AL, mientras que la restricción calórica “*per se*” produjo un aumento similar. La V<sub>max</sub> presentó el mismo comportamiento frente al AM y la restricción alimentaria. De acuerdo con ello, se puede observar que el máximo valor se obtuvo en los grupos AM<sub>100</sub> AL, control R y AM<sub>100</sub> R. Caso especial tiene lugar con los valores de K<sub>m</sub> ya que el ácido maslínico redujo su valor en ambas situaciones nutricionales (AL y R) en un 51,7% y un 53,1% respectivamente, aunque en este caso, la restricción dietaria aumentó su valor en ambos grupos en más del 160% de su valor.

La eficiencia catalítica y razón de actividad presentaron efectos similares, encontrándose diferencias sólo en los grupos con AM, sin verse afectados por la restricción calórica. Los incrementos de la eficiencia catalítica fueron del 300,0% y 86,7% para AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R respectivamente. En el caso de la razón de actividad estos aumentos fueron del 122,7% y 50,1%. La actividad total del enzima no mostró diferencias para los grupos restringidos, que, a su vez, resultaron ser similares al grupo AM<sub>100</sub> AL, el cual sí difirió (+143,9%) respecto a su control.

#### 3.4.2.3. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>)

Los efectos del ácido maslínico y de la restricción calórica sobre el comportamiento cinético de la IDH-NADP<sup>+</sup> de músculo de la dorada se representa en la **Figura 3.24**. Las curvas de saturación de este enzima, bajo las cuatro situaciones nutricionales estudiadas, siguieron un típico comportamiento michaeliano sin que se evidencien en ningún caso signos de sigmoidicidad, apreciándose un claro efecto positivo del ácido maslínico sobre la actividad específica del enzima a cada una de las concentraciones de isocitrato, tanto en condiciones de saciedad como de restricción alimentaria.

La **Tabla 3.24** muestra los parámetros cinéticos de la IDH-NADP<sup>+</sup> del músculo de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico en condiciones de saciedad y de



restricción alimentaria del 1,5%. Ambas situaciones alimentarias modificaron, aunque de diferente forma, los distintos parámetros cinéticos determinados.

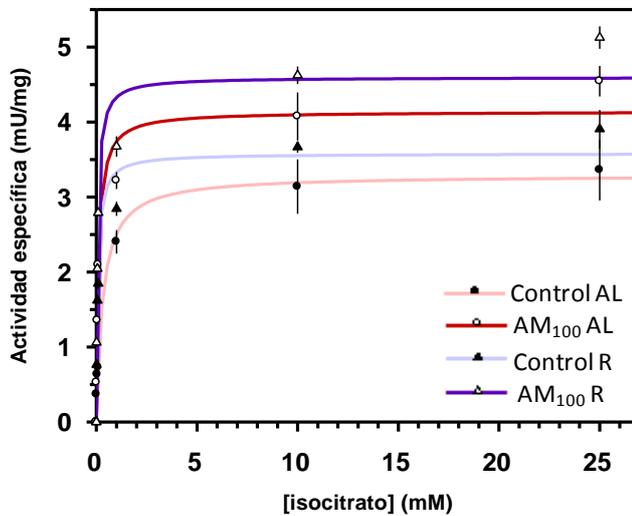


Figura 3.24. Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima IDH-NADP<sup>+</sup> en músculo blanco de dorada. Los valores se presentan como la media ± SEM de al menos 6 valores.

Los dos parámetros cinéticos directamente relacionados con la velocidad de la reacción, la actividad específica y la  $V_{max}$ , se vieron afectadas significativamente por el ácido maslínico. Ambos aumentaron en los grupos alimentados con AM. La actividad específica del grupo AM<sub>100</sub> AL lo hizo en un 26,7% y la del grupo AM<sub>100</sub> R en un 28,5% respecto a la de sus controles. La restricción, por su parte, incrementó ligeramente los valores de este parámetro cinético. Por su parte, la  $V_{max}$  de los dos grupos de estudio alimentados con ácido maslínico, AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R, aumentó en un 28,6% y un 24,4% frente a la de sus respectivos grupos control, AL y R.

Tabla 3.24. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la IDH-NADP<sup>+</sup> del músculo de la dorada

IDH-NADP <sup>+</sup> músculo	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	3,30±0,33 <sup>a</sup>	4,18±0,23 <sup>b</sup>	3,61±0,15 <sup>a</sup>	4,64±0,14 <sup>b</sup>
$V_{max}$ (mU)	0,35±0,02 <sup>a</sup>	0,45±0,02 <sup>b</sup>	0,41±0,02 <sup>a</sup>	0,51±0,02 <sup>b</sup>
$K_m$ (mM)	0,30±0,04 <sup>a</sup>	0,11±0,00 <sup>b</sup>	0,08±0,00 <sup>c</sup>	0,06±0,00 <sup>d</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	1,18±0,28 <sup>a</sup>	4,28±0,40 <sup>b</sup>	5,41±0,38 <sup>b</sup>	8,20±0,33 <sup>c</sup>
Razón de actividad	0,22±0,05 <sup>a</sup>	0,50±0,05 <sup>b</sup>	0,51±0,04 <sup>b</sup>	0,60±0,03 <sup>b</sup>
Actividad total (U)	28,07±3,23 <sup>a</sup>	45,02±2,56 <sup>b</sup>	29,88±1,26 <sup>a</sup>	43,44±1,31 <sup>b</sup>

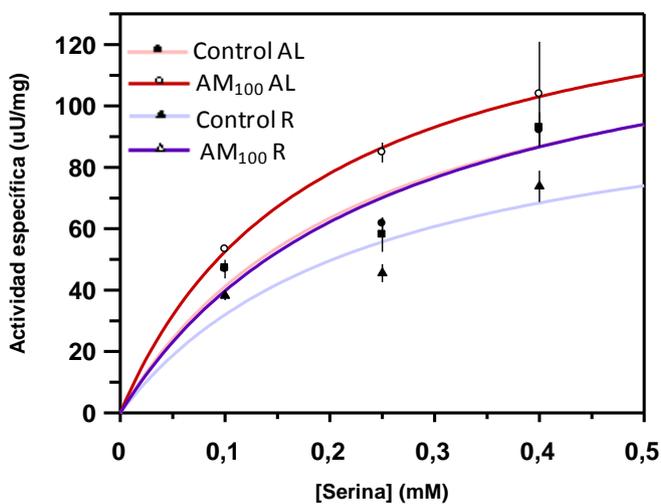
AE (Actividad específica),  $V_{max}$  (Velocidad máxima),  $K_m$  (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ), Razón de actividad ( $V_{0,1}/V_{max}$ ), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



La  $K_m$ , indicadora del grado de afinidad del enzima por el sustrato, se vio modificada tanto por el ácido maslínico como por la restricción con el objetivo de obtener el máximo grado de optimización cinética. El ácido maslínico redujo significativamente este parámetro en un 63,3% en el grupo AM<sub>100</sub> AL y en sólo un 25,0% en el grupo AM<sub>100</sub> R. Este menor decremento alcanzado en las condiciones de restricción se debe a que en esta situación se redujo significativamente este valor en un 73,3% respecto al control de la situación *ad libitum*. Los otros dos importantes parámetros cinéticos, eficiencia catalítica y razón de actividad, se vieron afectados por ambas condiciones ensayadas, ácido maslínico y restricción calórica. Ambas incrementaron significativamente sus valores. La eficiencia catalítica aumentó un 262,7% en condiciones de saciedad y un 51,6% en condiciones de restricción, a pesar de que esta situación de restricción ya aumentó un 358,5% su valor cuando se comparan los grupos controles, R frente a AL. La razón de actividad siguió un comportamiento paralelo al observado para la eficiencia catalítica aunque los incrementos fueron menores. En condiciones de saciedad, el ácido maslínico aumentó su valor en un 56,0% y un 17,7% bajo restricción calórica, mientras que esta última situación provocó un aumento del 263,6% en la situación control. La actividad total solamente se vio afectada por el ácido maslínico en ambas situaciones (AL y R), oscilando los incrementos alcanzados entre un 60,4% para AL y un 45,4% para R.

#### 3.4.2.4. Serina deshidratasa (Ser-DH)

En la **Figura 3.25** y **Tabla 3.25** se representan las curvas de saturación y los diferentes parámetros cinéticos de la Ser-DH del músculo blanco de la dorada sometidas a las cuatro situaciones nutricionales ensayadas. Al igual que en los otros casos analizados, las curvas de saturación de este enzima mostraron un comportamiento michaeliano típico, viéndose la actividad incrementada por el ácido maslínico.



**Figura 3.25.** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima Ser-DH en músculo blanco de dorada. Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de al menos 6 valores.



**Tabla 3.25. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ser-DH del músculo de la dorada**

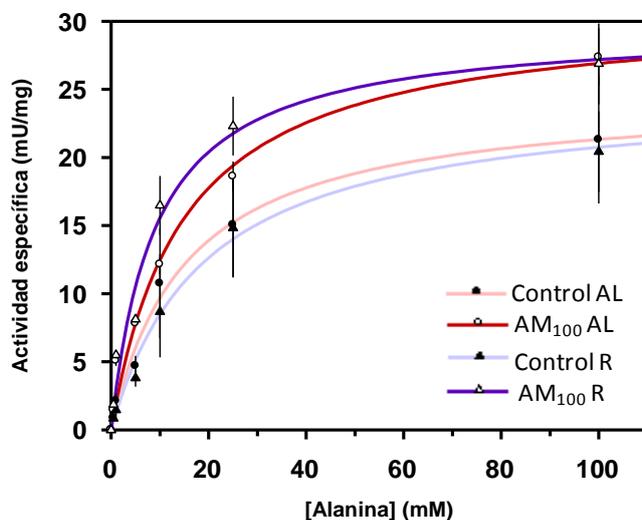
Ser-DH músculo	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )
AE (μU/mg proteína)	138,0±7,3 <sup>a</sup>	159,5±50,6 <sup>a</sup>	110,1±13,2 <sup>a</sup>	143,1±19,1 <sup>a</sup>
V <sub>max</sub> (μU)	88,5±4,7 <sup>a</sup>	101,9±32,4 <sup>a</sup>	74,7±9,0 <sup>a</sup>	94,7±12,7 <sup>a</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	0,23±0,00 <sup>a</sup>	0,21±0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,03 <sup>a</sup>	0,26±0,04 <sup>a</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,49±0,41 <sup>a</sup>	0,31±0,08 <sup>a</sup>	0,37±0,11 <sup>a</sup>
Razón de actividad	0,34±0,04 <sup>a</sup>	0,33±0,11 <sup>a</sup>	0,35±0,06 <sup>a</sup>	0,33±0,04 <sup>a</sup>
Actividad total(U)	1,17±0,06 <sup>a</sup>	1,72±0,55 <sup>a</sup>	0,91±0,11 <sup>a</sup>	1,34±0,18 <sup>a</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>0,1</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

El análisis, de todos los parámetros cinéticos determinados, tales como actividad específica, V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub>, eficiencia catalítica y razón de actividad, permite concluir que, en este tejido, ninguna de las situaciones estudiadas, presencia de ácido maslínico y restricción calórica, modificó significativamente el comportamiento cinético de este enzima.

### 3.4.2.5. Alanina aminotransferasa (Ala-AT)

La **Figura 3.26** representa los efectos del ácido maslínico y la restricción dietaria sobre el comportamiento cinético de la Ala-AT del músculo blanco de la dorada. La actividad enzimática de los grupos alimentados con las dietas AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R fue mayor que la de los controles AL y R, respectivamente aunque estas variaciones no fueron diferentes significativamente.



**Figura 3.26.:** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima Ala-AT en músculo blanco de dorada. Los valores se presentan como la media ± SEM de al menos 6 valores.



La **Tabla 3.26** muestra, por su parte, los efectos del AM y de la restricción sobre los parámetros cinéticos de la Ala-AT. Aunque el AM aumentó en un 25,1% y un 18,8% la actividad específica en condiciones AL y R respectivamente, estos no fueron significativos. El mismo comportamiento lo siguió la  $V_{max}$ .

**Tabla 3.26.** Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Ala-AT del músculo de la dorada

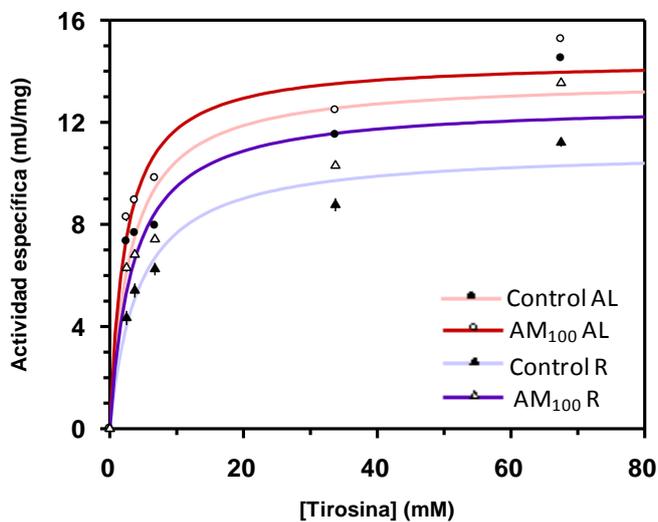
Ala-AT músculo	<i>Ad Libitum</i> (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	24,69±2,84 <sup>a</sup>	30,89±2,67 <sup>a</sup>	24,97±2,51 <sup>a</sup>	29,66±3,44 <sup>a</sup>
$V_{max}$ (mU)	10,56±1,22 <sup>a</sup>	13,16±1,14 <sup>a</sup>	11,29±1,13 <sup>a</sup>	13,08±1,52 <sup>a</sup>
$K_m$ (mM)	16,06±1,66 <sup>a</sup>	14,74±0,97 <sup>a</sup>	20,76±3,09 <sup>a</sup>	19,03±1,44 <sup>a</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	0,66±0,14 <sup>a</sup>	0,89±0,14 <sup>a</sup>	0,54±0,16 <sup>a</sup>	0,73±0,24 <sup>a</sup>
Razón de actividad	0,19±0,05 <sup>a</sup>	0,25±0,03 <sup>a</sup>	0,15±0,04 <sup>a</sup>	0,27±0,04 <sup>a</sup>
Actividad total (U)	209,2±24,1 <sup>a</sup>	332,9±28,7 <sup>b</sup>	206,5±20,8 <sup>a</sup>	277,5±32,1 <sup>a</sup>

AE (Actividad específica),  $V_{max}$  (Velocidad máxima),  $K_m$  (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ), Razón de actividad ( $V_s/V_{max}$ ), Act. total (U totales). Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El resto de los parámetros cinéticos,  $K_m$ , eficiencia catalítica y razón de actividad no se vieron afectados. Solamente se observó un incremento significativo del 59,1% y un 34,4% en la actividad total del enzima en los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R frente a sus respectivos controles.

#### 3.4.2.6. Tirosina aminotransferasa (Tyr-AT)

En la **Figura 3.27** se reflejan las curvas de saturación de la Tyr-AT del músculo de la dorada sometida a las diferentes situaciones nutricionales.



**Figura 3.27.** Efecto del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético del enzima málico (EM) en el músculo blanco de dorada. Los valores se presentan como la media ± SEM de al menos 6 valores.



Todas las curvas de saturación siguieron un típico y normalizado comportamiento michaeliano, sin evidentes signos de sigmoidicidad. Se comprueba, así mismo, un incremento generalizado de la actividad específica del enzima en presencia de ácido maslínico tanto en condiciones de alimentación a saciedad como en restricción alimentaria.

Los efectos del ácido maslínico y de la restricción de la ingesta de alimento sobre los diferentes parámetros cinéticos de la Tyr-AT del músculo blanco de la dorada se muestran en la **Tabla 3.27**.

**Tabla 3.27. Efecto del ácido maslínico sobre los parámetros cinéticos de la Tyr-AT del músculo de la dorada**

Tyr-AT músculo	Ad Libitum (AL)		Restringida (R)	
	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )	Control	100 mg/Kg (AM <sub>100</sub> )
AE (mU/mg proteína)	13,70±0,05 <sup>a</sup>	14,44±0,07 <sup>b</sup>	10,96±0,13 <sup>c</sup>	12,74±0,05 <sup>d</sup>
V <sub>max</sub> (mU)	4,39±0,01 <sup>a</sup>	4,62±0,02 <sup>b</sup>	3,72±0,04 <sup>a</sup>	4,22±0,01 <sup>d</sup>
K <sub>m</sub> (mM)	3,07±0,06 <sup>a</sup>	2,41±0,13 <sup>b</sup>	4,31±0,21 <sup>c</sup>	3,43±0,12 <sup>d</sup>
Eficiencia catalítica (mU·mM <sup>-1</sup> )	1,43±0,02 <sup>a</sup>	1,92±0,06 <sup>b</sup>	0,86±0,06 <sup>c</sup>	1,23±0,04 <sup>d</sup>
Razón de actividad	0,54±0,01 <sup>a</sup>	0,57±0,01 <sup>a</sup>	0,40±0,03 <sup>b</sup>	0,49±0,01 <sup>c</sup>
Actividad total (U)	116,4±0,4 <sup>a</sup>	155,6±0,7 <sup>b</sup>	90,6±1,1 <sup>c</sup>	119,2±0,4 <sup>a</sup>

AE (Actividad específica), V<sub>max</sub> (Velocidad máxima), K<sub>m</sub> (Constante de Michaelis), Eficiencia catalítica (V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>), Razón de actividad (V<sub>2,5</sub>/V<sub>max</sub>), Act. total (U totales), Los parámetros cinéticos se calculan a partir del ajuste no lineal utilizando el programa de análisis de datos GraFit. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 6 valores. Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

En relación con actividad específica de la tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) del músculo de la dorada, se puede observar que la administración de ácido maslínico durante 210 días produjo un incremento significativo de un 5,4% y 16,2% para los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R, respecto a sus controles. Este parámetro, sin embargo, disminuyó significativamente por la restricción calórica un 20,0% para el control y un 11,8% el grupo AM<sub>100</sub> R. Un comportamiento prácticamente semejante ocurrió para la V<sub>max</sub>. El ácido maslínico aumentó significativamente la velocidad máxima tanto en la alimentación *ad libitum* como restringida. Además este parámetro disminuyó en un 15,3% en los controles sometidos a alimentación restringida.

La K<sub>m</sub>, presentó variaciones entre los diferentes grupos experimentales. La velocidad semi-máxima se alcanzaba a menores concentraciones de sustrato en los grupos que ingerían dieta suplementada con ácido maslínico, indicando una reducción significativa del valor de la K<sub>m</sub> por este triterpeno pentacíclico. Esta disminución fue del 21,5% en el grupo *ad libitum* y del 20,4% en el grupo restringido; por el contrario, la restricción “*per se*” provocó un aumento significativo del 40,4% de este valor en el grupo control R comparado con el del control AL y un aumento del 42,3% en la K<sub>m</sub> del grupo AM<sub>100</sub> R respecto a la del grupo AM<sub>100</sub> AL.

Lo mismo que ocurrió con la actividad específica, tuvo lugar con la eficiencia catalítica; el AM influenció positivamente, produciendo un aumento significativo del valor de este parámetro tanto en la situación AL como en la R. Este aumento fue del 34,3% y 43,0% en la eficiencia catalítica de los



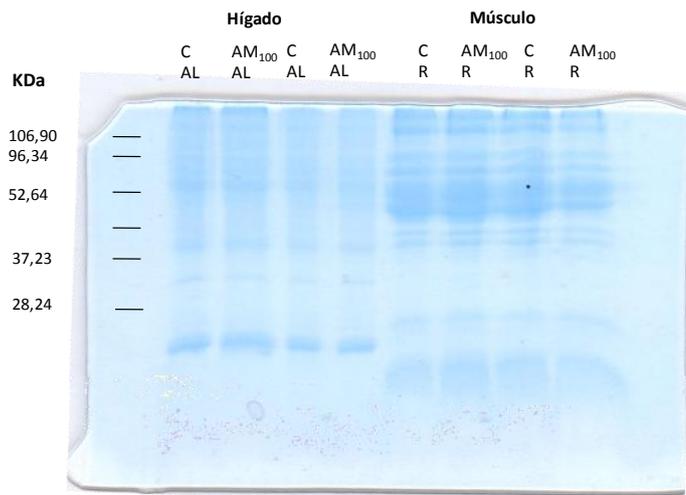
grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R comparadas con sus respectivos controles. Sin embargo, la restricción disminuyó la eficiencia catalítica del grupo control R en un 39,9% y la del grupo AM<sub>100</sub> R en un 35,9%. La razón de actividad presentó diferencias sólo en los grupos restringidos, siendo un 22,5% mayor en el AM<sub>100</sub> R, que en el control R. En este sentido, sólo podemos afirmar que el AM influya sobre la razón de actividad en condiciones de restricción dietaria. Por otro lado, el valor de actividad total de la Tyr-AT más elevado se alcanzó también en los grupos alimentados con ácido maslínico, siendo el aumento en el grupo AM<sub>100</sub> AL de un 33,7% superior al del control AL y en el AM<sub>100</sub> R de un 31,6% comparado con el control R.



### 3.5. Efecto del ácido maslínico sobre los niveles de expresión proteica de los diferentes enzimas estudiados por la técnica "Western blot"

Los ensayos de "Western blot" se llevaron a cabo en los enzimas productores de NADPH, tales como G6PDH, EM, ICD-NADP<sup>+</sup>, y además, en enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, Ser-DH y Ala-AT. Todos ellos se analizaron tanto en hígado, como en el músculo blanco de las doradas controles y alimentadas con ácido maslínico *ad libitum* y con restricción dietaria. El procedimiento que se empleó para detectar la banda inmunorreactiva de cada proteína en cuestión, es el que se describe en el apartado de material y métodos.

En la **Figura 3.28** podemos observar el patrón de expresión de proteínas en el hígado y en el músculo blanco de la dorada alimentada con las distintas dietas experimentales enriquecidas con ácido maslínico. La figura corresponde con una tinción de azul Comassie de un gel al 15% de poliacrilamida, en el que se cargó una cantidad de proteína correspondiente a 100 µg, en todos los casos. Las diferentes situaciones ensayadas, corresponden con las que hemos venido utilizando en toda la tesis. Siendo el grupo C AL, el Control alimentado *ad libitum*; AM<sub>100</sub> AL, al grupo adicionado con 100 mg de ácido maslínico por kg de dieta y alimentado *ad libitum*, y los mismos tratamientos para la situación restringida (R). La tinción, además de representarnos el patrón específico de proteínas de cada tejido, nos informa que la electroforesis se ha desarrollado adecuadamente.

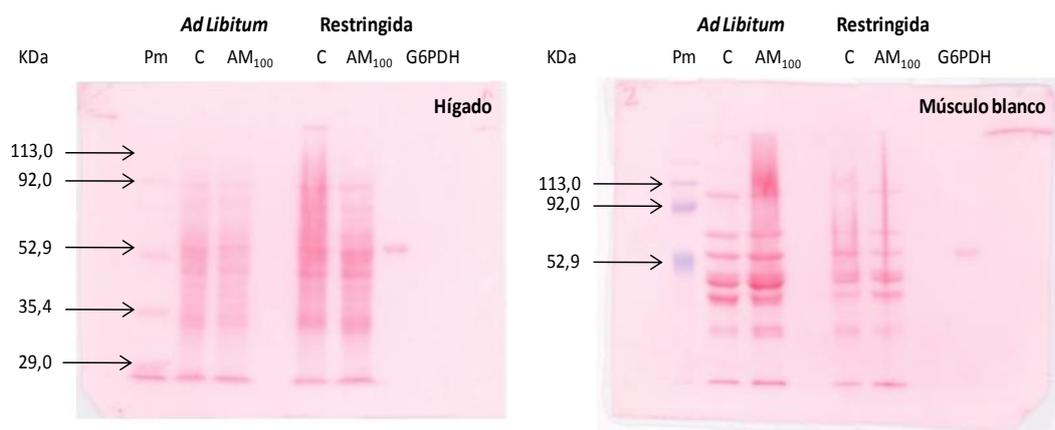


**Figura 3.28.** Detalle de un gel al 15% de acrilamida teñido con azul Comassie en donde se aprecia el patrón proteico en hígado (izquierda) y músculo blanco (derecha) de todos los grupos experimentales. En todos los casos la carga de proteína fue de 100 µg.

El paso siguiente en el desarrollo del proceso de un "Western blot", consiste en la transferencia de las proteínas a una membrana que, en nuestro caso, fue de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Posteriormente, la tinción con rojo Ponceau de las mismas, nos revela las proteínas que se han transferido desde el gel a la propia membrana. En la **Figura 3.29** se puede observar dos membranas



teñidas, una correspondiente a hígado (izquierda), y otra a músculo (derecha). Por regla general, en todos los casos, la distribución de las calles fue la que se aprecia en la figura; a la izquierda de cada membrana, un marcador de pesos moleculares, seguido de los extractos *ad libitum* (Control AL y AM<sub>100</sub> AL), una calle vacía entre AL y R (para evitar solapamientos), seguido de dos extractos en condiciones de restricción (Control R y AM<sub>100</sub> R); y finalmente, una muestra de la proteína pura (utilizada como control positivo). Concretamente estas membranas corresponden a una electroforesis en un gel al 10% de acrilamida, y posteriormente, incubadas con el anticuerpo anti-G6PDH, para determinar los niveles de expresión de este enzima, tanto en hígado, como músculo blanco en cada situación experimental.



**Figura 3.29.** Tinción con rojo Ponceau de las membranas de hígado y músculo blanco de doradas, correspondientes a las diferentes condiciones experimentales ensayadas, con las que se incubó el anticuerpo anti-G6PDH. Se aprecia el patrón de bandas de proteínas correspondientes a una carga de 50  $\mu$ g y la distribución por calles de los diferentes extractos utilizados.

### 3.5.1. Niveles de expresión proteica en hígado de dorada

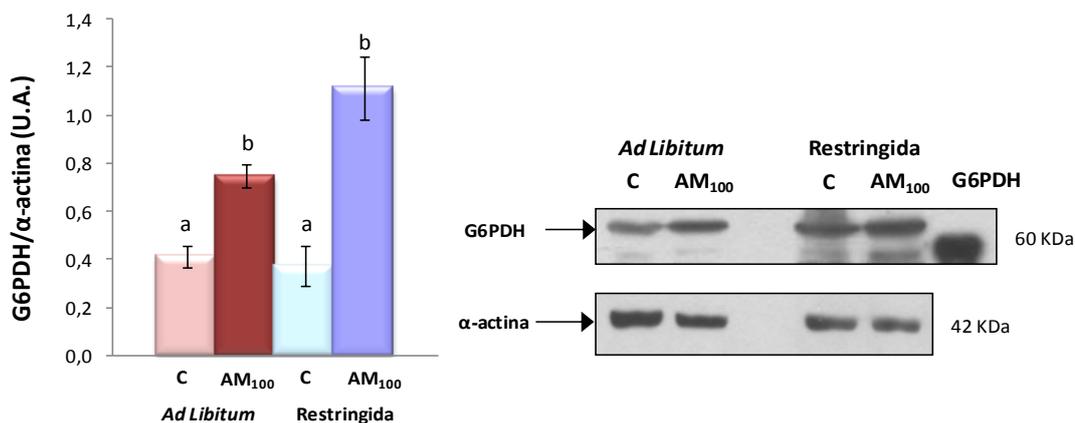
#### 3.5.1.1. Niveles de expresión de G6PDH

Los niveles de expresión de la G6PDH hepática se determinaron mediante análisis “Western blot” en condiciones totalmente desnaturizantes utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-G6PDH de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). La dilución empleada de anticuerpo que nos dio banda inmunorreactiva correspondió a 1/5000, y el volumen de carga de proteína que se empleó para la SDS-PAGE fue la correspondiente a 50  $\mu$ g, en todos los tratamientos. Los extractos que empleamos para la detección de los niveles de expresión de G6PDH, correspondieron a extractos citosólicos de hígado de doradas alimentadas con las cuatro situaciones nutricionales.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.30** Como resultado de este análisis se obtuvo una banda inmunorreactiva de masa molecular aparente de 60 kDa. Esta banda se manifiesta

más intensamente en los grupos experimentales que se alimentaron con ácido maslínico, tanto para AM<sub>100</sub> AL, como para AM<sub>100</sub> R, que en las situaciones controles. Estas diferencias se magnifican cuando se analizaron los resultados densitométricamente y se compararon con las bandas inmunorreactivas encontradas tras su incubación con el anticuerpo anti- $\alpha$  actina (1/1000). Las diferencias encontradas en la intensidad de las bandas mostraron variaciones estadísticamente significativas. La cantidad de G6PDH encontrada para el grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 82,9% superior a la encontrada en el grupo control AL, mientras que, el nivel de G6PDH del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 202,7% mayor al encontrado en el grupo control R.

La banda detectada correspondiente a la proteína G6PDH, no fue la única que se apreció, sino que obtuvimos una serie de bandas inespecíficas de menor intensidad a la encontrada para esta proteína. Esta inespecificidad puede deberse a que el anticuerpo empleado era policlonal. El utilizar G6PDH pura como control positivo, en una de las calles, nos marcó la banda que correspondía específicamente a esta proteína. La ligera diferencia de masa molecular encontrada entre el enzima puro y el procedente de las doradas, se debe a los distintos orígenes existentes entre la G6PDH de dorada y el enzima puro utilizado.



**Figura 3.30.** Análisis por “Western blot” del contenido de G6PDH en extractos citosólicos de hígado de dorada alimentada con ácido maslínico. En nuestras condiciones, se obtuvo una banda inmunorreactiva de 60 kDa (panel derecho). La carga de la proteína fue de 50  $\mu$ g, para todos los tratamientos. Esta carga se normalizó con la banda de  $\alpha$ -actina. Se cuantifica la relación entre ambas proteínas y el resultado se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa (U.A.) (panel izquierdo). Los resultados corresponden a la media de 5 cuantificaciones diferentes  $\pm$  S.E.M. Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge, de FujiFilm.

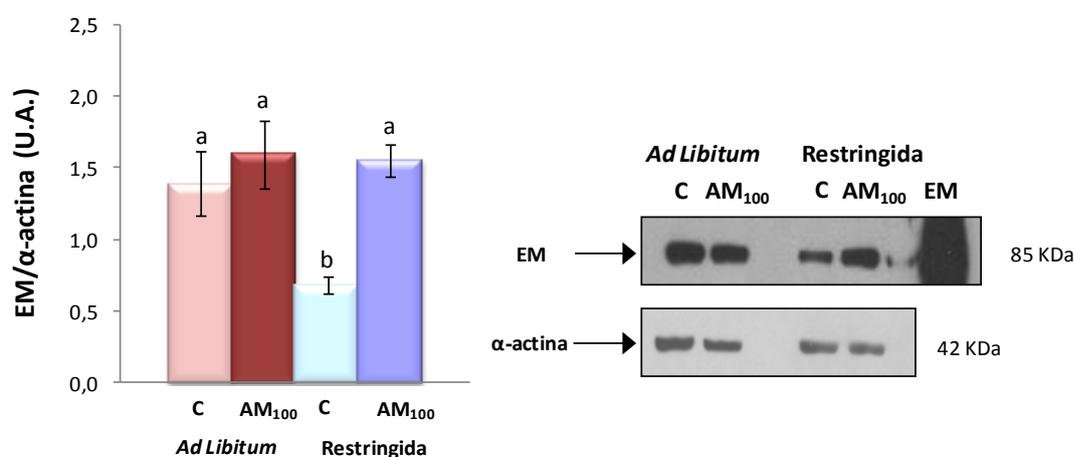
### 3.5.1.2. Niveles de expresión de EM

En la **Figura 3.31** se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de “Western blot” realizado para cuantificar los niveles de expresión del EM en extractos citosólicos de hígado de la



dorada alimentada con ácido maslínico. Como se muestra en la figura, se ha detectado señal inmunorreactiva frente al anticuerpo monoclonal de ratón anti-EM de cerebro de vaca. Esta banda inmunorreactiva fue única, y se corresponde con una masa molecular de 85 kDa.

El hecho de que sólo se revelara una única banda, nos puso de manifiesto la excelente especificidad del anticuerpo, debido a su naturaleza monoclonal. La zona de mayor intensidad del enzima puro se corresponde con la posición específica de las bandas del EM de la dorada. La dilución de anticuerpo empleada fue 1/1000 y la carga de proteína fue el volumen de extracto citosólico equivalente 50  $\mu$ g en todas las muestras de hígado procedentes de los diferentes grupos experimentales estudiados.



**Figura 3.31.** Análisis por “Western blot” del contenido de EM en extractos citosólicos de hígado de dorada alimentada con ácido maslínico. En nuestras condiciones, se obtuvo una banda inmunorreactiva de 85 kDa. La carga de la proteína fue de 50  $\mu$ g, en todos los casos; esta carga se normalizó con la banda de  $\alpha$ -actina. Se cuantifica la relación entre ambas proteínas y el resultado se expresa en unidades arbitrarias de densidad relativa (U.A.) (panel izquierdo). Los resultados corresponden a la media de 5 cuantificaciones  $\pm$  S.E:M. Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge, de Fujifilm.

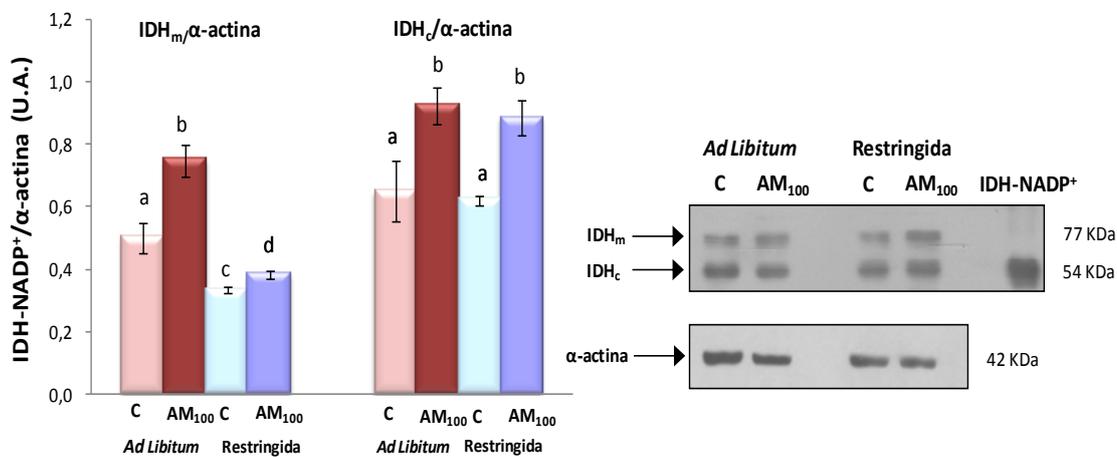
Tras la normalización realizada con las bandas de  $\alpha$ -actina y su posterior cuantificación se puede observar un ligero aumento presente en todos los ensayos aunque no existieron diferencias significativas en los niveles de expresión de este enzima en las doradas alimentadas con la dieta *ad libitum* y suplementadas con ácido maslínico respecto a los niveles de expresión de los peces alimentados con la dieta control AL.

Sin embargo, cuando nos fijamos en los grupos que se alimentaron con una dieta restringida al 1,5% del peso del pez (R) observamos una importante disminución del 51,1% en los niveles de expresión del enzima málico en condiciones controles frente al control AL; mientras que la adición de ácido maslínico (AM<sub>100</sub> R) produjo en esta situación de restricción un aumento del 129,4%

respecto al control R. Este aumento encontrado se equiparó a los niveles de expresión del EM encontrados en las condiciones *ad libitum*.

### 3.5.1.3. Niveles de expresión de IDH-NADP<sup>+</sup>

En la **Figura 3.32** se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de “Western blot” realizado para cuantificar los niveles de expresión de proteína específica IDH-NADP<sup>+</sup> en extractos citosólicos del hígado de la dorada alimentada con ácido maslínico. El anticuerpo utilizado para la detección de esta proteína, fue un anticuerpo policlonal de conejo anti-IDH<sub>c</sub> citosólico de hígado de rata. La dilución empleada para obtener banda inmunorreactiva fue 1/5000, y la carga de la proteína correspondió a 50 µg.



**Figura 3.32.** Análisis por “Western blot” del contenido de IDH-NADP<sup>+</sup> en extractos citosólicos de hígado de dorada alimentada con ácido maslínico (panel derecho). Aparecen dos bandas inmunorreactivas, una de 77 kDa y otra de 54 kDa. La carga de la proteína fue de 50 µg, en todos los tratamientos. Esta carga se normaliza con la banda de α-actina. Se cuantifica la relación entre ambas proteínas y se expresa en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa (U.A.) (panel izquierdo). Los resultados corresponden a la media de 5 cuantificaciones diferentes ± S.E:M Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge, de FujiFilm.

Como resultado del análisis de “Western blot” se obtuvo una doble banda, en todos los grupos experimentales, de masas moleculares correspondientes a 77 kDa y 54 kDa. Aparentemente, la banda inmunorreactiva de mayor peso molecular, 77 kDa, parece ser menos intensa que la de 54 kDa. Se observó, a su vez, que el enzima puro bandeó a una masa molecular correspondiente a 54 kDa, lo que nos indica que la banda inmunorreactiva correspondiente a la proteína IDH-NADP citosólica (IDH<sub>c</sub>), es la que se manifiesta a esa misma masa molecular. La banda inmunorreactiva de 77 kDa puede ser la fracción mitocondrial del enzima IDH-NADP<sup>+</sup> (IDH<sub>m</sub>). Esto explicaría el hecho que aparezca con menor intensidad.

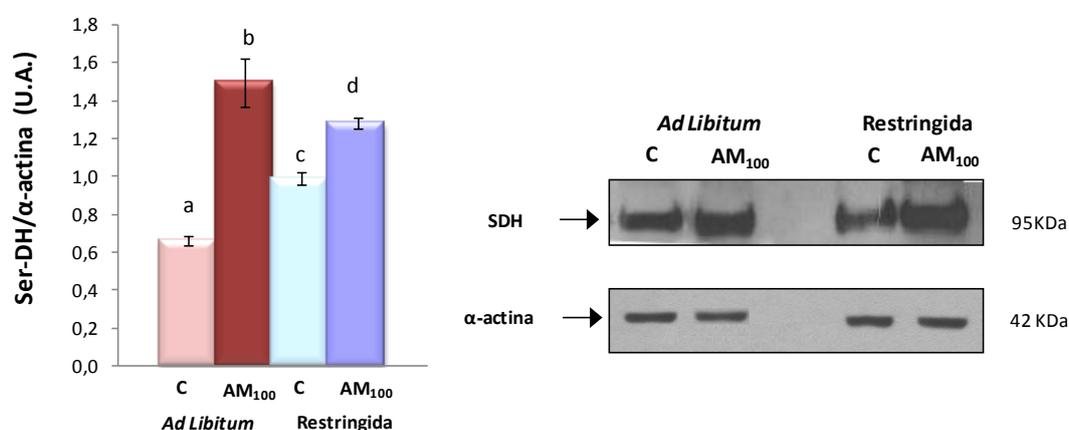


La normalización por la banda de  $\alpha$  actina se realizó para ambas bandas inmunorreactivas detectadas. Las diferencias encontradas en la intensidad de las bandas de 77 kDa de masa molecular resultan aparentes en todos los grupos experimentales. Los grupos alimentados con ácido maslínico presentaron mayor intensidad de banda que los controles; estas diferencias se mantuvieron cuando se tuvo en cuenta la banda de  $\alpha$ -actina, de tal manera que el valor del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 49,8% superior al control AL, y el del AM<sub>100</sub> R un 14,7% respecto al control R.

La banda inmunorreactiva correspondiente a la fracción citosólica, con una masa molecular de 54 kDa resultó ser mayor significativamente para estos mismos grupos. Los valores de los grupos alimentados con dieta suplementada con ácido maslínico, AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R fueron superiores en un 41,9% y 42,7% que los controles AL y R, respectivamente. Mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de este enzima entre las situaciones *ad libitum* y restringidas. Estos resultados nos confirman, los mayores niveles de expresión del enzima IDH-NADP<sup>+</sup> en las doradas que se alimentaron con ácido maslínico, en ambas situaciones (AL y R).

#### 3.5.1.4. Niveles de expresión de Ser-DH

Los niveles de expresión de proteína específica Ser-DH se determinaron mediante análisis "Western blot" en condiciones totalmente desnaturalizantes utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ser-DH de hígado de rata. La dilución empleada de anticuerpo que nos dio banda inmunorreactiva correspondió a 1/5000, y la carga de proteína que se empleó para la SDS-PAGE fueron 200  $\mu$ g. Los extractos que empleamos para la detección de los niveles de expresión de Ser-DH, correspondieron a extractos citosólicos de hígado de doradas alimentadas con las cuatro situaciones nutricionales. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.33**.



**Figura 3.33.** Análisis por "Western blot" del contenido de Ser-DH en tejido hepático de dorada alimentada con ácido maslínico. En nuestras condiciones, se aprecia la banda inmunorreactiva de 95 kDa. La carga de la proteína correspondió a 200  $\mu$ g, en todos los tratamientos; esta carga se normalizó con la cuantificación de la banda de  $\alpha$ -actina correspondiente a la misma membrana. Los resultados corresponden a la media de 5 cuantificaciones diferentes  $\pm$  S.E.M. Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge, de FujiFilm.

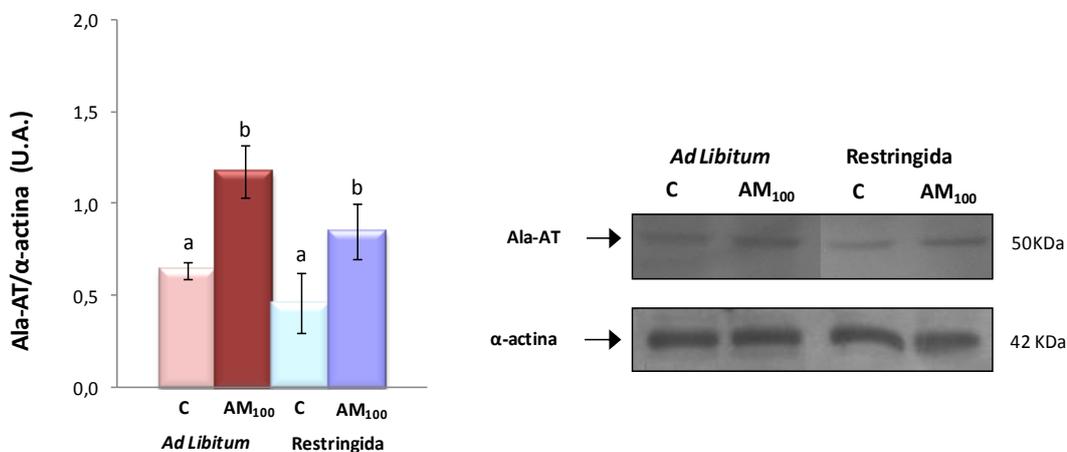


Para el desarrollo del “western blot” de este enzima, en lugar de utilizar enzima puro, se emplearon como control positivo muestras de hígado de rata realimentadas tras un periodo de ayuno ya que, en esta situación, presentan unos niveles de Ser-DH sobreexpresada.

Como resultado de este análisis se obtuvo una banda inmunorreactiva de masa molecular aparente de 95 kDa. Esta banda se manifiesta más intensamente en los grupos experimentales que se alimentaron con ácido maslínico, tanto para AM<sub>100</sub> AL, como para AM<sub>100</sub> R, que en las situaciones controles. Estos incrementos son tales, que cuando se analizan los resultados densitométricamente y se comparan con las bandas inmunorreactivas de  $\alpha$  actina, observamos que presentan diferencias estadísticamente significativas. La cantidad encontrada de Ser-DH correspondiente al grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 125,8% superior a la del control AL, y la del grupo AM<sub>100</sub> R fue un 29,4% mayor que la encontrada en el grupo control R. En este caso se puede observar un claro efecto de la restricción calórica sobre los niveles de expresión del enzima ya que la cantidad de Ser-DH encontrada en los peces sometidos a la dieta control restringida fueron un 49,6% superior a los encontrados en los alimentados con la dieta control *ad libitum*.

### 3.5.1.5. Niveles de expresión de Ala-AT

En la **Figura 3.34** se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de “Western blot” realizado para cuantificar los niveles de expresión de proteína Ala-AT en extractos citosólicos en el hígado de la dorada alimentada con ácido maslínico. El anticuerpo utilizado para la detección de esta proteína, fue un anticuerpo policlonal de ratón anti-Ala-AT. La dilución empleada para obtener banda inmunorreactiva fue 1/1000, y la carga de la proteína correspondió a 40  $\mu$ g.



**Figura 3.34.** Análisis por “Western blot” del contenido de Ala-AT en tejido hepático de dorada alimentada con ácido maslínico. En nuestras condiciones, se aprecia la banda inmunorreactiva de 50 kDa. La carga de la proteína correspondió a 40  $\mu$ g, en todos los tratamientos; esta carga se normalizó con la cuantificación de la banda de  $\alpha$ -actina correspondiente a la misma membrana. Los resultados corresponden a la media de 5 cuantificaciones diferentes  $\pm$  S.E.:M. Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge, de FujiFilm.



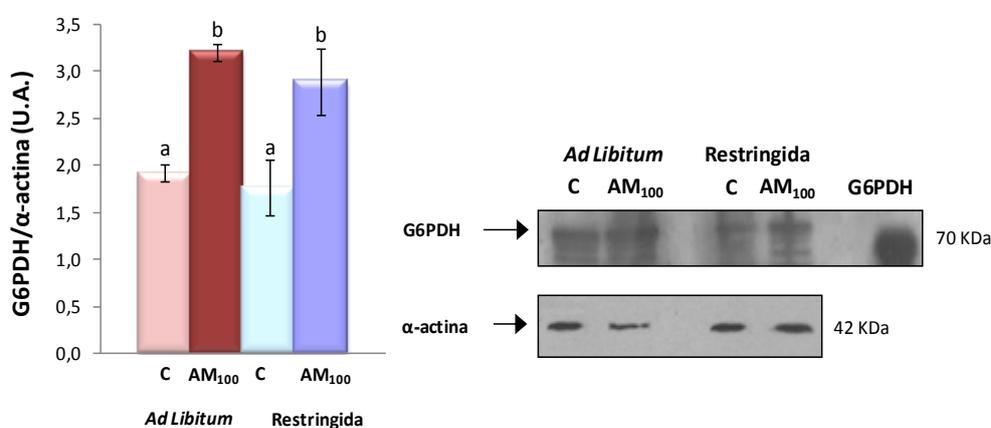
Para el caso concreto de la proteína Ala-AT, el ensayo electroforético SDS-PAGE realizado lo fue en geles con un 15% de acrilamida. La banda inmunorreactiva correspondiente a este enzima presentó una masa molecular aparente de 50 kDa.

Los resultados encontrados sugieren que el ácido maslínico produce un aumento en la cantidad de este enzima en el hígado de la dorada. En los grupos AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R, apareció una banda inmunorreactiva correspondiente a la Ala-AT de mayor intensidad que la encontrada en los grupos controles. Este aumento supuso un incremento significativo del 84,1% en las doradas alimentadas con dieta AM<sub>100</sub> AL, y del 85,0% para aquellas que lo hacían con AM<sub>100</sub> R. Estas diferencias, sin embargo, no se encontraron en los peces sometidos a restricción dietaria.

