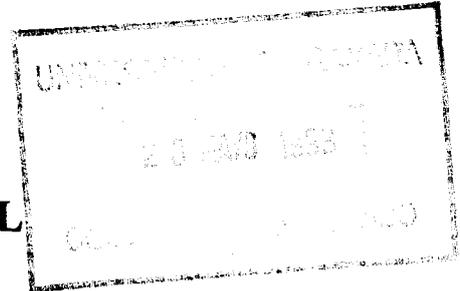


Proct, 14/85

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL



**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*)**

JUAN BAUTISTA BARROSO ALBARRACIN

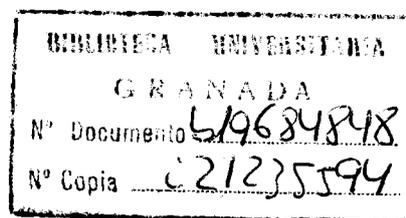
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

T
15
142

TESIS DOCTORAL

**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*)**

JUAN BAUTISTA BARROSO ALBARRACIN

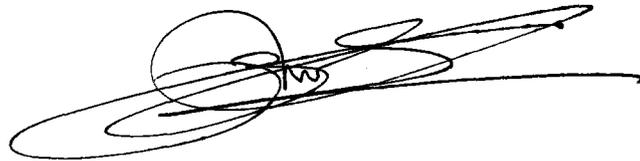


UNIVERSIDAD DE GRANADA

1993

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Memoria que presenta el Licenciado en
Ciencias Biológicas D. Juan Bautista Barroso
Albarracín para aspirar al Grado de Doctor.**



Fdo.: Juan Bautista Barroso Albarracín

DIRECTORES DE LA MEMORIA:

Fdo.:

Prof. Dr.

D. José Antonio Lupiáñez Cara

Fdo.:

Prof. Dr.

Dña. Leticia García Salguero

INDICE

INTRODUCCION	2
1. IMPORTANCIA METABOLICA DEL NADPH	2
2. SISTEMAS ENZIMÁTICOS PRODUCTORES DE NADPH	4
2.1 ASPECTOS GENERALES Y SIGNIFICACION METABOLICA.	4
2.2 PROPIEDADES DE LOS ENZIMAS REGULADORES	12
2.2.1 PROPIEDADES Y DISTRIBUCION DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA.	12
2.2.2 PROPIEDADES Y DISTRIBUCION DE LA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA.	14
2.2.3 PROPIEDADES Y DISTRIBUCION DEL ENZIMA MALICO Y DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA- NADP	15
2.3 INTEGRACION CELULAR CON OTROS PROCESOS METABOLICOS	19
3. MECANISMOS DE REGULACION DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS PRODUCTORES DE NADPH.	21
3.1 REGULACION METABOLICA Y CELULAR..	21
3.2 INFLUENCIA DE DIVERSOS MACRONUTRIENTES DIETARIOS: REGULACION NUTRICIONAL	27
3.2.1 EFECTO DEL NIVEL DE PROTEÍNA.	28
3.2.2 EFECTO DEL NIVEL DE CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS.	34
3.2.3 INFLUENCIA DE LAS SITUACIONES DE AYUNO Y REALIMENTACION	39
OBJETO Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO	45
MATERIAL Y METODOS.	49
1. ESPECIE ENSAYADA	50
2. MATERIAL UTILIZADO EN LAS DISTINTAS TECNICAS EXPERIMENTALES	50
3. PRODUCTOS	51
4. ANIMALES Y MANTENIMIENTO	52
.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	53
6. ELABORACION DE LAS DIETAS	55