### 3.5.2. Niveles de expresión proteica en músculo blanco de dorada

#### 3.5.2.1. Niveles de expresión de G6PDH

Los niveles de expresión de proteína específica G6PDH se determinaron mediante análisis "Western blot" utilizando el mismo anticuerpo que se empleó para detectar la G6PDH de hígado; un anticuerpo policlonal de conejo anti-G6PDH de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). La dilución empleada de anticuerpo que nos dio una banda inmunorreactiva correspondió a 1/5000, y la carga de proteína que se empleó para la SDS-PAGE fue de 50 µg, en todos los tratamientos. Los extractos que empleamos para la detección de los niveles de expresión de G6PDH, correspondieron a extractos citosólicos de músculo blanco de doradas alimentadas con las cuatro situaciones nutricionales. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.35**.



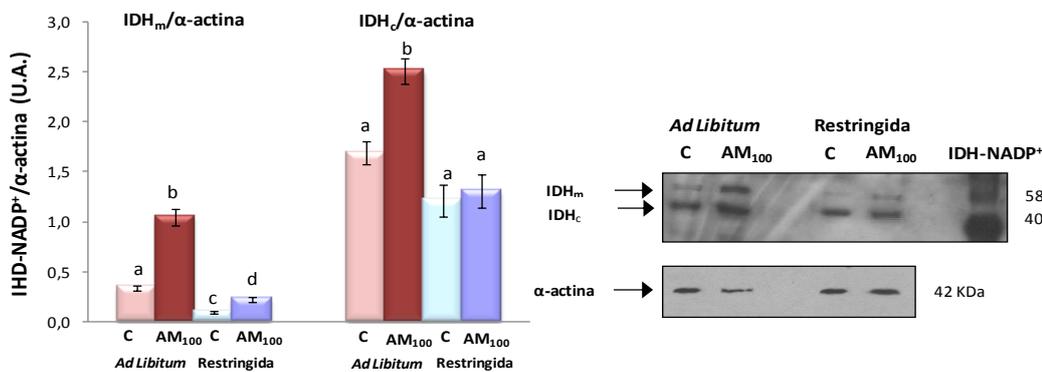
**Figura 3.35.** Análisis por "Western blot" del contenido de G6PDH en tejido muscular de dorada alimentada con ácido maslínico. En nuestras condiciones, se aprecia la banda inmunorreactiva de 70 kDa. La carga de la proteína correspondió a 50 µg, en todos los tratamientos; esta carga se normalizó con la cuantificación de la banda de α-actina correspondiente a la misma membrana. Los resultados corresponden a la media de 5 cuantificaciones diferentes ± S.E.M. Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge, de FujiFilm.



Como resultado de este análisis se obtuvo una banda inmunorreactiva de masa molecular aparente de 70 kDa. Esta banda se manifiesta más intensamente en los grupos experimentales que se alimentaron con ácido maslínico, tanto para AM<sub>100</sub> AL, como para AM<sub>100</sub> R, que en las situaciones controles. Este incremento es tal, que cuando se analizan los resultados densitométricamente y se comparan con las bandas inmunorreactivas encontradas en la  $\alpha$ -actina, observamos que estas diferencias se magnifican entre los distintos tratamientos con ácido maslínico alcanzando niveles de significación. La cantidad de G6PDH muscular del grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 67,0% superior a la del control AL, y la encontrada en el grupo AM<sub>100</sub> R fue un 63,8% mayor que la del grupo control R.

### 3.5.2.2. Niveles de expresión de IDH-NADP<sup>+</sup>

En la **Figura 3.36** se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de “Western blot” de la proteína IDH-NADP<sup>+</sup> en extractos citosólicos del músculo de dorada alimentada con ácido maslínico. El anticuerpo utilizado, fue un anticuerpo policlonal de conejo anti-IDH<sub>c</sub> de hígado de rata. La dilución empleada para obtener banda inmunorreactiva fue 1/5000 y la carga de proteína fue de 50  $\mu$ g.



**Figura 3.36.** Análisis por “Western blot” del contenido de IDH-NADP<sup>+</sup> en extractos citosólicos de músculo de dorada alimentada con AM. Se aprecian dos bandas inmunorreactivas, una de 58 kDa y otra de 40 kDa. La carga de la proteína correspondió a 50  $\mu$ g, en todos los tratamientos; esta carga se normalizó con la cuantificación de la banda de  $\alpha$ -actina. Los resultados corresponden a la media de 5 cuantificaciones diferentes  $\pm$  S.E.M. Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge de FujiFilm.

Como resultado del análisis de “Western blot” se obtuvo en todos los grupos experimentales una doble banda de masas moleculares correspondientes a 58 kDa y 40 kDa, al igual que ocurría en el caso del hígado. La normalización por la banda de  $\alpha$  actina se realizó para ambas bandas inmunorreactivas detectadas, y los resultados se expresaron como intensidad de la banda de IDH-NADP<sup>+</sup> por la intensidad de la banda de  $\alpha$ -actina, expresado en unidades arbitrarias (U.A.) Las diferencias encontradas en la banda de masa molecular de 58 kDa, que podría coincidir con la fracción mitocondrial del enzima IDH-NADP<sup>+</sup>, resultan diferentes significativamente en todos los grupos experimentales, y mayores para las dietas a las que se añadió ácido maslínico; además, se

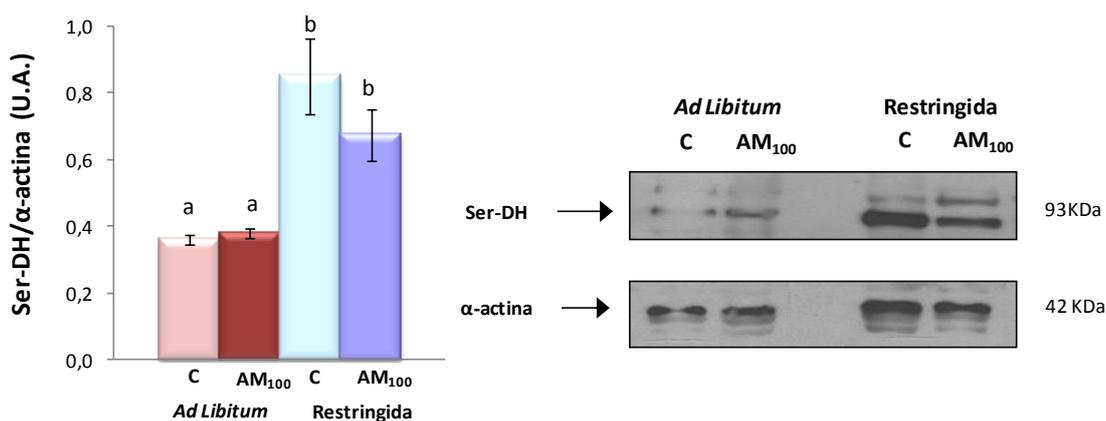


observa que las bandas correspondientes a los tratamientos *ad libitum* son mayores que en los restringidos.

En relación con la banda de 40 kDa de masa molecular correspondiente a la fracción citosólica del enzima, los grupos alimentados con ácido maslínico en condiciones *ad libitum* presentaron una banda de mayor intensidad que la encontrada en el grupo control AL. Esta diferencia se mantuvo cuando se normalizó con la banda de  $\alpha$  actina, de tal manera que la cantidad de enzima en el grupo AM<sub>100</sub> AL fue un 48,5% superior la encontrada en el grupo control AL. La restricción alimentaria no produjo diferencias significativas en los niveles de expresión de este enzima.

### 3.5.2.3. Niveles de expresión de Ser-DH

La detección de la banda inmunorreactiva correspondiente a la Ser-DH no fue tarea fácil, por tratarse de un enzima que presenta bajos niveles de expresión. Se necesitaron 250  $\mu$ g de proteína para su inmunodetección. La dilución del anticuerpo policlonal de conejo anti-Ser-DH de hígado de rata fue 1/5000. Los resultados se muestran en la **Figura 3.37**.



**Figura 3.37.** Análisis por "Western blot" del contenido de Ser-DH en tejido muscular de dorada alimentada con ácido maslínico. En nuestras condiciones, se aprecia la banda inmunorreactiva de 93 kDa. La carga de la proteína correspondió a 250  $\mu$ g, en todos los tratamientos; esta carga se normalizó con la cuantificación de la banda de  $\alpha$ -actina correspondiente a la misma membrana. Los resultados corresponden a la media de 3 cuantificaciones de western diferentes  $\pm$  S.E.:M. Para la cuantificación se utilizó el programa MultiGauge de FujiFilm.

Para corroborar que la banda que le atribuíamos a la Ser-DH era la específica para esta proteína, utilizamos como control positivo una muestra de hígado y músculo de rata en condiciones de realimentación, momento en el que se sobreexpresa la Ser-DH. Además, la calibración del gel, utilizando los marcadores de pesos moleculares, mediante el software MultiGauge de FujiFilm nos permitió conocer la masa molecular exacta de las proteínas y por identificación y comparación con las encontradas en hígado se identificaron la Ser-DH y la  $\alpha$  actina en el caso del músculo blanco.



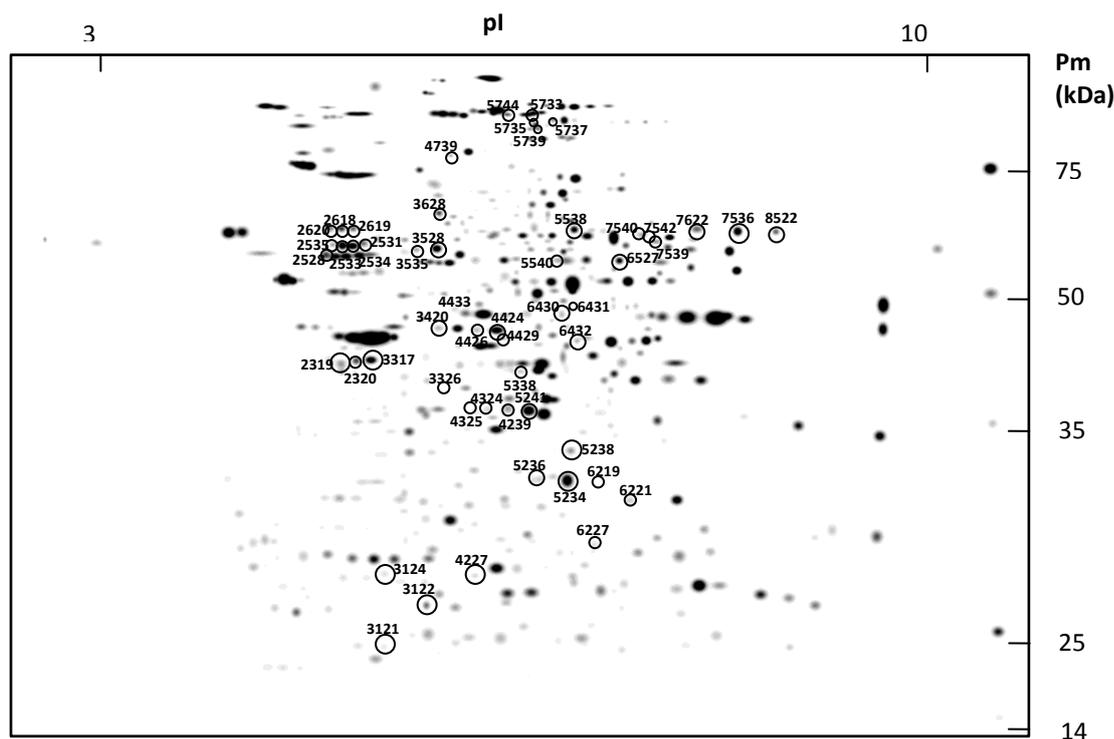
En la **Figura 3.37** se puede observar que las doradas sometidas a restricción calórica presentaron unos niveles de expresión superiores significativamente a los encontrados en los grupos alimentados a saciedad, siendo estos incrementos de un 135,6% para el grupo control R frente al control AL y de un 77,4% para el grupo AM<sub>100</sub> R frente al AM<sub>100</sub> AL . Estas diferencias, sin embargo, no se manifestaron entre los grupos de peces alimentados con ácido maslínico cuando se comparan con sus respectivos controles. Por lo tanto, los niveles de expresión de la proteína Ser-DH sólo se vieron influenciados por la restricción dietaria.



### 3.6. Análisis del patrón de expresión de proteínas (proteoma) en el hígado de la dorada alimentada con ácido maslínico

#### 3.6.1. Patrón de expresión proteico en el hígado de la dorada

El estudio del efecto del ácido maslínico (AM) sobre el proteoma del hígado de la dorada consistió en el análisis general de expresión proteica mediante el uso combinado de electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas (MS). Con los extractos proteicos de hígado de las diferentes situaciones nutricionales se realizó una electroforesis bidimensional (SDS-PAGE), tal y como se indica en la sección de material y métodos. El número de geles realizados por tratamiento fue de 3, de este modo se obtuvo un total de 12 geles. La superposición de todos ellos dio lugar a lo que se conoce como “gel máster”, pues contiene todas las manchas proteicas (“spots”) detectados individualizadamente. Por ello, el perfil de proteínas correspondientes al gel máster fue elegido como gel de referencia para el actual estudio. De este modo, los otros tres tratamientos (9 geles) fueron comparados con éste (3 geles). Un total de 564 proteínas fueron asignadas al perfil de referencia. En la **Figura 3.38** se muestra el “gel máster” 2-DE del hígado de la dorada. Las manchas proteicas que aparecen rodeadas de un círculo fueron los que presentaron una expresión diferencial, tras el análisis cuantitativo, en respuesta a la utilización de los diferentes tratamientos nutricionales (control AL, AM<sub>100</sub> AL, control R, AM<sub>100</sub> R).



**Figura 3.38.** Gel “máster” representativo del proteoma del hígado de la dorada obtenido por electroforesis bidimensional (2-DE). Se detallan todos los spots que muestran una expresión diferencial inducida por los tratamientos.



Para el análisis cuantitativo de las proteínas se empleó el programa PDQuest (Bio-Rad). Las proteínas consideradas como diferentes entre los distintos grupos experimentales seguían los siguientes criterios:

- El triple de diferencia en el spot, de tal modo que los spots que se consideran como diferentes, corresponden a una diferencia en la zona de al menos tres veces con respecto a otra.
- Los spots considerados para cada tratamiento, aparecían en al menos dos geles, de las tres réplicas que había para cada uno de ellos.
- Los cambios en la expresión consistían en 3 réplicas del análisis cuantitativo con el PDQuest para cada grupo de peces.

Los resultados se expresan como diferencias cualitativas y/o cuantitativas de expresión proteica. En el primer caso, atendiendo a que aparezcan proteínas o no en alguna de las situaciones nutricionales; y en el segundo caso, atendiendo a que existan diferencias en la cantidad de proteína expresada.

El número de spots analizados en los geles fue un total de 564. De todos ellos, 57 fueron los que presentaron una expresión diferente entre los distintos grupos experimentales, y son precisamente los que aparecen representados en el gel “máster” (**Figura 3.39**). Las proteínas asignadas a este perfil fueron detectadas en al menos 2 de los 3 geles de cada grupo de peces. El número de manchas proteicas detectado sobre los 12 geles variaba entre 523 y 552. Las proteínas detectadas presentaban unas masas moleculares (Pm) comprendidas entre 115,70 y 19,36 kDa, y un punto isoeléctrico (pI) entre 3 y 10; aunque la mayoría de las proteínas (un 80%) en las que se detectaron diferencias, presentaron una masa molecular que oscilaba entre 35 y 70 kDa y un punto isoeléctrico entre 4,90 y 7,00.

En la **Tabla 3.28** se muestran las masas moleculares y puntos isoeléctricos de cada uno de estas manchas proteicas que mostraron diferencias cualitativas y cuantitativas, y que cumplieron los criterios anteriormente descritos. Quizás el efecto más sobresaliente encontrado en el análisis proteómico fue que los cambios de expresión proteica que aparecieron en las situaciones nutricionales restringidas (AM<sub>100</sub> R frente a control R) fueron más numerosos que los encontrados en las situaciones *ad libitum* (AM<sub>100</sub> AL frente a control AL).

Así, de un total de 57 manchas proteicas encontrados que presentaron diferencias cualitativas y/o cuantitativas, 47 de ellos, es decir un 82,5%, fueron diferentes en condiciones de restricción alimentaria, de ellos, un total de 24, correspondieron a diferencias cualitativas, y el resto, 23, a diferencias cuantitativas. Mientras que por otra parte, sólo 10 manchas proteicas con diferencias (el 17,5% restante) fueron encontrados en las situaciones *ad libitum*, siendo 6 de ellos los que presentaron diferencias cualitativas frente a los 4 “spots” restantes que presentaron diferencias cuantitativas.

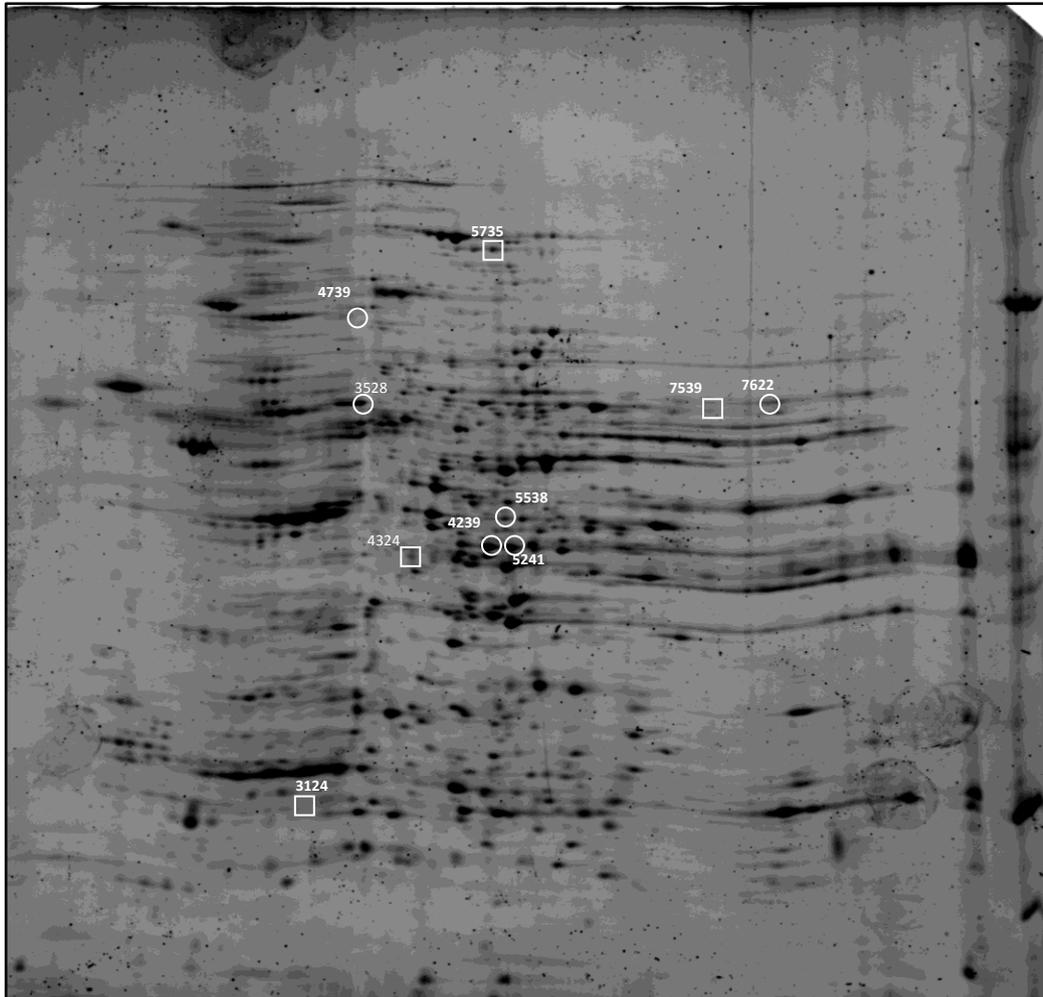


De este modo, y como resumen, se puede afirmar que la sinergia generada entre la suplementación de ácido maslínico (AM) a la dieta de la dorada y la restricción al 1,5% de alimento, provocó los mayores cambios de expresión de proteínas en el hígado de estos peces, siendo ligeramente mayoritarios los cambios correspondientes a diferencias cualitativas.

**Tabla 3.28. Masas moleculares y puntos isoeléctricos de los diferentes spots que mostraron diferencias de expresión**

	<i>Ad Libitum (AL)</i>			Restringida (R)		
	Spot	Pm (kDa)	pl	Spots	Pm (kDa)	pl
Diferencias cuantitativas	3528	58,28	5,78	2319	42,75	5,00
	4239	38,86	6,36	2320	43,02	5,13
	4739	83,23	5,89	2528	56,63	4,95
	5241	38,70	6,53	2529	56,64	5,04
	5538	61,05	6,71	2533	58,88	5,01
	7622	62,56	7,90	2534	58,85	5,09
				2618	62,63	5,00
				2619	62,68	5,10
				2620	62,76	4,91
				3122	26,94	5,70
				3317	43,11	5,24
				3420	46,12	5,80
				4227	29,45	6,06
				4324	38,81	6,20
				4429	45,11	6,32
				5234	33,85	6,81
				5238	35,76	6,84
				5338	42,06	6,47
				5538	61,05	6,71
				6219	33,90	7,06
			6432	44,86	6,88	
			6527	55,72	7,23	
			7536	62,03	8,25	
			7540	61,25	7,43	
			8522	62,00	8,58	
Diferencias cualitativas	3214	28,54	5,35	2531	59,37	5,18
	4324	38,81	6,20	2535	59,12	4,93
	5735	93,38	6,61	3121	24,97	5,35
	7539	60,72	7,67	3124	28,54	5,35
				3326	40,75	5,83
				3535	58,02	5,62
				3628	66,35	5,80
				4325	38,57	6,10
				4424	45,90	6,27
				4426	45,98	6,11
				4433	47,99	5,93
				4739	83,23	5,89
				5236	33,93	6,62
				5540	55,77	6,74
				5545	61,12	6,63
				5733	99,44	6,53
				5737	94,88	6,67
				5744	99,45	6,42
				5739	94,02	6,59
				6221	31,61	7,32
			6227	29,69	7,00	
			6430	47,51	6,77	
			6431	48,05	6,85	
			7542	59,72	7,55	

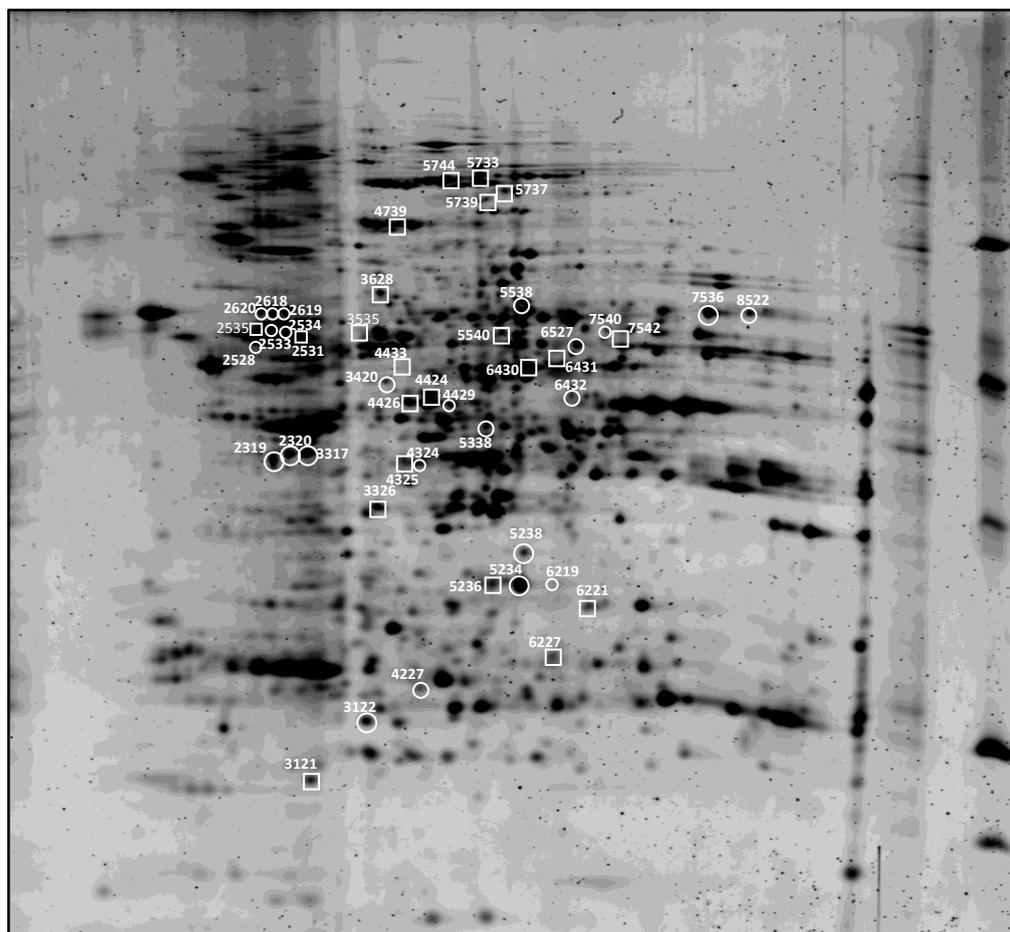
En la **Figura 3.39** se representa el gel obtenido por electroforesis bidimensional (2-DE) correspondiente a la situación nutricional AM<sub>100</sub> AL. Las diferencias que hubo con respecto al gel control AL, aparecen rodeadas de círculos o cuadrados, según corresponden con diferencias cuantitativas, o cualitativas, respectivamente.



**Figura 3.39.** Gel obtenido por electroforesis bidimensional (2-DE) de hígado de la dorada correspondiente a la situación nutricional AM<sub>100</sub> AL. Se muestran señaladas todas las manchas de proteínas para las que se presentaron diferencias con respecto al control AL. ○=Diferencias cuantitativas □=Diferencias cualitativas

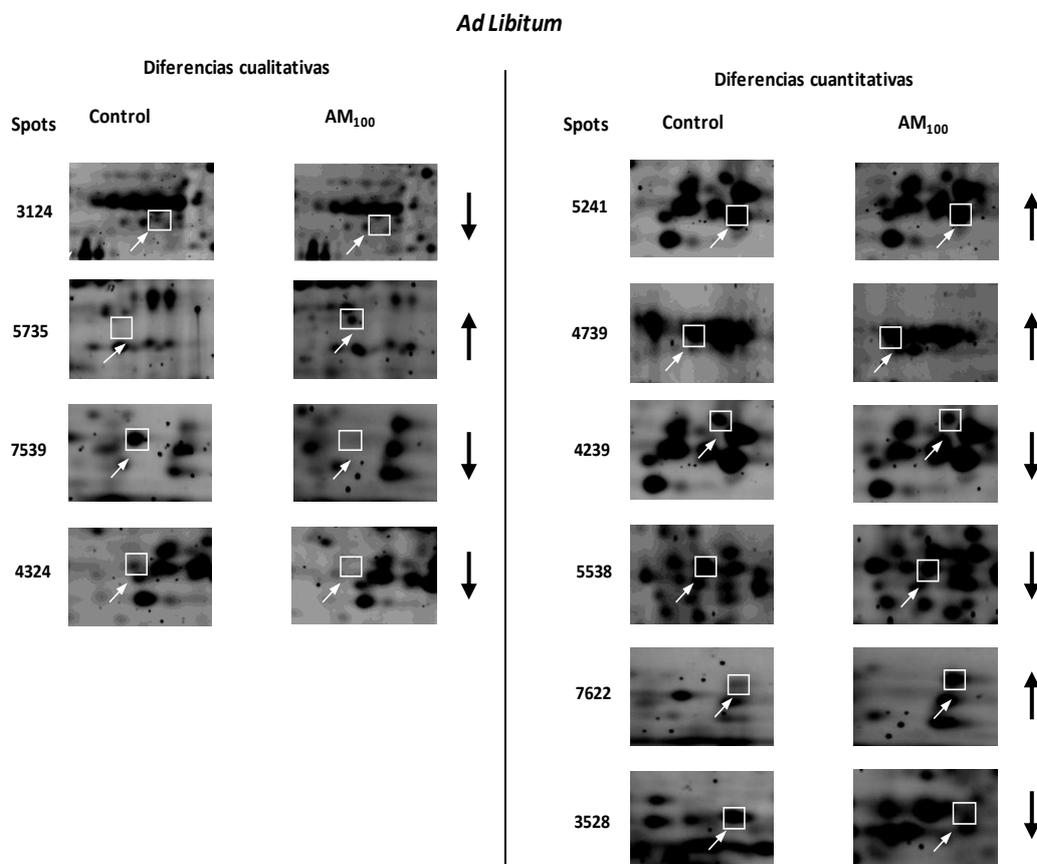


En la **Figura 3.40** se aprecia el gel obtenido por electroforesis bidimensional (2-DE) correspondiente a la situación nutricional AM<sub>100</sub> R. Las diferencias que hubo con respecto al gel control R, aparecen rodeadas de círculos o cuadrados, según corresponden con diferencias cuantitativas, o cualitativas, respectivamente.



**Figura 3.40.** Gel 2-DE de hígado de dorada correspondiente a la situación nutricional AM<sub>100</sub>R. Se muestran señaladas todos los "spots" para las que se presentaron diferencias con respecto al control R, tanto cuali, como cuantitativamente. ○ = Diferencias cuantitativas ◻ = Diferencias cualitativas

En la **Figura 3.41** se muestran las imágenes correspondientes al detalle de los diferentes “spots” que mostraron diferencias cuantitativas y cualitativas en la alimentación *ad libitum* (AL). En estas figuras se puede observar la zona exacta del gel 2-DE de cada situación nutricional donde aparece el “spot”. Las diferencias cualitativas observadas, ponen de manifiesto que el ácido maslínico (AM) induce la expresión de algunas proteínas, que no se expresaban en el grupo control AL, tal es el caso del spot 5735; pero también reprime la expresión proteica en algunos de los casos, como aparecía en los spots 3124, 4324 y 7539. La influencia cuantitativa del ácido maslínico (AM) sobre la expresión de muchas proteínas del hígado de dorada se demuestra por los cambios que existieron en la situación nutricional AM<sub>100</sub> AL comparada con el control AL. Cabe destacar que el ácido maslínico no siempre produjo una inducción sobre la expresión proteica, sino que existieron casos en los que la proteína se veía disminuida, este es el caso del spot 4239 (cadena a de la lisozima). En los spots 4739, 5241 y 7622 (catalasa) de muestra como el AM aumentó cuantitativamente la expresión de estas proteínas.



**Figura 3.41.** Conjunto de “spots” que presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre los grupos experimentales alimentados *ad libitum*.



Los resultados encontrados para los grupos experimentales que estuvieron sometidos a una dieta restringida al 1,5% de la biomasa total de la cuba se muestran en la **Figura 3.42**. Se observan cambios en la expresión de una gran cantidad de proteínas, sobre todo si se compara esta situación con la *ad libitum*, en la que se observaron menos cambios. De este modo, la inclusión de ácido maslínico (AM) a la dieta de dorada en condiciones de restricción produjo una gran variedad de cambios en la expresión proteica. Estos cambios fueron cualitativos y cuantitativos; y a su vez, se observaron proteínas que aumentaban su expresión en respuesta al AM y restricción calórica (R), otras que disminuían, algunas proteínas que no se expresaban, y las que sí se expresaban y no lo hacían en la situación control R.

Las diferencias cualitativas encontradas que se expresaron en el grupo de doradas alimentadas con dieta AM<sub>100</sub> R y no el grupo control R, se refieren a los “spots” 2531, 2535 (proteína regulada por glucosa), 3121, 3124 (EF-2), 3628, 4424 (6PGDH), 4426 (fumaroil acetoacetato hidrolasa), 4739, 5236 (urato oxidasa), 5540 (G6P isomerasa) y 5737. Los “spots” que, por el contrario, aparecieron en el grupo de peces control R, y que no lo hicieron en el AM<sub>100</sub> R son el 3326, 3535, 4325, 4433, 5744, 5739, 6227 (aldehído DH) y 6430.

Por lo que respecta a las diferencias cuantitativas encontradas en estos mismos grupos, destacar que el ácido maslínico aumentó la expresión de una cantidad de proteínas mayor, que en las que provocó su disminución. Así, los “spots” 2319 (queratina), 2320 (queratina), 2528 (queratina), 2533, 2534, 2618 (HSP-60), 2619, 2620 (GF-15575), 3317 (queratina), 4324, 5234 (urato oxidasa), 5238 (17-β-hidroxiesteroide DH tipo 4), 6432, 6527 y 7536 (catalasa) se vieron incrementados en el grupo AM<sub>100</sub> R en comparación con el grupo control R. La situación nutricional AM<sub>100</sub> R también produjo una disminución cuantitativa en la expresión de algunas proteínas comparadas con las del grupo control R; éstas se refieren a los spots 3122, 3420 (fumaril acetoacetato hidrolasa), 4427, 4429 (ATPasa tipo ABC), 5338 (4-hidroxifenilpirúvico hidrolasa), 6219 (urato oxidasa), 7540 (aldehído DH) y 8522 (catalasa).

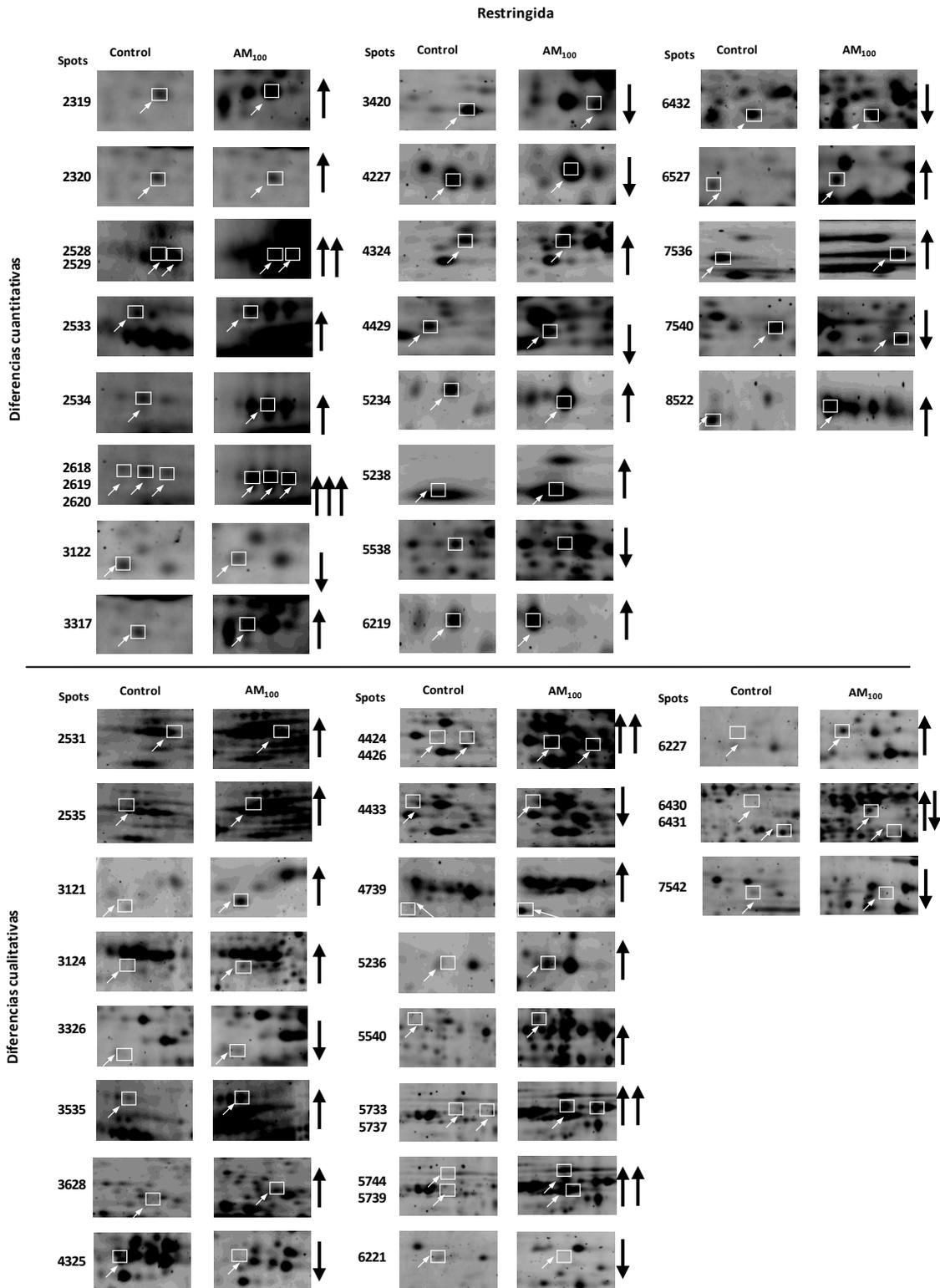


Figura 3.42. Conjunto de spots que presentaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre los grupos experimentales alimentados con dieta restringida.



La intensidad de cada "spot" se cuantificó como la media de la intensidad de la mancha proteica en los tres geles de cada tratamiento en unidades arbitrarias de densidad. Con estos valores, se construyó un histograma en el que se representaba la intensidad del "spot" en las situaciones *ad libitum* por un lado (Figura 3.43) y las restringidas por otro (Figura 3.44).

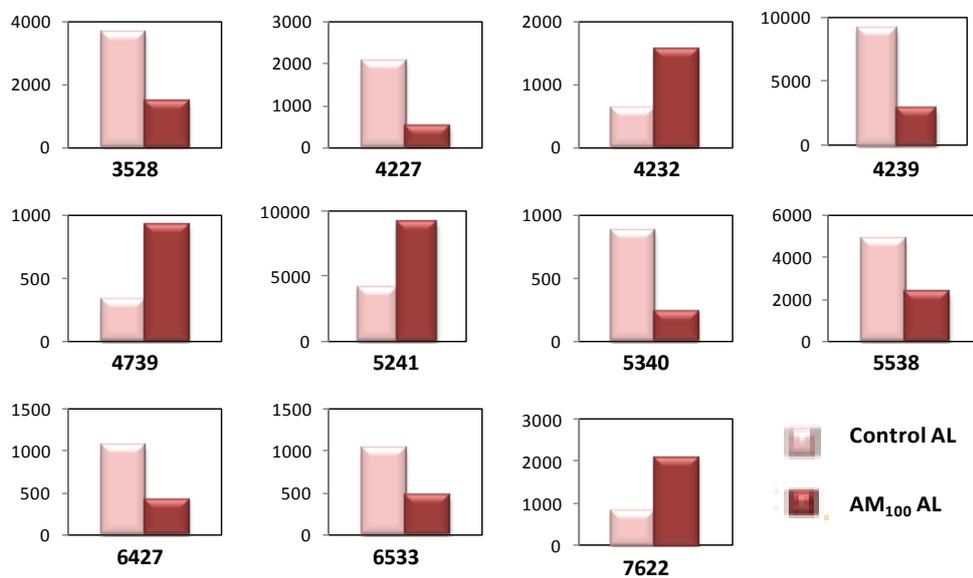


Figura 3.43. Histograma representativo de la cantidad de spot existente en condiciones *ad libitum*. Cada tratamiento es media de 3 valores.

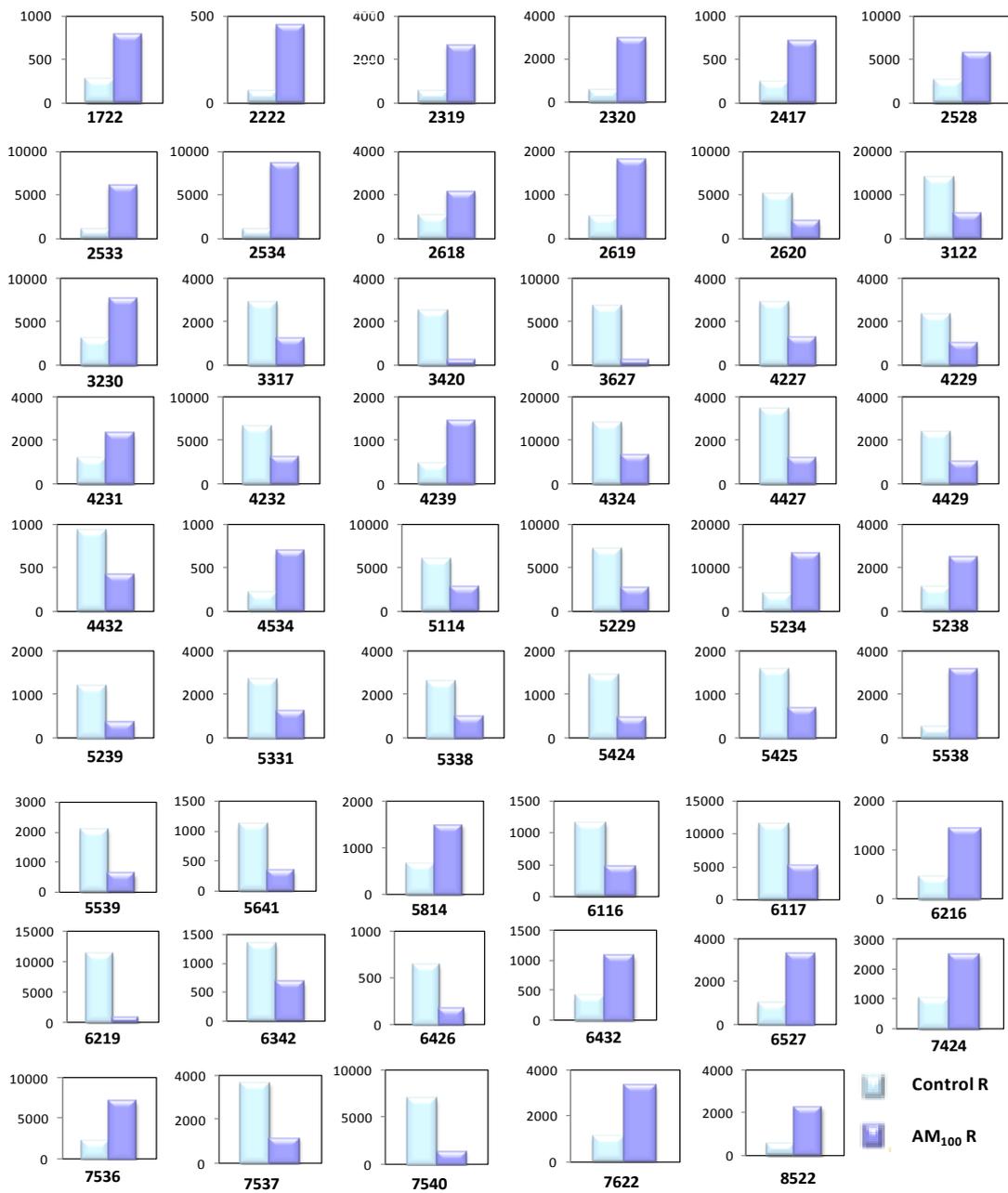


Figura 3.44. Histograma representativo de la cantidad de spot existente en condiciones de alimentación restringida al 1,5% de la biomasa total de la cuba. Cada tratamiento es media de 3 valores.



### 3.6.2. Identificación de las proteínas con patrón de expresión diferente

La identificación de proteínas mediante el estudio de secuencias homólogas (o comparación de sus masas) se puede llevar a cabo basándonos en el hecho de que muchas proteínas de peces se encuentran altamente conservadas. Así, proteínas que comparten secuencias similares, es probable que desempeñen la misma función. Por esta razón, las bases de datos suelen identificar secuencias homólogas en diferentes especies que pueden facilitar las tareas de identificación y de asignación de la función. La continuación del estudio genómico de diferentes especies animales que se está llevando en la actualidad sin duda facilitará la identificación de un número de proteínas cada vez mayor (Thiellement et al., 1999).

En la actualidad existe discrepancia a cerca de los criterios que es necesario seguir para asignar una identificación inequívoca a cada una de las proteínas analizadas, pero todos ellos se basan fundamentalmente en la utilización de parámetros como el número de las masas de péptidos resultantes de digestiones teóricas de proteínas en las bases de datos (*peptides matched*), probabilidad asociada a cada búsqueda (*score*) y el porcentaje de secuencia de la proteína candidata que cubren las masas de los péptidos que hemos podido identificar (*sequence coverage*). Cuanto mayor sea el valor de esos tres parámetros (*matches*, *score* y *coverage*), mayor es la probabilidad de una identificación correcta. En general, una identificación realizada con las herramientas y metodologías que hemos descrito debe superar unos determinados umbrales (valores numéricos de cada uno de los parámetros) para poder considerar que la identificación es lo suficientemente fiable. Estos umbrales son:  $score \geq 1 \times 10^3$ ,  $peptides\ matched \geq 3$  y  $sequence\ coverage \geq 25\%$ . A pesar de que una identificación aceptable para una proteína analizada debe superar estos tres umbrales conjuntamente, a veces es posible cometer errores. Por esta razón, para las identificaciones de las proteínas analizadas en nuestros experimentos nos hemos apoyado en la comparación de los datos de punto isoelectrico y pesos moleculares teóricos y experimentales obtenidos para cada una de las posiciones que ocupan las proteínas en los geles bidimensionales.

El procedimiento empleado para la identificación de las proteínas fue el siguiente: los péptidos resultantes de la digestión de la proteína con tripsina fueron analizados por espectrometría de masas (MALDI/TOF-TOF). A continuación, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos, NCBI nr, combinando los resultados de la huella peptídica (MS) con las posteriores fragmentaciones (MS/MS) de hasta doce péptidos de cada spot, según la calidad del espectro MS. Se trata pues de una búsqueda combinada (MS + MS/MS) que hace el equipo. Si las fragmentaciones se tienen en cuenta para la búsqueda de secuencias, aumentando así el éxito en la identificación, y si no lo son, busca sólo por huella peptídica.

El motor de búsqueda utilizado es el llamado MASCOT, y como la mayoría de ellos, lo que hace es buscar incidencias entre las masas de los péptidos experimentales (obtenidos después de la digestión de nuestra muestra) y las masas de los péptidos teóricos, es decir, obtenidos directamente



de la digestión teórica de las secuencias anotadas en las bases de datos. En la **Tabla 3.29** se muestran las identificaciones obtenidas para 32 de las proteínas que presentaban diferencias entre los grupos experimentales.

**Tabla 3.29. Conjunto de proteínas identificadas por MS y búsqueda en la base de datos**

Spot	Homología	Especie	Mr/pi	Nº péptidos	Nº de acceso (gi)	Mowse Score(*)	Coverage (%)
2319	Citoqueratina E7	<i>Danio rerio</i>	42,75/5,00	7	50539834	80	15
2320	Proteína de los filamentos intermedios	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	43,02/5,13	6	47213546	93	12
2528	Queratina Tipo II	<i>Liparis atlanticus</i>	56,63/4,95	20	45239061	293	22
2529	Queratina Tipo II	<i>Liparis atlanticus</i>	56,64/5,04	12	45239061	194	17
2534	Queratina Tipo II K8a	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	58,85/5,09	19	185132941	407	24
2535	Proteína regulada por glucosa 58 kDa	<i>Xenopus laevis</i>	59,12/4,93	7	148226947	139	14
2618	Chaperonina HSP-60	<i>Paralichthys olivaceus</i>	62,63/5,00	14	82466667	140	19
2619	Chaperonina HSP-60	<i>Paralichthys olivaceus</i>	62,68/5,10	11	82466667	325	21
2620	Chaperonina HSP-60	<i>Paralichthys olivaceus</i>	62,76/4,91	15	82466667	159	24
3124	EF-2 traducción eucariótico	<i>Pongo abelli</i>	28,54/5,35	8	55728420	200	10
3317	LOC768289 (Proteína de los filamentos intermedios)	<i>Danio rerio</i>	43,11/5,24	12	116875789	126	26
3420	Fumaril acetoacetato hidrolasa	<i>Danio rerio</i>	46,12/5,80	6	41054569	160	18
4239	Cadena a de la lisozima	<i>Homo sapiens</i>	38,86/6,36	6	9955038	175	33
4325	Metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina, clase I	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	38,57/6,10	5	47220090	225	20
4424	6-fosfogluconato DH	<i>Nasonia vitripennis</i>	45,90/6,27	5	156554573	188	22
4426	Fumarilacetoacetato hidrolasa	<i>Danio rerio</i>	45,98/6,11	3	41054569	122	8
4429	Supresor de quinasa Ras 1	<i>Mus musculus</i>	45,11/6,32	7	56205443	87	11
5234	Urato oxidasa	<i>Salmo salar</i>	33,85/6,81	6	73915328	243	15
5236	Urato oxidasa	<i>Salmo salar</i>	35,76/6,84	6	73915328	108	18
5238	17-β-hidroxiesteroide DH tipo 4	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	35,76/6,84	12	115361554	518	56
5338	4 hidroxifenilpirúvico dioxigenasa	<i>Danio rerio</i>	42,06/6,47	10	82187435	170	20
5540	Glucosa 6 P isomerasa	<i>Mugil cephalus</i>	99,44/6,74	9	20067649	201	20
5538	Fosfoglucomutasa 1	<i>Danio rerio</i>	42,06/6,47	12	41056111	239	23
6219	Urato oxidasa	<i>Salmo salar</i>	33,90/7,06	6	73915328	216	17
6227	Metilmalonato-semialdehído DH	<i>Monodelphis domestica</i>	29,69/7,00	6	126282736	339	12
7542	Aldehído DH fam 4, A1	<i>Danio rerio</i>	59,72/7,55	8	41055855	252	15
7536	Catalasa	<i>Oplengathus fasciatus</i>	62,03/8,25	20	52354832	457	33
7539	Aldehído DH fam 4, A1	<i>Danio rerio</i>	60,72/7,67	5	41055855	203	10
7540	Aldehído DH fam 4, A1	<i>Danio rerio</i>	61,25/7,43	8	41055855	241	15
7622	Catalasa	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	62,56/7,90	15	52354832	215	24
8522	Catalasa	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	62,00/8,58	12	52354832	277	21

(\*) Score calculado usando MASCOT. Se muestran aquellos spots con un porcentaje superior al 99,9% de protein score o ion score C.I.%.



En ella, aparece representada la especie con la que se compara la secuencia y con la que presenta una mayor homología, el número de péptidos (*peptides count*) que se han logrado emparejar en la búsqueda de secuencias de cada proteína, el número de acceso de la proteína y el *protein score*, que se trata de una puntuación que da el motor de búsqueda (MASCOT) a cada identificación, según un sistema probabilístico basado en la distribución de las masas de los péptidos según la masa de la proteína a la que pertenecen (Sistema Mowse). El *protein score* C.I. % que se refiere al intervalo de confianza (cuanto más cerca esté de 100, más fiable es la búsqueda, pero para creérsela debe estar por encima del 99%) en todos los casos identificados superó el 99,99%.

### 3.6.3. Clasificación funcional de las proteínas identificadas

Tomando en conjunto los datos generados de los apartados anteriores se consiguió identificar con éxito 31 manchas proteicas (spots), que corresponden a 18 proteínas diferentes. El motivo por el que hubo más “spot”, que proteínas se debía a que varias manchas proteicas detectadas como diferentes en el análisis, resultaron ser isoenzimas de la misma proteína, de tal manera que al tener diferente punto isoeléctrico se detectaban como “spots” diferentes, pero la masa molecular era la misma. Concretamente estas manchas proteicas fueron 7, de ahí que las identificaciones se redujeran a 18. Estas proteínas se clasificaron según su función en las siguientes categorías funcionales:

- **Glucolíticas, gluconeogénicas y otras:** Fosfoglucomutasa 1 (PGM-1); aldehído deshidrogenasa (Ald-DH); glucosa 6-fosfato isomerasa (Glucosa 6 PI); proteína regulada por glucosa de 85 kDa; metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina clase I (metiltransferasa-SAM clase I).
- **Ciclo de las pentosas fosfato:** 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH).
- **Síntesis de proteínas:** factor de elongación eucariótico (EF-2).
- **Degradación de aminoácidos:** Fumarilacetoacetato hidrolasa (Fumarilacetoacetato-H); 4 hidroxifenolpirúvico dioxigenasa; metilmalonato semialdehído deshidrogenasa.
- **Plegamiento proteínas:** chaperonina HSP60.
- **Metabolismo de los esteroides, esteroides y ácidos grasos:** 17-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- **Factores crecimiento/proliferación celular:** proteína supresora de Ras 1.
- **Estructurales (Citoesqueleto):** queratina tipo II; proteína de los filamentos intermedios.
- **Estrés oxidativo:** catalasa.
- **Metabolismo de purinas:** urato oxidasa.
- **Sistema inmunitario inespecífico:** lisozima

Las 32 proteínas y sus funciones aparecen resumidas en la **Tabla 3.30**. En ella se puede visualizar, además del número de “spot” con el que se corresponde y la función metabólica que



desempeña, agrupadas en las categorías anteriormente enumeradas, también, la intensidad de la mancha proteica, expresada en unidades arbitrarias media de los 3 geles.

**Tabla3.30. Funciones de las proteínas identificadas**

Proteína	Función	Spot	Expresión proteica			
			Control AL	AM <sub>100</sub> AL	Control R	AM <sub>100</sub> R
<b>Glucólisis, gluconeogénesis y otros</b>						
PGM-1	Convierte la G1P en G6P	5545	4812,1	2288,5	499,1	770,2
Ald-DH	Conversión de aldehído en alcohol, (NAD <sup>+</sup> )	7539	3887,9	-	-	-
		7540	1840,8	1044,6	6965	1388,2
		7542	1452,3	1023,8	2037,2	-
Glucosa 6-PI	Transformación de G6P en F6P	5540	906,2	405,6	-	868,8
Proteína regulada por glucosa 58 kDa		2535	2063,6	438,7	-	1067,4
Metiltransferasa-SAM, Clase I	Cataliza reacciones de metilación	4325	926,3	-	754,2	
<b>Ciclo de las pentosas fosfato (CPP)</b>						
6PGDH	Enzima productor de NADPH	4424	-	-	-	9313,6
<b>Síntesis de proteínas</b>						
EF-2	Factor de elongación en la traducción de eucariotas	3124	851,8	-	-	1055,0
<b>Degradación de aminoácidos y otros</b>						
Fumarilacetoacetato H	Degradación de la tirosina	3420	577,8	604	2913	1230,9
		4426	9248,6	133729,9	-	1833,9
4-hidroxifenilpirúvico dioxigenasa	Degradación de la tirosina	5338	1156,6	1275,9	2587,4	985,4
Metilmalonato semialdehído DH	Degradación de Val	6277	610,9	528,0	-	750,2
<b>Sistema inmunitario específico</b>						
Cadena a de la lisozima		4239	9171,5	2875,5	6571,2	3115,3
<b>Plegamiento de proteínas</b>						
Chaperonina HSP-60	En respuesta al estrés	2618	1673,2	1916,5	1304,8	2890,2
		2619	2558,9	1411,3	1013,8	2143,4
		2620	1088	1063,4	486	1786,6
<b>Metabolismo de esteroides, esteroides y ácidos grasos</b>						
17-β-hidroxiesteroide DH tipo 4	Degradación andrógenos	5238	1416,6	1386,3	1068,6	2448,8
<b>Factores de crecimiento/ Proliferación celular</b>						
Quinasa supresora de Ras 1	Induce proliferación celular	4429	969,3	863,9	3503,1	1174,7
<b>Estructurales (citoesqueleto)</b>						
Queratina Tipo II	Estructura escamas (citoesqueleto)	2528	3105,0	955,0	2549,9	5730,0
		2529	947,1	4114,0	6168,2	7384,2
		2534	4886,7	1599,3	1068,8	8514,5
Proteína de los filamentos intermedios		2319	1308,8	1888,1	516,1	2598,8
		2320	882,1	1307,4	626,7	2951,0
		3317	8211,5	5443,1	3081,7	7644,1
<b>Estrés oxidativo</b>						
Catalasa	Degradación peróxido de hidrógeno	7536	2238,7	4444,3	2211,3	7160,4
		7622	807,9	2090,7	1080,9	3297,4
		8522	753,1	137,6	534,1	2286,8
<b>Catabolismo de purinas</b>						
Urato oxidasa		5234	8175,7	6971,0	3777,2	13195,3
		5236	816,5	813,2	-	1818,8
		6219	2509,7	6299,4	11446,9	832,4



### 3.7. Análisis de la estructura del hígado y músculo blanco de dorada por microscopía óptica y electrónica

#### 3.7.1. Análisis histológico por microscopía óptica

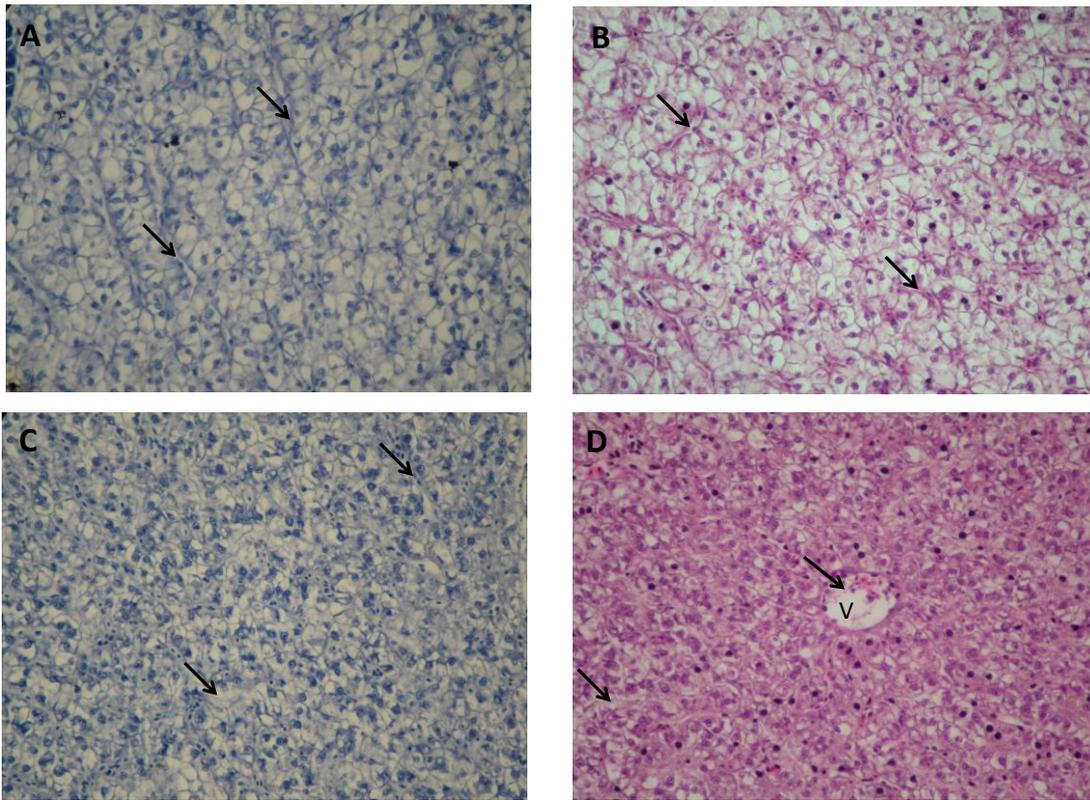
El hígado es un tejido que controla multitud de procesos metabólicos. En él tienen lugar procesos de amoniogénesis, lipogénesis, gluconeogénesis, entre otros, de tal forma que alteraciones en la estructura de este tejido pueden traducirse en cambios metabólicos.

Los resultados que encontramos en la estructura del hígado de las doradas alimentadas con ácido maslínico y restricción del alimento corresponden al patrón general con disposición en cordones descrito en teleósteos. El hígado en peces, a diferencia de los mamíferos no presenta una estructura lobular. La morfología histológica se encuentra constituida por un laberinto ramificado de sinusoides, los cuales se encuentran suspendidos en una intrincada red de tejido conectivo. Las células hepáticas se encuentran localizadas entre los sinusoides formando estructuras tipo cordones, conocidas como cordones celulares hepáticos. Los hepatocitos son células poligonales que presentan un núcleo que se tiñe intensamente, en el cual se encuentra un nucleolo prominente. En este sentido, observamos que los hepatocitos son simples y que se disponen en el parénquima ordenadamente, formando cordones más o menos hexagonales, y entre ellos se encuentran los sinusoides de tipo fenestrado encargados del transporte sanguíneo. El núcleo de estos hepatocitos es bastante aparente, se dispone centralmente y es esférico.

En general, en todos los tratamientos experimentales encontramos el tejido algo más dilatado de lo normal. A pesar de ello se diferencian bien todas las estructuras y nos permite un análisis comparativo entre los diferentes grupos.

La técnica de tinción que empleamos para observar el tejido hepático correspondió a hematoxilina-eosina (H-E) tal como se describe en el apartado de material y métodos.

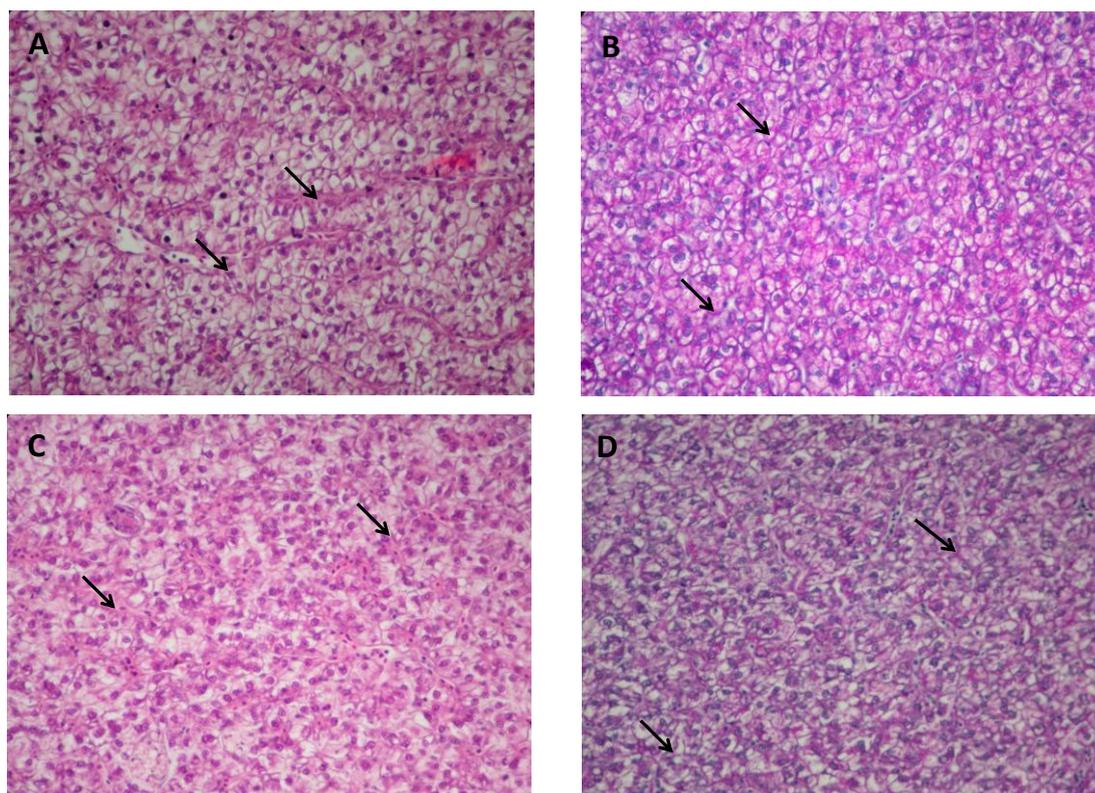
La **Figura 3.45** muestra los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas histológicas con hematoxilina (H) y hematoxilina y eosina (H-E) a secciones hepáticas de los grupos experimentales control AL y AM<sub>100</sub> AL. Las imágenes al microscopio óptico muestran parte del parénquima hepático con hepatocitos acordonados y piramidales; entre ellos aparecen los sinusoides hepáticos. Se observa un núcleo prominente bien teñido. En el panel D, además, se puede observar una vena central a la cual drenan los sinusoides. En general, no se observan grandes diferencias entre estos dos grupos en la forma de los hepatocitos y sinusoides. Lo más destacable es el tamaño y número de estas células hepáticas. En el grupo AM<sub>100</sub> AL se observan hepatocitos más pequeños, pero más numerosos y un mayor grado de compactación del parénquima, que los que se observan en el grupo control AL. El tamaño de los núcleos, sin embargo, parece ser el mismo en ambos tratamientos.



**Figura 3.45.** Estructura del hígado a microscopía óptica en los grupos control AL (panel A y B) y AM<sub>100</sub> AL (panel C y D). Se observa el parénquima hepático constituido por las células hepáticas y los sinusoides (flechas). Hematoxilina y H-E-eosina (H-E). 40X. V: vena central.

Tal y como se muestra en la **Figura 3.46**, los hepatocitos correspondientes al grupo control R se disponen formando un parénquima hepático homogéneo en líneas generales, en donde aparecen dispuestos los hepatocitos acordonados de un tamaño normal y entre ellos, se aprecian los sinusoides algo más dilatados que en el resto de los grupos. El parénquima hepático correspondiente al grupo AM<sub>100</sub> R se asemeja bastante al del grupo AM<sub>100</sub> AL, en donde se presentan los hepatocitos con un tamaño menor que en los controles. Los espacios existentes entre los cordones formados por los hepatocitos aparentemente son más reducidos en este mismo tratamiento.

El aspecto general del parénquima en los grupos alimentados con ácido maslínico, tanto AL, como R, es menos homogéneo que en los grupos controles, apreciándose un mayor dinamismo celular que se traduce en un aparente mayor desorden, frente al orden y grado de estaticidad apreciado en el grupo control.



**Figura 3.46.** Estructura del hígado a microscopía óptica en los grupos control R (panel A y B) y AM<sub>100</sub> R (panel C y D). Se observan los hepatocitos piramidales con sus núcleos teñidos más intensamente y los sinusoides hepáticos (flechas). H-E. 40X.

Las imágenes obtenidas a microscopía óptica en todos los grupos experimentales, controles, adicionados con ácido maslínico y/o grupos alimentados con restricción del alimento, mostraron una apariencia de tejido hepático dentro de la normalidad, sin que hubiese síntomas de daño alguno en el tejido.

Por otro lado, pudimos observar evidencias de hepatopáncreas en el hígado de la dorada, tanto en la situación control AL y R, como en los grupos que se alimentaron con ácido maslínico. El páncreas exocrino o hepatopáncreas se dispone en acinos pancreáticos, separados del parénquima hepático por una fina capa de tejido conjuntivo. Las células pancreáticas se organizan en torno a una rama de la vena porta, separados por una membrana basal y fibras reticulares.

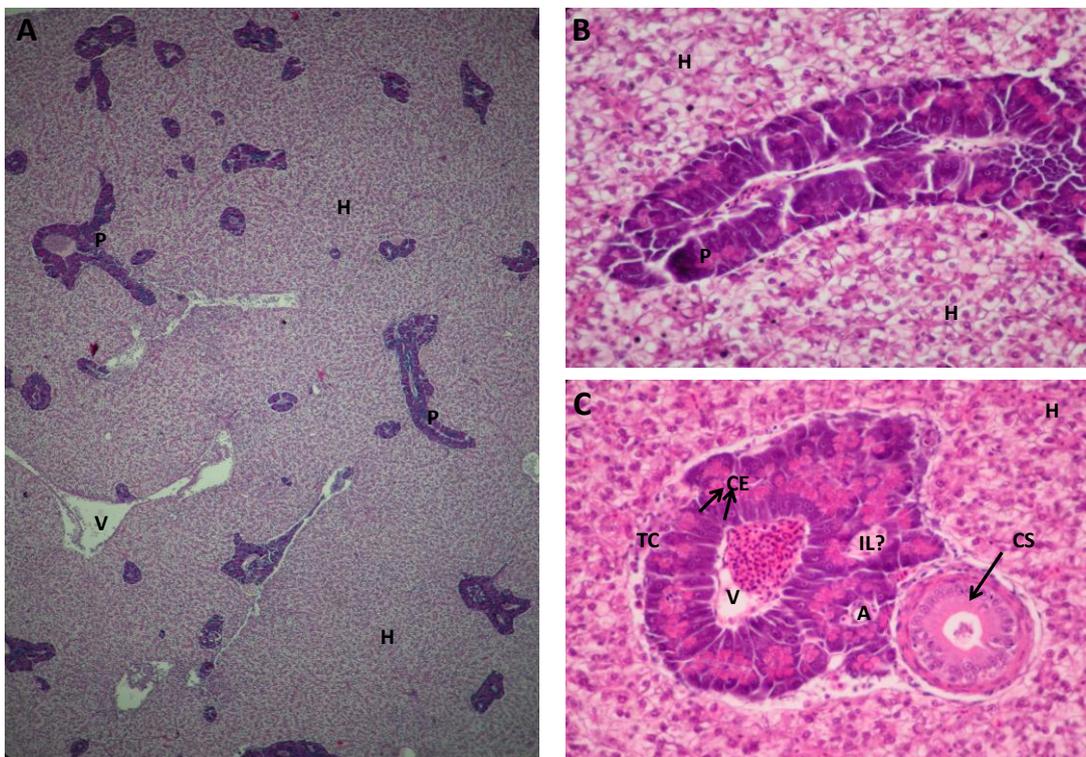
Las células del hepatopáncreas presentan una disposición particular, de tal manera que existen dos capas de células enfrentadas, las células de zona interior en contacto con la membrana basal de la vena, mientras que las de la zona más externa están en contacto con la capa externa de tejido



conjuntivo; en medio de ambas, un canalículo. Las células exocrinas son altas y columnares, con un núcleo esférico.

En la **Figura 3.47** se detalla la estructura del hepatopáncreas que encontramos en el hígado de todos los grupos experimentales de doradas. En el panel A (10X) se observa el parénquima hepático con las incrustaciones de páncreas exocrino o hepatopáncreas, se aprecia perfectamente como las células pancreáticas se infiltran entre los sinusoides hepáticos. En el panel B (40X), se aprecia detalladamente, a más aumento, la estructura del hepatopáncreas; y en el panel C (40X), un corte transversal del mismo.

En la sección transversal del hepatopáncreas se visualizan las dos capas de células que lo constituyen, entre ambas debe existir un canalículo que se aprecia débilmente. La capa de células más interna descansa sobre la membrana basal de la vena porta. Se observa, también, entre las células, una arteriola, y una masa de células endocrinas que podrían asemejarse al islote de Langerhans existente en mamíferos. A su vez, un conducto de secreción relacionado con la eliminación de productos de secreción, propiamente dichos, del páncreas.



**Figura 3.47.** Estructura a microscopio óptico del hepatopáncreas. H-E. Panel A: 10X. Paneles B y C: 40X. Se muestran las infiltraciones de páncreas entre los hepatocitos y la estructura histológica del hepatopáncreas en corte transversal (panel C). H: hepatocitos; P: páncreas; V: vena; A: arteriola. IL: islote de Langerhans; CS: conducto de secreción; TC: tejido conjuntivo; CE: células exocrinas.

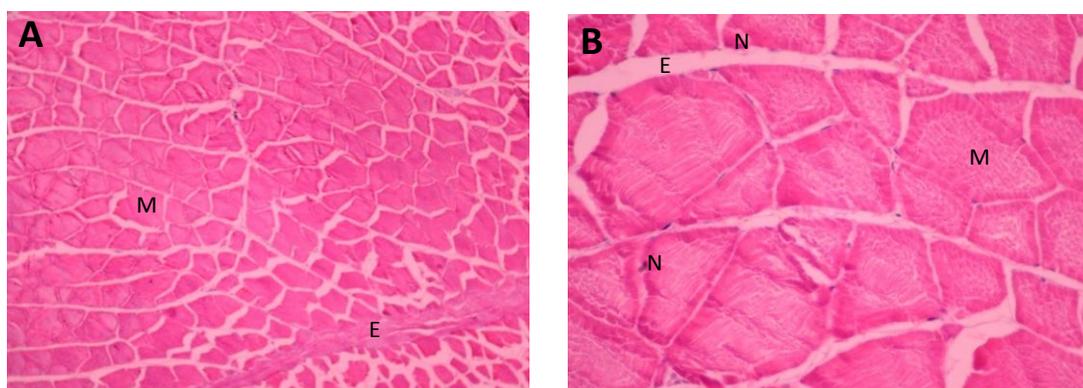


La importancia del tejido muscular como almacenamiento de proteínas, y su implicación en los procesos de crecimiento nos llevó a estudiar la estructura de este tejido a microscopía óptica. El procedimiento empleado fue igual que para el caso del hígado.

En la **Figura 3.48** se muestra un corte transversal a dos aumentos diferentes, 10X (panel A) y 40X (panel B) del tejido muscular en las doradas. Las imágenes que obtuvimos para los diferentes grupos experimentales no mostraron diferencia alguna a microscopio óptico en la musculatura de las doradas objeto de estudio, es por ello por lo que representamos dos imágenes, una correspondiente a un grupo control (panel A) y otra a un grupo alimentado con ácido maslínico (panel B) como modelos para describir el tejido muscular en las doradas ensayadas.

Se aprecia que las células musculares o miocitos son de diferente tamaño y están muy vascularizadas. El núcleo de las mismas aparece bien teñido y en el interior de los miocitos se distinguen las miofibrillas (M). Las miofibrillas contienen proteínas contráctiles, actina y miosina, que a estos aumentos no se aprecian. Estas proteínas o filamentos están ordenados en forma alterna muy característica, haciendo que el músculo parezca estriado en una observación microscópica.

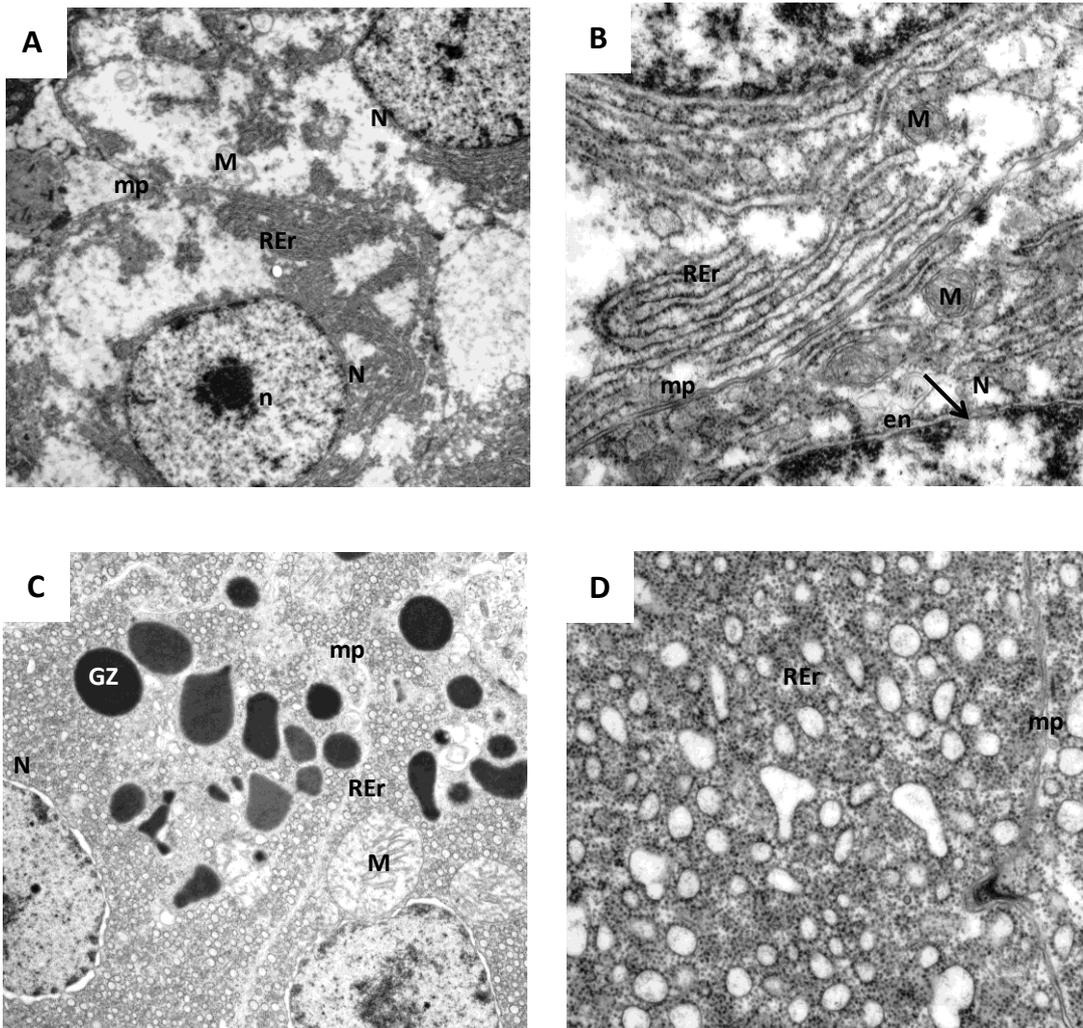
El tejido conjuntivo que envuelve las distintas células musculares o endomisio (E) es muy aparente y está constituido por una lámina basal y fibras reticulares. Se observa, a su vez, los vasos sanguíneos cuyo interior se encuentra rodeado de endotelio, así como los núcleos aplanados de estas células endoteliales. Del sarcoplasma sólo se distingue la gran cantidad de miofibrillas y el núcleo, no apreciándose los granos de glucógeno y mitocondrias a estos aumentos.



**Figura 3.48.** Músculo estriado esquelético a microscopía óptica en sección transversal. Se observan perfiles de diferente tamaño correspondientes a células musculares. H-E. Panel A: 10X; panel B: 40 X. M: miofibrillas; N: núcleos; E: endomisio.

### 3.7.2. Análisis histológico por microscopía electrónica de transmisión

Para estudiar la ultraestructura del hígado y músculo blanco se emplearon técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta técnica presenta una resolución mayor y más aumentos que la microscopía óptica, pudiéndose observar las células con mayor detalle. La **Figura 3.49** muestra cuatro imágenes correspondientes a los hígados de doradas alimentadas con la dieta control AL. En el panel A (4400X), se observa el detalle de dos hepatocitos con su citoplasma y su núcleo, incluso se aprecia la membrana plasmática de ambos.



**Figura 3.49.** Ultraestructura a microscopía electrónica de transmisión (MET) del hígado de dorada alimentada con dieta control AL. Panel A: 4400X; panel B: 20000X; panel C: 7000X; panel D: 20000X. En los paneles A y B se observa los componentes citoplasmáticos y nucleares del hígado, mientras que en los paneles C y D observamos secciones de infiltraciones de hepatopáncreas en el parénquima hepático de las doradas. M: mitocondrias; N: núcleo; n: nucléolo; en: envoltura nuclear; REr: retículo endoplasmático rugoso; GZ: gránulos de zimógeno; mp: membrana plasmática.



El núcleo (N) de estas células presenta un tamaño normal, es eucromático y se distingue perfectamente el nucleolo (n) con una disposición central. Además, si nos fijamos detenidamente, se observa tanto la envoltura nuclear (en), como los poros nucleares (flecha). En el citoplasma se observa, retículo endoplasmático rugoso (REr) asociado a ribosomas y mitocondrias de un tamaño mediano (M). El aparato de Golgi (AG) y gránulos de glucógeno no se hacen muy patentes en estas imágenes.

En el panel B (20000X) se detalla otra sección hepática a más aumentos en donde se visualizan los orgánulos citoplasmáticos y nucleares de los hepatocitos que hemos comentado anteriormente. Los paneles C (7000X) y D (20000X) corresponden a zonas de páncreas exocrino o hepatopáncreas en el hígado de las doradas.

En el panel C se ven perfectamente los gránulos de zimógeno (gz) que se corresponden con gránulos de secreción y son acumuladores en su interior de enzimas digestivas. En el panel D aparecen las cisternas dilatadas correspondientes al REr del páncreas exocrino.

De este modo, y de una manera general el hígado de las doradas controles AL se corresponde con lo que se ha visto a microscopio óptico y con lo descrito en teleósteos, siendo el tamaño, número y aparición de orgánulos celulares los típicos en una o unas células hepáticas.

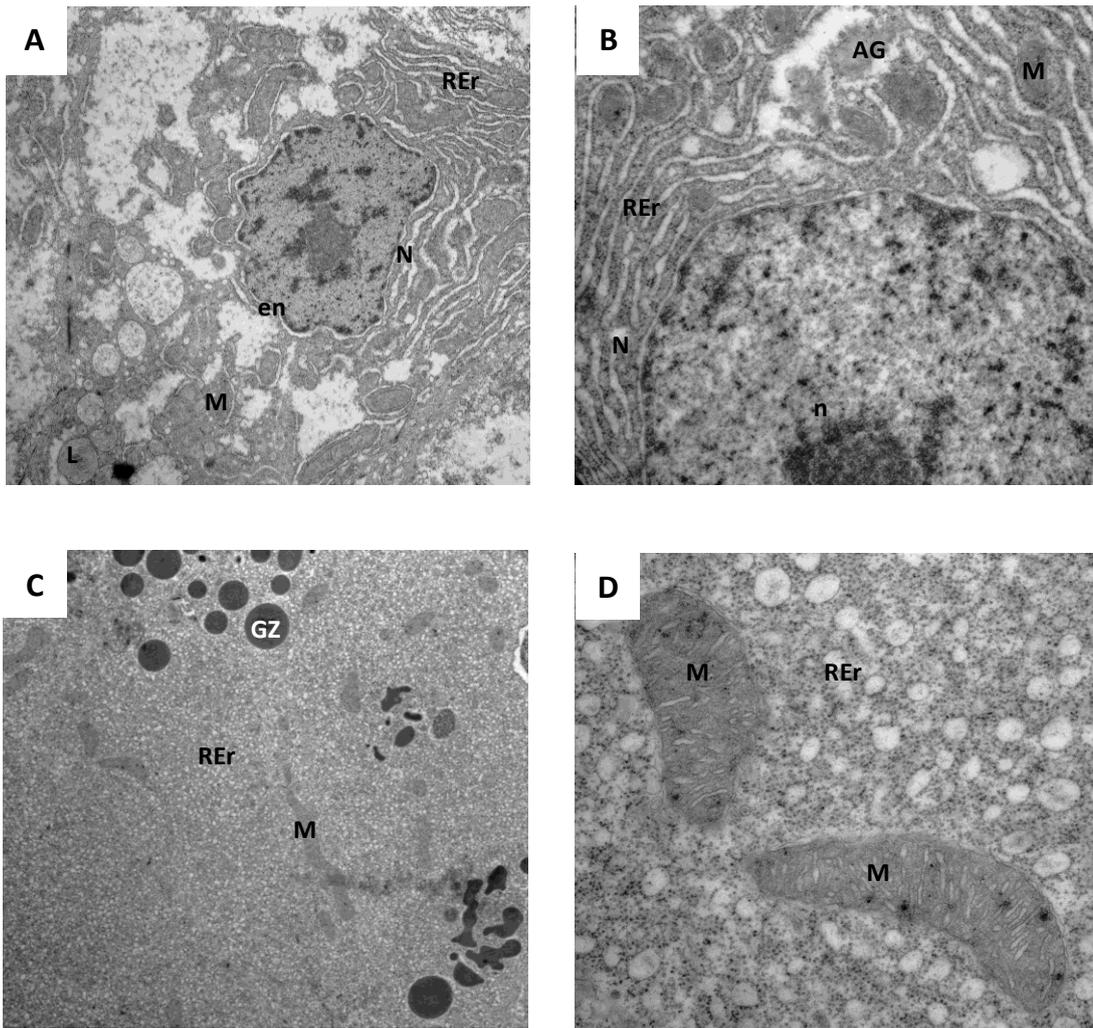
La **Figura 3.50** muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión correspondientes a secciones de hígado de doradas alimentadas con la dieta AM<sub>100</sub> AL. En los paneles A (4400X) y B (12000X) se muestra detalladamente parte del hepatocito, en el que se distingue su citoplasma y núcleo.

Al igual que ocurría en el grupo control AL, el núcleo de las doradas alimentadas con dieta AM<sub>100</sub> AL es prominente, eucromático y en él se puede visualizar el nucleolo, la envoltura nuclear y los poros nucleares. En el interior del citoplasma aparecen los orgánulos típicos: REr abundante y vesiculado, mitocondrias, aparato de Golgi (AG), e incluso lisosomas.

Los paneles C (3000X) y D (20000X) se corresponden con infiltraciones de páncreas en el parénquima hepático, hepatopáncreas. Se aprecian abundantes mitocondrias de tamaño normal, gránulos de zimógeno y una gran extensión de túbulos de REr rodeados de ribosomas.

Las diferencias que se encontraron con respecto a la situación control AL, son que los hepatocitos, al igual que se apreciaba a microscopía óptica son algo más pequeños y están más unidos, haciendo que el parénquima esté más compacto.

La grasa en ambas situaciones, no se manifiesta en forma de vacuola, sino más bien dispersa por el citoplasma del hepatocito. En el grupo AM<sub>100</sub> AL aparecen unos lisosomas secundarios con estructuras membranosas en su interior, que se distinguen de los que aparecen en el grupo control AL.

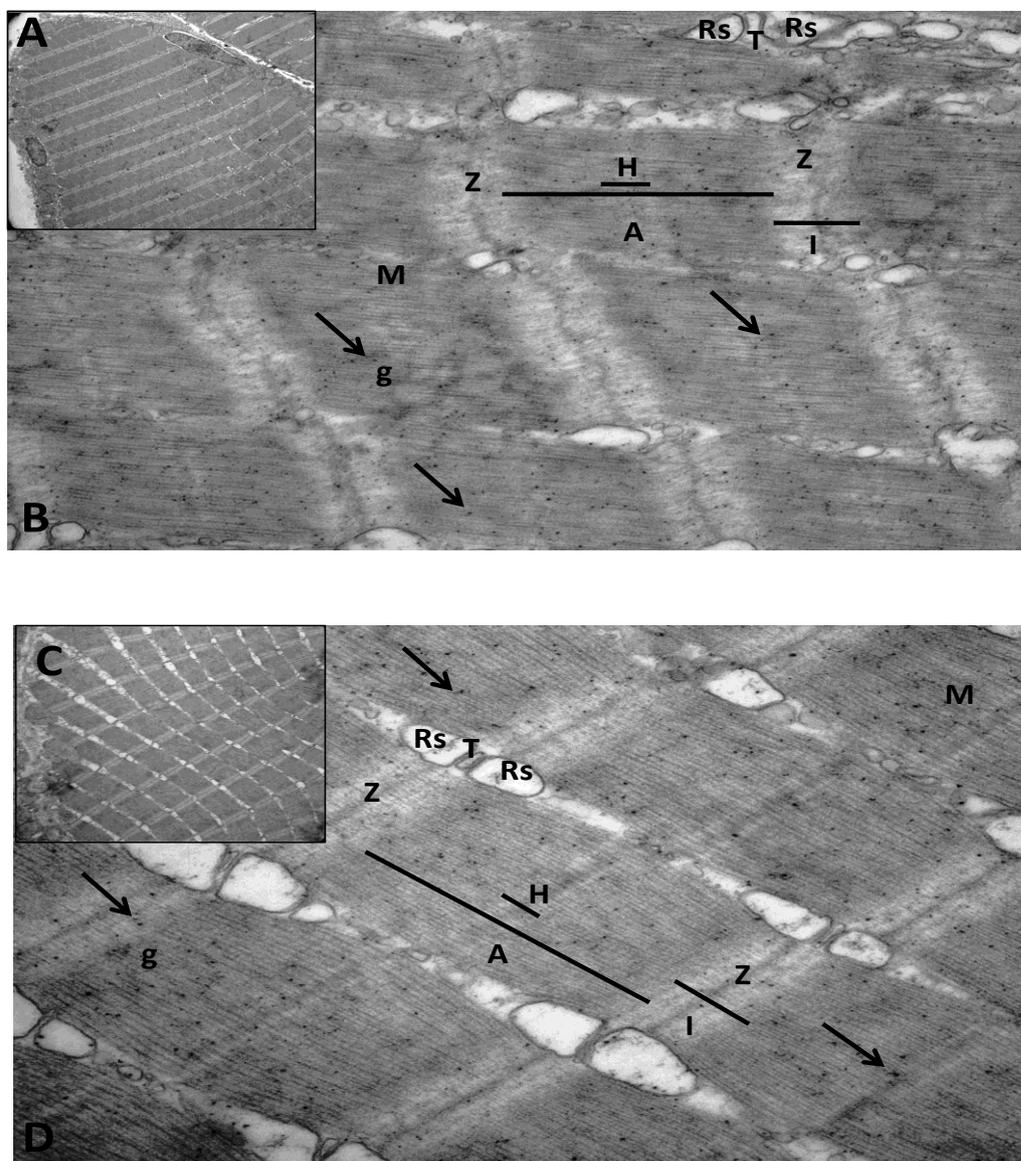


**Figura 3.50.** Ultraestructura a microscopía electrónica de transmisión (MET) del hígado de dorada alimentada con dieta AM<sub>100</sub> AL. Panel A: 4400X; panel B: 12000X; panel C: 3000X; panel D: 20000X. En los paneles A y B se observa los componentes citoplasmáticos y nucleares del hígado, mientras que en los paneles C y D observamos secciones de infiltraciones de hepatopáncreas en el parénquima hepático de las doradas. M: mitocondrias; N: núcleo; n: nucléolo; en: envoltura nuclear; REr: retículo endoplasmático rugoso; GZ: gránulos de zimógeno; mp: membrana plasmática.

Por otro lado, se analizó a su vez, la ultraestructura del músculo a MET en las situaciones control AL y AM<sub>100</sub> AL. Los resultados que encontramos se muestran en la **Figura 3.51**. En ella se puede observar la estructura típica de la unidad anatómica y funcional o sarcómero que forman el músculo. En ambas situaciones, control AL y AM<sub>100</sub> AL, el sarcómero se encuentra bien definido, apreciándose todas sus bandas y líneas que constituyen el sarcómero. Una unidad de sarcómero se encuentra limitado por 2 líneas Z en donde se encuentra una zona A (anisótropa) y una zona I (isótropa). En la banda I del sarcómero pueden distinguirse los filamentos de actina y en la banda A,



se encuentra los filamentos de miosina que son las responsables de la contracción muscular. En el músculo, también podemos observar tríadas; una tríada es una combinación de tres componentes intracelulares: una invaginación del sarcolema llamada túbulo T (T) en medio de dos cisternas terminales de retículo endoplasmático liso (REI) o retículo sarcoplasmático (Rs) de la fibra muscular.



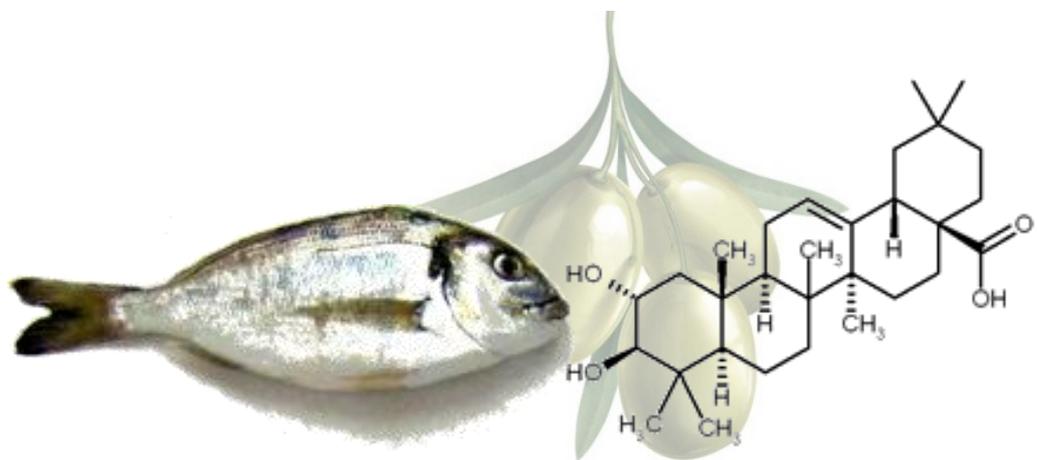
**Figura 3.51.** Ultraestructura a microscopía electrónica de transmisión (MET) del músculo de dorada alimentada con dieta control y AM<sub>100</sub> AL. Panel A: 3000X; panel B: 12000X; panel C: 7000X; panel D: 20000X. En los paneles A y B se observa la estructura del músculo en las doradas controles AL, mientras que en los paneles C y D observamos la estructura muscular de las doradas AM<sub>100</sub> AL. M: miofibrillas; A: banda anisotrópica; I: banda isotrópica; Z: línea Z; H: banda H; T: túbulos T; Rs: retículo sarcoplasmático; g: granos de glucógeno (flechas).



A, su vez, se observan las miofibrillas musculares estrechamente unidas unas a otras en el grupo control AL y algo más dilatadas en el grupo AM<sub>100</sub> AL. Finalmente, la resolución que nos ofrece la microscopía electrónica nos permite observar los granos de glucógeno (g) que eran inobservables a microscopía óptica. En ambos tratamientos, estos gránulos aparecen dispersos por todo el citoplasma muscular o sarcoplasma.

# Discusión

---







## 4. Discusión

### 4.1. Efecto del ácido maslínico y restricción del alimento sobre la utilización de la dieta y crecimiento de las doradas

Es indudable que para un óptimo crecimiento, todos los animales precisan del consumo de una dieta equilibrada que aporte todos los nutrientes necesarios para el desarrollo y para el mantenimiento de sus funciones vitales (Cowey, 1979). En el caso de los peces dicha dieta debe ser rica en proteínas, las cuales deben constituir entre un 35% y un 50% del total de los componentes de la dieta.

Una parte importante de la proteína de la dieta (60-70%) es empleada para la obtención de energía y en el mantenimiento de las funciones vitales, mientras que un 30-40% es utilizada con fines estructurales. Los lípidos de la dieta, juegan un papel, también, fundamental en la alimentación de los peces, como fuente de ácidos grasos esenciales y para la obtención de energía. En cuanto a los hidratos de carbono, a pesar de no constituir una fuente de energía relevante para los peces, y no ser nutrientes esenciales, deben incluirse en la dieta, puesto que la glucosa es el combustible principal para determinados tejidos como el sistema nervioso, glóbulos rojos y gónadas funcionales, y, en menor medida, en músculo.

La dieta empleada en este trabajo de investigación, además de tener los niveles de proteína, lípidos y carbohidratos adecuados, contiene también correctores vitamínicos y minerales proporcionando, en su conjunto, todos los nutrientes necesarios para el funcionamiento de la maquinaria metabólica de los peces, para mantener el rango de crecimiento óptimo.