7. CONTROL DE INGESTA Y PESO	56
8. INDICES BIOLÓGICOS UTILIZADOS	56
9. MÉTODOS ANALÍTICOS	58
9.1 DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE LAS DIETAS	58
9.2 TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LA DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.	59
9.3 TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LA DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS METABOLICOS	60
9.4 DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.	62
9.4.1 DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA Y 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA.	62
9.4.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMA MALICO.	64
9.4.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP	66
9.4.4 PARAMETROS CINETICOS.	69
9.5 DETERMINACION ENZIMATICA DE METABOLITOS	69
9.5.1 DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUCOSA 6-FOSFATO, FRUCTOSA 6-FOSFATO, Y 6-FOSFOGLUCONATO	69
9.5.2 DETERMINACION ENZIMATICA DE L-MALATO	71
9.5.3 DETERMINACION ENZIMATICA DE ISOCITRATO.	72
9.5.4 DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUCOSA.	73
9.5.5 DETERMINACION ENZIMATICA DE NADP	74
9.5.6 DETERMINACION DE LA GLUCOSA SANGUINEA.	75
9.5.7 DETERMINACION DE GLUCOGENO	76
RESULTADOS	79
1. INFLUENCIA DEL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS PRODUCTORES DE NADPH EN DISTINTOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS	80
1.1 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA	80
1.2 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA	81
1.3 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMA MALICO.	81

1.4 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP	86
1.5 CONTRIBUCION DE LOS DISTINTOS ORGANOS Y TEJIDOS A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH.	91
1.5.1 CONTRIBUCION RELATIVA DE LOS DISTINTOS TEJIDOS Y ORGANOS A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH.	91
1.5.2 CONTRIBUCION ABSOLUTA DE LOS DISTINTOS TEJIDOS Y ORGANOS A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH	92
1.5.3 CONTRIBUCION RELATIVA HEPATICA A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH EN ANIMALES CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	92
1.5.4 CONTRIBUCION ABSOLUTA HEPATICA A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH EN ANIMALES CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.	93
2. INFLUENCIA DE DIFERENTES MACRONUTRIENTES DIETARIOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS	98
2.1 INFLUENCIA DEL NIVEL DE PROTEÍNA DE LA DIETA	98
2.1.1 EFECTO DE LAS PROTEINAS	98
2.1.2 SUSTITUCION DE GRASAS POR PROTEINA.	99
2.1.3 SUSTITUCION DE CARBOHIDRATOS POR PROTEINA.	100
2.2 INFLUENCIA DEL NIVEL DE GRASA DE LA DIETA	111
2.2.1 EFECTO DE LAS GRASAS	111
2.2.2 SUSTITUCION DE CARBOHIDRATOS POR GRASAS	112
2.3 INFLUENCIA DEL NIVEL DE CARBOHIDRATOS DE LA DIETA	112
2.3.1 EFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS	112
3. INFLUENCIA DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH EN TRUCHA ARCO-IRIS, CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	118
3.1 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	118
3.2 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LA ACTIVIDAD 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	128
3.3 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE	

LA ACTIVIDAD ENZIMA MALICO EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.	136
3.4 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LA ACTIVIDAD ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL	141
DISCUSION	155
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFIA	182

INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA METABOLICA DEL NADPH

Uno de los más importantes factores bioquímicos relacionados con los procesos de crecimiento y proliferación celular, lo constituye la disponibilidad, por parte de los diferentes tejidos, de moléculas de equivalentes de reducción en forma de NADPH, así como de un conjunto adecuado de nucleótidos. El NADPH 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, implicados entre otras funciones, en la formación de los diferentes elementos de membrana, hidroxilasas microsomales, y la reducción de glutathione necesario en procesos de detoxificación (Eggleston y Krebs, 1974; Orrenius et al., 1983). Todo ello está claramente relacionado con fenómenos de crecimiento y detoxificación celulares, que requieren una síntesis activa de estos elementos de membrana. Es necesario resaltar el hecho de que la producción celular 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, las moléculas de NADPH participan de una forma directa en los procesos de síntesis de la gran mayoría de los constituyentes lipídicos de membrana, tales como ésteres de colesterol y los diferentes fosfolípidos y esfingolípidos, así como en 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, participan de forma indirecta al actuar como un importante metabolito activador de la propia síntesis de proteínas (Kan et al., 1988; Gross et al., 1988).