La ingesta media de los grupos experimentales que no fueron sometidos a la restricción de alimento fue 1,13 y 1,23 g dieta/100 g pez/día, adicionado o no de ácido maslínico respectivamente, se mantuvo dentro de márgenes aceptables. Doradas de mayor tamaño (130 g), alimentadas de forma manual y automática libre o modulada, presentaron valores de ingesta de 1,2 (manual) y 1,1 g/100g pez/día (automática), en condiciones de temperatura (25°C) y fotoperiodo (Luz:Oscuridad; L:O) (12L:12O) constantes (Velázquez et al., 2006b).

Cuando se simulan condiciones de invierno (17°C, 9L:15O) y verano (26°C, 12L:12O), la ingesta voluntaria media, de doradas de unos 100g de peso medio, fue de 0,6 y 1,4 g/100g pez/día, respectivamente, lo que pone de manifiesto la influencia de las condiciones ambientales sobre la ingesta (Velázquez et al., 2006a). La temperatura media de nuestro experimento fue de 17 °C y la ingesta media del 1,1% que es sensiblemente mayor que la registrada por Velázquez et al. (2006a) a esta misma temperatura (0,6%) mantenida constante durante 100 días.



Como era de esperar, la temperatura afectó a la ingesta de los animales a lo largo del experimento. Cuando las doradas tenían 22,6 g de peso medio tuvieron una ingesta del 1,32% a 15 °C de temperatura media, mientras que las doradas de 12 g presentaron una ingesta del 2,44% a 20,2°C de temperatura. Este efecto de la temperatura, aumentando la cantidad de alimento ingerido al aumentar la temperatura, se ha observado en todas las especies de peces (Jobling, 1988; Velázquez et al., 2006a) (Figura 4.1). Así, por ejemplo, en la dorada, Sierra (1995) observó esa relación estrecha y directa entre temperatura e ingesta, con independencia de la composición de la dieta

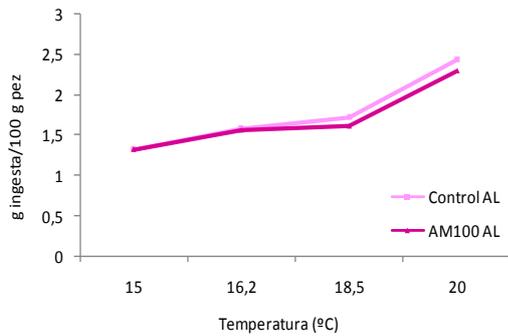


Figura 4.1. Relación entre la ingesta (g/100 g pez) y la temperatura (°C) de los grupos control AL y AM<sub>100</sub> AL en distintos periodos del ensayo experimental.

Cuando se calcula el coeficiente de crecimiento térmico (CCT), una forma de expresar la tasa crecimiento para temperaturas cambiantes, que se utiliza mucho en los modelos de crecimiento de la acuicultura intensiva (Querellou, 1984), el único grupo experimental que se destacó significativamente, con un aumento de peso, fue el que ingirió la dieta *ad libitum* adicionada de ácido maslínico (AM<sub>100</sub> AL).

El tamaño de los animales también afecta a la ingesta relativa (%) de alimento aunque de forma menos marcada. A lo largo de los casi 7 meses que duraron los ensayos se manifestó esa influencia de la edad/peso sobre la ingesta tal como se indica gráfica y matemáticamente en la Figura 4.2 para los grupos que ingieren dieta *ad libitum*. El ajuste hubiera sido aún mejor si la temperatura se hubiera mantenido constante a lo largo del periodo experimental; de hecho, ya hemos comentado la influencia de la temperatura sobre la ingesta.

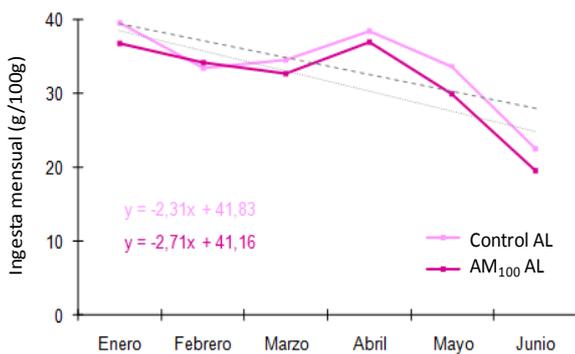


Figura 4.2. Evolución mensual de la ingesta de los grupos control AL y AM<sub>100</sub> AL a lo largo del ensayo experimental. Se observa que a medida que transcurre el tiempo, disminuye la ingesta.



Las necesidades proteicas y energéticas disminuyen con la edad, como consecuencia de la menor tasa de síntesis y retención proteica para crecimiento (Peragón et al., 2000) que, a su vez, se asocia con cambios de naturaleza endocrina. Además, cuando la ingesta individual se pudo controlar rigurosamente, se observó que la cantidad de alimento ingerido se correlacionaba positivamente con la relación RNA/proteína, la tasa de crecimiento y las velocidades fraccionales de síntesis y degradación proteica muscular (Houlihan et al., 1988; Houlihan et al., 1989).

La dorada, entre 1 y 3 años, experimenta una progresiva disminución de la velocidad de crecimiento, asociada a la disminución de GH circulante así como de GH y RNA mensajero-GH hipofisarios (Martí-Palanca, 1996; Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999).

Los índices de crecimiento, para dietas que cubren las necesidades de una determinada especie, aumentan al aumentar la ingesta de tal forma que la ganancia de peso es, sobre todo, consecuencia de un mayor aporte de proteína y energía. Sin embargo, el aumento de temperatura también estimula, y hasta ciertos límites, la actividad de distintas rutas metabólicas en los poiquiloterms como, por ejemplo, el recambio proteico tisular y la retención proteica para crecimiento (Fauconneau y Arnal, 1985).

Se ha sugerido que uno de los mecanismos responsables de la estimulación del crecimiento, con el aumento de temperatura, es la mayor liberación de hormona de crecimiento (Bjornsson et al., 1989), al menos en los salmónidos.

La duración de los ensayos fue suficientemente larga (210 días) como para detectar, con bastante precisión, los cambios inducidos, en las tasas de crecimiento y utilización de la dieta, por el régimen de alimentación (alimentación *ad libitum* o restringida) o la adición de ácido maslínico. La restricción de alimento, que en el cerdo resulta eficaz para que el efecto estimulante del ácido maslínico se manifieste de manera rentable (García-Granados, resultados no publicados), no ha sido suficiente como para establecer diferencias significativas entre los grupos experimentales control, pero sí entre estos y los que ingieren dieta restringida adicionada de ácido maslínico (**Tabla 3.2**), lo que vamos a utilizar con propósitos comparativos. Además, la ingesta absoluta y relativa de ácido maslínico (**Tabla 3.3**), con las ingesta establecidas, llegan a diferenciarse en tres dosis suficientemente distintas como para permitir, también, un análisis comparado.

El ácido maslínico indujo un aumento significativo del peso final, tanto en términos absolutos (g) como en g/día y porcentaje de aumento de peso, y este efecto se produjo con cierta independencia de la dosis y del régimen de alimentación.

Estudios previos, en la trucha arco-iris (Fernández-Navarro et al., 2006; Fernández-Navarro et al., 2008), han demostrado que el ácido maslínico estimula el crecimiento y la conversión del alimento y que, estos efectos sobre el crecimiento, se manifiestan también en parámetros propios del proceso como el aumento en los niveles de proteína, DNA y RNA o la mayor tasa fraccional ( $K_s$ ) y absoluta ( $A_s$ ) de síntesis proteica, aspectos que se discutirán más adelante.



Además, el crecimiento de la dorada, en los distintos grupos experimentales, se desarrolló de forma armónica como se pone de manifiesto por la falta de diferencias significativas entre los índices de nutrición o entre las relaciones hepato- y mio-somáticas (**Tabla 3.1**). Cuando la ganancia de peso se relaciona con la cantidad de alimento ingerido se obtienen los índices de conversión o utilización del alimento. En este sentido, el índice de eficacia alimentaria (EA: g ganados/g ingeridos) representa un índice práctico de calidad de la dieta para crecimiento y, hasta cierto punto, independiza el crecimiento de la cantidad de ingesta. Los resultados pusieron de manifiesto dos hechos complementarios: por una parte, la menor ingesta del grupo control restringido con respecto al grupo control *ad libitum*, se traduce en una mejor utilización de los nutrientes para crecimiento y el valor del índice es mayor y, por otra parte, el ácido maslínico aumenta la utilización de la dieta para crecimiento (EA), más claramente en los grupos sometidos a ingesta restringida.

De mayor interés, desde el punto de vista nutritivo, es la utilización de la proteína de la dieta para crecimiento ya que la proteína es la base estructural del crecimiento y al ácido maslínico lo estamos considerando como posible estimulante de este proceso. La inversión de la proteína de la dieta en peso, expresada por el coeficiente de eficacia de crecimiento (CEC: g ganados/g proteína ingerida), dio resultados paralelos al índice EA ya que la cantidad de proteína de las dietas experimentales fue la misma en todas ellas. El VPP, por otra parte, representa el porcentaje de la proteína de la dieta que se invierte en crecimiento, considerando a este como aumento de la retención de proteína por el animal.

El ácido maslínico aumentó la retención proteica, especialmente en los animales alimentados *ad libitum* donde se alcanzaron índices de retención de hasta el 48,4%, valores realmente elevados respecto a los obtenidos para peces en crecimiento activo en los que del 30 al 40% de los aminoácidos de la dieta son normalmente utilizados para crecimiento. En los animales con alimentación restringida el estímulo del crecimiento no llegó a ser significativo, en términos de retención de proteína (VPP) que también supero el 40%. Normalmente, para dietas de la misma composición, una ligera restricción de la ingesta debe favorecer la retención relativa de proteína, que es lo que ocurre entre los dos grupos control, pero no entre los que tienen ácido maslínico.

En relación a la composición corporal destaca la mayor concentración de proteína en los animales que ingieren maslínico. La mayor retención de proteína que se da en estos grupos de animales cursa con una disminución no significativa del contenido graso. Unos animales más magros pueden cubrir determinadas preferencias de los consumidores, al igual que ocurre con determinados animales de granja como el cerdo en el que la dieta con maslínico también induce el desarrollo de una carne magra (García-Granados, resultados no publicados). En cualquier caso, la composición corporal de las doradas (valores medios del 18,3% de proteína y 9,5% de grasa, en fresco), que no se modificó por cualquiera de los tratamientos, entra dentro de los valores normales de composición para individuos de la misma edad/peso. Con la edad, la dorada aumenta su contenido en grasa y proteína pasando de una media del 16% de proteína (en sustancia seca) y 7% de grasa a los 10 g de peso (Marcouli et al., 2006) a un 18,5-20% de proteína y 9-16% de grasa a los 200-450 g de peso (Grigorakis et al., 2005; Martínez-Llorens et al., 2009).



## 4.2. Recambio proteico y contenido en ácidos nucleicos del hígado y músculo blanco de la dorada

En la actualidad las propiedades biológicas y terapéuticas del ácido maslínico están siendo objeto de muchos estudios. Este compuesto natural presente en la aceituna y sus residuos se ha usado para tratar diversas patologías como las causadas por parásitos del género *Cryptosporidium* (García-Granados, 1988b) o las causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (Xu et al., 1996, García Granados, 1998c, Vlietinck et al., 1998).

También se ha demostrado que el ácido maslínico puede actuar como un supresor de tumores de colon induciendo apoptosis selectiva en líneas de células tumorales por activación de la caspasa-3 en un mecanismo independiente de p53 (Reyes et al. 2006). Además el ácido maslínico puede suprimir el estrés oxidativo y la producción de citoquinas (Márquez-Martín et al., 2006a; Rodríguez-Rodríguez et al., 2006) y constituye un nuevo inhibidor de la glucógeno fosforilasa (Wen et al., 2005, 2006).

### 4.2.1. Velocidad y naturaleza del crecimiento del hígado de doradas alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico

En trabajos realizados por nuestro grupo de investigación se ha demostrado recientemente que el ácido maslínico puede utilizarse como aditivo en la dieta de peces como la trucha (Fernández-Navarro et al., 2006, Fernández-Navarro et al., 2008). El ácido maslínico actúa como un factor que estimula la velocidad de crecimiento en el hígado de trucha. Este órgano es fundamental en la regulación del metabolismo energético en los peces, en la síntesis de proteínas exportables y en la regulación de los nutrientes que se destinan a otros tejidos.

En el presente trabajo se analiza el efecto de la alimentación con ácido maslínico sobre el crecimiento y recambio de proteínas en el hígado y músculo blanco de la dorada, una especie de agua salada con unas características y hábitats diferentes a la trucha. Este estudio se ha realizado en condiciones de piscifactoría lo cual hace que los resultados que se han obtenido sean mucho más aplicables y extrapolables a las condiciones reales de “producción industrial” de estos peces. Además de la alimentación a saciedad o *ad libitum* se ha estudiado también el efecto de la alimentación con una ración restringida al 1,5% del peso de la dorada.

La alimentación con una ración que aporta nutrientes y energía por debajo de los requerimientos óptimos para la obtención de un máximo aprovechamiento del alimento (crecimiento) tiene mucho interés por varias razones. La primera de ellas es que en estas condiciones de ración restringida la regulación de las diferentes rutas del metabolismo celular se “pone a prueba”. Es una situación en la que determinadas rutas estarán activadas y otras inhibidas con el objetivo de asegurar el abastecimiento de las funciones celulares básicas en una situación donde el aporte de nutrientes se encuentra ligeramente por debajo de los requerimientos para un crecimiento óptimo. En segundo lugar, los efectos de un compuesto capaz de influir sobre el



crecimiento celular serán más patentes en una situación en la que el aporte de nutrientes y energía se encuentra ligeramente restringido. En tercer lugar, combinando los efectos de la restricción de la ración y la adición de ácido maslínico se puede estudiar la posibilidad de que la adición de este nuevo elemento pueda contrarrestar los efectos de la restricción alimentaria.

Los resultados demuestran que la ingestión de ácido maslínico induce un incremento significativo en el peso del hígado, en el contenido total de RNA y en el contenido total de proteína tisular. Por lo que respecta a la naturaleza del crecimiento, la ingestión de ácido maslínico provoca un incremento en el contenido total de DNA índice de que se está produciendo un incremento en el número de células. No se observan cambios significativos en el tamaño de las células. Estos efectos son más patentes en el caso de la alimentación con ración restringida aunque prácticamente todos se producen también durante la alimentación *ad libitum*.

Estos resultados concuerdan con los descritos previamente en el hígado de trucha (Fernández-Navarro et al., 2008) y sugieren que la ingestión de ácido maslínico induce un incremento en la velocidad de división celular que sería responsable del mayor número de células detectado y en lo cual estaría basado el incremento de peso observado. Este incremento en los procesos de división celular estaría mantenido por una estimulación en la síntesis de DNA, RNA y proteínas.

#### **4.2.2. Velocidades de recambio de proteínas y contenido de ácidos nucleicos del hígado de dorada alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico**

Los valores obtenidos en este trabajo de velocidad fraccionaria de acumulación ( $K_G$ ,  $1,09 \pm 0,08$  % día<sup>-1</sup>), síntesis ( $K_S$ ,  $14,91 \pm 1,00$  % día<sup>-1</sup>) y degradación ( $K_D$ ,  $13,82 \pm 1,11$  % día<sup>-1</sup>) de proteínas en el hígado de doradas alimentadas *ad libitum* con dieta control son característicos con respecto a los obtenidos en otras especies de agua marina como el bacalao (Houlihan et al., 1988), o de agua dulce como la trucha (Peragón et al., 1998) en determinadas etapas de su desarrollo.

Las velocidades de recambio proteico, tanto síntesis como degradación, en la dorada alcanzan valores más altos que los de la trucha o el bacalao cuando se encuentran en determinadas etapas de desarrollo. En el caso de truchas en estado juvenil o adulto, la  $K_S$  alcanza unos valores alrededor del 8% día<sup>-1</sup> y la  $K_D$  de 4-6% día<sup>-1</sup> (Peragón et al., 1998). Los altos valores de  $K_S$  y  $K_D$  pueden explicarse considerando la etapa de desarrollo en la que se encuentran las doradas objeto de este estudio.

En un estudio previo realizado en truchas en el que se estudiaba el efecto del estado de desarrollo sobre las velocidades de recambio de proteínas en el hígado de trucha (Peragón et al., 1998) se puso de manifiesto la existencia de altos valores de  $K_S$  y  $K_D$  en etapas tempranas de desarrollo, en concreto en truchas alevines y juveniles de 7,4 y 43,5 g de peso corporal. En el caso de las truchas de 43,5 g de peso, los valores descritos de  $K_S$  y  $K_D$  fueron 15,94 y 12,26 %día<sup>-1</sup> respectivamente, valores similares a los descritos en este trabajo para doradas de 76,31 g de peso.



El hacer este estudio en doradas que se encuentran en etapas tempranas de desarrollo tiene su sentido pues se trata de las etapas en las cuales el crecimiento tisular se encuentra estimulado y son los momentos en los que cualquier elemento que influya sobre el crecimiento del organismo puede tener un mayor efecto.

Este trabajo junto al de Sierra, (1995) son los únicos realizados hasta la fecha en los que se ha determinado las velocidades de recambio de proteínas en el hígado y músculo blanco de la dorada (*Sparus aurata*). Ambos experimentos se han realizado en instalaciones de cultivo de peces de mar y en condiciones de fotoperiodo, flujo de agua y temperatura de piscifactoría, no de acuarios de laboratorio. Los valores de las velocidades de recambio proteico obtenidos en ambos trabajos son muy similares observándose en ambos casos relativamente altas velocidades de recambio de proteínas en el hígado de la dorada.

En nuestros resultados la alimentación a saciedad también influye, al menos en parte, de los altos valores observados de las velocidades de recambio de proteínas ya que en animales alimentados con ración restringida al 1,5% de la masa corporal, los valores de  $K_S$ ,  $K_D$  y  $C_S$  son significativamente menores a los alimentados *ad libitum*.

Por lo que respecta al resto de parámetros relacionados con las velocidades de recambio proteico ( $C_S$ ,  $K_{RNA}$ ,  $K_{DNA}$  y ERP) los valores de algunos de ellos en el hígado de dorada son relativamente altos (Fernández-Navarro et al., 2006). Los valores de  $C_S$  y  $K_{DNA}$ , al igual que ocurre con la  $K_S$ , son significativamente altos mientras que la  $K_{RNA}$  muestra unos valores parecidos a los observados en otros estudios (Fernández-Navarro et al., 2006). Esto indica que altas velocidades de síntesis de proteínas en el hígado de dorada se correlacionan con alta capacidad de síntesis no con cambios en la eficacia de traducción.

La eficacia de retención de proteínas (ERP) es significativamente inferior a la descrita para la trucha (Fernández-Navarro et al., 2006), lo cual está de acuerdo con los relativamente bajos valores de  $K_G$ . En definitiva, con una alimentación *ad libitum* con una dieta control, el hígado de la dorada de aproximadamente 66 g de peso se caracteriza por mostrar altas velocidades de recambio proteico, una relativamente baja eficacia de retención y acumulación de proteínas. La alimentación con una ración restringida produce unas velocidades de recambio proteico más bajas y una eficacia de retención y acumulación de proteínas similares a la observada con la alimentación *ad libitum*.

La alimentación durante 210 días con ácido maslínico produce un significativo incremento en los valores de  $K_S$ ,  $K_D$ ,  $C_S$ ,  $K_{RNA}$  y  $K_{DNA}$  mientras que los valores de  $K_G$  no se modifican y la ERP disminuye. En definitiva, el ácido maslínico provoca una estimulación de las velocidades de recambio de proteínas (síntesis y degradación) sin alterar la velocidad de acumulación de éstas. La concentración de RNA y la eficacia de traducción también incrementan. Estos incrementos soportan los incrementos descritos en la velocidad de síntesis de proteínas que llega a alcanzar valores de  $26,98 \pm 1,22$  y  $31,09 \pm 3,66$  % día<sup>-1</sup>.



El comportamiento de la  $K_G$  y ERP reflejan que el incremento en el recambio proteico no tiene como objetivo soportar un incremento en la velocidad de crecimiento o acumulación de proteínas de este tejido, sino aumentar la síntesis y exportación de proteínas desde el hígado al resto del pez. Los altos valores de concentración de RNA y DNA indican la existencia de un metabolismo activado de estas dos macromoléculas. El hígado es un tejido regulador responsable del mantenimiento de la homeostasis metabólica de muchos compuestos, de la síntesis de proteínas exportables que desempeñarán su función en otros destinos y responsable de la regulación de los niveles de combustibles y desechos celulares. El ácido maslínico estimula el recambio proteico en este tejido e incrementa los niveles de RNA y DNA.

En el caso de la alimentación con ración restringida, los incrementos observados en las doradas alimentadas con ácido maslínico son incluso mayores, llegando los valores de  $K_S$  y  $K_D$  casi a triplicar los valores controles e indicándonos que el metabolismo de las proteínas hepáticas se encuentra extraordinariamente estimulado por la ingestión de ácido maslínico.

#### **4.2.3. Velocidad y naturaleza del crecimiento del músculo blanco de las doradas alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico**

El músculo blanco es un tejido con una estructura, función y metabolismo diferente al hígado. Es el tejido que forma el almacén estructural del pez, tiene como principal función el desplazamiento y la locomoción de estos animales y su metabolismo se organiza con el objetivo de abastecer de energía química a la contracción muscular. En el caso de que el pez se vea sometido a largos periodos de inanición, las proteínas musculares pueden ser degradadas y actuar como “reserva de energía” para estos organismos. La velocidad de crecimiento de este tejido es muy parecida y determina la velocidad de crecimiento del animal completo y la naturaleza del crecimiento del tejido muscular se basa en procesos de generación de nuevas fibras musculares (reclutamiento de nuevas fibras) y de crecimiento de las fibras preexistentes.

Los resultados descritos en este trabajo muestran que la ingestión de ácido maslínico produjo un incremento de peso en el músculo blanco de las doradas alimentadas *ad libitum* y con ración restringida. También se observó un incremento en el contenido de proteína total y RNA total. En cuanto a la naturaleza del crecimiento, al igual que ocurre en el hígado, se observa un incremento en el contenido total de DNA (número de células) en las doradas alimentadas con ácido maslínico sin que se observen cambios en la relación proteína /DNA (tamaño de las células). En definitiva, el ácido maslínico estimula el crecimiento del músculo blanco de la dorada induciendo procesos de generación de nuevas células o fibras musculares. Resultados similares a éstos han sido descritos en el caso de la trucha arco iris (Fernández-Navarro et al., 2008).

En los trabajos de Weatherley y Gill (1984) en los que se analiza la dinámica de crecimiento del músculo blanco de la trucha, se describen cómo diferencias de crecimiento somático inducidas experimentalmente se encuentran estrechamente relacionadas con ajustes proporcionales de



procesos de hipertrofia y reclutamiento de nuevas fibras, de manera que para cada tamaño de pez se mantiene una distribución precisa de diámetros de fibras musculares.

Los procesos de hipertrofia de las células musculares predominan durante las etapas de crecimiento rápido, en particular, durante las primeras etapas del desarrollo, aunque en peces grandes, el reclutamiento de nuevas fibras es de mayor importancia (Weatherley, 1990; Kiessling et al., 1991; Peragón et al., 2001). Los efectos producidos por el ácido maslínico responden por tanto a este segundo patrón de crecimiento observado habitualmente en peces grandes.

#### **4.2.4. Velocidades de recambio de proteínas y contenido de ácidos nucleicos del músculo blanco de doradas alimentadas con dietas suplementadas con ácido maslínico**

En los peces, el músculo blanco es el tejido más grande y el principal sitio de acumulación de proteínas. Los aminoácidos derivados de su recambio se utilizan para sintetizar alrededor del 30% del total de proteínas corporales (Houlihan et al., 1988). Aunque su velocidad fraccionaria de síntesis proteica es la más baja de todos los tejidos, es el que acumula proteínas de forma más eficaz. En estudios realizados en el bacalao (*Gadus morhua*) se ha descrito la existencia de una clara relación entre la velocidad de síntesis de proteínas y la velocidad de crecimiento cuando este pez se alimenta con diferentes raciones de una misma dieta (Houlihan et al., 1988). Además otros estudios (Weatherley y Gill 1989, Peragón et al., 1998) demuestran que la velocidad de crecimiento de este tejido es muy similar a la del organismo completo y la evolución de éste determina el crecimiento y tamaño del pez.

Los valores de  $K_s$  descritos para el músculo blanco de dorada alimentadas *ad libitum* con una dieta control son de  $1,20 \pm 0,20 \text{ \% día}^{-1}$ . Estos valores están de acuerdo con los descritos en otras especies. No obstante también se observan que los valores de los otros parámetros relacionados ( $C_s$ ,  $K_{RNA}$  y  $K_{DNA}$ ) son significativamente superiores a los descritos en truchas en situaciones similares (Fernández-Navarro et al., 2008). La alimentación con una ración restringida provoca un incremento en la  $K_s$  y en la  $K_D$  que no se traduce en cambios en la  $K_G$ . Las velocidades absolutas siguen un comportamiento parecido al descrito para las velocidades fraccionarias. Es decir, la restricción de la ración induce un incremento en la velocidad de degradación de proteínas que para mantener la velocidad de acumulación es compensada con una mayor velocidad de síntesis.

La alimentación *ad libitum* con una dieta enriquecida en ácido maslínico (100 mg/kg) provoca un significativo incremento en las velocidades de recambio proteico, tanto fraccionarias ( $K_s$ ,  $K_D$ ) como absolutas ( $A_s$ ,  $A_D$ ) que se traducen en un incremento en la velocidad absoluta de acumulación de proteínas ( $A_G$ ) tisular que en definitiva es la responsable del mayor crecimiento en peso observado en estas doradas. Por el contrario la ingestión de ácido maslínico no produce cambios en la  $K_s$ ,  $K_D$  y  $K_G$  en los grupos alimentados con ración restringida al 1,5% de la masa corporal, aunque sí que varían  $A_G$  y  $A_s$ .



En definitiva, los mayores efectos de la alimentación con 100 mg/kg de ácido maslínico sobre el crecimiento y recambio proteico del músculo blanco de dorada se observan cuando se alimenta con una ración apropiada. En unas condiciones de aporte de nutrientes y energía óptimos, el ácido maslínico induce un incremento en las velocidades de crecimiento influyendo directamente sobre las velocidades de síntesis y degradación de proteínas del músculo blanco. Cuando el aporte de nutrientes y energía se encuentra, en cierta medida restringido, los efectos del ácido maslínico son menos evidentes ya que parte de la estimulación inducida se empleará para compensar la restricción alimenticia.

La dorada es una especie de un gran interés en la acuicultura en el Mediterráneo y otras áreas. La producción en piscifactorías de doradas se ha incrementado enormemente en la última década (FAO, 2000). Esta rápida expansión ha conducido a una disminución de los precios del mercado de esta valiosa especie. La disponibilidad de harina de pescado para la dieta de estos peces se está convirtiendo en un factor limitante (Tidwell y Allan, 2001) y los costes de alimentación se incrementan continuamente. Por ello, la investigación se está dirigiendo hacia la mejora de la práctica y la ración alimenticia. Se está investigando el efecto de la sustitución parcial de harina de pescado por proteínas de plantas y aceites (Francis et al., 2001; Watanabe, 2002), la optimización de la ración empleada (Velázquez et al., 2006) o el uso de aditivos alimentarios que mejoren el aprovechamiento de la dieta o de la proteína (Fernández-Navarro et al., 2006; Fernández-Navarro et al., 2008). Uno de esos posibles aditivos es el ácido maslínico. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la adición a la dieta de ácido maslínico junto con la restricción en el tamaño de la ración. Trabajos realizados en *Dicentrarchus labrax* ponen de manifiesto que pueden obtenerse, en determinadas circunstancias, altas eficiencias alimenticias con un acceso al alimento restringido (Azzaydi et al., 1998).



### **4.3. Influencia del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético y nivel de expresión de diferentes enzimas del metabolismo intermediario del hígado y músculo blanco de la dorada**

La mejor manera de profundizar bioquímicamente en el conocimiento de los diferentes fenómenos del crecimiento y desarrollo de los seres vivos, consiste en corroborar, mediante estudios moleculares, los principales elementos que forman parte de los procesos que los caracterizan. Uno de estos estudios consiste en determinar el comportamiento cinético y de expresión de un grupo de enzimas que podríamos calificar como auténticos marcadores moleculares del crecimiento. Es sabido que durante los periodos activos de crecimiento y proliferación celulares se ponen en marcha de forma específica una serie de procesos en los que se forzosamente se movilizan determinados compuestos, fundamentalmente aminoácidos y nucleótidos o, por otra parte, se necesitan de forma específica otros metabolitos tales como los equivalentes de reducción que son claves para entender cualquier proceso biosintético necesario para llevar a cabo cualquier tipo de desarrollo celular.

Existen dos formas conocidas y diferentes en las que se manifiesta el crecimiento, en una de ellas, cuando se lleva a cabo por fenómenos de hiperplasia celular, caracterizada por un aumento controlado del número de células y en donde se hace necesario un incremento del número de núcleos y por tanto de material nuclear, de un incremento de la cantidad total de proteína celular y, finalmente, de un aumento en la cantidad total de lípidos estructurales. La otra forma conocida de crecimiento se manifiesta por fenómenos de hipertrofia celular, que, al contrario del anterior, se caracteriza por un incremento en el tamaño de las células ya preexistentes y en el que predomina el aumento en las cantidades celulares de proteína y lípidos estructurales frente a una relativa constancia en el contenido nuclear.

Por tanto, se debe entender al crecimiento y proliferación celulares, cualquiera que sea el tipo que los caracterice, hiperplasia o hipertrofia o la combinación de ambos, como el resultado final de un aumento de masa orgánica total, considerada en mayor grado como proteína estructural, junto con un importante incremento en la biosíntesis de lípidos de membrana. Por todo ello, es lógico pensar en la extraordinaria importancia que durante el crecimiento celular presenta tanto el metabolismo de proteínas, como consecuencia de un continuo y constante recambio proteico en la que deben predominar las velocidades de síntesis y acumulación de proteínas, como en la necesidad de utilizar equivalentes de reducción durante los obligados procesos de síntesis, elongación e insaturación de los diferentes ácidos grasos que participan en la estructuras de los distintos lípidos que forman parte de las membranas celulares.

Los principales tejidos involucrados en el crecimiento de un organismo, en general, y, en particular, en el de los peces utilizados en este estudio, son el hígado y el músculo blanco. Cada uno de ellos con funciones, en relación con el crecimiento, perfectamente delimitadas. El tejido hepático constituye un órgano central en los procesos que juegan un papel importante en la homeostasis metabólica, siendo especialmente activo en la regulación del metabolismo energético del animal completo y, sobre todo, en la exportación de numerosos metabolitos manufacturados al resto de las



células de los tejidos periféricos. Como se sabe, este tejido constituye, el principal lugar donde tiene lugar la amoniogénesis, especialmente activa en situaciones celulares en donde existe un alto recambio proteico, la síntesis de ácidos grasos, punto de partida para la formación de lípidos de membrana y la gluconeogénesis a partir del esqueleto carbonado de los aminoácidos movilizados durante el crecimiento, necesaria para satisfacer de este combustible a aquellas células que viven prácticamente a expensas de este combustible energético. Debido a todo ello, este tejido está implicado en la regulación del crecimiento global de la dorada.

Por lo que respecta al músculo blanco, su papel en el crecimiento tanto en sentido positivo como negativo es, por varias razones, indudable. En primer lugar porque este tejido contribuye aproximadamente en un 65% de la masa total del pez, siendo por tanto el principal reservorio de las proteínas en los peces, de manera que los aminoácidos que se liberan durante el proceso de recambio proteico van a contribuir en más del 30% a la síntesis total de proteínas del animal completo (Fauconneau et al., 1985). En segundo lugar, porque se trata del tejido más sensible a los cambios de peso ya sea por acumulación de proteínas en situaciones de crecimiento, o por pérdida de las mismas en situaciones contrarias. De hecho, el músculo blanco contribuye en un 66% a la pérdida de proteínas del animal completo durante un periodo de ayuno prolongado (Barroso et al., 1998) con la consecuente disminución de más del 30% en el tamaño completo del animal, siendo especialmente importante la disminución de la concentración total de DNA, en más de un 68%, indicando una clara hipoplasia y, por tanto, de una reducción del número de células.

Por todo ello, y para el desarrollo del presente trabajo se han seleccionado y estudiado, tanto desde el punto de vista cinético como molecular a través de estudios de expresión, un grupo de enzimas claves pertenecientes a aquellos procesos metabólicos íntimamente implicados con los fenómenos de crecimiento y proliferación celulares, correspondientes al metabolismo proteico y lipídico del hígado y músculo blanco de la dorada bajo dos situaciones nutricionales que afectan claramente al crecimiento celular, una situación en la que los peces se alimentan *ad libitum*, lo que suponía una cantidad diaria de alimento, como media, del 2% del peso del animal ya que se alimentaban a saciedad; y otra situación de restricción alimentaria controlada, en la que se restringía la dieta diaria al 1,5% del peso del animal.

Los enzimas marcadores de crecimiento finalmente elegidos corresponden a los cuatro principales sistemas de producción de equivalentes de reducción en forma de NADPH, tales como las dos deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), junto con el enzima málico (EM) y la isocitrato deshidrogenasa NADP<sup>+</sup> dependiente (IDH-NADP<sup>+</sup>), junto con otros tres enzimas representativos del metabolismo de proteínas una que cataliza una reacción de desaminación como la serina deshidratasa (Ser-DH), y dos más que catalizan dos reacciones de transaminación, una correspondiente a la de un aminoácido no esencial tal como la alanina aminotransferasa (Ala-AT), cuyo sustrato constituye el metabolito gluconeogénico más importante en el principal caso de integración metabólica entre el tejido hepático y muscular (ciclo de la alanina); y la otra, que utiliza un aminoácido esencial, como la



tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) y cuyo sustrato constituye un extraordinario ejemplo de función precursora básica para la funcionalidad y regulación metabólicas.

En este trabajo, demostramos, claramente, un incremento significativo del crecimiento y del recambio proteico de la dorada alimentadas a saciedad con dietas suplementadas con ácido maslínico, mientras que, este mismo compuesto, era capaz de compensar los efectos, negativos respecto al crecimiento, que supone someter a los peces a una restricción alimentaria. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha consistido en evaluar bioquímicamente la participación de este triterpeno natural en los cambios del crecimiento de estos animales mediante su relación con el comportamiento cinético de algunos de los enzimas que actúan como marcadores del crecimiento y proliferación celulares. Estos estudios se han llevado a cabo en los dos tejidos que mencionamos anteriormente y los resultados obtenidos están de acuerdo con la naturaleza de cada uno de ellos en relación con el crecimiento y con el metabolismo celular de cada tejido.

En todos los casos, enzimas, tejidos y situaciones nutricionales, se realizó un completo estudio cinético, caracterizando los principales parámetros que definen su actividad. Además, y con objetivo de confirmar los resultados cinéticos, se llevaron a cabo estudios de expresión en la mayor parte de estos enzimas. De esta forma, y de acuerdo con la disponibilidad de los anticuerpos específicos para cada una de los enzimas, se analizaron los niveles de expresión de la G6PDH, EM e IDH-NADP<sup>+</sup> de hígado y músculo blanco de dorada, tanto en situación *ad libitum* como en restricción calórica, como representantes de los diferentes sistemas de producción de NADPH y los de la Ser-DH y Ala-AT en los mismos tejidos y las mismas condiciones nutricionales, como representantes del metabolismo proteico.

#### **4.3.1. Sistemas de producción de equivalentes de reducción del hígado y músculo blanco de la dorada**

Los dos principales factores metabólicos relacionados con los procesos de crecimiento y proliferación celulares lo constituyen, por una parte, la disponibilidad continua y constante de equivalentes de reducción en forma de NADPH, y por otra, el suministro, también continuo y constante, de un nivel adecuado de ribosa 5-fosfato (Rib5P) necesaria para generar el conjunto de nucleótidos (ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos) necesarios, a su vez, para satisfacer el metabolismo de ácidos nucleicos durante las diferentes fases del ciclo celular. El proceso metabólico que asegura los niveles de ambos factores lo constituye el ciclo de las pentosas fosfato (CPP), cuyo papel central en el metabolismo y su carácter multifuncional se refleja en la **Figura 4.3**.

El conjunto de moléculas de NADPH, como uno de los productos finales del CPP, es debido, tanto a la actividad de la G6PDH y 6PGDH como a la de los otros dos sistemas de producción de equivalentes de reducción, EM e IDH-NADP<sup>+</sup>, y va a ser indispensable para el desarrollo de un importante número de procesos metabólicos claves en el mantenimiento de un estado estacionario celular, necesario para justificar la existencia de un trabajo químico que permita la vida de la célula. Cabe destacar, entre estos procesos, su participación en la mayoría de procesos biosintéticos, como



la biosíntesis de colesterol y sus derivados y la biosíntesis, elongación e insaturación de ácidos grasos, todos ellos implicados, entre otros, en la formación de elementos de membrana.

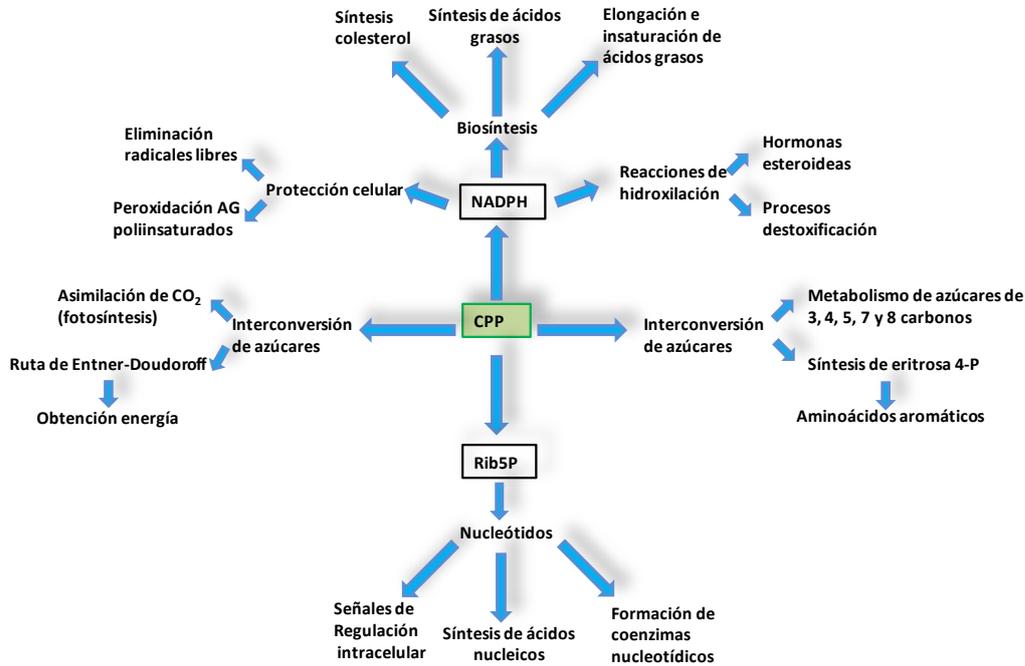


Figura 4.3. Multifuncionalidad del ciclo de las pentosas fosfato (CPP).

También participan en prácticamente todas las reacciones de hidroxilación a través de la actividad de las hidroxilasas microsomales y en los procesos de protección celular por medio de la destoxificación y eliminación de radicales libres gracias a su participación en sistemas tales como glutatión reductasa/peroxidasa, óxido nítrico sintasa, etc. (Eggleston y Krebs, 1974; Orrenhius et al., 1983; Barroso et al., 1999; Barroso et al., 2000).

Si a esto unimos el hecho de la participación directa y necesaria del NADPH en la reacción de reducción de los ribonucleótidos para formar desoxirribosa, catalizada por la ribonucleótido reductasa, durante la fase S del ciclo celular, podemos deducir que la producción celular de NADPH está íntimamente relacionada con el crecimiento celular, y, por tanto, con el del organismo completo, siendo éste uno de los objetivos más interesantes del campo de la acuicultura, al relacionarse directamente con la producción animal y por consiguiente con la rentabilidad comercial.

Cuando bajo cualquier situación metabólica, la célula necesita utilizar las moléculas de NADPH con el objetivo de satisfacer cualquiera de sus funciones, ésta, utiliza las disponibles en, lo que podríamos denominar, almacén celular de estos equivalentes de reducción. Sin embargo, existe una



cierta dirección en su utilización, dependiendo del sistema de producción empleado. Así, un 50%, aproximadamente, de las necesidades de NADPH en la síntesis, elongación e insaturación de ácidos grasos y en la síntesis de colesterol y las hidroxilaciones posteriores procede de las actividades G6PDH y 6PGDH, lo que exige una perfecta integración con el metabolismo de hidratos de carbono, y el otro 50% necesario procede de la actividad del EM como consecuencia de transportar las moléculas de Acetil CoA desde la mitocondria hasta el citosol a través de la lanzadera del citrato. Por otra parte, el resto de las necesidades de NADPH necesarias para cumplir otros requisitos relacionados con los procesos de crecimiento y proliferación, como los correspondientes al metabolismo de nucleótidos, proceden fundamentalmente de la actividad del CPP y de la IDH-NADP<sup>+</sup>.

Anteriormente, nuestro grupo había puesto de manifiesto un importante efecto estimulante del ácido maslínico sobre el crecimiento y recambio proteico del hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) bajo diferentes condiciones celulares, gracias a su efecto como inhibidor de proteasas (Fernández-Navarro et al., 2006; Fernández-Navarro et al., 2008). Además, nuestro grupo ha podido demostrar, por otra parte, que el ácido maslínico inhibe el crecimiento de células cancerígenas estimulando específicamente los fenómenos de apoptosis celular (Reyes et al., 2006; Reyes-Zurita et al., 2009a; Reyes-Zurita et al., 2009b). En resumen, hemos podido demostrar que este triterpeno natural es capaz de incrementar específicamente el crecimiento de células normales e inhibir selectivamente el crecimiento patológico de células cancerígenas.

#### **4.3.1.1. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa del hígado y músculo blanco de la dorada**

Uno de los sistemas de producción de NADPH estudiados corresponde a la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa hepática (G6PDH). Nuestros resultados muestran un aumento significativo de la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) del enzima producido por el ácido maslínico, tanto en animales alimentados a saciedad como los alimentados a restricción, sin que se altere la constante de Michaelis ( $K_m$ ) del enzima por la G6P. Por ello, es lógico que aumente proporcionalmente la eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) sin que se altere la razón de actividad ( $V_{ss}/V_{max}$ ).

Estos resultados se confirman con los obtenidos en los niveles de expresión del enzima ya que en las doradas AM<sub>100</sub> AL fue casi un 100% superior a los del control AL. Utilizando un anticuerpo policlonal anti-G6PDH de conejo se ha detectado la presencia de proteína inmunorreactiva en muestras de hígado y músculo blanco de dorada. La banda inmunorreactiva resultante correspondiente a esta proteína presentó una masa molecular aparente de 60 kDa en el caso del hígado, y de 70 kDa en músculo blanco. Las diferencias encontradas en los pesos moleculares de ambos tejidos, puede atribuirse a que son tejidos diferentes. En ambos tejidos, el ácido maslínico tuvo un efecto claro produciendo una expresión de este enzima, confirmando de este modo, los resultados obtenidos de actividad enzimática anteriores.

Esta enzima ha sido ampliamente estudiada en numerosas especies, y se han obtenido resultados de banda inmunorreactiva tanto para la proteína dimérica, de un peso molecular aparente 97kDa como se encontró en hígado de trucha (Barroso et al., 1998); como para la proteína



monomérica de 60 kDa de peso molecular cada uno de ellos, como se observó en el pez gato (Seddon et al., 1997) y en el caracol español (Rammanan et al., 2006). Estos últimos resultados se asemejan más a los encontrados en hígado y músculo blanco de la dorada en el presente trabajo.

En relación con la situación de restricción calórica es necesario destacar que ésta produjo un aumento en la  $K_m$  respecto a la situación *ad libitum* sin que el ácido maslínico alterase este valor. Sin embargo, si aumentó los niveles de expresión del enzima en algo más del 200% cuando se comparan los del grupo AM<sub>100</sub> R respecto a los de los controles.

Teniendo en cuenta que se han determinado, en el estado estacionario de cada una de las situaciones estudiadas, las concentraciones celulares de los diferentes metabolitos que actúan de sustratos de tres de los enzimas productores de NADPH, y que se conocen los parámetros cinéticos de estos enzimas, se pueden determinar las velocidades enzimáticas celulares responsables del flujo del proceso en el que intervienen en cada una de estas condiciones experimentales.

Los resultados de la **Tabla 4.1** muestran las velocidades de la G6PDH del hígado de la dorada en las cuatro situaciones estudiadas y a las concentraciones celulares de G6P. Se puede comprobar que el ácido maslínico incrementó en un 40% la velocidad del enzima a la concentración celular de G6P.

**Tabla 4.1. Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de G6P y actividad específica de la G6PDH del hígado y músculo blanco de la dorada en el estado estacionario de cada situación nutricional.**

	HÍGADO		MÚSCULO BLANCO	
	[G6P] (mM)	A.E. G6PDH (mU/mg)	[G6P] (mM)	A.E. G6PDH ( $\mu$ U/mg)
<b>Control AL</b>	1,46 $\pm$ 0,05	19,96 $\pm$ 1,41	1,69 $\pm$ 0,08	78,7 $\pm$ 3,8
<b>AM<sub>100</sub> AL</b>	1,64 $\pm$ 0,10	27,57 $\pm$ 1,60	1,67 $\pm$ 0,06	120,5 $\pm$ 8,7
<b>Control R</b>	1,28 $\pm$ 0,20	20,27 $\pm$ 1,55	1,93 $\pm$ 0,13	117,2 $\pm$ 6,1
<b>AM<sub>100</sub> R</b>	2,98 $\pm$ 0,20	28,54 $\pm$ 1,57	2,48 $\pm$ 0,08	187,6 $\pm$ 8,6

Los resultados son media  $\pm$  SEM de al menos 9 valores. A.E. corresponde a la actividad específica celular calculada a partir de la actividad específica máxima de la G6PDH y la  $K_m$  para el G6P y de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten.

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Barroso et al., 1998, Barroso et al., 1999a; Barroso et al., 1999b; Barroso et al., 2001) mostramos cambios significativos tanto en el comportamiento cinético como en los niveles de expresión de este enzima bajo diferentes condiciones nutricionales y de desarrollo en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). En estos trabajos demostramos que, con los cambios del crecimiento que se llevan a cabo en los diferentes periodos de desarrollo, con la eliminación de carbohidratos de la dieta y, finalmente, con el ayuno prolongado, se produjo una disminución significativa de la actividad específica del enzima hepático (Barroso et al., 1998; Barroso et al., 1999a; Barroso et al., 2001), mientras que otras condiciones nutricionales, como cambios en la frecuencia alimentaria, la realimentación tras un largo periodo de ayuno (Barroso et al., 1998; Barroso et al., 1999b) y, finalmente, la administración de una dieta



suplementada con aminoácidos libres (Barroso et al., 1998; Barroso et al., 1999b) se incrementó significativamente, en este tejido, tanto la actividad enzimática como la eficiencia catalítica, de acuerdo con los incrementos encontrados en los niveles de expresión de este enzima.

Ninguna de las situaciones empleadas en estos trabajos fue capaz de modificar los valores de  $K_m$  del enzima para la G6P y  $NADP^+$  significativamente, demostrando que estas condiciones no afectan el grado de afinidad del enzima para cada uno de sus sustratos.