2. SISTEMAS ENZIMATICOS PRODUCTORES DE NADPH

2.1 ASPECTOS GENERALES Y SIGNIFICACION METABOLICA.

La generación celular de NADPH se lleva a cabo preferentemente gracias a las actividades de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, concretamente glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), y en menor medida por las actividades de el enzima málico (EM) e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (IDH-NADP).

El ciclo de las pentosas fosfato es una vía alternativa de oxidación de glucosa que proporciona NADPH en dos reacciones consecutivas de la rama oxidativa catalizadas por la G6PDH y 6PGDH. El enzima málico fue originariamente encontrado en la fracción citoplasmática de las células hepáticas y cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato. La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP cataliza la descarboxilación de isocitrato a α -cetoglutarato, y se localiza tanto en la fracción citoplasmática como en la mitocondrial.

Si bien la ruta de las pentosas fosfato está considerada como secundaria en la oxidación de la glucosa, participa en la formación de equivalentes de reducción y pentosas fosfato que son imprescindibles para distintos tipos de síntesis (Shimeno, 1982). Así el NADPH necesario para la biosíntesis de ácidos grasos se genera a partir de estos sistemas enzimáticos, siendo todos activos en hígado de trucha (Baldwin y Reed, 1976), salmón coho (Lin et al., 1977a,b), anguila (Aster y Moon, 1981; Abraham et al., 1984), y pez gato (Likimani y Wilson, 1982).

Todo ello posibilita, como se ha descrito en vertebrados superiores, que esta vía se vea influenciada, tanto por el tipo de dieta y situación hormonal, como por las condiciones de vida (McDonald y Johnson, 1965). Por otra parte, en peces, fundamentalmente en carnívoros, la G6PDH posee una actividad que es de cuatro a siete veces mayor que en mamíferos indicando así una elevada operatividad de esta vía.

La G6P es el precursor para esta ruta metabólica, dando lugar a la formación, como mencionamos anteriormente, de dos biomoléculas: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), y ribosa 5-fosfato. El primer producto se utiliza en un gran número de procesos biosintéticos y especialmente para la síntesis de ácidos grasos y esteroides, siendo el segundo necesario en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

Para obtener una mayor comprensión de la implicación del NADPH en gran cantidad de procesos biosintéticos reductores es importante determinar el papel relativo que juegan estos sistemas productores de NADPH así como los factores que los afectan.

Varios investigadores han tratado de establecer el aporte de estos sistemas frente a otras rutas como la glucolítica, usando diferentes métodos basados en la medida de la actividad de los enzimas implicados en esta rutas metabólicas o en el uso de inhibidores específicos de la glucólisis, como el iodoacetato, que inhibe la enzima gliceraldéhidio 3P-deshidrogenasa (Ekberg, 1958). También se ha trabajado con sustratos marcados (Katz y Wood, 1960) o administrando a los animales metabolitos intermediarios, como el acetato-1-¹⁴C, y midiendo el carbono marcado que aparece en el CO₂ y en el glucógeno (Hochachka, 1962; Nagai e Ikeda, 1972, 1973). Los resultados muestran que bajo condiciones normales, es la glucólisis la principal vía de degradación de la glucosa, aunque existe una aportación relativamente importante de la vía de las pentosas fosfato (Shimeno y Takeda, 1972, 1973). Lin et al., (1970), en el pez

Cichlasoma bimaculatum, observaron que el 66% de la degradación se hace vía glucólisis, el 19% vía pentosas fosfato y el 22% por la vía del glucurónico; no obstante, en eritocitos de perca aparece tan efectiva como la vía general (Bachand y Leary, 1975). Shimeno y Takeda (1973), obtienen en el hígado o hepatopáncreas, mayor actividad para la vía de las pentosas fosfato que en el músculo, presentándose relativamente pequeña, de forma que era la glucólisis la vía principal en este último, según muestran las elevadas actividades de los enzimas fosfoglucomutasa, fosfoglucosa isomerasa y fosfofructoquinasa, lo que hace suponer que la vía de las pentosas fosfato en hígado está asociada a la formación de NADPH y ribosas fosfato, que serán transportadas a un determinado tejido diana, mientras que en músculo predomina la glucólisis proveiendo así de la energía necesaria para el movimiento.