El comportamiento seguido por la G6PDH muscular fue relativamente parecido al del enzima hepático ya que el ácido maslínico produjo un claro aumento de la actividad enzimática máxima y de la eficiencia catalítica tanto en condiciones ad libitum como restringidas, aunque en este caso, a pesar de un incremento significativo en los valores de  $K_m$  en ambas situaciones. Al mismo tiempo, los valores de  $V_{max}$  se corroboraron con los niveles de expresión encontrados, llegando a ser del orden de un 60% superior a los controles. En este caso, la velocidad del enzima a la concentración muscular de G6P aumentó en un orden parecido al de los niveles de expresión (**Tabla 4.1**).

Estos resultados coinciden con los encontrados en otras especies de peces y realizados por nuestro grupo de investigación (Fernández-Navarro, 2004). Con ellos podemos demostrar que la suplementación a la dieta de ácido maslínico (150 mg/kg de dieta) produjo, en la trucha arco iris, un incremento en la  $V_{max}$  y eficiencia catalítica de este enzima del orden del 26%, sin cambios en los valores de  $K_m$ , mientras que en el caso de la dorada el enzima parece ser más sensible al ácido maslínico ya que la suplementación de una cantidad menor a la dieta (100 mg/kg de dieta) produjo un efecto claramente superior. Por el contrario, el comportamiento cinético de este enzima no se modificó en este tejido a lo largo del desarrollo de la trucha (Barroso, 1993) indicando que este enzima presenta una clara capacidad de inducción/represión de acuerdo con las condiciones celulares.

#### **4.3.1.2. 6-Fosfogluconato deshidrogenasa del hígado y músculo blanco de la dorada**

El segundo sistema de producción de equivalentes de reducción ( $NADPH$ ) perteneciente al CPP corresponde a la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). En general, los valores de actividad de este enzima, en el hígado de la dorada, son menores que los que presenta la otra deshidrogenasa del ciclo, G6PDH, a diferencia de lo que parece ocurrir en otras especies, como la trucha arco iris, donde los valores o son semejantes a los que presenta la G6PDH o son significativamente superiores (Barroso, 1993; Barroso et al., 1998; Barroso et al., 1999a; Barroso et al., 1999b; Barroso et al., 2001; Fernández-Navarro, 2004).

El ácido maslínico, produjo un incremento significativo de los parámetros cinéticos,  $V_{max}$ , actividad específica y eficiencia catalítica, sin modificar otros como la  $K_m$  y razón de actividad, es decir, este enzima presenta un comportamiento semejante al que ocurre en la actividad G6PDH. Los cambios obtenidos en los parámetros de actividad fueron similares, en porcentajes, en ambos enzimas.



Para nuestro reconocimiento, esta es la primera vez que se demostró un cambio significativo en la actividad de este enzima por acción del ácido maslínico ya que en trabajos previos realizados en la trucha arco iris no se encontraron diferencias (Fernández-Navarro, 2004). En la dorada parece que ambos enzimas del ciclo, G6PDH y 6PGDH participan de forma activa en el suministro adecuado de NADPH, mientras que en la trucha arco iris todo el peso recae en la primera deshidrogenasa.

Es interesante comprobar cómo, en este caso, el mayor aporte de equivalentes de reducción necesarios para justificar el incremento de peso del animal generado por el ácido maslínico ocurre gracias a que este triterpeno provoca, tanto en condiciones *ad libitum* como en condiciones de restricción alimentaria, un incremento extraordinario de los niveles de 6-fosfogluconato (6PG), lo que permite, junto con el incremento significativo encontrado en la velocidad máxima del enzima, justificar, sobradamente, el incremento encontrado en la actividad del enzima, que, incluso, llega a alcanzar, prácticamente, los valores de actividad específica máxima.

Estos resultados se muestran en la **Tabla 4.2** en la que se puede observar como la presencia de ácido maslínico en condiciones *ad libitum* incrementa 3 veces la concentración hepática de 6PG.

**Tabla 4.2. Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de 6PG y actividad específica de la 6PGDH del hígado y músculo blanco de la dorada en el estado estacionario de cada situación nutricional.**

	HÍGADO		MÚSCULO BLANCO	
	[6PG] (mM)	A.E. 6PGDH (mU/mg)	[6PG] (mM)	A.E. 6PGDH ( $\mu$ U/mg)
<b>Control AL</b>	0,28 $\pm$ 0,00	10,69 $\pm$ 0,82	2,38 $\pm$ 0,12	68,0 $\pm$ 5,7
<b>AM100 AL</b>	0,73 $\pm$ 0,19	15,52 $\pm$ 1,00	2,88 $\pm$ 0,14	125,0 $\pm$ 8,7
<b>Control R</b>	0,65 $\pm$ 0,01	11,46 $\pm$ 0,90	3,13 $\pm$ 0,15	89,9 $\pm$ 6,2
<b>AM100 R</b>	0,73 $\pm$ 0,15	14,45 $\pm$ 0,99	4,22 $\pm$ 0,20	120,9 $\pm$ 9,1

Los resultados son media  $\pm$  SEM de al menos 9 valores. A.E. corresponde a la actividad específica celular calculada a partir de la actividad específica máxima de la 6PGDH y la  $K_m$  para el 6PG y de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten.

Por lo que respecta al enzima procedente del músculo blanco, el comportamiento cinético de la 6PGDH, en relación con el ácido maslínico, es, en ciertos aspectos, parecido al que presenta la isoforma hepática. De hecho, el ácido maslínico incrementa la  $V_{max}$  y actividad específica, pero a diferencia de lo que ocurre en el hígado, el ácido maslínico, redujo espectacularmente los valores de la  $K_m$  tanto en situación *ad libitum* como restringida. Este particular efecto proporcionó un incremento extraordinario de la eficiencia catalítica del enzima, en lo que podríamos calificar como un ejemplo de máxima optimización molecular con la finalidad de conseguir el objetivo final que es contribuir de manera eficaz en el suministro adecuado de NADPH. Este comportamiento demuestra que en el músculo de la dorada este enzima puede representar el paso limitante en la regulación del flujo en el suministro de estos equivalentes de reducción.



Cuando a este comportamiento cinético, producido por la presencia de ácido maslínico en la dieta, se le aplican los valores celulares de 6PG encontrados en el musculo blanco, se observa, como en condiciones de alimentación *ad libitum* (AM<sub>100</sub> AL), la actividad específica máxima aumenta más del 80% en relación con la situación control.

Por otra parte, es tan interesante el comportamiento cinético de este enzima, probablemente, máximo responsable, en el músculo, del suministro de NADPH durante el crecimiento provocado por el ácido maslínico, que la restricción calórica, *per se* (control R vs control AL), incrementa en más del 30% la actividad específica en condiciones celulares mientras que la presencia del ácido maslínico en estas condiciones (AM<sub>100</sub> R) ejerce un efecto aditivo para alcanzar los valores de actividad encontrados en condiciones *ad libitum* (AM<sub>100</sub> AL).

Trabajos previos en otros peces tales como la trucha arco iris, demuestran que los estudios realizados bajo diferentes condiciones no modificaron el comportamiento cinético de este enzima. Barroso et al (1999a), analizaron el comportamiento cinético del enzima hepático durante el desarrollo del pez, no encontrando modificaciones de la  $V_{max}$  actividad específica y eficiencia catalítica, mientras que estos mismos autores ponían de manifiesto un crecimiento hiperplásico durante las primeras etapas, seguido de un comportamiento mixto (hiperplásico más hipertrófico) para acabar, al final del tiempo experimental, con un tipo de crecimiento claramente hipertrófico. Sin embargo, cuando analizaron estos parámetros en relación con la unidad celular pudieron observar una significativa disminución que corría paralela con el incremento de crecimiento hipertrófico.

Otros trabajos, publicados anteriormente (Barroso, 1993; Barroso et al., 1998; Barroso et al., 1999b; Barroso et al., 2001; Fernández-Navarro, 2004), analizaron el comportamiento de este enzima bajo diferentes condiciones nutricionales. Una de las condiciones nutricionales estudiadas consistió en someter a las truchas a ciclos de ayuno y realimentación (Barroso, 1993; Barroso et al., 1998), bajo estas condiciones, estos autores mostraron que el ayuno provocó un disminución significativa de la  $V_{max}$  actividad específica y eficiencia catalítica, mientras que la realimentación restituyó estos valores a pesar de que en las primeras fases de la realimentación el enzima sufrió una clara sobre-expresión.

Otros trabajos muestran que el cambio en la frecuencia alimentaria o la administración de una dieta suplementada con aminoácidos libres, no afectaron a ninguno de los parámetros cinéticos del enzima hepático de la trucha pero, sin embargo, si lo hizo en los enzimas procedente del riñón y tejido adiposo (Barroso, 1993; Barroso et al., 1999b).

La eliminación del contenido de carbohidratos de la dieta de la trucha redujo significativamente los parámetros cinéticos directamente relacionados con la actividad enzimática tales como la  $V_{max}$  actividad específica y eficiencia catalítica del enzima hepático, sin embargo no alteró los parámetros de la isoforma procedente del tejido adiposo (Barroso et al., 2001).



Finalmente, otras situaciones provocan cambios significativos en la expresión del enzima, así, otros autores demuestran que tanto la insulina como la triiodotironina ( $T_3$ ) regulan la expresión del enzima durante la diferenciación de los adipocitos del tejido adiposo marrón (García-Jiménez et al., 1993).

Como se comentaba en la introducción de este apartado de la discusión, las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato (G6PDG y 6PGDH) contribuyen, no sólo en los procesos relacionados con la génesis de lípidos de membrana, sino también con las necesidades específicas de NADPH en los procesos claramente relacionados con el crecimiento, como el metabolismo de nucleótidos. Este doble papel está perfectamente relacionado con los fenómenos de hiperplasia celular que son los predominantes en relación con la acción que ejerce el ácido maslínico sobre el crecimiento global de la dorada y que constituye uno de los principales objetivos de este trabajo.

#### 4.3.1.3. Enzima málico del hígado y músculo blanco de la dorada

El tercer sistema de producción de NADPH lo constituye el enzima málico (EM). Su papel en el metabolismo celular se centra casi exclusivamente en el metabolismo biosintético, proporcionando una parte importante de equivalentes de reducción para la síntesis de lípidos en general y de los integrantes de las membranas celulares en particular. En general, los valores de los parámetros cinéticos relacionados directamente con la actividad enzimática,  $V_{max}$ , actividad específica y eficiencia catalítica, son menores en el músculo blanco que en el hígado, aunque la diferencia de tamaño entre ambos tejidos permite encontrar una diferencia de hasta 10 veces superior la actividad total del músculo respecto al hígado.

El estudio de la proteína enzima málico (EM) mediante la técnica de “western blot” en muestras citosólicas de hígado se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-EM citosólico de cerebro de vaca. La detección de la banda inmunorreactiva fue única, y se correspondió con una masa molecular aparente de 85 kDa. Este peso molecular coincide con el peso molecular de referencia que da la casa comercial Abnova (Ref. H00004199-M01) para este mismo anticuerpo. Sin embargo, estudios en trucha sometidas a ayuno y realimentación mostraron una banda inmunorreactiva de 62 kDa utilizando un anticuerpo policlonal de ratón (Barroso et al., 1998). La intensidad de la banda correspondiente a la proteína EM se hacía menos intensa a medida que transcurría el tiempo de ayuno; la realimentación restauraba en el hígado los niveles normales de EM.

Los resultados cinéticos y de expresión obtenidos con el enzima hepático, demuestran que durante la administración de la dieta *ad libitum*, el ácido maslínico no modificó significativamente la  $V_{max}$ , actividad específica y eficiencia catalítica, lo que se ve confirmado con los niveles de expresión encontrados. Probablemente, la alta actividad enzimática encontrada en la G6PDH y 6PGDH producida por el ácido maslínico proporciona la cantidad suficiente de NADPH, y, por tanto, no se hace



necesario un aporte superior de este compuesto generado por un posible incremento en los niveles hepáticos del EM.

Sin embargo, la restricción alimentaria provocó una importante y significativa disminución de los niveles celulares del enzima cuando son comparados con los valores controles alimentados *ad libitum*, restableciéndose posteriormente por la presencia del ácido maslínico hasta alcanzar los valores normales. Este resultado es especialmente importante ya que demuestra que la depleción general que presenta el animal bajo esta situación nutricional, se refleja de forma especial, en determinados aspectos moleculares, entre ellos, los niveles celulares de EM, cuya reducción nos permite entender la disminución de la membranogénesis propia de esta situación dietaria, y es, precisamente, en esta situación nutricional en la que el ácido maslínico contribuye de forma positiva, incrementando dicha concentración hasta valores normales, justificando el potencial aumento del número de células que tiene lugar tras la administración de este compuesto.

Este comportamiento específico, junto con otros que se muestran y desarrollan a lo largo de este trabajo, tales como el análisis proteómico a través del patrón global expresión de proteínas, nos indican que esta situación nutricional es clave para entender muchos de los cambios moleculares obligados y necesarios que deben presentarse en la maquinaria metabólica para conseguir, más fácilmente, las condiciones óptimas del funcionamiento celular.

Los niveles de malato, hepático y muscular, en el estado estacionario, encontrados en las cuatro condiciones nutricionales, permitirán conocer, con exactitud, la actividad celular del enzima málico a dichas concentraciones. Los resultados se muestran en la **Tabla 4.3**.

**Tabla 4.3. Efecto del ácido maslínico sobre las concentraciones celulares de malato y actividad específica del enzima málico (EM) del hígado y músculo blanco de la dorada en el estado estacionario de cada situación nutricional.**

	HÍGADO		MÚSCULO	
	[Malato] (mM)	A.E. EM (mU/mg)	[Malato] (mM)	A.E. EM (μU/mg)
<b>Control AL</b>	4,83±0,62	5,42±0,38	4,57±0,20	294,1±21,3
<b>AM<sub>100</sub> AL</b>	5,11±0,51	6,45±0,39	3,95±0,15	605,6±56,0
<b>Control R</b>	3,68±0,26	7,33±0,61	3,61±0,32	427,7±37,7
<b>AM<sub>100</sub> R</b>	5,16±0,97	7,85±0,57	2,82±0,20	498,6±37,1

Los resultados son media ± SEM de al menos 9 valores. A.E. corresponde a la actividad específica celular calculada a partir de la actividad específica máxima del enzima málico y la  $K_m$  para el malato de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten.

Teniendo en cuenta los diferentes parámetros cinéticos del enzima málico hepático y las concentraciones de su sustrato encontradas en este tejido, podemos calcular la actividad del enzima que tiene lugar durante el estado estacionario. En este tejido, el ácido maslínico no produjo modificaciones significativas en dicha actividad específica, ni en condiciones *ad libitum* (5,42 vs 6,45) ni restricción alimentaria (7,85 vs 7,33). Sin embargo, la restricción alimentaria si afectó esta



velocidad, siendo más del 35% superior la encontrada en el grupo control R frente al control AL, mientras que este porcentaje fue mayor del 20% cuando se compara el grupo AM<sub>100</sub> R respecto al grupo AM<sub>100</sub> AL.

Un comportamiento radicalmente diferente presenta el enzima málico del músculo blanco de la dorada. En este caso, el ácido maslínico produjo un incremento significativo de la  $V_{max}$ , actividad específica y eficiencia catalítica y paralelamente una significativa disminución de la  $K_m$  tanto en condiciones *ad libitum* como en condiciones de restricción alimentaria, alcanzándose el máximo grado de optimización cinética.

Por todo ello, la actividad celular, alcanzada a las concentraciones musculares de malato, fue extraordinariamente alta (mayor de un 100%) en condiciones *ad libitum* y en presencia de ácido maslínico, sin que este compuesto afectara a la actividad en condiciones de restricción, ya que esta situación *per se* incrementó en más de un 40% la actividad celular de este enzima (**Tabla 4.3**).

Comportamientos cinéticos similares de este enzima se han descrito en la literatura científica. Algunos autores han mostrado cambios en las actividades del enzima y su expresión en el hígado de la trucha sometidas a ciclos de ayuno y realimentación (Barroso et al., 1998). El ayuno provocó una drástica disminución tanto de la actividad como de los niveles de expresión del enzima, para posteriormente restablecer estos valores tras la realimentación. Por el contrario, durante el crecimiento de la trucha no se encontraron modificaciones ni en la actividad enzimática ni en la concentración celular del enzima (Barroso et al., 1999a).

Otras condiciones nutricionales, tales como el cambio en la frecuencia de la alimentación o la administración a los peces de dietas especiales por suplementación de aminoácidos libres provocan modificaciones en el comportamiento cinético del enzima málico procedente de diferentes tejidos de la trucha (De la Higuera et al., 1998; Barroso et al., 1999b).

Estos autores demuestran que un aumento de la frecuencia alimentaria produce un incremento de la actividad y eficiencia catalítica del enzima del hígado y tejido adiposo de la trucha, mientras que no varía en las células renales. Efectos semejantes se encontraron cuando estos peces se alimentaron con dietas suplementadas con aminoácidos libres (De la Higuera et al., 1998; Barroso et al., 1999b).

Otra situación nutricional que provoca cambios en el comportamiento cinético del enzima málico de la trucha consiste en la eliminación de los carbohidratos de la dieta (Barroso et al., 2001). Este trabajo demuestra que la eliminación de este principio inmediato de la dieta significativamente reduce la actividad y la expresión del enzima del hígado de la trucha sin modificar el comportamiento cinético de la isoforma del tejido adiposo.



#### 4.3.1.4. Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> del hígado y músculo blanco de la dorada

El cuarto sistema de producción de equivalentes de reducción estudiado corresponde a la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> (IDH-NADP<sup>+</sup>). La IDH-NADP<sup>+</sup> cataliza la oxidación descarboxilante del isocitrato para convertirlo en 2-oxoglutarato con la producción concomitante del coenzima reducido en forma de NADPH, y su papel, junto al resto de los sistemas de producción de NADPH, es el de ser el principal donador de electrones esencial para numerosas reacciones de carácter biosintético, protección y detoxificación (Gálvez y Gadal, 1995; Barroso et al., 1999c; Barroso et al., 2000)

Es conocida la existencia de numerosas isoformas de este enzima localizadas en diferentes orgánulos celulares (Donaldson, 1982; Chen et al., 1988; Fatania et al., 1993; Barroso, 1993; Gálvez y Gadal, 1995; Canino et al., 1996; Henke et al., 1998; Corpas et al., 1999). Fundamentalmente, el papel que juegan estas isoformas de la IDH-NADP<sup>+</sup> en las diferentes localizaciones celulares, citosol, microsomas, peroxisomas, cloroplastos, mitocondria, glioxisomas, etc. está relacionado con el aporte de equivalentes de reducción necesarios para llevar a cabo reacciones de hidroxilación, desaturación, elongación y reducción catalizadas por las diferentes familias de hidroxilasas, desaturasas, elongasas y reductasas características de esos orgánulos, aunque también deben participar en el aporte del almacén celular de estos equivalentes de reducción necesarios para el resto de reacciones metabólicas que los utilizan.

Nuestros resultados muestran que la isoforma de procedencia citosólica se ve fuertemente afectada por el ácido maslínico y por la restricción calórica en el hígado de la dorada. El ácido maslínico incrementa los valores de  $V_{max}$ , actividad específica y eficiencia catalítica de acuerdo con los incrementos obtenidos en los niveles de expresión de esta isoforma, sin cambios en los valores de  $K_m$  y razón de actividad, corroborando que este aumento de actividad se debe a un incremento en los niveles celulares del enzima y no a una activación de la proteína preexistente.

Por lo que respecta a la restricción alimentaria, y aunque los resultados de expresión no lo corroboran, ésta situación incrementa *per se* la actividad enzimática hasta valores alcanzados por los grupos AM<sub>100</sub> AL. Es interesante observar que la adición de ácido maslínico a la dieta de los peces alimentados a restricción (AM<sub>100</sub> R) ejerce a su vez un efecto aditivo al encontrado en los controles restringidos.

Al ensayar la actividad IDH-NADP<sup>+</sup> por "western-blot" en extractos citosólicos, en condiciones desnaturalizantes, se observa la aparición de dos bandas inmunorreactivas, correspondientes a las dos isoformas del enzima, mitocondrial y citosólica. En tejido hepático, la primera de ellas, presentó una banda de un peso molecular aparente correspondiente a 77 kDa y la segunda, de 54 kDa. Las diferencias observadas entre grupos experimentales, se refieren en el caso de la IDHm-NADP<sup>+</sup>, únicamente en los grupos *ad libitum*, observándose un incremento en el grupo alimentado con ácido



maslínico. Caber resaltar, que la isoforma citosólica fue más abundante en este tejido, que la mitocondrial. En el caso de la isoforma IDHc-NADP<sup>+</sup> pudimos observar, que ambos grupos alimentados con ácido maslínico presentaban un aumento en los niveles de expresión del enzima. De este modo, al existir mayor cantidad de enzima en el hígado de las doradas alimentadas con ácido maslínico, se corroboró los resultados obtenidos cinéticamente, en los que la actividad de este enzima era mayor.

Los pesos moleculares obtenidos en el presente estudio para ambas isoenzimas, no coinciden totalmente con los que obtuvieron Minich et al., 2003 quienes utilizaron anticuerpos purificados frente a cada una de las isoenzimas, IDHm-NADP<sup>+</sup> y IDHc-NADP<sup>+</sup> en neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y células de la microglía de rata y obtuvieron en ambos casos un peso molecular aparente de 47kDa, aunque la isoforma IDHm-NADP<sup>+</sup> aparecía únicamente en células neuronales, mientras que la IDHc-NADP<sup>+</sup> se obtuvo en el resto de células. Esto refuerza la idea de que la expresión de las isoformas del enzima IDH-NADP<sup>+</sup>, mitocondrial y citosólica varían en los diferentes tejidos, incluso entre las células de un mismo tejido (Minich et al., 2003). Henderson, 1968; Yoshihasa et al., 2001 y Haraguchi et al., 2003 observaron que en corazón de rata predomina la isoforma mitocondrial, mientras que en el hígado, por el contrario, predomina la citosólica. Este último dato, coincide con los resultados obtenidos en hígado de dorada.

Los estudios en peces sobre la expresión de este enzima se reducen a trucha arco iris. En este sentido, Barroso et al., 2001 estudiaron la expresión del enzima IDH-NADP<sup>+</sup> en truchas alimentadas con dietas bajas en el nivel de carbohidratos. Los tejidos empleados fueron hígado y tejido adiposo. Los resultados que obtuvieron se referían a una única banda inmunorreactiva con un peso molecular aparente de 44 kDa correspondiente a la forma monomérica del enzima, que se presentaba más expresada en tejido adiposo que en hígado.

Durante el desarrollo de los diferentes tipos de crecimiento tiene lugar numerosos cambios metabólicos que exigen la utilización específica de NADPH. Uno de estos tipos de crecimiento ocurre durante la senescencia celular, especialmente importante en el mundo vegetal, y en la que se ponen en marcha procesos activos de recambio de proteínas, metabolismo de ácidos nucleicos y movilización de nitrógeno (Buchanan-Wollaston, 1997). Estos cambios afectan de forma especial al metabolismo de los peroxisomas de la hoja ya que durante la senescencia se incrementa la expresión de los genes que codifican los enzimas del ciclo del ácido glioxílico, de la malato sintasa y de la isocitrato liasa (De Bellis et al., 1990; Vicentini y Matile, 1993; Pastori y del Río, 1997). Además, se ha propuesto la implicación del metabolismo peroxisomal de especies reactivas de oxígeno durante el mecanismo oxidativo característico de la senescencia celular (Del Río et al., 1998).

Por lo que respecta a la isoforma citosólica de la IDH-NADP<sup>+</sup> presente en el músculo blanco de la dorada, se comprueba que su comportamiento cinético frente al ácido maslínico es parecido al que presenta el tejido hepático. Tanto en condiciones de alimentación *ad libitum* como en condiciones de restricción alimentaria, el ácido maslínico es capaz, de incrementar de forma significativa la  $V_{max}$  y



la actividad específica, de acuerdo con los cambios que se alcanzan en los niveles de expresión génica, demostrando que los niveles celulares del enzima son, en principio, responsables del incremento de actividad.

Sin embargo, este efecto se ve reforzado por el hecho de que el ácido maslínico es capaz de disminuir significativamente los valores de  $K_m$  optimizando la eficiencia catalítica del enzima. Esto unido a que en estas condiciones aumenta significativamente la razón de actividad podemos concluir que el ácido maslínico, además de inducir los niveles de enzima aumenta, paralelamente, la actividad del enzima preexistente, alcanzándose en este tejido un máximo grado de optimización cinética. Es importante mencionar que la respuesta al ácido maslínico en el caso de la restricción calórica fue cualitativamente semejante aunque cuantitativamente menor.

Las diferencias encontradas en cuanto a las masas moleculares se deben principalmente al origen del anticuerpo, a la especie en cuestión y al tejido en donde se detecta. Es por ello, por lo que cuando detectamos los niveles de estos mismos isoenzimas en el músculo blanco de la dorada, encontramos ligeras variaciones en los pesos moleculares de cada una de ellas, de tal modo que la fracción IDHm-NADP<sup>+</sup> dio banda inmunorreactiva entorno a los 58 kDa y la IDHc-NADP<sup>+</sup>, aproximadamente 40 kDa. Al igual que ocurría en hígado, la isoforma más abundante en este tejido fue la citosólica.

#### **4.3.2. Enzimas claves del metabolismo proteico del hígado y músculo blanco de la dorada**

La primera y más importante manifestación metabólica implicada en un proceso activo de crecimiento celular corresponde a un cambio significativo del recambio proteico. El equilibrio existente entre las velocidades de síntesis y degradación de proteínas va a ser clave en el resultado final. De esta forma un incremento de la velocidad de síntesis, una reducción de la velocidad de degradación o ambas situaciones a la vez, trae como consecuencia un importante incremento de la velocidad de acumulación proteica y por tanto del crecimiento celular y orgánico.

Numerosos trabajos han sido publicados en los últimos años, en este campo, por diferentes grupos de investigación incluido el nuestro (Houlihan et al., 1986; Houlihan et al., 1988; Mathers et al., 1993; Peragón et al 1998; Peragón et al., 1999a; Peragón et al., 1999b; Peragón et al., 2000; Peragón et al., 2001; Fernández-Navarro et al., 2006; Fernández-Navarro et al., 2008). En ellos se ponen de manifiesto las diferentes características moleculares que definen el recambio de proteínas en relación con las condiciones del crecimiento y proliferación celulares que lo modifican

Por tanto, es lógico que el metabolismo de los diferentes aminoácidos deba jugar un papel central en la movilización de nitrógeno en periodos de crecimiento y proliferación. En este trabajo, siguiendo con lo comentado al principio del apartado 4.3, hemos seleccionado y estudiado el comportamiento cinético y molecular de tres enzimas clave del metabolismo de aminoácidos, en función con los papeles que, como enzimas marcadores, juegan durante los procesos de crecimiento



y proliferación celulares. Los tres enzimas seleccionados fueron la serina deshidratasa (Ser-DH), alanina aminotransferasa (Ala-AT) y tirosina aminotransferasa (Tyr-AT).

En relación con este punto, el objetivo de este trabajo consistió en analizar los efectos del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético y sobre los niveles de expresión de estos sistemas enzimáticos en el hígado y músculo blanco de las doradas sometidas a condiciones de alimentación a saciedad y restricción de alimento, de acuerdo con el protocolo experimental seguido en esta tesis.

#### 4.3.2.1. Serina deshidratasa del hígado y músculo blanco de la dorada

El metabolismo de la L-serina, junto con el de la glicina, juega un papel central y clave durante los procesos de crecimiento y proliferación al estar íntimamente relacionados con el metabolismo de fragmentos monocarbonados, a su vez, estrechamente ligado al metabolismo del ácido tetrahidrofólico (Snell et al., 1987). Este aminoácido va a ser la fuente predominante de los grupos monocarbonados durante la síntesis “de novo” de los diferentes nucleótidos y además, es el precursor de, entre otros, aminoácidos, tales, como cisteína y taurina, de lípidos de membrana como la fosfatidilserina y sus derivados, etanolamina y colina, y de moduladores neuronales, tales, como la glicina y la D-serina. Además, se ha demostrado que en cultivos de células humanas la L-serina es esencial durante la estimulación del crecimiento (Korning et al., 2003).

Por todo ello, la serina deshidratasa (Ser-DH) parece ser fundamental para el mantenimiento de unos niveles adecuados de L-serina durante la proliferación celular y es considerada como un enzima marcador de la maduración tisular, estando, además, implicada en la regulación del desarrollo de diferentes órganos (Sugimoto et al., 2002; Korning et al., 2003). En este sentido, otros autores han detectado un incremento de la actividad Ser-DH en el hígado de ratones portadores de tumor ascítico de Ehrlich (Korekane et al., 2003), relacionando este incremento de la actividad con un aumento de la gluconeogénesis hepática en estos ratones.

En nuestro trabajo no hemos podido observar efectos significativos del ácido maslínico sobre el comportamiento cinético de este enzima, ni en el hígado ni en el músculo blanco de la dorada. Ninguno de los parámetros cinéticos analizados,  $V_{max}$ , actividad específica, eficiencia catalítica,  $K_m$  y razón de actividad se modificaron en presencia de este triterpeno, tanto en condiciones *ad libitum* como de restricción alimentaria. Estos resultados parecen indicar que el enzima no juega un papel importante en el crecimiento inducido por el ácido maslínico.

La serina deshidratasa está también implicada en la gluconeogénesis hepática en animales. Se determinaron los niveles de proteína específica Ser-DH mediante “western blot” utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ser-DH de rata. La banda inmunoreactiva obtenida en las muestras de hígado fue de una masa molecular de 93 kDa y en el músculo de 95 kDa. Estos pesos difieren enormemente de los encontrados en hígado de rata correspondientes a una masa de 34,1 kDa (López-Flores, et al., 2005).



Estos resultados obtenidos en el hígado de rata se corresponden con la forma monomérica del enzima. Los niveles de proteína fueron significativamente menores en ratas tratadas con tioacetamida (TAA). Este compuesto se utilizaba como modelo experimental válido para estudiar situaciones de daño hepático en la rata. Los resultados que se encontraron en el presente trabajo, fueron un mayor nivel de expresión hepática de la Ser-DH en los grupos restringidos, sin que el ácido maslínico influyera sobre la expresión de este enzima. En el músculo, sin embargo, los niveles de expresión de esta proteína sí que se ven potenciados por la adición de ácido maslínico a la dieta.

Este comportamiento difiere de lo que ocurre con la participación de este enzima en otras condiciones celulares relacionadas con el metabolismo hepático, concretamente, con situaciones de daño agudo y crónico del hígado que conduce a un estado clínico de malnutrición calórica. En este sentido, nuestro grupo recientemente ha demostrado una significativa disminución de los niveles de la Ser-DH hepática, de los niveles RNA mensajero y de la actividad cinética en ratas sometidas a una ingestión crónica de tioacetamida, la cual, incluso, afecta su localización celular (López-Flores et al., 2005).

Del mismo modo, la acidosis metabólica crónica, inducida en ratas mediante ingestión de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 10 días, disminuye tanto la actividad específica del enzima como los niveles de Ser-DH hepática y de RNA mensajero de la Ser-DH, indicando que durante esta situación tiene lugar una represión específica de la transcripción del gen de este enzima (López-Flores et al., 2006).

#### **4.3.2.2. Alanina aminotransferasa del hígado y músculo blanco de la dorada**

El ácido maslínico fue capaz de modificar tanto el comportamiento cinético como los niveles de expresión de la alanina aminotransferasa (Ala-AT) del hígado de la dorada. Tanto en condiciones *ad libitum* como en restricción, este triterpeno incrementa significativamente los parámetros cinéticos directamente relacionados con la actividad del enzima, tales como la  $V_{\text{max}}$ , actividad específica y eficiencia catalítica, sin que altere la  $K_m$  y razón de actividad, indicando que dicho aumento de la actividad del enzima se debe a un incremento en la concentración celular de Ala-AT. Esto se ve confirmado por los resultados de los análisis de "Western blot" en los que se aprecia un incremento mayor del 60%, tanto en condiciones *ad libitum* como en condiciones de restricción alimentaria.

Los niveles de expresión de proteína Ala-AT en muestras citosólicas de hígado de dorada se determinaron mediante análisis de "Western blot" utilizando un anticuerpo policlonal anti-Ala-AT de ratón. La detección de banda inmunorreactiva se correspondió con una masa molecular de 50 kDa en el hígado de la dorada. La casa comercial Sigma (WH0002875M2) de la que procedía el anticuerpo hacía referencia a una masa molecular aparente de 60 kDa. Estas diferencias de pesos existentes entre el hígado de dorada y la referencia de la casa, pueden deberse a que se tratan de tejidos y especies diferentes y/o a la movilidad electroforética de las proteínas bajo las condiciones ensayadas.



Los resultados del estudio cinético de este enzima que se obtuvieron en el hígado de la dorada pusieron de manifiesto un incremento de los parámetros cinéticos relacionados con la actividad del enzima en los grupos alimentados con ácido maslínico, AM<sub>100</sub> AL y AM<sub>100</sub> R. Estos resultados se reforzaron con la detección de banda inmunorreactiva correspondiente a la proteína Ala-AT, ya que ésta era mayor en los grupos AM, que en los grupos controles. Una mayor actividad del enzima Ala-AT se relaciona con una alta respuesta metabólica (Cowey et al., 1977).

En ambas condiciones nutricionales, es evidente que, existe una mayor movilización del metabolismo de aminoácidos y por tanto de las principales reacciones que manipulan el nitrógeno amínico, aunque probablemente, con objetivos diferentes. La Ala-AT, cataliza reversiblemente la transformación de alanina a piruvato junto con la de 2-oxoglutarato a glutamato. Es muy probable que en condiciones de alimentación a saciedad, donde el aporte de aminoácidos es alto y por tanto se reduce la movilización de las proteínas endógenas, sea posible que los aminoácidos procedentes de la dieta se utilicen mayoritariamente para formar proteínas estructurales y que el exceso de aminoácidos, a partir del piruvato generado tras su transaminación, pueda ser utilizado en otras funciones metabólicas precursoras.

Por el contrario, en condiciones de restricción alimentaria, donde la cantidad de aminoácidos procedentes de la dieta es reducida, la Ala-AT deberá actuar transformando el piruvato celular en alanina, y, a partir de esta, otros aminoácidos con el objetivo de aumentar la síntesis de proteínas y compensar la reducción del crecimiento característico de esta situación nutricional. En ambos casos es lógico que la actividad de este enzima se vea incrementada.

Previamente, nuestro grupo de investigación (Sánchez-Muros et al., 1998) mostró una clara respuesta adaptativa de la alanina aminotransferasa en el hígado y riñón de la trucha arco iris en respuesta tanto un ayuno prolongado (caso de extrema restricción alimentaria) y en la que se movilizan las proteínas endógenas, como a una dieta alta en proteínas y libre de carbohidratos, en donde se movilizan las proteínas exógenas.

En ambos casos, se pudo observar un incremento significativo de la  $V_{max}$  actividad específica y eficiencia catalítica, sin cambios en la  $K_m$  y razón de actividad, correspondiendo a un comportamiento cinético similar al que ejerce el ácido maslínico en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, estos efectos no se dieron en el enzima renal.

Un incremento en la actividad Ala-AT hepática parece estar relacionada con una alta respuesta metabólica, y, por tanto, capaz de aumentar la concentración celular de alanina contribuyendo a incrementar la gluconeogénesis a partir de este aminoácido como demuestra Cowey et al. (1977).

Por lo que respecta al enzima del músculo de la dorada, el ácido maslínico no produjo ningún cambio en el comportamiento cinético del enzima, ya que ninguno de los parámetros cinéticos analizados se ve afectado por este triterpeno ni en condiciones de saciedad ni de restricción.



#### 4.3.2.3. Tirosina aminotransferasa del hígado y músculo blanco de la dorada

La tirosina aminotransferasa (Tyr-AT) es el enzima regulador del catabolismo hepático de la tirosina en mamíferos. Se ha demostrado que cuando el suministro celular de la glucosa es limitado y las proteínas terminan constituyendo la principal fuente energética, el catabolismo de las moléculas de tirosina provee al organismo tanto de sustratos cetogénicos en forma de Acetoacetyl-CoA como gluconeogénicos en forma de fumarato. Desde un punto de vista genético-molecular es uno de los enzimas que aparecen primero en el hígado en el estado postnatal (Sereni et al., 1959).

De hecho, en la rata, la expresión de Tyr-AT está ausente en el feto apareciendo poco después del nacimiento, tanto la actividad enzimática como la acumulación de RNA mensajero cuando se activa la transcripción génica (Sereni et al., 1959; Rothrock et al., 1987). Este comportamiento permite calificar a la Tyr-AT como enzima marcador del hígado adulto (Cai et al., 2007).

En relación con este enzima, nuestros resultados muestran como el ácido maslínico afecta profundamente al comportamiento cinético, en todas las situaciones nutricionales (condiciones *ad libitum* y condiciones de restricción) y en los dos tejidos utilizados (hígado y músculo blanco de la dorada). En el hígado y en el músculo blanco de las doradas, alimentadas tanto a saciedad como sometidas a restricción calórica, los cambios del comportamiento cinético se observan cuando se analizan los diferentes parámetros relacionados directamente con la actividad enzimática,  $V_{max}$ , actividad específica y eficiencia catalítica; además, y esto es importante, el ácido maslínico es capaz de reducir significativamente la  $K_m$  del enzima para la tirosina, optimizando la eficiencia catalítica del enzima. Este comportamiento nos demuestra, claramente, que el ácido maslínico es capaz, no sólo, de incrementar la expresión celular del enzima, aumentando su concentración, sino que, además, aumenta significativamente la afinidad del enzima por su sustrato, con lo que aumenta la velocidad a concentraciones celulares de tirosina.

En este sentido, se ha demostrado que la Tyr-AT se induce claramente por la presencia de glucocorticoides (Schmid et al., 1987) cuya estructura química derivada del colesterol es muy parecida a la que presenta el propio ácido maslínico. También se ha descrito que el enzima se induce por glucagon y AMP cíclico, aumentando el nivel transcripcional del RNA mensajero de la Tyr-AT (Moore y Koontz, 1989). Por otra parte, en la trucha arco iris y otras especies de peces, la Tyr-AT se induce en presencia de cortisol (Whiting y Wiggs, 1977a; Lipsky et al., 1986) y se reprime durante la maduración sexual de las hembras de la trucha (Whiting y Wiggs, 1977b).

Además, recientemente, trabajos de nuestro grupo de investigación ha mostrado cambios en el comportamiento cinético de la Tyr-AT hepática a lo largo del desarrollo de la trucha, mostrando una progresiva disminución de la actividad específica del enzima,  $V_{max}$  y eficiencia catalítica, sin cambios en los valores de  $K_m$  y razón de actividad, lo cual es consistente con la existencia de una regulación del número de moléculas de enzima (Peragón et al., 2009). Previamente, habíamos demostrado que



la actividad de este enzima se incrementa significativamente durante un ayuno prolongado para retornar a los valores controles tras la realimentación (Peragón et al., 2008).

Todos estos resultados demuestran que la Tyr-AT es un enzima inducible tanto en la trucha como en la dorada, fundamentalmente en situaciones que cursan con un cambio significativo en la manipulación metabólica de aminoácidos. Al contrario de lo que ocurre en mamíferos, los peces usan mayoritariamente estos compuestos, además de para la síntesis de proteínas, como importantes combustibles energéticos y como precursores metabólicos de moléculas de alta funcionalidad. La tirosina es uno de ellos, de forma que los productos finales de su catabolismo pueden ser utilizados para diferentes propósitos energéticos y metabólicos.



#### **4.4. Caracterización proteómica por electroforesis bidimensional y espectrometría de masas del hígado de la dorada**

La proteómica se centra en el análisis global de las proteínas que se sintetizan y se expresan en una situación determinada en un determinado tejido. Las proteínas son el producto final de la expresión de los genes. Los cambios en la abundancia de las proteínas pueden producirse por alteraciones en la velocidad de transcripción, en la vida media del RNA mensajero, así como por sucesos de regulación post-traducciona.

Existen otros enfoques para estudiar la expresión génica diferencial que se produce como consecuencia de un determinado tratamiento basados en tecnología de ácidos nucleicos para analizar la expresión de RNA mensajero en un determinado tejido, sin embargo, esta expresión no siempre se refleja en los niveles de proteínas sintetizadas. Por lo tanto, la proteómica tiene la potencialidad de aportar una visión más “real” de la expresión génica que las tecnologías basadas en los ácidos nucleicos. La electroforesis en gel en dos dimensiones (2-DE) combinada con el mapeo de masas de péptidos por MALDI-TOF para la identificación de proteínas, son procedimientos ampliamente utilizados para la determinación del patrón de expresión proteico diferencial en los sistemas biológicos en respuesta a diversas situaciones experimentales.

En el presente trabajo se describe el uso del análisis proteómico en un organismo no modelo para demostrar que la proteómica puede utilizarse como metodología para identificar las proteínas y mecanismos celulares que se expresan en respuesta a cambios nutricionales en la dorada. Aunque existen algunos estudios realizados en otras especies como la trucha (Martín et al., 2001; Smith et al., 2005), perca (Reddish et al., 2008) o el pez cebra (Ziv et al., 2008), éste es el primero que se ha realizado en el hígado de la dorada para estudiar el efecto de un aditivo en la dieta sobre la respuesta del patrón de expresión proteica global. Los resultados descritos en este trabajo demuestran que mediante este procedimiento pueden identificarse y caracterizarse las principales rutas metabólicas que responden ante una determinada situación nutricional.

##### **4.4.1. Efectos del ácido maslínico y la restricción alimentaria sobre el proteoma del hígado de la dorada**

Bajo las condiciones analíticas usadas en el actual estudio, se ha medido la abundancia de 564 manchas de proteínas en el hígado de doradas controles y alimentadas con 100 mg/kg de ácido maslínico *ad libitum* o con ración restringida.

En este estudio se han identificado 57 manchas de proteínas que se encuentran presentes a diferentes niveles como resultado de alguna de las situaciones experimentales analizadas. Este número representa un 9,6% de las manchas de proteínas analizadas en el estudio. De esas 54 proteínas, 5 incrementan (2 completamente) y 5 disminuyen (2 completamente) su nivel de expresión en respuesta al ácido maslínico en las doradas alimentadas *ad libitum*. En el caso de la



alimentación con ración restringida, 47 proteínas muestran un patrón de expresión diferencial en respuesta a la alimentación con ácido maslínico, 31 de ellas incrementan su expresión (15 completamente) y 16 disminuyen (8 completamente).

Las proteínas que mostraron una expresión diferencial se recortaron de los geles, se sometieron a hidrólisis con tripsina y se identificaron usando la técnica de la huella peptídica mediante un MALDI/TOF-TOF.

Los perfiles peptídicos generados se utilizaron para buscar en las bases de datos disponibles. Estos perfiles se compararon frente a todas las secuencias génicas disponibles sin restricción alguna de tipo de organismos o especies. La identificación de proteínas usando la huella peptídica se basa en la presencia en las bases de datos de una secuencia génica o proteica estrechamente relacionada que tenga un alto nivel de identidad en la secuencia de aminoácidos.

En 31 de las proteínas procesadas para el mapeo peptídico se encontró homología significativa con las secuencias existentes y fueron así identificadas. Todas las identificaciones fueron frente a secuencias de teleósteos. En 7 casos, varias manchas proteicas se identificaron con la misma proteína, indicando que se trataban de diferentes isoformas expresadas de la misma proteína.

Así se identificaron 18 proteínas que fueron: glucosa 6-fosfato isomerasa, fosfoglucomutasa-1, aldehído deshidrogenasa, proteína regulada por glucosa, metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina-clase I (glucolisis/gluconeogénesis y otras rutas relacionadas), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (ruta de las pentosas fosfato), factor de elongación 2 de la síntesis de proteínas (EF-2) y proteína quinasa supresora de Ras 1 (factores de crecimiento), Hsp60 (plegamiento de proteínas), 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 4 (metabolismo de esteroides, esteroides y ácidos grasos), queratinas tipo II, proteína de los filamentos intermedios (proteínas estructurales), catalasa (enzima antioxidante), urato oxidasa (catabolismo de nucleótidos de purina), metilmalonato semialdehído deshidrogenasa (degradación de la valina), fumarilacetoacetato hidrolasa, 4-hidroxifenilpirúvico dioxigenasa (degradación de la tirosina) y cadena a de la lisozima (sistema inmunitario inespecífico). Este amplio espectro de proteínas identificadas demuestra la gran influencia del ácido maslínico sobre el metabolismo hepático.

#### **4.4.2. Análisis de las proteínas identificadas en el hígado de la dorada con patrón de expresión modificado**

La glucosa 6-fosfato isomerasa es una enzima que cataliza la transformación reversible de la glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato. Esta reacción forma parte de la glucolisis/gluconeogénesis y regula los niveles de glucosa 6-fosfato disponibles bien para el ciclo de las pentosas fosfato o para la síntesis de glucógeno. La alimentación con ácido maslínico induce un incremento en su actividad en condiciones de restricción de la ración, indicando una glucolisis estimulada. En la alimentación a



saciedad, el ácido maslínico induce una disminución en sus niveles indicando un menor nivel de degradación de la glucosa vía glucolisis.

La fosfoglucomutasa 1 es la enzima que cataliza la transformación reversible de glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato, reacción implicada en la salida y entrada de glucosa 6-fosfato de la glucolisis hacia la síntesis y degradación del glucógeno. El ácido maslínico en la alimentación con ración restringida induce un incremento en los niveles de esta enzima lo cual indica la existencia de un metabolismo del glucógeno estimulado. Durante la alimentación a saciedad, el efecto es el contrario, induciendo el ácido maslínico un descenso en los niveles de fosfoglucomutasa 1. La aldehído deshidrogenasa es una flavoproteína que lleva unido covalentemente un grupo FAD, se encuentra presente en el hígado de mamíferos, contiene molibdeno y átomos de hierro no-hemo. Actúa sobre los aldehídos y sustratos N-heterocíclicos catalizando reacciones de oxidación reducción complejas en las que se transforma un grupo aldehído en un grupo carboxilo con la generación de una molécula de  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , y en algunos casos ATP. Los tejidos animales contiene este tipo de enzimas inespecíficos que, se cree, actúan retirando aldehídos tóxicos de dichos tejidos (Sheikh et al., 1997; Steinmetz et al., 1997).

En el hombre se encuentra implicada en el metabolismo del etanol, en concreto en la transformación de acetaldehído a acetato en presencia de  $\text{NAD}^+$  y en peces, en general y en la dorada en particular, forma parte de los sistemas enzimáticos de biotransformación de xenobióticos (Pretti et al., 2001). Los resultados de nuestro trabajo muestran la existencia de dos isoformas distintas de esta enzima. La alimentación con ácido maslínico disminuye los niveles de expresión de ambas isoformas. Según los datos del NCBI Inr la proteína regulada por glucosa de 58 kDa es una proteína que presenta diferentes dominios, uno de los cuales tiene homología con la tiorredoxina y otro con la isomerasa de disulfuros proteicos (PDI). Ambas actividades están implicadas en reacciones redox fundamentales para el funcionamiento celular a muchos niveles, entre los cuales puede encontrarse el plegamiento de proteínas.

La alimentación con ácido maslínico en condiciones de ración restringida, induce un incremento en los niveles de expresión de esta proteína. En condiciones *ad libitum* el ácido maslínico induce un descenso en los niveles de esta proteína. Un comportamiento parecido se observa para la chaperonina Hsp60, otra de las proteínas identificadas por espectrofotometría de masas.

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa cataliza la transformación de 6-fosfogluconato en ribulosa 5-fosfato mediante una reacción de descarboxilación en la que paralelamente se genera una molécula de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Es uno de los sistemas de producción de NADPH considerados como marcador de los procesos de crecimiento celular y cuya actividad se ha determinado también en este trabajo. Los altos niveles de expresión inducidos por la ingestión de ácido maslínico en condiciones de alimentación restringida coinciden con altos niveles de actividad encontrados en estas condiciones.



El factor de elongación 2 de la síntesis de proteínas (EF-2) es una proteína individual de 100 kDa esencial en la etapa de elongación de la cadena polipeptídica en la síntesis de proteínas en eucariotas (Weissbach H y Ochoa S, 1976). Este factor cataliza la translocación dependiente de la hidrólisis de GTP del peptidil-tRNA desde el sitio del aminoácido hasta el sitio del péptido en el ribosoma. EF-2 se une al GTP y al ribosoma formando un complejo ternario (Kohno et al., 1986). La ingestión de ácido maslínico a una ración restringida induce un incremento en los niveles de expresión de EF-2 que está de acuerdo con los altos niveles de velocidad de síntesis de proteínas encontrados en estas condiciones.

La quinasa supresora de Ras 1 (KSR1) es una proteína con actividad tirosina quinasa que fosforila específicamente residuos de tirosina de Ras 1 produciendo su inactivación. Ras 1 es una proteína con actividad GTPasa implicada en rutas de transducción de señales que actúan directamente sobre la síntesis de proteínas y la división celular como la ruta de transducción de señales mediada por la quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Denouel-Galy et al., 1997). La alimentación con ácido maslínico en situaciones de ración restringida produce un significativo descenso en los niveles de KSR1 que implicaría una mayor actividad de la ruta de las MAPK que estaría de acuerdo con el incremento observado en la velocidad fraccionaria de síntesis proteica y en el incremento en el contenido total de DNA (número de células) encontrado en esta situación.

La 4-hidroxifenilpirúvico dioxigenasa y la fumarilacetoacetato hidrolasa participan en la degradación de la tirosina. La primera cataliza la descarboxilación del 4-hidroxifenilpirúvico que se transforma en homogentisato. La fumarilacetoacetato hidrolasa cataliza la transformación de fumarilacetoacetato en fumarato y acetoacetato mediante una reacción de hidrólisis. En ambos casos, la alimentación con una ración restringida induce un incremento en los niveles de expresión de ambas proteínas.

La metilmalonato semialdéhido deshidrogenasa cataliza la conversión del metilmalonato semialdéhido en propionil-CoA en una reacción dependiente de  $\text{NAD}^+$  y coenzima A. Esta reacción se encuentra en la parte final de la ruta de degradación de la valina. MMSDH se encuentra en el interior de la mitocondria y funciona como un tetrámero de subunidades de 55 kDa (Hatter y Sokatch, 1988; Goodwin et al, 1989). Los análisis de comparación de secuencias revelan que esta proteína es un miembro de la superfamilia de las aldehídos deshidrogenasas (Hempel et al., 1993) con las cuales comparten muchos de los residuos necesarios para desempeñar la función aldehído deshidrogenasa. La ingestión de ácido maslínico junto a una ración restringida induce la expresión de esta proteína.

Otra proteína que ve regulado su nivel de expresión por la ingestión de ácido maslínico es la 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 4. De forma genérica, las 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas catalizan la interconversión estereoespecífica de un grupo hidroxilo en un grupo cetona en el carbono 17 de los andrógenos y estrógenos. Como consecuencia de dicha transformación se puede alterar la capacidad de unión de esas hormonas con su receptor nuclear



específico (Mindnich y Adamski, 2009). En la actualidad se trata de una familia completa de enzimas multifuncionales que comprenden hasta 14 miembros diferentes en mamíferos (Lukacik et al., 2006; Moeller y Adamski, 2006). En el caso del pez cebra, se han identificado dos tipos de 17beta-HSDs: un tipo que podría también actuar en el metabolismo de los ácidos grasos o esteroides y el otro grupo representado por las que específicamente actúan sobre los esteroides (Baker, 2004). En concreto la que se corresponde con el Tipo 4 tiene una estructura característica de tres dominios (Leenders et al., 1994) que albergan las actividades 3-hidroxiacil-CoA hidratasa, acilo graso-CoA enoil hidratasa y un dominio transportador de esteroides.

Esta estructura única junto con su localización peroxisomal (Markus et al., 1995) y otros datos obtenidos de modelos animales y enfermedades humanas (Huyghe et al., 2006) así como estudios filogenéticos (Breitling et al., 2001) sugieren fuertemente que esta enzima está implicada en la beta oxidación de los ácidos grasos y el metabolismo de los ácidos biliares. La alimentación con ácido maslínico a una ración restringida induce un incremento en los niveles de expresión de esta proteína con respecto a los controles. La catalasa es una enzima que contiene un grupo hemo y que reduce el agua oxigenada hasta agua y oxígeno molecular. Esta enzima desempeña una importante función en la protección frente a la generación de radicales libres de oxígeno mediada por contaminantes (Peters et al., 1994). Esta enzima se ha utilizado como un biomarcador antioxidante para estudiar el efecto de la exposición a determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos como el pireno y fluoreno en doradas juveniles (Kopecka-Pilarczyk y Correia, 2009). Los resultados de nuestro estudio demuestran la existencia de 3 isoformas distintas de esta proteína en el hígado de doradas juveniles que en respuesta al ácido maslínico incrementan su nivel de expresión, siendo la respuesta más intensa en condiciones de alimentación con ración restringida.

El ácido úrico o urato es el producto del catabolismo de las purinas procedentes de un exceso de ingesta o de la degradación de los ácidos nucleicos. En los peces se expresan los enzimas de la denominada ruta uricolítica que degradan el urato hasta urea por medio de una serie de reacciones enzimáticas. La primera de ellas es la conversión de urato hasta alantoina y peróxido de hidrógeno en los peroxisomas hepáticos catalizada por la urato oxidasa. Se trata de una enzima evolutivamente muy conservada presente en procariontes y eucariotes.

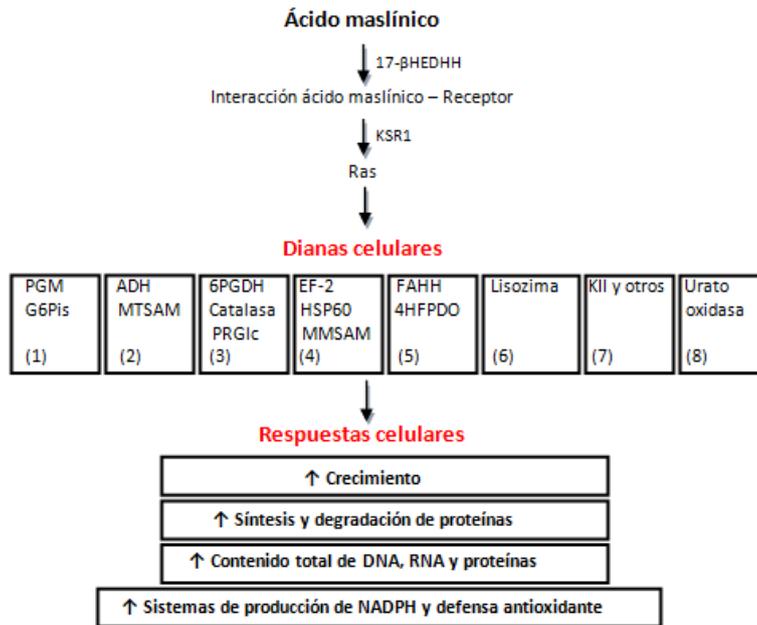
Se ha propuesto que el urato puede actuar como una potente defensa antioxidante frente al envejecimiento y cáncer causado por oxidantes y radicales libres (Proctor, 1970; Ames et al., 1981). La alimentación con ácido maslínico incrementa los niveles de expresión de la urato oxidasa en el hígado de la dorada.

La lisozima es una proteína que ataca y rompe las cadenas de polisacáridos que se encuentran en el peptidoglucano de las paredes celulares de bacterias (Phillips, 1966). Son enzimas que se encuentran en las lágrimas y otras secreciones corporales y en grandes cantidades en la yema del huevo. Algunas bacterias, hongos y algunos virus contienen lisozima (Sanz et al., 1992). En los peces



se considera a esta enzima implicada en el sistema de defensa inmunológica frente a infecciones bacterianas o de otros microorganismos (Sakai et al., 1992) y se ha utilizado como enzima constituyente de un sistema inmunitario inespecífico (Rodríguez et al., 2002). La alimentación con ácido maslínico disminuye los niveles de expresión de esta proteína en el hígado de dorada lo cual puede reflejar la existencia de una menor incidencia de infecciones bacterianas en la dorada.

En la **Figura 4.4**, se propone un posible mecanismo de señalización mediante el cual el ácido maslínico podría desempeñar su acción a nivel molecular y celular.



**Figura 4.4. Posible ruta de señalización celular inducida por la ingestión de ácido maslínico en el hígado de dorada alimentada con ración restringida.** Dianas celulares: 1. Metabolismo de la glucosa; 2. Destoxificación y metabolismo de xenobióticos; 3. Producción de NADPH y defensa antioxidante; 4. Síntesis y plegamiento de proteínas; 5. Degradación de aminoácidos; 6. Sistema inmunitario inespecífico; 7. Citoesqueleto; 8. Degradación de purinas. 17-βHEDHH = 17-β-hidroxi-esteroide deshidrogenasa, KSR1 = proteína quinasa supresora de Ras 1, PGM = fosfoglucomutasa, G6Pis = glucosa 6-fosfato isomerasa, ADH = aldehído deshidrogenasa, MTSAM = metilmalonato semialdehído deshidrogenasa, 6PGDH = 6-fosfogluconato deshidrogenasa, EF-2=factor de elongación 2, FAHH = fumarilacetoacetato hidrolasa, PRGlc = proteína regulada por glucosa, 4HFPDO = 4-hidroxfenilpirúvico dioxigenasa, MMSAM = metilmalonato semialdehído deshidrogenasa, K II = queratinas tipo II.

El citoplasma de las células eucariotas contiene una red compleja de delgados filamentos que sirven como un esqueleto interno o citoesqueleto. Las propiedades de este citoesqueleto afectan a la forma y propiedades mecánicas de las células. Los tres componentes principales del citoesqueleto son los microfilamentos de 6 nm de diámetro, los microtúbulos de 23-25 nm de diámetro y los filamentos intermedios de aproximadamente 10 nm de diámetro. En la mayoría de las células los



filamentos intermedios proveen de la base estructural para el citoesqueleto (Wangikar et al., 1995; Perona y Craik, 1995; Le Bonniec et al., 1996). Estos filamentos intermedios suponen sólo el 1% de las proteínas en una célula aunque proveen de hasta casi el 85% de las proteínas en las capas externas y resistentes de la piel. En los mamíferos, la familia de genes que codifican las proteínas estructurales de los filamentos intermedios tiene alrededor de 70 miembros y son uno de las familias multigénicas mayores (Hesse et al., 2001; Hesse et al., 2004). Las queratinas tipo I y II son las subfamilias con un mayor número de miembros. Zimek y Weber, (2005) describen las características de estos genes en teleósteos. En este trabajo se pone de manifiesto cómo el ácido maslínico incrementa los niveles de expresión de las queratinas tipo II y otras proteínas constituyentes de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular.



#### 4.5. Análisis estructural del tejido hepático y muscular de las doradas alimentadas con ácido maslínico

Las técnicas histológicas generales nos proporcionan una idea muy aproximada de los procesos que acontecen en cada uno de los orgánulos del hepatocito y de células asociadas a éste; así como las que tienen lugar en el músculo. La importancia de estos dos tejidos, los convierten en tejidos clave en todos los procesos relacionados con el crecimiento. Por ello, resulta de especial interés efectuar un análisis de microscopía óptica y electrónica para comprobar si se producían cambios en sus estructuras que fueran responsables de las condiciones intrínsecas del ensayo experimental, ya sea por la adición de ácido maslínico a la dieta, o por la restricción del alimento.

El estudio de microscopía óptica realizado a partir de tejido hepático de los distintos grupos experimentales puso de manifiesto una mayor cantidad de células hepáticas, aunque estas resultaron ser más pequeñas, y la existencia de una mayor compactación del parénquima hepático en los grupos que fueron alimentados con ácido maslínico, tanto en situación AL, como R, que en los grupos controles. Estos resultados se asemejan a los encontrados por Fernández-Navarro (2004) en truchas arco iris alimentadas con dosis de entre 25 y 250 mg de ácido maslínico por kg de dieta, observando una mayor compactación del parénquima hepático, sin que ésta dificulte el intercambio de sustancias a nivel sinusoidal. Esta compactación es consecuencia del mayor índice de hiperplasia, o aumento del número de unidades celulares, determinado a través del contenido total de DNA, tal y como se demuestra en el presente trabajo.

La estructura del hígado que apareció en todos los grupos fue la estructura típica comparable a la mayoría de teleósteos. El parénquima no mostraba el patrón normal lobular, constituido por la vesícula biliar y vasos sanguíneos como ocurre en vertebrados superiores; sino que en la dorada objeto de estudio, al igual que ocurre en el pez gato, en la carpa, entre otras especies, el parénquima hepático está invadido por tejido pancreático en las cercanías, sobre todo, de la vena porta. Las zonas donde coinciden hígado propiamente dicho y tejido pancreático se denomina hepatopáncreas (Takashima y Hibiya, 1995).

El parénquima está dividido, por el hepatopáncreas, en lóbulos irregulares, asociados a tejido conjuntivo. En estos lóbulos, los hepatocitos se disponen radialmente alrededor de un sinusoides para formar una unidad tubular (Díaz et al., 1999). Existe controversia sobre la disposición de los hepatocitos, pudiendo disponerse en forma glomerular (Arias et al., 1996), o en forma tubular o acordonada (Hampton et al., 1985). En nuestro caso, la disposición que adquieren estos hepatocitos se corresponde más bien con cordones. En la base de estos hepatocitos se ubican los sinusoides hepáticos de células endoteliales con sus núcleos aplanados sobresaliendo hacia el lumen sinusoidal.

El hepatocito, observado en nuestras condiciones, adopta una forma piramidal, con su citoplasma de tinción clara y el núcleo más o menos esférico fuertemente teñido, con su cromatina dispuesta en grumos y un nucleolo muy marcado. Esta descripción coincide con la encontrada en trucha (Anderson y Mitchum, 1974; Hampton, 1985; Roberts, 1989).



Los hepatocitos de peces no sólo muestran diferencias entre especies, sino que también se producen cambios en función de la edad, sexo, estado nutricional y época de desove (Rocha et al., 1997).

Los hepatocitos del pez gato y de la trucha suelen contener gránulos de glucógeno, situados cerca de los sinusoides y del canalículo biliar (Hinton y Pool, 1976). Chapman (1981) y Nopanitaya et al., (1979) consideran que la cantidad de glucógeno es la característica más destacada en el carpín dorado. Grandes depósitos de glucógeno también se observaron en el hígado del pez cebra, en el pez mosquito, y el “guppy”, también llamado “pez millón” (Weiss, 1972, 1974).

En comparación con los de los mamíferos, los hepatocitos de los peces no metabolizan mucho el glucógeno (Luna et al., 1985). Algunos autores, describen en la trucha una asociación entre el glucógeno, retículo endoplasmático liso y ocasionales gotas de lípidos, e interpretan dicha asociación con la capacidad para sintetizar y/o degradar glucógeno, dependiendo de la demanda metabólica (Hinton y Pool, 1976). Los resultados que obtuvimos en el hígado de la dorada, no revelaron mucha cantidad de glucógeno en los grupos experimentales, sin embargo Fernández-Navarro, 2004, afirmó encontrar un mayor contenido de glucógeno en las truchas que se alimentaban con ácido maslínico.

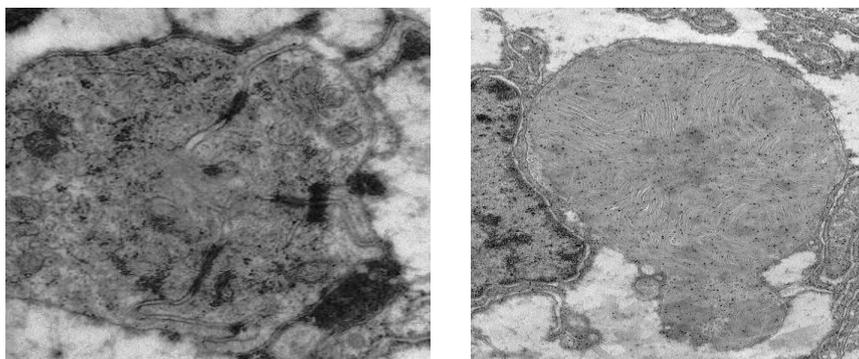
Una característica típica de los teleósteos es la presencia de un páncreas exocrino difuso, que se expande a través del mesenterio y de los islotes de Langerhans en el tejido conectivo situados alrededor de algunos órganos digestivos, o, por otra parte, se difunde en el tejido adiposo intraperitoneal (González et al., 1993). La forma y disposición de los acinos pancreáticos que encontramos, son similares a los de la organización del hígado de la tilapia, *Hydrocynus forskahlii* (Geyer et al., 1996), pez gato, *Ictalurus punctatus* (Hinton y Pool, 1976), corvina, *Micropogon undulatus* (Eurell y Haensly, 1982) y la pescadilla, *Cynoscion guatucupa* (Díaz et al., 1999). Las células exocrinas encontradas en la dorada, se organizan en acinos en torno a un pequeño lumen intercelular. En el citoplasma apical se observaron gránulos de zimógeno los cuales varían en densidad (Morrison, 1987).

Las observaciones obtenidas por microscopía óptica se ven reforzadas más aún cuando se observan los hepatocitos al microscopio electrónico. Conviene resaltar que a diferencia de lo encontrado en trucha (Fernández-Navarro, 2004), en dorada no se observan grandes cantidades de glucógeno ni a microscopía óptica ni electrónica. Asimismo, tampoco parece haber mayor cantidad de mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso. El número y tamaño de mitocondrias resultaba similar en todos los tratamientos; y sin embargo, se encontró en todos los grupos, gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso y, además, bien organizado. Por otra parte, la cantidad de grasa pudo ser algo mayor en las doradas alimentadas con ácido maslínico, hecho que también fue observado en la trucha alimentada con este mismo compuesto, aunque con dosis diferentes (Fernández-Navarro, 2004), pero en todos los casos estaba dentro de la normalidad. Al mismo tiempo, pudimos observar escasez de aparato de Golgi en todos los grupos experimentales. En general, el conjunto de estructuras celulares aparecen más dilatadas de lo normal, probablemente debido a las técnicas histológicas empleadas para la visualización de estas estructuras.



El tamaño y número de los hepatocitos en los grupos experimentales que se alimentaron con ácido maslínico, no fue la única diferencia que se encontró respecto a los controles, sino que se pudo distinguir entre la forma de los lisosomas secundarios que aparecían en los grupos controles y los de los grupos tratados con ácido maslínico. Los lisosomas secundarios resultan de la fusión repetida de los lisosomas primarios con diversos sustratos unidos a la membrana. Esto hace que la morfología de los lisosomas secundarios sea muy variada.

Debido a la diversa morfología de los mismos, a menudo reciben diversos nombres, como vacuolas digestivas que resultan de la fagocitosis de grandes partículas, como ocurre en bacterias; cuerpos multivesiculares que se corresponden con sacos membranosos que contienen numerosas vesículas; y vacuolas autofágicas que son estructuras lisosómicas que contienen (y probablemente digieren) membranas u orgánulos intracelulares, tales como mitocondrias o gránulos de secreción. Además de estos, existen muchos otros tipos de lisosomas. La morfología que se encontró en los grupos alimentados con ácido maslínico aparecían como cuerpos membranosos ocupando prácticamente toda la extensión del lisosoma, mientras que esta cantidad de membranas, no se observaron en los lisosomas de las doradas controles (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5.** Morfología típica de los lisosomas secundarios encontrados en una situación control AL (panel izquierdo) y en una situación AM<sub>100</sub> AL (panel de la derecha) observándose el interior de éste totalmente repleto de estructuras membranosas.

Los resultados que obtenidos por microscopía óptica y electrónica del hígado de las doradas alimentadas con las dietas suplementadas con ácido maslínico tanto *ad libitum* como con restricción alimentaria al 1,5% del peso del pez, demuestran una estructura normal en el hígado de todos los animales. El mayor recambio proteico, traducido en un mayor crecimiento, debido principalmente a fenómenos de hiperplasia, también descrito en trucha (Fernández-Navarro, 2004) se evidencia, a su vez, por una mayor compactación del parénquima hepático y un mayor número de hepatocitos dispuestos entre los sinusoides. De este modo, los resultados de histología refuerzan el resto de los resultados obtenidos en la presente memoria.



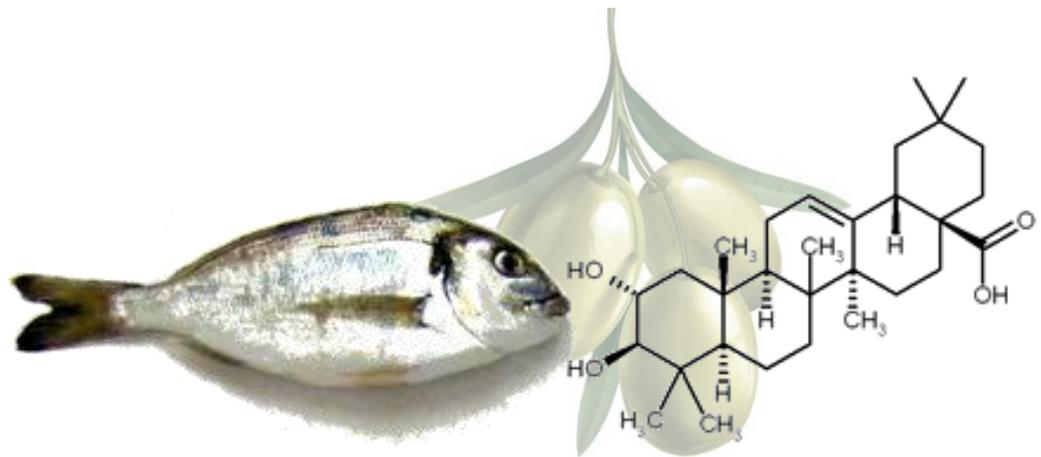
La estructura revelada por microscopía óptica y electrónica de las células musculares en las doradas, pusieron de manifiesto la existencia de diferentes características, tales como, la forma irregular y variable de los miocitos, la gran cantidad de miofibrillas que los constituyen, el endotelio que los rodea y los núcleos que, perfectamente, se distinguen de los de carácter aplanado que presentan las células endoteliales. Aparentemente, no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales, observando únicamente que las miofibrillas en los grupos alimentados con ácido maslínico, AM<sub>100</sub> AL se encontraban ligeramente más dilatadas que en el grupo control AL.

A microscopía electrónica de transmisión, además de lo anteriormente citado, pudimos observar cantidades considerables de gránulos de glucógeno, mitocondrias de tamaño normal, y la unidad estructural y funcional de las células musculares, el sarcómero perfectamente estructurado en todos los casos. El tamaño y número de las células musculares en uno y otro tratamiento, no fue tal como para concluir diferencias entre ellos. De este modo, el ácido maslínico, y/o la restricción alimentaria no provocaron diferencias estructurales en el músculo de las doradas con respecto al músculo de los controles, concluyendo, por consiguiente, que no existe daño alguno muscular atribuible a estas dos condiciones experimentales.



# Conclusiones

---







## 5. CONCLUSIONES

**Primera.** La inclusión de ácido maslínico en la dieta estándar para doradas en condiciones de piscifactoría, a una dosis de 100 mg por kg de dieta, provoca una estimulación del crecimiento, tanto en condiciones de saciedad, como en alimentación restringida. En relación a la utilización nutritiva de la dieta, el índice de conversión de los grupos experimentales con alimentación restringida fue mejor que en los alimentados *ad libitum*. Los mejores índices de utilización nutritiva de la proteína fueron los obtenidos en las doradas pertenecientes al grupo AM<sub>100</sub> AL.

**Segunda.** La adición de ácido maslínico indujo un aumento significativo del peso del hígado y músculo blanco de la dorada, un mayor contenido total de RNA, DNA y concentración de proteína tisular, así como un incremento en las velocidades de recambio proteico, tanto de síntesis como degradación. El mayor crecimiento del tejido hepático y muscular, en las doradas alimentadas con dieta suplementada con ácido maslínico es debido a procesos de hiperplasia celular indicativos de un incremento en el número de células. No se observan cambios significativos en el tamaño celular. Este compuesto, por tanto, actúa como un auténtico factor de crecimiento, capaz de modular el recambio proteico a través de la estimulación de los procesos de síntesis y degradación proteica, así como, del contenido en ácidos nucleicos, principalmente, por favorecer la síntesis de DNA.

**Tercera.** En hígado, la adición de ácido maslínico produjo un incremento significativo de la actividad de los principales sistemas de producción de NADPH. La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup> mostraron una mayor actividad específica y velocidad máxima indicadoras de una mayor cantidad de este enzima, resultado que se confirmó con la mayor expresión que apareció en los grupos tratados. Por otro lado, la menor K<sub>m</sub> en estos grupos indica un aumento de la afinidad del enzima por su sustrato. La V<sub>max</sub> del enzima málico, por su parte, se vio incrementada en los dos grupos adicionados con ácido maslínico, pero estas diferencias no se encontraron en la actividad específica del enzima. Los valores de K<sub>m</sub> no mostraron efecto alguno de la afinidad del enzima sobre su sustrato; a su vez, los resultados de expresión pusieron de manifiesto estos hechos, no encontrándose diferencias de expresión por la adición de ácido maslínico, sino por la restricción dietaria. Por su parte, los enzimas relacionados con el metabolismo de proteínas, serina deshidratasa, alanina aminotransferasa y tirosina aminotransferasa mostraron actividades mayores en alguno de los grupos alimentados con ácido maslínico. La serina deshidratasa mostró mayor velocidad y actividad específica sin cambios en la afinidad en los grupos que se alimentaban con ácido maslínico y con ración restringida. La actividad alanina aminotransferasa se vio estimulada por la presencia de ácido maslínico en los grupos que se alimentaban a saciedad; aunque la afinidad del enzima aumenta sólo en los grupos de alimentación restringida y ácido maslínico.

Los resultados indican que el ácido maslínico induce la expresión y cambio de actividad de los enzimas responsables de la homeostasis metabólica, propia de este tejido, y necesaria para justificar, finalmente, el mayor crecimiento de las doradas alimentadas con este compuesto.



**Cuarta.** En el músculo de la dorada, el ácido maslínico, tanto en condiciones de alimentación a saciedad como de restricción calórica, produce un incremento de la actividad específica y  $V_{max}$  en los enzimas G6PDH, 6PGDH, IDH-NADP<sup>+</sup>, y Tyr-AT. En todos ellos además, aumentó significativamente la afinidad del enzima por su sustrato. El mayor número de moléculas de enzima en la G6PDH e IDH-NADP<sup>+</sup> se puso también de manifiesto por la técnica de “Western blot”. El ácido maslínico estimuló positivamente tanto la afinidad como la actividad específica del enzima málico en el grupo ad libitum. En cuanto a las actividades Ser-DH y Ala-AT no se vieron afectadas por la adición de ácido maslínico. De este modo, se observa como en músculo el efecto que tiene el ácido maslínico se refiere esencialmente a un aumento de las rutas metabólicas que implican una mayor producción de NADPH implicados de forma directa en los procesos de crecimiento celular.

**Quinta.** Se ha caracterizado por vez primera el proteoma del hígado de la dorada mediante electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y comparación de secuencias. Se han conseguido analizar y cuantificar al mismo tiempo la expresión de 564 manchas de proteínas distintas. Se ha demostrado que esta metodología es apropiada para realizar estudios de proteómica en organismos no modelo, como es la dorada. La ingestión de ácido maslínico a ración restringida induce cambios en la expresión de proteínas implicadas en rutas de transducción de señales, metabolismo de la glucosa, procesos de detoxificación celular y metabolismo de xenobióticos, sistemas de producción de NADPH y defensa antioxidante, síntesis y plegamiento de proteínas, degradación de aminoácidos, citoesqueleto, degradación de purinas, sistema inmunitario inespecífico. Es el primer estudio de proteómica realizado en esta especie para evaluar el efecto de un aditivo en la dieta sobre el conjunto de proteínas celulares expresadas diferencialmente en un órgano. Este estudio de proteómica funcional ha permitido proponer una posible ruta celular de integración mediante la cual el ácido maslínico puede desencadenar las respuestas celulares observadas a nivel tisular y de organismo.

**Sexta.** El análisis de la estructura histológica del hígado mediante microscopía óptica y electrónica revela que las doradas alimentadas con 100 mg de ácido maslínico por kg de dieta presentan un incremento en el número de hepatocitos, dispuestos en un parénquima mucho más compactado, en el que quedan pocos espacios vacíos. El aspecto general del parénquima hepático en los grupos con ácido maslínico, corresponde al de un tejido con mayor dinamismo celular, frente a un “orden estático” existente en los grupos controles. La estructura muscular de la dorada, por su parte, no muestra cambios significativos entre los diferentes grupos.

**Conclusión general.** Los resultados obtenidos en el presente trabajo, tanto nutricionales, cinéticos, moleculares y citológicos, permiten concluir que el ácido maslínico, un triterpeno pentacíclico de origen natural, puede ser utilizado como aditivo alimentario en la dieta estándar de dorada, ya que produce un mayor crecimiento en los peces que lo consumen, sin ocasionarle lesiones en los tejidos estudiados. Este efecto sobre el crecimiento cursó con un aumento en el contenido total de DNA, RNA y proteína tisular y estimula, además, el recambio proteico modificando las velocidades de síntesis y degradación de proteínas e incrementa la actividad de los



## Conclusiones

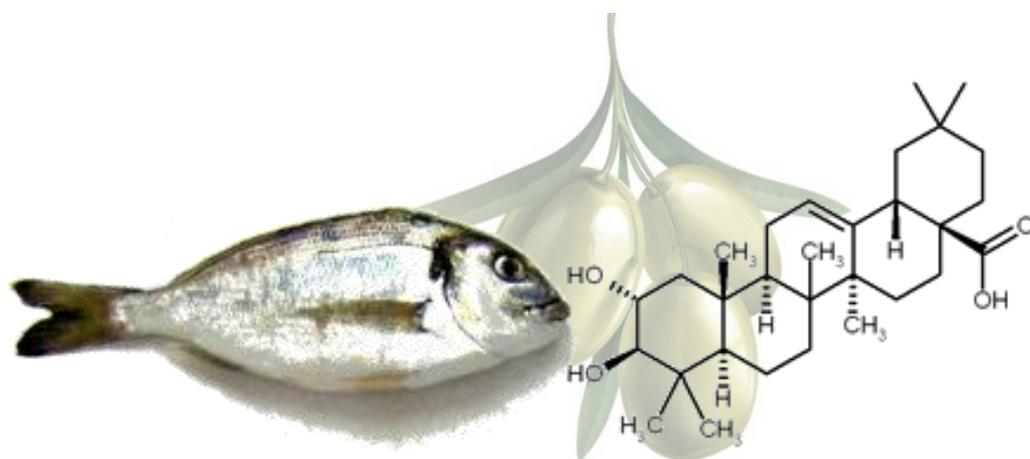
---

enzimas productores de NADPH, fundamentalmente, por su capacidad de inducir la expresión de enzimas marcadores del crecimiento celular y del metabolismo proteico, como se demuestra por los estudios de expresión y proteómica celular.



# *Bibliografía*

---







## 6. Bibliografía

- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A.M., y Bergot, P. (1997). "Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate". *J. Fish Biol.*, 50:1285-1302.
- Ames, N.B., Cathcart, R., Schwiers, E. y Hochstein, P. (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:58-62.
- Anderson, B. y Mitchum, D. (1974). "Atlas of Trout Histology". *Wyo. Game Fish. Comm. Bull.*, 13:15-21.
- AOAC. (2000). "Oficial Methods of Analysis. Association of Oficial Analytical Chemist", Gaithersburg, Maryland, USA, 1018.
- Arce, M.J. (1993). "Restricción de alimento manual y diferentes densidades de nutrientes en las dietas para el control del síndrome ascítico en el pollo de engorde". XI Ciclo de Conferencias Internacionales sobre Avicultura. INIFAP-SARH. Centro de ganadería. Colegio de Postgraduados.
- Archakov, A.I., Ivanov, Y.D., Lisitsa, A.V. y Zgod, V.G. (2007). "AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics". *Proteomics*, 7:4-9.
- Arias, A. (1980). "Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del robalo (*Dicentrarchus labrax*) en los esteros de Cádiz". *Inv. Pesq.*, 44:59-83.
- Arias, E. (1996). "Effects of the phenoxy herbicide MCPA on SCE frequency and cell kinetics in developing chick embryos." *Ecotoxicol. Environ.Saf.*, 33:25-29.
- Baker, M.E. (2004). "Co-evolution of steroidogenic and steroid-inactivating enzymes and adrenal and sex steroid receptors". *Mol. Cell. Endocrinol.*, 215: 55-62.
- Barroso, I. y Santisteban, P. (1999). "Insulin-induced early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription." *J. Biol. Chem.*, 274:17997-8004.
- Barroso, J.B. (1993). "Influencias nutricionales y de la edad sobre el comportamiento cinético de los sistemas productores de NADPH en diferentes tejidos de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)". Tesis doctoral Universidad de Granada. Granada, España.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupiáñez, J.A., del Río, L.A. (1999). "Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes." *J Biol. Chem.*, 274:36729-33.



- Barroso, J.B., Peragón, J., Contreras-Jurado, C., García-Salguero, L., Corpas, F.J., Esteban, F.J., Peinado, M.A., de La Higuera, M., Lupiáñez, J.A. (1998). "Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems." *Am. J. Physiol.*, 274:R1578-87.
- Barroso, J.B., Peragón, J., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (2001). "Carbohydrate deprivation reduces NADPH-production in fish liver but not in adipose tissue." *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33:785-796.
- Barroso, J.B.; García-Salguero, L.; Peragón, J.; de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (1994). "The influence of dietary protein on the kinetics of NADPH-production system in various tissues of rainbow trout". *Aquaculture*, 124:47-59.
- Barrows, C.H. y Kokkonen, G.C. (1982). "Dietary restriction and life extension, biological mechanisms". En: Moment GB, ed. *Nutritional approaches to aging research*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 219-243.
- Bastrop, R., K. Jürs y Spangenberg, R. (1992). "Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.*, 102:151-161.
- Bauchot, M.L. y Pras, A. (1987). "Guía de los Peces de Mar de España y Europa". Ediciones Omega, Barcelona. 432.
- Beamish, F. y Medland, T. (1986). "Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*". *Aquaculture*, 55:35-42.
- Beamish, F.W. y Mc Mahon, P.D. (1988). "Apparent heat increment and feeding strategy in walleye, *Stizostedion vitreum vitreum*". *Aquaculture*, 68:73-82.
- Bergemeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. y Stork, H. (1983). "D-Glucose. Determination with hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase". En: *Methods of Enzymatic Analysis*. Ed. por Bergemeyer H.U.n3:1196-1201.
- Bergheim, S., Malterud, K.E. y Anthonsen, T. (1991). "Preparative scale separation of neutral lipids and phospholipids by centrifugally accelerated thin-layer chromatography." *J. Lipid. Res.*, 32:877-879.
- Bergmeyer, H. U. (1975). "New values for the molar extinction coefficients of NADH and NADPH for the use in routine laboratories (author's transl)." *Z Klin Chem Klin Biochem.*, 13:507-8.
- Bergot, F. (1979). "Specific problems posed by carbohydrate utilization in the rainbow trout". *Ann. Nutr. Aliment.*, 33:247-57.
- Bianchi G., Vlahov G. y Pozzi N. (1994). "The lipids of *Olea europaea*. pentacyclic triterpene acids in olives". *Phytochemistry*, 37:205-207.



- Bibiano Melo, J.F., Lundstedt, L.M., Metón, I.; Baanante, I.V. y Moraes, G. (2006). "Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: *Pimelodidae*)". *Comp.Biochem. Physiol.*, 145A:181-187.
- Biemann, K. (1988). "Recent advances in protein sequencing by mass spectrometry" *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 16:99-111.
- Bjornsson, B., Thorarensen, H., Hirano, T., Ogasawara, T. y Kristinsson, J.B. (1989). "Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation". *Aquaculture*, 82:77-91.
- Blackstock, W.P., Weir, M.P. (1999). "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins". *Trends Biotechnol.*; 17:121-7.
- Blokus, H. (1986). "Aspects related to quality of farmed salmon (*Salmo salar*)". En: *Seafood quality determination*. Eds.: Kramer, D.E., y Liston, J. *Symposium International*.
- Bodkin, N.L., Ortmeyer, H.K. y Hansen, B.C. (1995). "Long-term dietary restriction in older-aged rhesus monkeys: effects on insulin resistance". *J. Gerontol. A. Biol. Sci.*, 50:B142-7
- Bonamusa, L. E. (1991). "Metabolism Glucidic en Fetge de *Sparus aurata*. Regulació en Funció de l'Aport Nutricional" (en catalán). Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Bond, C.E. (1996). "Nervous and endocrine systems". En: *Biology of Fishes*. 2<sup>nd</sup> ed. Bond, C.E (ed.).
- Bonnet, S., Fauconneau, B., David, K., Faure, A., y Laroche, M. (1996). "Effect of fasting and stress on post mortem changes in brown trout reared in sea water". *Refrigeration Science and Technology. Refrigeration and Aquaculture*, Bordeaux, France, 137-144.
- Boonyaratpalinn, M., Boonyaratpalinn, S. y Supamataya, K. (1994). "Ascorbyl-phosphate-Mg as a dietary vitamin C source for sea bass *Lates calcarifer*". En: *The Third Asian Fisheries Forum*. Singapore; October 27-31, 1992. Chou, L.M.; Munro, A.D.; Lam, T.J.; Chen, T.W.; Cheong, L.K.K.; Ding, J.K.; Hooi, K.K.; Khoo, H.W.; Phang, V.P.E.; Shim, K.F. y Tan, C.H: (Eds.). Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, 725-728.
- Borrebaek, B. y Christophersen, B. (2000). "Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments". *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 125:387-393.
- Boyce, S.J. y Clarke, A. (1997). "Effect of body size and ration on specific dynamic action in the Antarctic plunderfish, *Harpagifer antarcticus* Nybelin". *Physiological Zoology.*, 70:679-690.



- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, 72:248-54.
- Breitling, R., Marijanovic, Z., Perovic, D. y Adamski J. (2001). "Evolution of 17beta-HSD type 4, a multifunctional protein of beta-oxidation". *Mol. Cell. Endocrinol.*, 171:205-210.
- Brett, J.R. (1979). "Environmental factors and growth". En: *Fish Physiology*. Hoar, W.S., D.J.
- Brett, J.R. y Groves, T.T.D., (1979). "Physiological energetic". En: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.), *Fish Physiology*, Academic Press, New York, 8:280-351.
- Brooks, S., y Johnston, I.A. (1993). "Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin subunit composition of myotomal muscle-fibre types in the plaice *Pleuronectens platessa*". *Mar. Biol.*, 117:501-513.
- Buchanan-Wollaston, V. y Ainsworth, C. (1997). "Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation." *Plant. Mol. Biol.*, 33:821-34.
- Buckley, J. y Groves, T. (1979). "Influences of feed on the body composition on finfish". En: *Finfish Nutrition and fishfeed technology*. Halver, J.E. y Tiews, K, K. eds. Heedeman Verlag. Berlín., 2:335-343.
- Buddington, R.K., Buddington, K.K. y Kimura, K. (2002). "A high retinol dietary intake increases its apical absorption by the proximal small intestine of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*)." *J. Nutr.*, 132:2713-6.
- Bui, M. (1988). "Ascorbic acid and related compounds". En: *Modern Chromatographie Analyses of the Vitamins* (De Leenheer, A. P., Lambert, W. E. y De Ruyter, M.G.M., eds.), 30:267-301. Marcel Dekker, New York, NY and Basel, Switzerland.
- Cai, J., Zhao, Y. y Liu, Y. (2007). "Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells." *Hepatology*, 45:1229-39.
- Calder, P.C. (1998). "Dietary fatty acids and lymphocyte functions". *Proc. Nutr. Soc.* ,57:487-502.
- Canino, S., Nieri, B., Pistelli, L., Alpi, A. y De Bellis, L. (1996). "NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase in germinating cucumber cotyledons: purification and characterization of a cytosolic isoenzyme". *Physiol. Plant.*, 98:13-19.
- Cardenete , G., García, M. y Zamora, S. (1987). "Relación proteína/energía en las dietas para truchas. II. Efecto sobre la composición de distintas fracciones corporales". *Ars. Pharmaceutica.*, 27:237-246.



- Carrascal, L.M. y Palomino, D. (2002). "Determinantes de la riqueza de especies de aves en las islas Selvagem y Canarias". *Ardeola*, 49:211-221.
- Caseras, A., Metón, I., Vives, C., Egea, M., Fernández, F. y Baanante, I.V. (2002). "Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*).". *Br. J. Nutr.*, 88:607-14.
- Castelló-Orvay, F. (1993). "Acuicultura: historia, evolución y situación actual en Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos y Tecnología de Producción". (Editado por Castelló-Orvay, F.). 11-24. Publicaciones de la Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Celis, J.E., Rasmussen, H.H., Gromov, P., Olsen, E., Madsen, P., Leffers, H., Honoré, B., Dejgaard, K., Vorum, H. y Kristensen, D.B. (1995). "The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways". *Electrophoresis*, 16:2177-240.
- Chambers, G., Lawrie, L., Cash, P. y Murray, G. (2000). "Proteomics: a new approach to the study of disease". *J. Pathol.*, 280-288.
- Champan, G.B. (1981). "Ultrastructure of the liver of the fingerling rainbow trout *Salmo gairdneri*" Richardson. *Journal of Fish Biology*, 18:553-567
- Chen, R., Le Maréchal, P., Vidal, J., Jacquot, J.P. y Gadal, P. (1988). "Purification and comparative properties of the cytosolic isocitrate dehydrogenases (NADP) from pea (*Pisum sativum*) roots and green leaves". *Eur. J. Biochem.*, 175:565-572.
- Chen, W., Ji, J., Zhao, R., y Ru, B. (2002). "Comparative Proteome Analysis of Human Temporal Cortex Lobes by Two-Dimensional Electrophoresis and Identification of Selected Common Proteins". *Neurochem. Res.*, 27:871-881.
- Cho, B.H., Egwim P.O. y Fahey, G.C.Jr. (1985). "Plasma lipid and lipoprotein cholesterol levels in swine. Modification of protein-induced response by added cholesterol and soy fiber." *Atherosclerosis*, 56:39-49.
- Ciechanover, A., Hargrove, J.L. y Gross-Mesilaty, S. (1997). "Ubiquitin-mediated degradation of tyrosine aminotransferase (TAT) in vitro and in vivo". *Mol. Biol. Rep.*, 24:27-33.
- Clauser, K.R., Baker, P.R. y Burlingame, A.L. (1999). "Role of accurate measurement (10 ppm) in protei identification strategies employing MS or MS/MS and database searching". *Anal. Chem.*, 71:2871-2882.
- Colloca, F. y Cerasi, S. (2005). "Cultured Aquatic Species Information Programme *Sparus aurata*". FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). FAO-FIGIS.



- Colt, J. y Tchobanoglous. (1978). "Chronic exposure of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to ammonia: Effects on growth and survival". *Aquaculture*, 15:353-372.
- Company R., Calduch-Giner, J.A. Kaushik, S. y Pérez-Sánchez, J. (1999). "Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets." *Aquaculture*, 171:279-292.
- Cook, M.T., Hayball, P.J., Birdseye, L., Bagley, C., Nowak, B.F. y Hayball, J.D. (2003). "Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, *Sparidae* (Bloch and Schneider)) in winter." *Fish Shellfish Immunol.*, 14:333-45.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Lupiáñez, J.A. y del Río, L.A. (1999). "Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence." *Plant. Physiol.*, 121:921-928.
- Corpas, J. (1987). "Separación y comportamiento cinético de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato de hígado y corteza renal de rata". Tesis doctoral, Universidad de Granada, Granada, España.
- Cowey, C.B. (1994). "Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values". *Aquaculture*, 124: 1-11.
- Cowey, C.B. y Sargent, J. (1979). "Nutrition". En: *Fish Physiology*. Hoar, Randall y Brett (Eds). Academic Press, New York. 3:1-69.
- Cowey, C.B. y Walton, M.J., (1989). "Intermediary metabolism". En: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*, 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press, New York, 259-329.
- Cowey, C.B., Knox, D., Adron, J. W., George, S. y Pine, B. (1977). "The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Br. J. Nutr.*, 38:463-70.
- Cummings, J.L., Houlihan, J.P y Hill, M. A. (1986). "The pattern of reading deterioration in dementia of the Alzheimer type: observations and implications." *Brain Lang*, 29: 315-23.
- Dabrowski, H. y Guderley, H. (2002). "Intermediary metabolism". En: *Fish Nutrition*. Halver, J.E. y Hardy, R.W. (Eds.). Academic Press, London .310-365.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. y Bogwald, J. (1997). "Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES)". *J. Fish Dis.*, 20:241-273.
- Daza, A., C. López-Bote, Olivares, A., Menoyo, D. y Ruíz, J. (2006). "Effect of age at the beginning of the free-range fattening period on growth and carcass and fat quality in Iberian pigs." *Arch. Anim. Nutr.*, 60:317-24.



- De Bellis, L., Picciarelli, L., Pistelli, L. y Salin, M.L. (1990). "Localization of glyoxylate-cycle marker enzymes in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons". *Planta*, 180:435-439.
- De Francesco, M., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S.J. y Poli, B.M. (2004). "Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Aquaculture*, 236:413-429.
- De la Higuera, García-Gallego, M., Hidalgo, M.C. y Suárez, M.D. (1989). "Utilization of dietary protein by the eel (*Anguilla anguilla*): Optimum dietary protein levels". *Aquaculture*, 79:53-61.
- De la Higuera, M. (1990). "Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fish: introductory remarks. In *Mediterranean Aquaculture*", 122-124. Edited by Flos, R.; Tort, L. and Torres, P. Ellis Horwood books in aquaculture and fisheries support.
- De La Higuera, M., García-Gallego, M., Sanz, A., Cardenete, G., Suárez, M.D. y Moyano, F.J. (1988). "Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". *Aquaculture*, 71:37-50.
- De la Higuera, M., Garzón, A., Hidalgo, M.C., Peragón, J., Cardenete, G y Lupiáñez, J.A. (1998). "Influence of temperature and dietary supplementation either with free or coated lysine on the fractional protein turnover rates in the White muscle of carp". *Fish Physiol. Biochem.*, 18:85-95.
- De la Higuera, M., Murillo A., Varela, G. y Zamora, S. (1977a). "The influence of high dietary fat levels on protein utilization by the trout (*Salmo gairdneri*)". *Comp.Biochem.Physiol.* 56A:37-41.
- De la Higuera, M.; Zamora, S.; Murillo, A. y Varela G. (1977b). "Influencia de la ingesta grasa en la composición de la trucha y en su palatabilidad para el hombre". *Ann. Bromatol.* XXIX (2):221-230.
- Dellmann, H.D. y Carithers, J. (1993). "Intrahypothalamically transected neurosecretory axons do not regenerate in the absence of glial cells." *J Neural Transplant Plast.*, 4:127-37.
- Dellmann, H.D., (1993). *Txtbook of Veterinary Histology*. 3<sup>rd</sup> edition. Lea and Febiger. Philadelphia, USA.
- Denouel-Galy, A., Douville, E.M., Warne, P.H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G., Downward, J. y Eychène, A. (1997). Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. *Current Biology*, 8:46-55.
- Devaux, A., Pesonen, M., Monod, G. y Andersson, T. (1992). "Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes". *Biochem. Pharmacol.*, 43:898-901.
- Diamondstone, T.I. y Litwack, G. (1963). "Formation of tyrosine-alpha-ketoglutarate transaminase activity *in vitro*." *Nature*, 197:493-4.