El nivel de actividad de la vía de las pentosas fosfato varía de acuerdo con al especie estudiada. Shimeno y Takeda (1973), encuentran que la actividad G6PDH estaba presente en todas las especies de peces estudiadas, aunque existían variaciones en la actividad en función de la especie. La mayor actividad se detectó en el hígado de anguila, dos veces superior a la de carpa, y tres veces a la de trucha arco-iris. También Yamauchi et al. (1975), encuentran que la actividad G6PDH en hígado de *Salvelinus fontinalis* es diez veces superior a la de *O. mykiss*. Así, las variaciones en la actividad de la vía entre distintas especies puede ser el resultado de variaciones en los requerimientos para esos metabolitos, los cuales a su vez, pueden verse afectados por factores extrínsecos como la dieta, disponibilidad del alimento, salinidad, tensión de oxígeno, temperatura, etc.

Existen importantes y confirmadas variaciones en el metabolismo de estas rutas, relacionadas con procesos anóxicos y especialmente con la aclimatación a bajas temperaturas. Hochachka (1967), investiga algunos aspectos de las adaptaciones metabólicas a la temperatura, señalando los cambios que tienen lugar en el hígado y el

músculo durante la glucólisis en el proceso de adaptación al frío. Así, la actividad de la ruta glucolítica en los tejidos muscular y hepático de peces aclimatados al frío, era muy superior a la de los controles. Los cambios producidos en la glucólisis hepática fueron mucho más complejos que los del tejido muscular; mientras que en el músculo de peces aclimatados al frío sólo se producía una ligera activación de la lipogénesis (medida como acetil-1-¹⁴C incorporado a lípidos) que se correspondía con un ligero incremento en la participación del shunt de las pentosas fosfato, en el hígado de los peces aclimatados al frío, se produjo una fuerte activación de la lipogénesis, siendo casi tres veces superior a la de peces controles. Así pues, parece existir una fuerte correlación entre el proceso de síntesis de ácidos grasos y la actividad de la vía de las pentosas fosfato (Kanungo y Prosser, 1959b; Hochachka, 1961, 1969; Hochachka y Hayes, 1962; Hazel y Prosser, 1974; Yamauchi et al., 1975; Jürss et al., 1987). A partir de esos estudios, parece ser que la utilización de la ruta del fosfogluconato cuando la temperatura disminuye, es temporal y asociada con procesos de reorganización celular, especialmente los relativos a síntesis de membranas mediante utilización de fosfolípidos que contengan un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (Tranulis et al., 1991). El papel de las biomembranas en la adaptación a la temperatura ha sido estudiado por una serie de investigadores que han observado alteraciones en la composición de las membranas dependientes de la temperatura. La adaptación de las membranas a bajas temperaturas está relacionada con una serie de procesos tales como: (a) aumento de la actividad de la gluconeogénesis y lipogénesis hepáticas; (b) una determinada proporción de los lípidos producidos en el hígado están asociados con la reorganización de los fosfolípidos en las membranas celulares; (c) se requiere una gran proporción de ácidos grasos poliinsaturados del grupo ω 3, y puesto que no se puede dar una síntesis endógena de estos ácidos es necesario el aporte exógeno de ácido linolénico. En este sentido, Irvine et al., (1957), observaron que la adición de

fosfolípidos y colesterol a la dieta incrementa la resistencia del pez a las bajas temperaturas; (d) aumento de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato con objeto de suplementar el NADPH necesario para el proceso de lipogénesis; y (e) aumento del requerimiento de oxígeno (Krebs y Brandt, 1975).