- Díaz, A.O., González Castro, M.; García, A.M.; Devinentini, C.V. y Goldemberg, A.L. (1999). "Morphological and histochemical characterization of liver from stripped weakfish, *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830)". *Biociencias*, 7:67-78.
- Díaz, J., Álvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M. y Kasushik, S.J. (1998). "Regulation of hepatic lipogenesis activity is affected by dietary protein level in European seabass (*Dicentrarchus labrax*)". *Comp. Biochem. Physiol.*, 135B:183-196.
- Díaz, J., Arzel, J., Aguirre, P., Corraze G. y Kaushik, S. (2003). "Growth and hepatic acetyl coenzyme-A carboxylase activity are affected by dietary protein level in European seabass (*Dicentrarchus labrax*)." *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 135:183-196.
- Díaz, R.M., García-Granados, A., Moreno, E., Parra, A., Quevedo-Sarmiento, J., Saenz de Buruaga A. y Saenz de Buruaga, J.M. (1988). "Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of diterpenoid compounds from *Sideritis*." *Planta Med.*, 54:301-4.
- Donaldson, R. P. (1982). "Nicotinamide cofactors (NAD and NADP) in glyoxysomes, mitochondria, and plastids isolated from castor bean endosperm." *Arch. Biochem. Biophys.*, 215:274-9.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., y Wang, X. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition". *Cell.*, 102:33-42.
- Eggleston, L.V. y Krebs, H.A. (1974). "Regulation of the pentose phosphate cycle." *Biochem. J.*, 138:425-35.
- Einen, O., Waagen, B. y Thomassen, M.S. (1998). "Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): I. Effects on weight loss, body shape, slaughter and fillet-yield, proximate and fatty acid composition". *Aquaculture*, 166:85-104.
- Einen, O., y Skrede, G. (1998). "Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*), fed high-energy diets". *Aquacult. Nutr.*, 4:99-108.
- Elliott, J.M. (1975) "Number of meals in a day, maximum weight of food consumed in a day and maximum rate of feeding for brown trout, *Salmo trutta L.*". *Freshwater Biology*, 5:287-303.
- Ellis, S.C. y Reigh, R.C. (1991). "Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*". *Aquaculture*, 97:383-394.
- Ellison, P.T. (1996). "Age and developmental effects on adult ovarian function". En: Mascie-Taylor NCG, ed. *Variability in human fertility: a biological anthropological approach*. New York: Cambridge University Press, 69-90.
- Ellison, P.T., Panter-Brick, C., Lipson, S.F. y O'Rourke, M.T. (1993). "The ecological context of human ovarian function". *Hum. Reprod.*, 8:2248-58



- Enes, P., S. Panserat, S., Kaushik, S. y Oliva-Teles, A. (2006). "Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles." *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 143:89-96.
- Euerll, J. A. y Haensly, W. E. (1982). "The histology and ultrastructure of the liver of Atlantic croaker *Micropogon undulatus* L." *Journal of Fish Biology*, 21:113-125.
- Eveleth, P.B. y Tanner, J.M. (1990). "Worldwide variation in human growth". 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cambridge University Press.
- FAO. (2007). "Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación". Departamento de Pesca y Acuicultura.
- Fatania, H., al-Nassar, K.E. y Sidhan, V. (1993). "Purification and partial characterisation of NADP(+)-linked isocitrate dehydrogenase from rat liver cytosol." *FEBS Lett* 320:57-60.
- Fauconneau, B. (1985a). "Protein synthesis and protein deposition in fish". En: *Nutrition and Feeding in Fish*. Cowey, C.B., Mackie, A.M. y Bell, J.G. (1994). (Eds). Academic Press, London, 17-45.
- Fauconneau, B. y Arnal, M. (1985b). "*In vivo* protein synthesis in different tissues and the whole body of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Influence of environmental temperature." *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, 82:179-187.
- Fauconneau, B., Arnal, M. y Luquet, P. (1981). "*In vivo* protein synthesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) muscle. Effect of temperature acclimatization". *Reprod. Nutr. Dev.*, 21:293-301.
- Fauconneau, B., y Paboeuf, G. (2001). "Muscle satellite cells in fish". En: *Muscle development and growth*. Ed: Johnston, I.A.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. y Whitehouse, C.M. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules". *Science*, 246:64-71.
- Ferguson M.M. (1992). "Enzyme heterozygosity and growth in rainbow trout: Genetic and physiological explanations". *Heredity*, 66:115-122.
- Fernández, F., García Miquel, A., Guínea, J. y Martínez, R. (1998). "Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the effect of diet composition and ration size". *Aquaculture*, 166: 67-84.
- Fernández, N., Festenstein, H., Alonzo, A., Biro, P.A., Labeta, M., Carolan, E., Houlihan, J., Mellor, A. y Flavell, R. (1986). "The expression of murine Qa region gene product(s) in L cell transformants." *J Immunogenet* 13:425-35.



- Fernández-Navarro, M., Peragón, J., Amores, V., de La Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (2008). "Maslinic acid added to the diet increases growth and protein-turnover rates in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 147:158-67.
- Fernández-Navarro, M., Peragón, J., Esteban, F.J., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (2006). "Maslinic acid as a feed additive to stimulate growth and hepatic protein-turnover rates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 144:130-40.
- Figeys, D. (2002). "Functional proteomics: mapping protein-protein interactions and pathways". *Curr Opin. Mol. Ther.*, 4:210-5.
- Fitch, W.M. y Chaikoff, I.L. (1960). "Extent and patterns of adaptation of enzyme activities in livers of normal rats fed diets high in glucose and fructose." *J. Biol. Chem.*, 235:554-7.
- Fonds, M., Cronie, R., Vethaak, A.D., y Van der Puyl, P. (1992). "Metabolism, food consumption and growth of plaice (*Pleuronectens platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) in relation to size and temperature". *Neth. J. Sea Res.*, 34:111-118.
- Foster, A.R., Houlihan, D.F. y Hall, S.J., (1993). "Effect of nutritional regime on correlates of growth rate in juvenile cod (*Gadus morhua*): comparison of morphological and biochemical measurements". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50:502-512.
- Frega N., Monzon M., Servidio G. y Lercker G. (1995). "Study on the oxidative stability of extra virgin olive oil by the Racimat test. Riv". *Ital. Sostanze Grasse*, 72:493-496
- French, C.J., Mommsen, T.P, Hochachka, P. W. (1981). "Amino acid utilisation in isolated hepatocytes from rainbow trout." *Eur. J. Biochem.*, 113: 311-7.
- Gadomski, D.M. y Petersen, J.H. (1988). "Effects of food deprivation on the larvae of two flatfishes". *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 44:103-111.
- Galloway, T.F., Kjørsvik, E. y Kryvi, H. (1999). "Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates". *J. Exp. Biol.*, 202:2111-2120.
- Galloway, T.F., Kjørsvik, E., y Kryvi, H. (1998). "Effect of temperature on viability and axial muscle development in embryos and yolk sac larvae of the Northeast arctic cod (*Gadus morhua*)". *Mar. Biol.* 132, 559-567.
- Gálvez, S., Hodges, M., Bismuth, E., Samson, I., Teller, S. y Gadal, P. (1995). "Purification and characterization of a fully active recombinant tobacco cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in *Escherichia coli*: evidence for a role for the N-terminal region in enzyme activity." *Arch. Biochem. Biophys.*, 323:164-8.



- García-Alcázar, A., Abellán, E., Dehesa; L., Arizcun, M., Delgado, J. y Ortega, A. (1994). "Experiencias de alimentación en preengorde y engorde de dorada (*Sparus aurata* L.) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) con dietas de distinta relación proteína/grasa. Bol. Ins. Esp. Oceanogr., 10:191-201.
- García-Granados, A. (1998a). "Procedure of industrial exploitation of 3-b-hydroxyolean 12-en-28-oic (oleanolic) and 2- $\alpha$ , 3- $\beta$ -dihydroxyolean-12-en-28-oic (maslinic) acids contents in the by-product of the olive processing". P.C.T. Int. Appl. W0 043331/1998. Chem. Abstr, 128:179706.
- García-Granados, A., (1998b). "Use of maslinic acid as serin proteases inhibitor in the treatment of the disease produced by the acquire immunodeficiency viruses". Spanish Patent P9702528.
- García-Granados, A., (1998c). "Use of maslinic acid as serin proteases inhibitor in the treatment of diseases produced by parasite of *Cryptosporidium genus*". Spanish Patent P9701029.
- García-Granados, A., Dueñas, J., Moliz, J.N., Parra, A., Pérez, F.L., Dobado, J.A. y Molina, J., (2000). "Semi-synthesis of triterpene A-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Part II. Theoretical and experimental C-13chemical shifts". J. Chem. Res.-S. 2:0326-0339.
- García-Granados, A., Fernández, A., Gutiérrez, M.C., Martínez, A., Quiros, R., Rivas, F. y Arias, J.M. (2004). "Biotransformation of ent-13-epi-manoyl oxides difunctionalized at C-3 and C-12 by filamentous fungi." Phytochemistry 65:107-15.
- García-Granados, A., Gutiérrez, M.C. y Rivas, F. (2003a). "Improved microbiological hydroxylation of sesquiterpenoids: semisynthesis, structural determination and biotransformation studies of cyclic sulfite eudesmane derivatives." Org. Biomol. Chem., 1:2314-20.
- García-Granados, A., López, P.E., Melguizo, E., Moliz, J.N., Parra, A., Simeo, Y. y Dobado, J.A. (2003b). "Epoxides, cyclic sulfites, and sulfate from natural pentacyclic triterpenoids: theoretical calculations and chemical transformations." J Org Chem 68:4833-44.
- García-Granados, A., López, P.E., Melguizo, E., Parra, A. y Simeo, Y. (2007). "Remote hydroxylation of methyl groups by regioselective cyclopalladation. Partial synthesis of hyptatic acid-A." J Org Chem 72:3500-9.
- García-Granados, A., Parra, A., Rivas, F. y Segovia, A.J. (2007). "Seven-membered cyclic sulfite eudesmane derivatives: partial synthesis, structural determination, and enzymatic resolution." J. Org. Chem., 72:643-6.
- Garlick P.J., Mc Nurlan M.A. y Preedy V.R. (1980). "A rapid convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H] phenylalanine". Biochem. J., 192:719-723.
- Gaylord, T.G., y Gatlin, D.M. (2001). "Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)". Aquaculture, 194:337-348



- Georgopoulos, C.B. y Conides, A.J. (1999). "Study on the effects of dietary starch on growth, food conversion and digestibility of adult gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758)", *J. Aquac. Trop.*, 14:143-152.
- Gerking, S.D. (1971). "Influence of rate of feeding and body weight on protein metabolism of bluegill sunfish". *Physiol. Zool.*, 44:9-19.
- Geyer, H.J. (1989). "Die morfologie, histologie and ultrastruktuur van die pankreas, lewer en galblaas"
- Geyer, H.J., Nel, M.N. y Swanepoel, J.H. (1996). "Histology and ultrastructure of the hepatopancreas of the tigerfish, *Hydrocynus forskahlii*". *J. Morphology*, 227:93-100.
- Gjedrem, T. (1997). "Flesh quality improvement in fish through breeding". *Aquacult. Int.* 5:197-206.
- Goldspink, D.F., Kelly, F.J. (1984). "Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from foetus to senility". *Biochem. J.*, 217:501-516.
- Gómez-Requeni, P. Mingarro, M. Kirchner, S., Caldach-Giner, J. A., Medale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A. M. Houlihan, D. F., Kaushik, S. J. y Pérez-Sánchez, J. (2003). "Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)". *Aquaculture*, 220:749-767.
- González, G.; Crespo, S. y Brusle, J. (1993). "Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, *Serranidae*), an available model for marine fish experimental studies". *Journal of Fish Biology*, 43:363-373.
- Goodwin, G.W., Rougra, P.M., Davis, E.J. y Harris, R.A. (1989) "Purification and characterization of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from rat liver". *J. Biol. Chem.* 264:65-71.
- Görg, A., Weiss, W. y Dunn, M.J. (2004). "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics". *Proteomics*, 4:3665-85.
- Granner, D.K. y Beale, E.G. (1985). "Regulation of the synthesis of tyrosine aminotransferase and relationship to  $m$ RNA TAT". *Mol. Cell. Biochem.* 53/54:113-128.
- Graves, P.R. y Haystead, T.A.J. (2002). "Molecular Biologist's Guide to Proteomics". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66:39-63.
- Greenlee, A. R., Dodson, M. V., Yablonka-Reuveni, Z., Kersten, C. A. y Cloud, J. G. (1995). "In vitro differentiation of myoblast from skeletal muscle of rainbow trout". *J. Fish Biol.*, 46:731- 747



- Grier, H.E., Weinstein, H.J., Revesz, T., Houlihan, P.W., Greenhalgh, C.L., Nathan, D.G. y Tantravahi, R. (1986). "Cytogenetic evidence for involvement of erythroid progenitors in a child with therapy linked myelodysplasia." *Br. J. Haematol.*, 64:513-9.
- Grigorakis, K. y Alexis, N. (2005). "Effects of fasting on the meta-quality and fat deposition of comercial-ize farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed different dietary regimes." *Aquacult. Nutr.*, 11:341-344.
- Gross, M., Rubino, D.H. y Starm, T.K. (1988). "Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysate". *J. Biol. Chem.*, 263:486-492.
- Guillen, N., Acin, S., Surra, J.C., Arnal, C., Godino, J., García-Granados, A., Muniesa, P., Ruíz-Gutiérrez, V. y Osada, J. (2008). "Apolipoprotein E determines the hepatic transcriptional profile of dietary maslinic acid in mice." *J Nutr Biochem.*
- Guinea, J. y Fernández, F. (1997). "Effect of feeding frequency, feeding level and temperature on energy metabolism in *Sparus aurata*". *Aquaculture*, 148:125-142.
- Gutmann, I. y Wahlefeld, A.W. (1983). "L- Malate. Determination with malate dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>. En: *Methods of Enzymatic Analysis.*" Ed. Bermejer, H.U. 3:85-89. Academic Press. New York.
- Haas, M.J. y Pitot, H.C. (1999). "Glucocorticoids stimulate CREB binding to a cyclic-AMP response element in the rat serine dehydratase gene". *Arch. Biochem. Biophys.*, 362:317-324.
- Halver, J.E. y Hardy, R.W. (2002). "Nutrient flow and retention". En: *Fish Nutrition*. Halver, J.E. y Hardy, R.W. (Eds.), Academic Press, London, 756-770.
- Hamada, A. y Maeda, W. (1983). "Oxygen uptake due to specific dynamic action of the carp, *Cyprinus carpio*". *Jap.J.Limnol.*, 44:225-239.
- Hampton, J.A., McCuskey, P.A. y McCuskey, R.S. y Hinton D.E. (1985). "Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes." *Anat. Rec.*, 213:166-75.
- Hardgrove, J.L. y Granner, D.K. (1985). "Biosynthesis and intracellular processing of tyrosine aminotransferase". In: *Transaminases*. Christen, P., Metzler, D.E., editors. New York: Wiley. 511-532.
- Hardy, R.W. (1989). "Diet preparation". En: *Fish Nutrition* (Editado por Halver, John E.), 2ª edición, 475-548. Academic Press, San Diego, CA.
- Hashimoto, S., Schmid, W. y Schiitz, G. (1984). "Transcriptional activation of the rat liver tyrosine aminotransferase gene by cAMP". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6637-6641.



- Hatter, K., Sokatch, J.R. (1988). "Purification of methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*" PAO. *Methods Enzymol.* 166:389-393.
- Hauser, S.T., Jacobson, A.M., Wertlieb, D., Weiss-Perry, B., Follansbee, D., Wolfsdorf, J.I., Herskowitz, R.D., Houlihan, J. y Rajapark, D.C. (1986). "Children with recently diagnosed diabetes: interactions within their families." *Health Psychol* 5:273-96.
- Hayward, R.S., Noltie, D.B., y Wang, N. (1997). "Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates". *Trans. Am. Fish Soc.*, 126:316- 322.
- He, X. y Liu, R.H. (2007). "Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity." *J. Agric. Food Chem.*, 55:4366-70.
- Hempel, J., Nicholas, H. y Lindahl, R. (1993) "Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework". *Protein Sci.*, 2:1890-1900.
- Hemre, G., Taranger, G.L. y Hansen, T. (2002). "Gonada development influences nutrient utilization in cod (*Gadus morhua*)". *Aquaculture*, 214:201-209.
- Henderson, R.J. y Sargent, J.R. (1981). "Lipid biosynthesis in rainbow trout fed diets of different fat content". *Comp. Biochem. Physiol.*, 69C:31-37.
- Henke, B., Girzalsky, W., Berteaux-Lecellier, V. y Erdmann, R. (1998). "IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids." *J Biol Chem* 273:3702-11.
- Hepher, B. (1988). "Nutrition of Pond Fishes". Cambridge University, Cambridge, 388.
- Herrmann, H. y Marchok, A. (1963). "Gain and loss of protein in explanted chick embryos". *Develop. Biol.*, 7:207-217.
- Hesse M, Zimek A, Weber K, Magin TM. 2004. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur. J. Cell Biol.* 83:19-26.
- Hesse, M., Magin, T.M. y Weber, K. (2001). "Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18". *J. Cell Sci.* 114:2569-2575.
- Heyer, A. y Leuret, B. (2007). "Compensatory growth response in pigs: effects on growth performance, composition of weight gain at carcass and muscle levels, and meat quality." *J. Anim. Sci.*, 85:769-78.
- Hibiya, T., (1982). "An atlas of Fish Histology". Normal and Pathological Features. Kondansa Ltd. Tokyo.



- Hidalgo, M.C., Skalli, A., Abellán, E., Arizcun, M. y Cardenete, G. (2006). "Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex L.*): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities". *Aquacult. Nutr.* 12:256–266.
- Hidalgo, M.C., Urea, E. y Sanz, A. (1999). "Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities". *Aquaculture*, 170:267-283.
- Hidalgo, M.C., Gallego, M.G., Suárez, M.D. y de la Higuera, M. (1993). "Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. I. Influence of dietary carbohydrate level". *Comp. Biochem. Physiol.*, 105a:165-169.
- Hillestad, M., Johnsen, F. y Asgard, T. (2001). "Protein to carbohydrate ratio in high-energy diets for Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)". *Aquac. Res.*, 32:517-529.
- Hinton, D.E. y Pool, C.H. (1976). "Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque)". *Journal of Fish Biology*, 8:209-219.
- Hiyoshi, M., Takamune, K., Mita, K., Kubo, H., Sugimoto, Y. y Katagiri, C. (2002). "Oviductin, the oviductal protease that mediates gamete interaction by affecting the vitelline coat in *Bufo japonicus*: its molecular cloning and analyses of expression and posttranslational activation." *Dev Biol* 243:176-84.
- Hochachka, P. y Somero, G. (2002). "Cellular metabolism, regulation and homeostasis. En: Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution". Hochachka, P.W: y Somero (Eds.). Oxford Univ. Press., 20-100.
- Hogman, W.J. (1968). "Annulus formation on scales on four species of coregonids reared under artificial conditions". *J. Fish Res. Board Can.*, 25:211-2112.
- Houlihan D.F. (1991). "Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetic. En "Advances in Comparative and Environmental Physiology" (Ed. Gilles R.), 7:1-43. Springer Verlag. Berlín.
- Houlihan, D.F. y McMillan, D.N. (1989a). "Short-term responses of protein synthesis to Re-feeding in rainbow trout". *Aquaculture*, 79:37-46.
- Houlihan, D.F., Agnisola, C., Lyndon, A.R., Gray, C. y Hamilton, N.M. (1988a). "Protein synthesis in a fish heart: responses to increased power output." *J. Exp. Biol.*, 137:565-87.
- Houlihan, D.F., Hall, S.J. y Gray, C. (1989b). "Effects of ration on protein turnover in cod". *Aquaculture*, 79:103-110.
- Houlihan, D.F., Hall, S.J., Gray, C., Noble, B.S., (1988b). "Growth rates and protein turnover in atlantic cod *Gadus morhua*". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55:649–657.



- Houlihan, D.F., Mc Millan D.N. y Laurent P. (1986). "Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in rainbow trout: Effect of body size". *Physiol. Zool.*, 59:482-493.
- Houlihan, P. J. (1986). "The marketing of nursing jargon." *Can Nurse*, 82:21-2.
- Hsueh, W., González-Crussi, F., Arroyave, J.L., Anderson, R.C., Lee, M.L. y Houlihan, W.J. (1986). "Platelet activating factor-induced ischemic bowel necrosis: the effect of PAF antagonists." *Eur J Pharmacol* 123:79-83.
- Huss, H.H. (1995). "Quality and Quality Changes in Fresh Fish". Rome: FAO. 195.
- Huss, H.H. (1998). *Pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*. FAO. Documento Técnico de Pesca 348.
- Huyghe, S., Mannaerts, G.P., Baes, M. y Van Veldhoven, P.P. (2006). "Peroxisomal multifunctional protein-2: the enzyme, the patients and the knockout mouse model". *Biochim. Biophys. Acta* 1761:973-994.
- Iba, Y., Sugimoto, Y. y Kamei, C. (2002). "Participation of mast cells in colitis inflammation induced by dextran sulfate sodium." *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24:15-8.
- Ingólfssdóttir S, Stefánsson G, Kristbergsson K. 1998. Seasonal variations in physicochemical and textural properties of North Atlantic cod (*Gadus morhua*) mince. *J. Aquat Food Prod Technol* 7:39–61.
- Isaaq, H.J., Chan, K.C., Liu, C. y Li, Q. (2001). "Multidimensional High Performance Liquid Chromatography-Capillary Electrophoresis Separation of a Protein Digest: an Update". *Electrophoresis*, 22:1133-1135.
- Ishibashi, T., Nagata, K., Ohkawara, H., Sakamoto, T., Yokoyama, K., Shindo, J., Sugimoto, K., Sakurada, S., Takuwa, Y., Teramoto, T. y Maruyama, Y. (2002). "Inhibition of Rho/Rho-kinase signaling downregulates plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in cultured human monocytes." *Biochim Biophys Acta*, 1590:123-30.
- Jacobson, A.M., Beardslee, W., Hauser, S. T., Noam, G. G., Powers, S. I., Houlihan, J. y Rider, E. (1986). "Evaluating ego defense mechanisms using clinical interviews: an empirical study of adolescent diabetic and psychiatric patients." *J. Adolesc.*, 9:303-19.
- James, D., McKeen, R., James, T.G. y Wetherbe, C. (1994). "A Comparative Analysis of MIS Project Selection Mechanisms". *Data Base*, 25:43-59.
- James, J., Brown, J., Douglas, M., Cox, J. y Stocker, S. (1992). "Improving the diet of under fives in a deprived inner city practice." *Health Trends*, 24:161-4.
- James, R., Sampath, K. y Ponmani, K.P. (1992). "Effect of metal mixtures on activity of two respiratory enzymes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* (Peters)." *Indian J. Exp. Biol.*, 30:496-9.



- Jobling, M. (1983). "Effect of feeding frequency on food intake and growth of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L." *J.Fish. Biol.*, 23:177-185.
- Jobling, M. (1985). "Growth". En *Fish Energetics: New Perspectives*. Tytler, P. y Calow, P. (eds.), Croom Helm London: 213-230.
- Jobling, M. (1988). "A review of the physiological and nutritional energetics of cod *Gadus morhua* L., with particular reference to growth under farmed conditions". *Aquaculture*, 70:1-19.
- Jobling, M. (1994). "Respiration and metabolism". En: *Fish Bioenergetics*. Chapman y Hall London: 8:121-146.
- Jobling, M., y Koskela, J. (1996). "Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth". *J. Fish Biol.* 49:658-667.
- Johnston, I. A. y Moon, T. W. (1980), "Exercise training in skeletal muscle of brook trout (*Salvelinus fontinalis*)". *J. Exp. Biol.*, 87:177-194.
- Johnston, I. A., Cole, N. J., Abercromby, M. y Vieira, V. (1998). "Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring". *J. Exp. Biol.*, 201:623-646.
- Johnston, I.A., Van Leeuwen, J.L., Davies, M.L.F., y Beddow, T. (1995). "How fish power predation fast-starts". *J. Exp. Biol.*, 198:1851-1861.
- Jones, G.D., y Farrell, D.J. (1992a). "Early life food restriction of broiler chickens. I. Methods of application, amino acid supplementation and the age at which restrictions should commence". *British Poultry Science*, 33:579-587.
- Jones, G.D., y Farrell, D.J. (1992b). "Early life food restriction of broiler chickens. II. Effects of food restrictions on the development of fat tissue". *British Poultry Science*, 33:589-601.
- Jost, J.P., Khairallah, E.A. y Pitot, H.C. (1968). "Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. V. Regulation of the rate of synthesis and degradation of serine dehydratase by dietary amino acids and glucose." *J. Biol. Chem.*, 243:3057-66.
- Juan, M.E., Wenzel, U., Ruíz-Gutiérrez, V., Daniel, H. y Planas, J.M. (2006). "Olive fruit extracts inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 human colon cancer cells." *J Nutr* 136:2553-7.
- Jürs, K. y Bastrop, R. (1995). "The Function of Mitochondria- Rich Cells (Chloride Cells) in Teleost Gills". *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5:235-255.
- Junghahn, I. y Jürss K (1988) "Effects of feeding and salinity on protein synthesis in the white epaxial muscle of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)". *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B:329-333.



- Kagawa, Y. (1978). "Impact of westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians". *Prev. Med.*, 7:205–217
- Kalogeropoulos, N., Alexis, M. y Henderson R. (1992). "Effects of dietary soy vean and cod-liver oli levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*)". *Aquaculture*, 104:293-308.
- Kan, B., London, I.M. y Levin, D.H. (1988). "Role of reversing factor in the inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione". *J.Biol.Chem.Canad.*, 23:652-656.
- Kanamoto, R., Su, Y.y Pitot, H.C. (1991). "Effects of glucose, insulin and cAMP on transcription of the serine dehydratase gene in rat liver". *Arch. Biochem. Biophys.* 288:562-566.
- Karas, M. y Hillenkamp, F. (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons". *Anal. Chem.*, 60:2299–301.
- Kaushik, R.R. (1995). "Surgery for cardiac arrhythmias." *J. Interv. Cardiol.*, 8: 83-8.
- Kaushik, S.J. (1997). "Recents developments in the nutrition and feeding of marine finfish of interest to the Mediterranean". En: INVE Conference, Presentación Comercial. Tesalónica, Grecia.
- Kemnitz, J.W., Weindruch, R., Roecker, E.B., Crawford, K., Kaufman, P.L. y Ershler, W.B. (1993). "Dietary restriction of adult male rhesus monkeys: design, methodology, and preliminary findings from the first year of study". *J. Gerontol.*, 48:B17–26.
- Keys, A., Brozek, J., Henschel, A., Mickelson, O. y Taylor, H. (1950). "The biology of human starvation". Minneapolis: University of Minnesota Press.
- Keys, A., Mickelsen, O., Miller, E.O. y Chapman, C.B. (1950). "The relation in man between cholesterol levels in the diet and in the blood." *Science*, 112:79-81.
- Kiessling, A., Storebakken, T., Asgard, T. y Kiessling, K.H. (1991). "Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in relation to ration and age". *Growth dynamics. Aquaculture*, 93:335-256.
- Kim, M.K., y Lovell, R.T. (1995). "Effect of restricted feeding regimes on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish, *Ictalurus punctatus* in ponds". *Aquaculture*, 135:285-293.
- Kim, Y.K., Yoon, S.K. y Riu, S.Y. (2000). "Cytotoxic triterpenes from stem bark of *Physocarpus intermedius*." *Planta Med.*, 66:485-6.
- Kirchner, S., Kaushik, S. y Panserat, S. (2003). "Low protein intake in associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*)". *J. Nutr.*, 133:2561-2564.



- Kissil, G., Meyers, R., Stickney, R. y Gropp, J. (1982). "Protein energy ratios in the feed of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*)". Proceedings of the Warmwater Fish Culture Workshop, Charleston, South Carolina, USA. Special publication, 3:145-152.
- Kjærsgård, I.V.H. y Jessen, F. (2003). "Proteome analysis elucidating post-mortem changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins". J. Agric. Food Chem, 51:3985–3991.
- Kleiber, M., (1961). In: The Fire of Life, John Wiley and Sons, New York, 142.
- Klose J. (1975). "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals". Humangenetik, 26:231-43.
- Knights, K.M., Gourlay, G.K., Hall, P.D. y Cousins, M.J. (1987). "Halothane hepatitis in an animal model: time course of hepatic damage." Br. J. Exp. Pathol., 68:613-24.
- Knights, B. (1985). "Feeding behavior and fish culture". En: Nutrition and Feeding in Fish. (Editado por Cowey, C.B., A. M. Macie y J.G. Bell), 223-241. Academic Press, Londres.
- Kohno, K., Uchida, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Nakanishi, T., Fukui, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M. y Okada, Y. (1986). "Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: Homology with GTP-binding proteins". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 4973-4982.
- Kopecka-Pilarczyk, J. y Correia, A.D. (2009). "Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to pyrene and fluorine". J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 327:49-57.
- Korekane, H., Nishikawa, A. y Imamura, K. (2003). "Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice." Arch. Biochem. Biophys, 412:216-22.
- Korninger, C., Roller, R.E., Lesch y O.M. (2003). "Gamma-hydroxybutyric acid in the treatment of alcohol withdrawal syndrome in patients admitted to hospital." Acta Med. Austriaca, 30:83-6.
- Korsgaard, B. y Mommsen, T.P. (1993). "Gluconeogenesis in hepatocytes of immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): control by estradiol." Gen. Comp. Endocrinol., 89:17-27.
- Krogdahl, A., Hemre, G.I. y Mommsen, T.P. (2005). "Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages". Aquacult. Nutr., 11:103-122.
- Laberee, K. y Milligan, C.L. (1999). "Lactate transport across sarcolemmal vesicles isolated from rainbow trout white muscle." J. Exp. Biol., 202:2167-2175.
- Ladrat, C., Chaplet, M., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. y Fleurence, J. (2000). "Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) muscle: Polymorphism and biochemical studies". Comp. Biochem. Physiol. B, 125:83-95.



- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227:680-5.
- Lag, G. y Michal, G. (1983). "D-glucose 6-phosphate and D-fructose-6-phosphate". En: *Methods in Enzymatic Analysis*. Ed. Bergmeyer H.U. 2:1238-1242.
- Lamas, O., Marti, A., y Martínez, J.A. (2002). "Obesity and immunocompetence". *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, S42-S45.
- Le Blanc, J.C.Y., Hager, J.W., Ilisiu, A.M., Hunter, C., Zhong, F. y Chu, I. (2003) "Unique scanning capabilities of a new hybrid linear ion trap mass spectrometer (Q TRAP) used for high sensitivity proteomics applications". *Proteomics*, 3:859-869.
- Le Bonniec, B.F., Myles, T., Johnson, T., Knight, C.G., Tapparelli, C. y Stone, S.R. (1996). "Characterization of the P2' and P3' Specificities of Thrombin Using Fluorescence-Quenched Substrates and Mapping of the Subsites by Mutagenesis". *Biochemistry*, 35:7114-7122.
- Lee, D.J. y Putnam, G.B. (1980). "The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet". *J. Nutr.*, 103:916-922.
- Lee, J., Valkova, N., White, M.P. y Kultz, D., (2006). "Proteomic identification of processes and pathways characteristic of osmoregulatory tissues in spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*)". *Comp. Biochem. Physiol. D*, 1:328-343.
- Leenders, F., Husen, B., Thole, H.H. y Adamski, J. (1994). "The sequence of porcine 80 kDa 17 beta-estradiol dehydrogenase reveals similarities to the short chain alcohol dehydrogenase family, to actin binding motifs and to sterol carrier protein 2". *Mol. Cell. Endocrinol.* 104:127-131.
- Lie, Ø., y Huse, I. (1992). "The effect of starvation on the composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*)". *Fisk. Dir. Skr., Ser. Ernoering*, 5:11-16.
- Link, T., Darland, J.M., y Dowling J.E. (2006). "Isolation of zebrafish mutations that affect the development and maintenance of the lens". *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, 42:S537.
- Link, W., Schevchenko, A. y Heisenberg, C.P. (2006). "Proteomics of early Zebrafish embryos". *BMC Develop. Bio.*, 6:1-9.
- Lipsky, M.M., Sheridan, T.R., Bennett, R.O. y May, E.B. (1986). "Comparison of trout hepatocyte culture on different substrates". *In Vitro* 22:360-362.
- Liu, D., Krueger, H. y Wang. (1970). "Catabolic pathways for glucose in the cichlid fish *Cichlasoma bimaculatum*". *Comp. Biochem. Physiol.* 36:173-181.



- Liu, J., Liu, Y. y Klaassen, C.D. (1995). "Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver injury in mice." *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 16:97-102.
- Liu, J., Liu, Y., Parkinson, A. y Klaassen, C.D. (1995). "Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275:768-74.
- Lizárraga, D., Tourino, S., Reyes-Zurita, F.J., de Kok, T. M., van Delft, J.H., Maas, L.M., Briede, J.J., Centelles, J.J., Torres, J.L., Cascante, M. (2008). "Witch hazel (*Hamamelis virginiana*) fractions and the importance of gallate moieties-electron transfer capacities in their antitumoral properties." *J. Agric. Food Chem.*, 56:11675-82.
- López, J.L., Marina A, Álvarez, G. y Vázquez, J. (2002). "Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species". *Proteomics* 2:1658-1665.
- López-Flores, I., Barroso, J.B., Valderrama, R., Esteban, F.J., Martínez-Lara, E., Luque, F., Peinado, M.A., Ogawa, H., Lupiáñez, J.A. y Peragón J. (2005). "Serine dehydratase expression decreases in rat livers injured by chronic thioacetamide ingestion." *Mol. Cell Biochem.*, 268:33-43.
- López-Flores, I., Peragón, J., Valderrama, R., Esteban, F.J., Luque, F., Peinado, M.A., Aranda, F., Lupiáñez, J.A. y Barroso, J.B. (2006). "Downregulation in the expression of the serine dehydratase in the rat liver during chronic metabolic acidosis." *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291:R1295-302.
- Lovell, R.T. (1979). "Factors affecting voluntary food consumption by channel catfish". *Proc. World Symp. Finfish Nutr. Fishfeed Technol.*, 1:555-564.
- Lovell, R.T: (1989). "Nutrition and Feeding of Fish". New York, USA, 20.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.*, 193:265-75.
- Lucas, M.C. y Priede, I.G. (1992). "Utilization of metabolic scope in relation to feeding and activity by individual and grouped zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan)". *J.Fish Biol.*, 41:175-190.
- Lukacik, P., Kavanagh, K.L. y Oppermann, U. (2006). "Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases". *Mol. Cell. Endocrinol.*, 248:61-71.
- Luna, M.A., Ordoñez, N.G., Mackay, B., Batsakis, J.G. y Guillaumondegui, O. (1985). "Salivary epithelial-myoeptithelial carcinomas of intercalated ducts: a clinical, electron microscopic, and immunocytochemical study." *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 59:482-90.
- Lundstedt, L.M., Melo, J.F. y Morales, G. (2004). "Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition." *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 137:331-9.



- Lupiáñez, J.A., Adroher, F.J., Vargas, A. M. y Osuna, A. (1987). "Differential behaviour of glucose 6-phosphate dehydrogenase in two morphological forms of *Trypanosoma cruzi*." *Int J Biochem* 19(11): 1085-9.
- Lupiáñez, J.A., Sánchez-Lozano, M.J., García-Rejón, L. y de la higuera, M. (1989). "Long-term effect of a high protein/non protein carbohydrate diet on the primary liver and kidney metabolism". *Aquaculture*, 79:91-101.
- Magnuson, J.J. (1962). "An analysis of aggressive behavior, growth, and competition for food and space in medaka (*Oryzias latipes* (Pisces, *Cyprinodontidae*))". *Can. J. Zool.*, 40:313-363.
- Mann, M. y Jensen, O.N. (2003). "Proteomic analysis o post-translational modifications". *Nat. Biotechnol.*, 21:255-61.
- Marais, P., Van der Merwe, H.J., y Dutoit, J.E. (1991). "The effect of compensatory growth on food intake, growth rate, body composition and efficiency of feed utilisation in Dorper sheep". *South African J. Animal Sci.* 21, 80-88.
- Marcouli, P., Alexis, M., Andriopoulou, A., y Lliopoulou-Georgudaki, J. (2006). "Dietary lysine requirement of juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* L." *Aquacult. Nutr.*, 12:25-33.
- Markus, M., Husen, B., Leenders, F., Jungblut, P.W., Hall, P.F. y Adamski, J. (1995). "The organelles containing porcine 17 beta-estradiol dehydrogenase are peroxisomes". *Eur. J. Cell Biol.* 68:263-267.
- Martín, R., Carvalho, J., Ibeas, E., Hernández, M., Ruiz-Gutiérrez, V., Nieto, M.L. (2007). "Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation". *Cancer Res.* 67:3741–3751.
- Martin, S., Cash, P., Blaney, S. y Houlihan, D.F. (2001). "Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation". *Fish Physiology and Biochemistry*, 24:259-270.
- Martín, S.A.M., Vilhelmsson, O. y Houlihan, D.F. (2003a). "Rainbow trout liver proteome. Dietary manipulation and protein metabolism". En: WB Souffrant, CC Metges, editors. *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism*, 57–60. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Martín, S.A.M., Vilhelmsson, O., Médale, F., Watt, P., Kaushik, S. y Houlihan, D.F. (2003b). "Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout". *Biochim Biophys Acta*, 1651:17–29.
- Martínez, I, y Jakobsen, Friis T. (2004). "Application of proteome analysis to seafood authentication". *Proteomics* 4:347–354.



- Martínez, I. y Jakobsen Friis, T. (2004). "Application of proteome analysis to seafood authentication". *Proteomics*, 4:347–354.
- Martínez, I., Jakobsen Friis, T. y Seppola, M. (2001). "Requirements for the application of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analyses to product speciation". *Electrophoresis*, 22:1526–1533.
- Martínez, I., Ofstad, R. y Olsen, R.I. (1990). "Electrophoretic study of myosin isoforms in white muscles of some teleost fishes". *Comp. Biochem. Physiol. B*, 96:221–227.
- Martínez-Llorens, S., Tomás Vidal, A., Jaurale-Gracia, I., Pla Torres, M. y Jover-Cerdá, M. (2009). "Optimum dietary soybean meal level for maximizing growth and nutrient utilization of on-growing gilthead sea bream (*Sparus aurata*)". *Aquacult. Nutr.*, 15:320-328.
- Martino, R.; Cyprino, J.; Portz, L. y Trugo, L. (2005). "Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels". *Aquacult. Nutr.*, 11:131-137.
- Martí-Palanca, H., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J. y Kaushik, S. (1996). "Growth hormone as a function of age and dietary protein:energy ratio in a marine teleost, The gilthead sea bream (*Sparus aurata*)". *Growth Regul.*, 6:253-259.
- Martorell, R. (1980). "Interrelationships between diet, infectious disease, and nutritional status". En: Greene, L.S., Johnston, F.E., eds. *Social and biological predictors of nutritional status, physical growth, and neurological development*. New York: Academic Press, 81-106.
- Mathers, E.M., Houlihan, D.F., Mc Carthy I.D. y Burren L.J. (1993). "Rates of growth and protein synthesis correlated with nucleic acid content in fry of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effects of age and temperature". *J. Fish Biol.*, 43:245-263.
- Matschak, T.W., Hopcroft, T., Mason, P.S., Crook, A.R., y Stickland, N.C. (1998). "Temperature and oxygen tension influence the development of muscle cellularity in embryonic rainbow trout". *J. Fish Biol.*, 53:581-590.
- Matschak, T.W., Stickland, N.C., Mason, P.S., y Crook, A.R. (1997). "Oxygen availability and temperature affect embryonic muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)". *Differentiation*, 61:229-235.
- Mazat, L., Lafont, S. y Berr, C. (2001). "Prospective measurements of dehydroepiandrosterone sulfate in a cohort of elderly subjects: relationship to gender, subjective health, smoking habits, and 10-year mortality". *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98:8145-50.



- Mc Kay, B. (1989). "Implicaciones nutricionales de la selección continua para crecimiento, eficiencia alimenticia y composición corporal en líneas de pollo de engorda" Shaver Poultry Breeding: Farms L.T.A. (Boletín). E.U.A. 5-22.
- Mc Millan, D.N. y Houlihan, D.F. (1988). "The effect of re-feeding on tissue protein synthesis in rainbow trout". *Physiol. Zool.*, 61:429-441.
- McCay, C.M., Crowel, M.F. y Maynard, L.A. (1935). "The effect of retarded growth upon the length of the life span and upon the ultimate body size". *J. Nutr.*, 10:63-79.
- Mecatti, M., Kaushik, S.J. y Poli, B.M. (2004). "Effect of total replacement of dietary fish meal by plant protein sources on early post mortem changes in the biochemical and physical parameters of rainbow trout". *Vet. Res. Comm* 28: 237-240.
- Melard, C., Baras, E., y Desprez, D. (1998). "Compensatory growth of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*". 4º Simposiun internacional sobre la acuicultura de tilapia 1:178-185.
- Méndez, G. y Weiser, W. (1993). "Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: *Cyprinidae*)". *Environ.Biol.Fish.*, 36:73-81.
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F. y Baanante, I.V. (2000). "6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*." *Biochim. Biophys. Acta.*, 1491:220-228.
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F. y Baanante, I.V. (2004). "Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition." *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 138:145-153.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F. y Baanante, I.V. (1999). "Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)". *Br. J. Nutr.*, 82:223-232.
- Millikin M.R. (1982). "Quantitative and cualitative requirements of fish". A review. *Fish. Bull.*, 80:655-686.
- Millward, D.J. y Bates, P.C. (1981). "Protein degradation in skeletal muscle: implications of a first order reaction for the degradative process." *Acta Biol. Med. Ger.*, 40:1309-15.
- Millward, D.J., Garlick, P.J., James W.P., Nnanyelugo, D.O. y Ryatt, J.S. (1973). "Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle." *Nature*, 241:204-5.



- Milne, J.A. y Cook, R.A. (1979). "Role of metals cofactors in enzyme regulation. Differences in the regulatory properties of *Escherichia coli* nicotinamide adenine dinucleotide specific malic enzyme depending on whether  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$  serves as divalent cation" *Biochemistry*, 18:04-10.
- Mindnich, R. y Adamski, J. (2009). "Zebrafish 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: An evolutionary perspective". *Mol. Cell. Endocrinol.* 301:20-26.
- Mingarro, M. (2004). "Estrategias de alimentación y cultivo de la dorada (*Sparus aurata*). Regulación endocrina y estado inmunopatológico". Tesis doctoral, Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Mingarro, M.M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Martínez-Valdivia, M., y Pérez-Sánchez, J. (2002). "Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormona an somatolactin paradigm". *Gen. Comp. Endocrinol.*, 128:102-11.
- Moeller, G. y Adamski, J. (2006). "Multifunctionality of human 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenases". *Mol. Cell. Endocrinol.* 248:47-55.
- Mommsem, T. P.; Vijayan, M. H. y Moon, T. W. (1999). "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation". *Reviews in: Fish Biology and Fisheries.* 9:211-268.
- Mommsen, T.P. y Moon, T.W. (1990). "Metabolic response of teleost hepatocytes to glucagon-like peptide and glucagon". *J. Endocrinol.*, 126:109-118.
- Montilla, M., Agil, P.A., Navarro, M. C., Jiménez, M. I., García-Granados, A., Parra, A. y Cabo, M. M. (2003). "Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*." *Planta Med.*, 69:472-4.
- Moon, T.W. y Foster, G.D. (1995). "Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences". En: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Eds.). Elsevier Science B.V.,4:393-434.
- Moon, T.W. y Hochachka, P.W. (1972). "Temperature and the kinetic analysis of trout isocitrate dehydrogenases". *Comp. Biochem. Physiol. B*, 42:725-730.
- Moore, P.S. y Koontz, J.W. (1989). "Regulation of tyrosine aminotransferase by insulin and cyclic-AMP: similar effects on activity but opposite effects on transcription". *Mol. Endocrinol.* 3:24-32.
- Moore, P.S. y Koontz, J.W. (1989). "Regulation of tyrosine aminotransferase by insulin and cyclic AMP: similar effects on activity but opposite effects on transcription." *Mol Endocrinol* 3:1724-32.
- Morrison, C. M. (1987). "Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: an atlas". Part One. Digestive tract and associated organs. *Canadian Special Publications in: Fisheries and Aquatic Sciences* 98:1-219.



- Moyano, F.J. (1990). "Utilización nutritiva de fuentes proteicas vegetales por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)". En: Tesis doctoral, Universidad de Granada, Granada.
- Munro, H.N. y Fleck, A. (1966). "Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. A supplementary review." *Analyst* 91:78-88.
- Mustafa, M.G., Wakamatsu, S., Takeda, T.A., Umino, T., Nakagawa, H., (1995). "Effects of algae meal as feed additive on growth, feed-efficiency, and bodycomposition in red-sea bream". *Fisheries Sci.* 61:25-28.
- Nader, B.L., Taketa, A.T., Pereda-Miranda, R. y Villarreal, M.L. (2006). "Production of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of *Galphimia glauca*". *Planta Med.* 72:842-844.
- Nagata, K., Ishibashi, T., Sakamoto, T., Ohkawara, H., Shindo, J., Yokoyama, K., Sugimoto, K., Sakurada, S., Takuwa, Y., Nakamura, S., Teramoto, T. y Maruyama, Y. (2002). "Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes." *Atherosclerosis* 163:39-47.
- Nagayama, F. y Ahshima, H. (1974). "Studies on the enzyme system of carbohydrate metabolism in fish-I. Properties of liver hexokinase". *Nippon Suisan Gakk.*, 40:285-290.
- Nagayama, F., Oshima, K. y Umesawa, (1972). "Distribution of glucose-6-phosphate metabolizing enzymes in fish". *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.*, 38:589-593.
- Nakagawa, H. (1971). "Enzymological study of amino acid nutrition. Physiological roles of serine dehydratase and cystathionine synthetase." *Seikagaku*, 43:245-66.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Sugimoto, M., Nakahara, T. y Tsuji, H. (2002). "Further stabilization of earthworm serine protease by chemical modification and immobilization." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66:2739-42.
- Nakamura, K., N. Shiraishi, Hosoo, S., Sueyoshi, K., Sugimoto, T., Nanmori, T., Nakagawa, H. y Oji, Y. (2002). "A protein kinase activated by darkness phosphorylates nitrate reductase in Komatsuna (*Brassica campestris*) leaves." *Physiol. Plant.*, 115:496-503.
- Navarro, I.; Gutiérrez, J. y Planas, J. (1992). "Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prologed fasting in Brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year". *Comp.Biochem.Physiol.*, 102A:401-407.
- Nevaldine, B.M., Bassel, A.R. y Hsu, R.Y. (1974). "Mechanism of pigeon malic enzyme subunit structure". *Biochim.Biophys.Acta*, 336:283-293.
- Nicholls, F., Nicholls, P. y Sand, O. (1976). "Phosphofructokinase and related glycolitic enzyme activities in flounder (*Platichthys flesus* L.) liver". *Comp.Biochem.Physiol.*, 54:441-451.



- Nicieza, A.G., y Metcalfe, N.B. (1997). "Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability". *Ecology* 78:2385-2400.
- Nishida, M., Takagahara, S., Maruyama, Y., Sugimoto, Y., Nagao, T. y Kurose, H. (2002). "G beta gamma counteracts G alpha (q) signaling upon alpha (1)-adrenergic receptor stimulation." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291:995-1000.
- Nopanitaya, W., Carson, J.L.; Grisham, J.W. y Aghajanian, J.G. (1979). "New observations on the fine structure of the liver in goldfish (*Carassius auratus*)". *Cell Tissue Research*, 196:249-261.
- NRC (National Research Council). (1977). "The Future of Animals, Cells, Models, and Systems in Research, Development, Education, and Testing. Proceedings of a Symposium of the Institute of Laboratory Animal Resources". National Academy of Sciences. Washington, D.C. 341.
- NRC (National Research Council). (1983). "Nutrient requirements of Warmwater Fishes and Composition". National Academy Press, Washington, D. C. 148.
- NRC (National Research Council). (1993). "Nutrient Requirements of Fish"., National Academic Press, Washington DC. 114.
- O'Farrell PH. (1975). "High resolution twodimensional electrophoresis of proteins". *J. Biol. Chem.*, 250:4007-21.
- Ogata, H., Aranishi, F., Hara, K., Osatomi, K. y Ishihara, T. (1998). "Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin" *L. J. Sci. Food Agric.*, 76:499-504.
- Ogawa, H. (2000). "Structure and function relationship of serine dehydratase from various sources". *Trends. Comp. Biochem. Physiol.*, 6:1-19.
- Ogawa, H., Fujioka, M., Su, Y., Nanamoto, R. y Pitot, H.C. (1991). "Nutritional regulation and tissue-specific expression of the serine dehydratase gene in rat". *J. Biol. Chem.*, 266:412-417.
- Oliva-Teles, A. (2000). "Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition". *Aquacult. Int.*, 8:477-492.
- Olivereau, M. y Olivereau, J.M. (1997). "Long-term starvation in the European eel: general effects and response of pituitary growth hormone (GH) and somatostatin (SL) secreting cells". *Fish. Physiol. Biochem.*, 17:261-269.
- Olivereau, M. y Rand-Weaver, M. (1994). "Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of Pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stages of the reproductive cycle." *Gen. Comp. Endocrinol.*, 93:28-35.



- Olvera-Novoa, M.A., Campos, S., Sabido, M.G. y Martínez-Palacios, C.A. (1990). "The use of alfalfa leaf protein concentrates as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*)". *Aquaculture*, 90:291-302.
- Orrenius, S.K., Ormstad, K., Thor, M. y Jewell, S.A. (1983). "Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells". *Fed. Proc.*, 12:3177-3188.
- Pandey, A. y Mann, M. (2000). "Proteomics to study genes and genomes". *Nature*, 405:837-46.
- Pandian, T.J., y Vivekanandan, E. (1985). "Energetics of feeding and digestion". En: *Fish Energetics: News Perspectives* (Editado por Tyler, P., P. Calow), 99-104. Croom Helm. Sidney.
- Papa, I., Álvarez, C., Verrez-Bagnis, V., Fleurence, J. y Benyamin, Y. (1996). "Post mortem release of fish white muscle a-actinin as a marker of disorganization". *J. Sci Food Agric.*, 72:63-70.
- Paris, G., De Francesco, M., Médale, F., Scappini, F., Mecatt,i M., Kaushik, S.J. y Poli, B.M. (2004). "Effect of total replacement of dietary fish meal by plant protein sources on early post mortem changes in the biochemical and physical parameters of rainbow trout". *Veterinary Res. Commun.*, 28:237-240.
- Parra, A., Rivas, F., López, P.E., García-Granados, A., Martínez, A.,Albericio, F., Márquez, N. y Muñoz, E. (2009). "Solution- and solid-phase synthesis and anti-HIV activity of maslinic acid derivatives containing amino acids and peptides." *Bioorg. Med. Chem.*, 17:1139-45.
- Parrington J y Coward K. (2002). "Use of emerging genomic and proteomic technologies in fish physiology". *Aquat. Living Resour.*, 15:193-196.
- Pastori, G.M. y del Río, L.A. (1997). "Natural senescence of pea leaves: an activated oxygen-mediated function for peroxisomes". *Plant Physiol.*, 113:411-418.
- Patočka, J. (2003). "Biologically active pentacyclic triterpenos and their current medicine Signification". *J. App. Biomed.*, 1:7-12.
- Patterson, R., Harris, K.E., Lee, M.L. y Houlihan, W.J. (1986). "Inhibition of rhesus monkey airway and cutaneous responses to platelet-activating factor (PAF) (AGEPC) with the anti-PAF agent SRI 63-072." *Int Arch Allergy Appl Immunol* 81:265-8.
- Pedersen, T., y Jobling, M. (1989). "Growth rates of large, sexually mature cod, *Gadus morhua*, in relation to condition and temperature during an annual cycle". *Aquaculture*, 81:161-168.
- Peragón J., Barroso J.B., de la Higuera M. y Lupiáñez J.A. (1998). "Relationship between growth and protein turnover and nucleic acids in the liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during development". *Can J. Fish Aquat. Sci.*, 55:649-657.



- Peragón J., Barroso J.B., de la Higuera M., Lupiáñez J.A. (1993). "Effect of frequency of feeding of diets with different protein content on the fractional rate of protein synthesis and degradation in liver and white muscle of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*". En: Fish Nutrition in Practice (Eds. Kaushik S.J. y Luquet P.), 61:287-292. Ediciones INRA (Les Colloques). París.
- Peragón J., Barroso J.B., García-salguero, L.; Fernández-Navarro M.; de la Higuera, M. y Lupiáñez J.A. (1999a). "Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the White muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Aquaculture, 179:425-437.
- Peragón, Barroso, J.B., J., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez J.A. (1999a). "Kinetic behavior and protein expression of hepatic NADPH-production systems during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". Aquaculture, 179:375-385.
- Peragón, J., Aranda, F., García-Salguero, L., Corpas, F.J. y Lupiáñez, J.A. (1989b). "Stimulation of rat-kidney hexose monophosphate shunt dehydrogenase activity by chronic metabolic acidosis." Biochem. Int., 18:1041-50.
- Peragón, J., Aranda, F., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (2009). Regulation of the kinetic behavior of serine dehydratase and tyrosine aminotransferase during the development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 293:119-124.
- Peragón, J., Aranda, F., García-Salguero, L., Lupiáñez, J.A. (1989a). "Influence of experimental diabetes on the kinetic behaviour of renal cortex hexose monophosphate dehydrogenases." Int. J. Biochem., 21:689-94.
- Peragón, J., Barroso, J.B. de la Higuera M. y Lupiáñez J.A. (2008). "Serine dehydratase and tyrosine aminotransferase activities increased by long-term starvation and recovery by refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." J. Exp. Zool. P., A Ecol. Genet. Physiol., 309:25-34.
- Peragón, J., Barroso, J.B., de la Higuera M. y Lupiáñez, J.A. (1999b). "Selective changes in the protein-turnover rates and nature of growth induced in trout liver by long-term starvation followed by re-feeding." Mol. Cell. Biochem., 201:1-10.
- Peragón, J., Barroso, J.B., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (2001). "Growth, protein-turnover rates and nucleic-acid concentrations in the white muscle of rainbow trout during development." Int J Biochem Cell Biol., 33:1227-38.
- Peragón, J., Barroso, J.B., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (2000). "Dietary alterations in protein, carbohydrates and fat increase liver protein-turnover rate and decrease overall growth rate in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Mol. Cell. Biochem., 209:97-104.
- Pereira, T. G., y Oliva-Teles, A. (2003). "Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles". Aquaculture Research, 34:11-17.



- Pérez, L., González, H., Jover, M., y Fernández-Carmona, J. (1997). "Growth of European sea bass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets containing varying levels of protein, lipid and carbohydrate". *Aquaculture*, 156:183-193.
- Pérez-Camino, M.C. y Cert, A. (1999). "Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils." *J. Agric. Food Chem.*, 47:1558-62.
- Pérez-Jiménez, A. (2007). "Respuesta nutritiva, metabólica y balance redox del dentón (*Dentex dentex*) bajo diferentes condiciones nutricionales. Tesis doctoral Universidad de Granada. Granada, España.
- Pérez-Sánchez, J. y Le Bail, P.Y. (1999). "Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish". *Aquaculture*, 177:117-128.
- Pérez-Sánchez, J., Costell, E., Mingarro, M., Carbonell, I., Vega-Rubín de Celis, S., Calduch-Giner, J.A., Orlando, M.L., Rielo, J.A., Pujalte, M.J., Garay, E., Sitjá-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., Izquierdo, L., y Durán, L. (2002). "Estrategias de alimentación y cultivo de la dorada. Estado patológico y control de la calidad sensorial". Eds.: Pérez-Sánchez, J., y Costell, E.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M, y Cottrell, I.J.S. (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data". *Electrophoresis*, 20:3551-3567.
- Perona, J.J. y Craik, C.S. (1995). "Structural basis of substrate specificity in the serine proteases". *Protein Sci.*, 4:337-360.
- Peters, L.D., Porte, C., Albaigés, J. y Livingstone, D.R., (1994). "7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina Pilchardus*) from the north coast of Spain". *Mar. Pollut. Bull.*, 28: 299-304.
- Phillips A.M. (1969). "Nutrition, digestion and energy utilization". En: *Fish physiology* (Eds. Hoar W.S. y Randall D.D.), 1:391-432. Academic Press. Nueva York.
- Phillips, D.C. (1966). "3-Dimensional Structure of an Enzyme Molecule". *Sci. Am.*, 215:78-90.
- Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J., Vázquez, J., Figueras, A. y Gallardo, J.M. (2003). "Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products". *J. Proteome Res.*, 2:127-135.
- Pitot, H.C. y Peraino, C. (1964). "Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver. I. Induction of threonine dehydratase and ornithine transaminase by oral intubation of casein hydrolysate" *J. Biol. Chem.*, 239:83-88.
- Pocrnjic, Z., Mathews, R.W., Rappaport, S. y Haschemeyer, A.E. (1983). "Quantitative protein synthetic rates in various tissues of a temperature fish in vivo by the method of phenylalanine swamping". *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 74:735-738.



- Powers, R.E., Saluja, A.K, Houlihan, M.J. y Steer, M.L. (1986). "Diminished agonist-stimulated inositol trisphosphate generation blocks stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic acini during diet-induced experimental pancreatitis." *J. Clin. Invest.*, 77:1668-74.
- Preedy, V.R., Paska, L., Sugden, P.H., Schofiel, P.S. y Sugden M.C. (1988). "The effects of surgical stress and short-term fasting on protein synthesis in vivo in diverse tissues of the mature rat." *Biochem. J.*, 250:179-88.
- Pretti, C., Salvetti, A., Longo, V., Giorgi, M. y Gervasi, P.G. (2001). "Effects of  $\beta$ -naphthoflavone on the cytochrome P<sub>450</sub> system, and phase II enzymes in gilthead seabream (*Sparus aurata*)". *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 130:133-144.
- Proctor, P. (1970). "Similar functions of uric acid and ascorbate in man". *Nature*, 228:868.
- Pungitore, C.R., Padron, J.M., León, L.G., García, C., Ciuffo, G.M., Martín, V.S. y Tonn, C.E. (2007). "Inhibition of DNA topoisomerase I and growth inhibition of human cancer cell lines by an oleanane from *Junellia aspera* (Verbenaceae). *Cell Mol. Biol.*, 15:13-7.
- Querellou, J. (1984). "Modèles de production en pisciculture intensive: application à l'élevage du loup". En *L'Aquaculture de Bar et des Sparidés*, editado por G. Barnabé y R. Billard, INRA publ., Paris, 483-494.
- Quinn, L.S., Norwood, T.H., y Nameroff, M. (1988). "Myogenic stem cells commitment probability remains constant as a function of organismal and mitogenic age". *J. Cell Physiol.*, 134:324-336.
- Quinton, J.C., y Blake, R.W. (1990). "The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*". *J. Fish Biol.* 37: 33-41.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. y Lunardiet, J. (1997). "Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis*, 18:307-16.
- Randall, D. (1982). "The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia". *J. Exp. Biol.*, 100:275-288.
- Ravaglia, G., Forti, P. y Maioli, F. (2002). "Dehydroepiandrosterone-sulfate serum levels and common age-related diseases: results from a cross-sectional Italian study of a general elderly population". *Exp. Gerontol.*; 37:701-12.
- Reddish, J.M., St-Pierre, N., Nichols, A., Green-Church, K. y Wick, M. (2008). "Proteomic analysis of proteins associated with body mass and length in yellow perch, *Perca flavescens*". *Proteomics*, 8:2333-2343.
- Refstie, T. y Kittelsen, A. (1979). "Effect of density on growth and survival of rainbow trout". *Aquaculture*, 11:329-334.



- Reyes, F.J., Centelles, J.J., Lupiáñez J.A. y Cascante, M. (2006). "(2 $\alpha$ , 3 $\beta$ )-2, 3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells." *FEBS Lett.*, 580:6302-10.
- Reyes-Zurita, F.J., Pachón-Peña, G., Lizárraga, D., Rufino-Palomares, E.E., Cascante, M. y Lupiáñez, J.A. (2009b) "The long-term effect of maslinic acid upon apoptosis induced in HT29 colon adenocarcinoma cells via caspase expression." *Comp. Biochem. Physiol.* (En prensa).
- Reyes-Zurita, F.J., Rufino-Palomares, E.E., Lupiáñez J.A. y Cascante, M. (2009a). "Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway." *Cancer Lett.*, 273: 44-54.
- Richard, P., Bergeron, J.P., M. Boulhic, M., Galois, R. y Person-Le Ruyet, R. (1991). "Effects of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*". *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 68:269-277.
- Ricker, W. E. (1973). "Linear regressions in fishery research". *J.Fish.Res.Bd.Canada.*, 30:409-434.
- Righetti, P.G., Campostrini, N., Pascali, J., Hamdan, M. y Astner, H. (2004). "Quantitative proteomics: a review of different methodologies". *Eur. J. Mass. Spectrom.* (Chichester, Eng), 10:335-48.
- Riis, P.M. (1983). "Adaptation of metabolism to various conditions: nutritional and other environmental conditions. En: P. M. Riis. *Dynamic biochemistry of animal production*. Elsevier Science Publishers. The Netherlands, 13:319-357.
- Robaina, L., Izquierdo, F., Moyano, J., Socorro, J., Vergara, M., Montero, D., y Fernández-Palacios, H. (1995). "Soybean and lupin meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histopatological implications". *Aquaculture*, 130:219-233.
- Roberts, R. (1989). "Fish Pathology". 2<sup>nd</sup> Ed. Bailliere Tindall, London.
- Roberts, S.B., Paul, A.A., Cole, T.J. y Whitehead, R.G. (1982). "Seasonal changes in activity, birth weight and lactational performance in rural Gambian women". *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 76:668-78
- Robinson, F.F., Classen, H.L., Hanson, J.A., y Onderka, D.K. (1992). "Growth performance, feed efficiency and incidence of skeletal and metabolic disease in full-feed and feed restricted broiler and roaster chickens". *E.U.A. J. Appl. Poultry Res.*, 1:33.41.
- Rocha, E., Monteiro, R.A.F. y Pereira, C.A. (1997). "Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, *Salmonidae*): a stereological study at light and electron microscopic levels". *The Anatomical Record*, 247:317-328.



- Rodríguez, A., Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuño, J., Polaina, J. y Meseguer, J. (2002). "Enriquecimiento del pienso de dorada con quitina y paredes de levaduras con fines preventivos". Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 18:119-125.
- Rodríguez, B., Torres, N., Rincón, A.R., Bourges, H., Panduro, A. y Tovar, A.R. (1996). "Hepatic phenylalanine-hydroxylase and tyrosine-aminotransferase mRNA levels in rats adapted to diets with different concentrations of protein". Rev. Invest. Clin., 48:413-419.
- Rodríguez-Rodríguez, R., Perona, J.S., Herrera, M.D. y Ruíz-Gutiérrez, V. (2006). "Triterpenic compounds from "orujo" olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats." J. Agric. Food Chem., 54:2096-102.
- Roehrig, K.L. y Allred, J.B. (1974). "Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen". Anal. Biochem., 58:414-21.
- Roth, G.S., Ingram, D.K., Black, A. y Lane, M.A. (2000). "Effects of reduced energy intake on the biology of aging: the primate model". Eur J Clin Nutr; 54:S15-S20.
- Rothrock, R., Lee, K.L., Isham KR, Johnson AC y Kenney FT. (1987). "Different mechanisms control developmental activation of transcription of genes subject to identical hormonal regulation in adult liver." Biochem. Biophys. Res. Commun., 144:1182-7.
- Rowlerson, A., y Veggetti, A. (2001). "Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species". En: Muscle development and growth. Ed: Johnston, I.A.
- Rudiyansyah y Garson, M.J. (2006). "Secondary metabolites from the wood bark of *Durio zibethinus* and *Durio kutejensis*". J. Nat. Prod., 69:1530.
- Ruohonen, K. (1986). "Biological models related to automatic control in aquaculture". A case study: automatic feeding control. En: Automation and Data Processing in Aquaculture, Trondheim, Norway, Pergamon Press., 75-80.
- Russell, M., Hayes, A., Simko, E. y Lumsden, J.S. (2006). "Plasma proteomic analysis of the acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to intraperitoneal inflammation and LPS injectionDevelop". Comp. Immunology., 30:393-406S.
- Russell, N.R., y Wooten, R.J. (1992). "Appetite and growth compensation in the European minnow, *Phoxinus phoxinus* (Cyprinidae), following short periods of food restriction". Envirom. Biol. Fishes, 34:277-285.
- Ryan, C.F., Road, J.D. y Buckley, P.A. (1993). "Energy balance in stable malnourished patients with chronic obstructive pulmonary disease." Chest., 103:1038-44.



- Sabaut, J.J. y Luquet, P. (1973). "Nutritional requirements of the gilthead sea bream, *Chrysophrys aurata*. Quantitative protein requirements". *Marine Biology*, 18:50-54.
- Saimaru, H., Orihara, Y., Tansakul, P., Kang, Y.H., Shibuya, M. y Ebizuka, Y. (2007). "Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*". *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 55:784-8.
- Sainz, R.D., de la Torre, F. y Oltjen, J.W. (1995). "Compensatory growth and carcass quality in growth-restricted and refed beef steers." *J. Anim. Sci.*, 73:2971-9.
- Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S. y Kobayashi, M. (1992). "The immunostimulating effects on chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*". *Dis. Asian Aquaculture*, 1:413-417.
- Saluja, A., Saluja, M., Robert, E., Powers, R.E., Houlihan, M.J. y Steer, M.L. (1986). "Failure of extracellular digestive enzymes to alter in vitro secretion by rat pancreas." *Am. J. Physiol.*, 250:C413-7.
- Samartin, S., y Chandra, R.K. (2001). "Obesity, overnutrition and the immune system". *Nutr. Res.*, 21:243-262.
- Sánchez Muniz, F. J., de la Higuera, M., Mataix, F.J. y Varela, G. (1978). "The yeast *Hansenula anomala* as a protein source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) hematological aspects *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiology*, 63:153-157.
- Sánchez-Ávila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jimenez, J. y de Castro, M.D. (2009). "Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction." *Talanta* 78:40-8.
- Sánchez-Muros, M.J., García-Rejon, L., García-Salguero, L., de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (1998). "Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics." *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 30:55-63.
- Sánchez-Muros, M.J., Corchete, V., Suárez, M.D., Cardenete, G., Gómez-Milán, E. y de la Higuera, M. (2003). "Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns". *Aquaculture*, 224:89-103
- Sandoval, I.V. y Sols, A. (1974). "Gluconeogenesis from serine by the serine-dehydratase-dependent pathway in rat liver." *Eur. J. Biochem.*, 43: 609-16.
- Sänger, A.M., y Stoiber, W. (2001) "Muscle fiber diversity and plasticity". En: *Muscle development and growth*. Ed: Johnston, I.A.



- Santinha, P.J.M., Médale, F., Corraze, G., y Gomes, E.F.S. (1999). "Effect of the dietary protein: lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)". *Aquac. Nutr.*, 5:147-156.
- Sanz, A., Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García Gallego, M. y de la Higuera. (1993). "Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. Influence of the relative proportions of the energy yielding nutrients". *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A:177-182.
- Sanz, J.M., García, P., García, J.L. (1992). "Role of Asp-9 and Glu-36 in the active site of the pneumococcal CPL1 lysozyme: an evolutionary perspective of lysozyme mechanism". *Biochemistry*, 31:8495-8499.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estévez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. y Tocher, D. (1999). "Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions". *Aquaculture*, 179:217-229.
- Sargent, J., Tocher, D. y Bell, J. (2002). "The lipids". En: *Fish Nutrition*. Halver, J.E. y Hardy, R.W. (Eds.). Academic Press, London, 182-257.
- Satia, B.P. (1974). "Quantitative protein requirements of rainbow trout. *Prog. Fish Cult.*, 33:132-134.
- Saunders, R.M. y Becker, R. (1984). "Amaranthus: A potential food and feed resource". En: *Adv. Sci. Tech.* Vol.VI. AACC. Ed. Pomeranz.
- Schar, M., Maly, I.P. y Sasse D. (1985). "Histochemical studies on metabolic zonation of the liver in the trout (*Salmo gairdneri*).". *Histochemistry*, 83:147-51.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996). "Mass spectrometry sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels". *Anal. Chem.*, 68:850-858.
- Schmid, E., Schmid, W., Jantzen, M., Mayer, D., Jastoff, B. y Schütz, G. (1987). "Transcriptional activation of the tyrosine aminotransferase gene by glucocorticoids and cAMP in primary hepatocytes" *Eur. J. Biochem.* 165:499-506.
- Schmid, E., Schmid, W., Jantzen, M., Mayer, D., Jastorff, B. y Schutz, G. (1987). "Transcription activation of the tyrosine aminotransferase gene by glucocorticoids and cAMP in primary hepatocytes." *Eur. J. Biochem.*, 165:499-506.
- Schultz, E. (1996). "Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscle". *Dev. Biol.*, 175:84-94.
- Schwarz, F.J., Plank, J., y Kirchgessner M. (1985). "Effect of protein or energy restriction with subsequent realimentation on performance parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.)". *Aquaculture*, 48:23-33.



- Sereni, F., Kenney, F.T. y Hretchmer, N. (1959). "Factors influencing the development of tyrosine-alpha-ketoglutarate transaminase activity in rat liver." *J. Biol. Chem.*, 234:609-12.
- Serra, C., Lampis, G., Pompei, R. y Pinza, M. (1994). "Antiviral activity of new triterpenic Derivatives". *Pharmacol. Res.*, 29:359-66.
- Serra, E. (1999). "Efecte del Contingut de Carbohidrats en la Dieta Sobre la composició corporal de Juvenils d'Orada (*Sparus aurata*)" (en catalán). Memoria del Máster Experimental en Biología. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Serrano, M.P., Valencia, D.G., Fuentetaja, A., Lázaro, R. y Mateos, G.G. (2008a). "Effect of gender and castration of females and slaughter weight on performance and carcass and meat quality of Iberian pigs reared under intensive management systems". *Meat Science*, 80:1122-1128.
- Serrano, M.P., Valencia, D.G., Nieto, M., Lázaro, R. y Mateos, G.G. (2008b). "Influence of sex and terminal sire line on performance and carcass and meat quality of Iberian pigs reared under intensive production systems". *Meat Science*, 78:420-428.
- Shearer, K.D. (1994). "Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids". *Aquaculture*, 119:63-88.
- Sheehan, E., O'Connor, T., Sheehy, P., Buckley, D.J., y Fitzgerald, R. (1996). "Effect of dietary fat intake on the quality of raw and smoked salmon". *Irish J. Agric. Food Res.*, 35:37-42.
- Sheikh, S., Ni, L., Hurley, T. y Weiner, H. (1997). "The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase". *J. Biol. Chem.*, 272:18817-18822.
- Sherarer, K. D. (1994). "Factors affecting the proximate composition of culture fishes with emphasis on salmonids". *Aquaculture*, 119:63-88.
- Sheridan, M. A. y Mommsen, T.P. (1991). "Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*". *Gen. Comp. Endocrinol.* 81:473-83.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Schevchenko, A., Boucherie, H. y Mann, M. (1996). "Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93:14440-5.
- Shevchenko, A., M. Wilm, M, Vorm, O., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Neubauer, G., Mortensen, P. y Mann, M. (1996). "A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone." *Biochem. Soc. Trans.*, 24:893-6.



- Shevchenko, S.I. (2000). "On Vortices Induced in Superfluid Films by Crossed Electric and Magnetic Fields", J. Low Temp. Phys., 121:429.
- Shiau, S.Y. y Lan, C.W. (1996). "Optimal dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*)". Aquaculture, 175:317-326.
- Shimeno, S. (1982). "Studies on carbohydrate metabolism in fish". V.S. Kotherkar, 123.
- Shimeno, S., Duan-Cun-Ming y Takeda, M. (1993). "Regulation of carbohydrate metabolism in fish XVI. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*". Nippon Suisan Gakk., 59:827-833.
- Shimeno, S., Hosokawa, H., Hirata, H. y Takeda, M. (1977). "Comparative studies of carbohydrate metabolism of yellowtail and carp". Nippon Suisan Gakk., 43:213-217.
- Shimeno, S., Kheyyali, D. y Takeda, M. (1990). "Metabolic adaptation to prolonged starvation in carp". Nippon Suisan Gakk., 56:35-41.
- Shyong, W.J.; Huang, C.H. y Chen, H.C. (1998). "Effects of dietary protein concentration on growth and muscle composition of juvenile Zacco barbata". Aquaculture, 167:35-42.
- Sierra, M.A. (1995). "La encapsulación como estrategia para establecer las necesidades de metionina y la suplementación de proteína de soja. Consecuencias sobre el recambio proteico tisular y el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*)". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Simpson, R. (2005). "Proteins and Proteomics. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. [www.proteinaproteomics.org](http://www.proteinaproteomics.org).
- Singer, S.R. y McDaniel, C.N. (1982). "Transport of the Herbicide 3-Amino-1, 2, 4-Triazole by Cultured Tobacco Cells and Leaf Protoplasts." Plant Physiol., 69:1382-1386.
- Skorskowski, E.F. y Storey, K.B. (1988). "Mitochondrial NAD(P)-dependent malic enzyme from herring skeletal muscle. Purification and some kinetic and regulatory properties". Fish. Physiol. Biochem., 5:241-258.
- Smith, Linwood S. (1989). "Digestive functions in teleost fishes". En: Fish Nutrition (editado por Halver, John E.), 331-421. Academic Press, San Diego.
- Smith, R., Wood, C., Cash, P., Diao, L. y Pärt, P. (2005). "Apolipoprotein A could be a significant determinant of epithelial integrity in rainbow trout gill cell cultures: A study in functional proteomics". Biochimica et Biophysica Acta, 1749:81-93.



- Smith, R.W., Knight, R.A. y Walsh, A. (1981). "Effect of lactation on the concentrations of protein, lipids and nucleic acids in ovine skeletal muscle." *Res. Vet. Sci.*, 30:253-254.
- Snell, K. (1984). "Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues." *Adv. Enzyme Regul.*, 22:325-400.
- Snell, K., Natsumeda, Y. y Webwe, G. (1987). "The modulation of serine metabolism in hepatoma 3924A during different phases of cellular proliferation in culture." *Biochem .J.*, 245:609-12.
- Stamataris, C., Kyriazakis, I., y Emmans, G.C. (1991). "The performance and the body composition of young pigs following a period of food retardation by food restriction". *Animal Production*, 53:373-381.
- Steen, H. y Mann, M. (2004). "The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing". *Mol.Cell.Biol.Review*, 5:699-711.
- Steffens, A. B. y Strubbe, J. H. (1987). "Regulation of body weight and food intake". *Sci. Prog.*, 71: 545-561.
- Steffens, W. (1987). "Further results of complete replacement of fish meal by means of poultry by-products meal in feed for trout fry and fingerling (*Salmo gairdneri*).". *Arch. Tierernahr.*, 37:1135-9.
- Steinmetz, C., Xie, P., Weiner, H. y Hurley, T. (1997). "Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion". *Structure*, 5:701-711.
- Stewart, W.D.P. (1967). "Nitrogen turnover in marine and brackish habitats. II. Use of <sup>15</sup>N in measuring nitrogen fixation in the field". *Ann. Bot. N. S.* ,31:385-407.
- Stickland, N.C., White, R.N., Mescall, P.E., Crook, A.R., y Thorpe, J.E. (1988). "The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)". *Anat. Embryol.*, 178:253-257.
- Stimpson, J.H. (1965). "Comparative aspects of the control of glycogen utilization in vertebrate liver." *Comp. Biochem. Physiol.*, 15:187-97.
- Stiti, N., Triki, S. y Hartmann, M.A. (2007). "Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* fruit ontogeny". *Lipids*, 42:55-67.
- Stockdale, F.E. (1992). "Myogenic cell lineages". *Dev. Biol.*, 154:284-298.
- Storebakken, T. y No, H.K. (1992). "Pigmentation of rainbow trout". *Aquaculture*, 100:209-229.
- Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M., Sanz, A. y de la Higuera, M. (1995). "Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel". *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A:421-428.



- Suárez, M.D.; Hidalgo, M.C. y García Gallego, M. (2002). "Metabolic effects of changes in the dietary protein: carbohydrate ratio in eel (*Anguilla anguilla*) and trout (*Onchorynchus mykiss*)". *Aquacult. Int.*, 10:143-156.
- Suárez, R.K. y Moonsen, T.P. (1987). "Gluconeogenesis in teleost fishes". *Can. J. Zool.*, 65:1869-1882.
- Sugden, P.H. y Fuller, S.J. (1991). "Correlations between cardiac protein synthesis rates, intracellular pH and the concentrations of creatine metabolites." *Biochem. J.*, 273:339-346.
- Sugimoto, K., Urano, T., Zushi, H., Inoue, K., Tasaka, H., Tachibana, M. y Dotsu, M. (2002). "Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin $\alpha$ ." *Cell Struct. Funct.*, 27:457-67.
- Sugimoto, S., Mitaka, T., Hirata, K. y Mochizuki, Y. (2002). "Morphological changes induced by extracellular matrix are correlated with maturation of rat small hepatocytes." *J. Cell Biochem.*, 87:16-28.
- Sugiyama, K., K. Sugiura, Hara, T., Sugimoto, K., Shima, H., Honda, K., Furukawa, K., Yamashita, S. y Urano, T. (2002). "Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation." *Oncogene*, 21:3103-11.
- Sultana, N. y Lee, N.H. (2007). "Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*." *Phytother Res.*, 21:1171-6.
- Summers, J.D., Sparrt, D. y Atkinson, J.L. (1990). "Restricted feeding and compensatory growth for broilers". *U.S.A. Poultry Sci.*, 69:1855-1861.
- Suzuki, O. y Yagi, K. (1976). "A fluorometric assay for beta-phenylethylamine in rat brain." *Anal. Biochem.*, 75:192-200.
- Tacon A. (1984). "Protein and amino acid requirements". En: *Fish Energetics: New Perspectives*. Tyler, P. y Callow, P. (Eds.) Johns Hopkins University Press, Baltimore, 155-184.
- Tacon A. (1994). "Feed Ingredients for carnivorous fish species: Alternatives to fishmeal and other dietary resources". *FAO-Fish. Circ.*, 881:35.
- Tacon, A. (2003). "Global trends in aquaculture and compound aquafeed production". A review. *International Aquafeed, Directory and Buyers*, 8-23. World Aquaculture Society, Turret RAI plc.
- Tacon, A.G., Webster, J.L. y Martínez, C.A. (1984). "Use of solvent extracted sunflower seed meal in complete diets for fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)". *Aquaculture*, 43:381-389.
- Tacon, A.G.J., (1979). "Activated sewage sludge, a potential animal foodstuff". *Nutritional characteristics. Agric. Environm.*, 4:271-279.



- Tacon, A.G.J., (1985). "Nutritional fish pathology". Rome, UNDP/FAO, ADCP Report No. ADCP/REP/85/22P.
- Takano, M., Takeuchi, M., Hiromi, I., Furukawa, K. (2002). "The binding of lamin B receptor to chromatin is regulated by phosphorylation in the RS region." *Eur. J. Biochem.*, 269:943-53.
- Takashima, F. y Hibiya, T. (1995). "An atlas of fish histology. Normal and pathological features". 2<sup>ed</sup>. Tokyo, Kodansha. 195.
- TamZiv, T., Gattegno, T., Chapovetsky, V., Wolf, H., Lubzens, E. y Admon, A. (2007). "Comparative proteomics of the developing fish (zebrafish and gilthead sea bream) oocytes. *Comp. Biochem. Phis. D.: Genomics and Proteomics*, 3:12-35.
- Tan, A.; Xie, S.; Lei, W. y Yang, Y. (2006). "Effect of dietary carbohydrate sources on growth performance and utilization for gibel carpm (*Carassius auratus gibelio*) and Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris Günther*)". *Aquacult. Nutr.*, 12:61-70.
- Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, Y., Takamatsu, H., Ito, T., Hatano, H., Sakagami, H., Tokuda, H., Nishino, D., Sugita, S., Shimura y Yoshida, T. (2002). "Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica calli*." *Phytochemistry*, 59:315-23.
- Taylor, J.A. y Johnson, R.S. (1997). "Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 11:1067-75.
- Taylor, J.A. y Johnson, R.S. (2001). "Implementation and uses of automated de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry." *Anal. Chem.*, 73:2594-604.
- Terofal, Fritz. 1990. "Peces de Mar". Editorial Blume, Barcelona.286.
- Teskeredzic, Z., Teskeredzic, E., Tomec, M., Hamanjeck, M., y McLean, E. (1995). "The impact of rationing upon growth, feed conversion efficiency and body composition of rainbow trout". *Water Sci. Technol.*, 31:219-223.
- Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K.D., Inselmann, S. y Rosenthal, H. (1999). "Growth of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture*, 174:355-367.
- Thomas, J.O. y Kornberg, R.D. (1978). "The study of histone-histone associations by chemical cross-linking." *Methods Cell Biol.*, 18:429-40.
- Thomot, A. y Bauchot, R. (1987). "The organogenesis of the membranous labyrinth in *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829 (Pisces, Holostei, Polypteridae)." *Anat. Anz.*, 164:189-211.
- Thongboonkerd, V., Klein, J.B. y Arthur J.M. (2004). "Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases." *Contrib. Nephrol.*, 141:292-307.



- Thorarinsdottir, K.A., Arason, S., Geirsdottir, M., Bogason, S.G. y Kristbergsson, K. (2002). "Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry". *Food Chem* 77:377-385.
- Tidwell, J.H. y Allan, G.L. (2001). "Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries." *Embo. Rep.*, 2:958-63.
- Tiews, K., Koops, H., Gropp, J. y Beck, H. (1979). "Compilation of fish meal-free diets obtained in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) feeding experiments at Hamburg" (1970–1977/78). En: J.E. Halver and K. Tiews, Editors, *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Heenemann, Berlín, 2:219–228.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Van der Eecken, A., Evjemo, J.O., Díaz, E., Bell, J.G. Geurden, I., Lavens, P. y Olsen, Y. (2002). "Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanism of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hipoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.)". *Aquacult. Nutr.*, 8:195-207.
- Ulijaszek, S.J. (1990). "Nutritional status and susceptibility to infectious disease". En: Waterlow, J.C., ed. *Diet and disease*. New York: Cambridge University Press, 137-54.
- Ullah, F., Hussain, H., Hussain, J., Bukhari, I.A., Khan, M.T., Choudhary, M.I., Gilani, A.H. y Ahmad, V.U. (2007). "Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*". *Phytother Res.*, 21:1076-81.
- Unger, R.H. (2000). "Leptin physiology: a second look". *Regul. Pept.*, 92:87-95.
- Usher, M.L., Stickland, N.C., y Thorpe, J.E. (1994). "Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity". *J. Fish Biol.*, 44: 953-964.
- Van der Have, T.M., y de Jong, G. (1996). "Adult size in ectotherms: temperature effects on growth and differentiation". *J. Theor. Biol.*, 183:329-340.,
- Van Waarde, A. (1983). "Aerobic and anaerobic ammonia production by fish". *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B: 675-684.
- Velázquez, M., Zamora, S. y Martínez, F.J. (2006a). "Effect of dietary energy content n gilthead sea bream (*Sparus aurata*) feeding behaviour and nutritional use of the diet". *Aquacult. Nutr.*, 12:127-133.
- Velázquez, M., Zamora, S. y Martínez, F.J. (2006b). "Effect of different feeding strategies on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) demand-feeding behaviour and nutritional utilization of the diet". *Aquacult. Nutr.*, 12:403-409.
- Venou, B., Alexis, M., Fountoulaki, E., Nengas, I., Apostolopoulou, M. y Castritsi-Cathariou, I. (2003). "Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient



- utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities". *Aquaculture*, 225:207-223.
- Vergara, J., Fernández-Palacios, H., Robaina, L. Jauncey, K., de la Higuera, M., y Izquierdo, M. (1996b). "The effects of varying dietary protein level on the growth, feed efficiency, protein utilization and body composition of gilthead sea bream fry". *Fisheries and Science*, 62:620-623.
- Vergara, J.M., Robaina Lidia, Izquierdo, M. y de La Higuera, M. (1996a). "Protein Sparing Effect of Lipids in Diets for fingerlings of Gilthead Sea Bream". *Fisheries Science*, 62:624-628.
- Vergara, J.M., Robaina, L., Caballero, M.J., Montero, D., Izquierdo, M.S. y Asksnes, A. (1999). "Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish melas of different quality". *Aquaculture*, 179:35-44.
- Verrez-Bagnis, V., Noël, J., Sautereau, C. y Fleurence, J. (1999). "Desmin degradation in postmortem fish muscle". *J. Food Sci.*, 64:240-242.
- Vicentini, F. y Matile, P. (1993). "Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisomes in senescent leaves". *J. Plant Physiol.*, 142, 50-56.
- Vierira, V.L.A., y Johnston, I. A. (1992). "Influence of temperature on muscle fibre development in larvae of the herring *Clupea harengus*". *Mar. Biol.*, 112:333-341.
- Vilhelmsson, O.T., Martín, S.A.M., Médale, F., Kaushik, S.J. y Houlihan, D.F. (2004). "Dietary plant protein substitution affects hepatic metabolism, but does not invoke a stress response, in rainbow trout". *Br. J. Nutr.*, 92:71-80.
- Vilhelmsson, O.T., Martin, S.A.M., Poli, B.M. y Houlihan, D.F. (2005). "Proteomics: Methodology and Application in Fish Processing". *Proteomics*, 3:401-421
- Viola, S., Mokady, S., Rappaport, U. y Arieli, Y. (1982). "Partial and complete replacement of fishmeal by soybean meal in feeds for intensive cultura of carp". *Aquaculture*, 26:223-236.
- Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S. y Pieters, L.A. (1998). "Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection". *Planta Med.*, 64:97-109.
- Walton, M. (1985). "Aspects of amino acid metabolism in teleost fish". En: *Feeding and Nutrition of fish* (Ed. Cowey, Bell, Mc Kie), 44-67. Academic Press. Londres.
- Walton, M. (1986). "Metabolic effects of feeding a high protein/ low carbohydrate diet as compared to a low protein/high carbohydrate diet to rainbow trout, *salmo gairdneri*". *Fish. Physiol. Biochem.*, 1:7-15.



- Walton, M.J. y Cowey, C.B. (1982). "Aspects of intermediary metabolism in Salmonid fish". *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B:59-79.
- Walzem, R.L., Storebakken, T. Hung, S.S. y Hansen, R.J. (1991). "Relationship between growth and selected liver enzyme activities of individual rainbow trout". *J. Nutr.*, 121:1090-8.
- Wang, D., Xia, M. y Cui, Z. (2006). "New Triterpenoids Isolated from the Root Bark of *Ulmus pumila* L." *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 54:775-8.
- Wang, R., Wei, S., Wang Wang, L., Liu, R., Yi Ding, R., y Du, L. (2006). "Constituents of the flowers of *Punica granatum*". *Fitoterapia*. 77:534-7.
- Wangikar, P.P., Rich, J.O., Clark, D.S. y Dordick, J.S. (1995). "Probing enzymic transition state hydrophobicities". *Biochemistry*, 34:12302-12310.
- Watanabe, M., Potter, V.R. y Pitot, H.C. (1968). "Systematic oscillations in tyrosine transaminase and other metabolic functions in liver of normal and adrenalectomized rats on controlled feeding schedules." *J. Nutr.*, 95:207-27.
- Watanabe, T. (1982). "Lipid nutrition in fish". *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B:3-15.
- Watanabe, T. (2002). "Strategies for further development of aquatic feeds". *Fisheries Sci.*, 68:242-252.
- Waterlow J.C., Garlick P.J. y Millward D.J. (1978). "Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body". *Publicaciones Elsevier Sciences, Amsterdam, New York, Oxford*.
- Weatherley, A.H., Gill, H.S., Rogers, S.C. (1979) "Growth dynamics of muscle fibres, dry weight, and condition in relation to somatic growth rate in yearling rainbow trout, *Salmo gairdneri*". *Can. J. Zool.*, 57:2385-2392.
- Weatherley, A.H. (1990). "Approaches to understanding fish growth". *Trans. Am. Fish Soc.*, 119:662-672.
- Weatherley, A.H. y Gill, A.H., (1984). "Growth dynamics of white myotomal muscle fibres in the bluntose minnow, (*Pimephales notatus*) Rafinesque, and comparison with rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson". *J. Fish Biol.*, 25:13-24.
- Weatherley, A.H. y Gill, A.H., (1989). "The role of muscle in determining growth and size in teleost fish". *Experientia*, 45:875-878.
- Weindruch, R. y Walford, R.L. (1988). "The retardation of aging and disease by dietary restriction". *Springfield, IL: Charles C Thomas Publisher*.



- Weiss, P. (1972). "Hepatic ultrastructure in two species of normal, fasted and gravid teleost fishes". *The American Journal of Anatomy*, 133:317-332.
- Weissbach H y Ochoa S. (1976). "Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis". *Annu. Rev. Biochem.*, 45:191-216.
- Wen, X., Sun, H., Liu, J., Wu, G., Zhang, L., Wu, X. y Ni, P. (2005). "Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12:4944-8.
- Wen, X., Zhan., P. Liu, J., Zhang, L., Wu, X., Ni, P. y Sun, H. (2006). "Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16:722-6.
- Westermeier, R. y Marouga, R. (2005). "Protein Detection Methods in Proteomics Research". *Bioscience Reports*, 25:19-32.
- Whiting, S.J. y Wiggs, A.J. (1977). "Effect of nutritional factors and cortisol on tyrosine aminotransferase activity in liver of brook trout, *Salvelinus fontinalis Mitchill*." *Comp. Biochem. Physiol.*, B 58:189-93.
- Whitworth, W.R., Berrien, P.L. y Keller, A. (1968). "Freshwater fishes of Connecticut". *State geological and natural history survey of Connecticut*, 101:134.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sánchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L. y Hochstrasser, D.F. (1995). "From proteins to proteomes large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis". *Biotechnology*, 14:61-65.
- Wilm, M. y Mann, M. (1996). "Analytical properties of the nanoelectrospray ion source." *Anal. Chem.*, 68:1-8.
- Wilson, R. P. (1986). "Protein and amino acid requirements of fishes." *Annu. Rev. Nutr.*, 6: 225-244.
- Wilson, R.P. (1994). "Utilization of dietary carbohydrate by fish". *Aquaculture*, 124:67-80.
- Wilson, R.P. y Poe, W.E., (1985). "Effects of feeding soybean meal with varying trypsin inhibitor activities on growth of fingerling channel catfish". *Aquaculture*, 46:19-25.
- Woessner, J.F. (1991). Matrix metalloproteases and their inhibitors in connective-tissue remodelling. *FASEB J.*, 5:2145–2154.
- Xu, H.X., Zeng, F.Q., Wan, M. y Sim, K.Y. (1996). "Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*." *J. Nat. Prod.*, 59: 643-5.



- Yager, T. y Summerfelt, R.C. (1993). "Effects of fish size and feeding frequency on metabolism of juvenile walleye". *Aquacultural Engineering.*, 12:19-36.
- Yamagishi, H. (1969). "Postembryonal growth and its variability of the three marine fishes with special reference to the mechanism of growth variation in fishes". *Res. Popul. Ecol.*, (Kyoto) 11:14-33.
- Yamagishi, T., Ozaki, M., Okazaki, T., Y Naito, Y., Yokota, Y., Ara, N. (1988). "Relationship between the relative regional thallium-201 uptake and the regional systolic or diastolic filling function." *Jpn. Circ. J.*, 52:525-534.
- Yamamoto, T., Konishi, K., Shima, T., Furuita, H., Suzuki, N. y Tabata, M. (2001). "Influence of dietary fat and carbohydrate levels on growth and body composition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under self-feeding conditions". *Fisheries Sci.*, 67:221-117.
- Yang, M., Wang, G.J., Howell, K.L., Lee, J.T y Cho, D.S.C (2005). "Quantitative analysis of 23-hydroxybetulinic acid in mouse plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry." *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 19:1619-23.
- Yang, Z.G., Li, H.R., Wang, L.Y., Li, Y.H., Lu, S.G., Wen, X.F., Wang, J., Daikonya, A. y Kitanaka, S. (2007). "Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities". *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 55:15-18.
- Yasutake, W.T. y Wales J. (1983). "Microscopy Anatomy of Salmonids: An Atlas". 1<sup>st</sup> ed., Resource Publication, 150. Washington D.C., USA.
- Yokoyama, K., Ishibashi, T., Yi-qiang, Nagayoshi, A. Teramoto, T., y Maruyama, Y. (2002). "HMG-CoA reductase inhibitors suppress intracellular calcium mobilization and membrane current induced by lysophosphatidylcholine in endothelial cells." *Circulation*, 105:962-7.
- Zahn, T., Arnold, H., y Braunbeck, T. (1996). "Cytological and biochemical response of R1 cells and isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to subacute in vitro exposure to disulfoton." *Exp.Toxicol. Pathol.*, 48:47-64.
- Zhang RJ, Sioma CS, Wang SH, Regnier FE. 2001. Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics. *Anal Chem* 73:5142–5149.
- Zhang, L. R. y Ma, T. X. (1995). "Antagonistic effect of oleanolic acid on anaphylactic shock". *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 16:527-30.
- Zimek A y Weber K. (2005). "Terrestrial vertebrates have two keratin gene clusters; striking differences in teleost fish". *Eur. J. Cell Biol.*, 84:623-635.



Ziv, T., Gattegno, T., Chapovetsky V., Wolf, H., Barnea, E., Lubzens, E. y Admon, A. (2008). "Comparative proteomics of the developing fish (zebrafish and gilthead seabream) oocytes". *Comp. Biochem. Physiol. Part D*, 3:12-35.