Es obvio, que el proceso de aclimatación al frío es un proceso complicado. Hochachka (1967) propone un mecanismo distinto a los expuestos anteriormente. Según este autor a bajas temperaturas, los requerimientos energéticos en organismos poikiloterms para crecimiento son muy pequeños, causando que el ratio ATP/AMP aumente; dado que el ATP ejerce una influencia limitante sobre el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la actividad de éste se verá inhibida. Sin embargo, y puesto que la glucólisis en el músculo es activa, la concentración de lactato en sangre e hígado aumenta, produciendo un incremento en la concentración de piruvato. Aunque el ciclo de los ácidos tricarbónicos está disminuido, la concentración de citrato aumenta al verse afectada por la concentración de piruvato. Este mecanismo produce una serie de consecuencias: (a) el citrato aumenta la afinidad por su sustrato de la acetil-CoA carboxilasa, éste es el enzima que activa el primer paso de la lipogénesis a partir de acetil-CoA, lo que se traduce en un aumento de la lipogénesis de los peces aclimatados al frío; (b) El NADPH generado por los sistemas enzimáticos productores de NADPH es utilizado en alguna de las etapas del proceso lipogénico; (c) El citrato es un modulador negativo de la fosfofructoquinasa, pero no de la fructosa 1,6-difosfatasa, enzima que transforma la fructosa difosfato en fructosa 6-fosfato, lo que se traduce en una acumulación de este último metabolito junto con glucosa 6-fosfato, contribuyendo así a aumentar la participación del ciclo de las pentosas fosfato en el metabolismo de la glucosa, y por tanto en la producción de NADPH; (d) El aumento en la concentración de glucosa 6-fosfato facilita la síntesis de glucógeno, aumentando por tanto su concentración hepática. Esta secuencia podría explicar el aumento en el contenido de

lípidos y glucógeno hepáticos de peces aclimatados al frío. No obstante, Baldwin y Reed (1978), examinando el efecto de la adaptación térmica sobre las actividades de los sistemas enzimáticos productores de NADPH, esperaban un aumento en la actividad de éstos al objeto de su participación en la síntesis lipídica durante el proceso de aclimatación a bajas temperaturas, sin embargo no obtuvieron resultados significativos.

Los sistemas enzimáticos de producción de NADPH juegan por tanto un papel central en el proceso lipogénico al suplementar las moléculas de NADPH necesarias para la transformación de acetyl-CoA en ácidos grasos (Yamauchi et al., 1975; Greenbaum et al., 1971; Leveille, 1972).

El hígado y el tejido adiposo son los principales tejidos lipogénicos en mamíferos terrestres y aves; la contribución relativa de esos dos tejidos a la velocidad de lipogénesis total del organismo varía con las especies (Pearce, 1980; Vernon 1980), el ritmo circadiano, la dieta, y las variaciones hormonales (Rous, 1977; Goubern y Portet, 1981).

Varios estudios han comparado las capacidades lipogénicas del hígado y el tejido adiposo en peces. Lin et al., (1977) realizaron medidas sobre las actividades de la ácido graso sintetasa, ATP citrato liasa, enzima málico, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, e isocitrato deshidrogenasa-NADP, en hígado y tejido adiposo de salmón coho, encontrando que las actividades de todos los enzimas eran mucho más altas en hígado que en tejido adiposo, indicando que el tejido adiposo no parecía tener un papel relevante en la síntesis de ácidos grasos. De manera similar, Likimani y Wilson (1982), comparan las mismas actividades en el hígado y tejido adiposo mesentérico de pez gato, concluyendo que el hígado era el tejido con mayor capacidad de síntesis de ácidos grasos. También Aster y Moon (1981), midieron las actividades enzimáticas antes descritas en varios tejidos de

anguila, observando que el hígado era el tejido lipogénico más importante, así como también el intestino y el músculo rojo eran otros tejidos lipogénicos potencialmente significativos. Lin et al., (1977c), mediante estudios de incorporación de tritio a los ácidos grasos (como medida de la síntesis total de ácidos grasos, independientemente de la fuente carbonada), en tejido adiposo e hígado, confirma la importancia de la lipogénesis en el hígado, ya que la velocidad de incorporación de tritio a los ácidos grasos hepáticos era treinta veces superior a la de los ácidos grasos de tejido de adiposo.

También Henderson y Sargent (1981), estudiaron las velocidades de incorporación de sustratos marcados a triacilgliceroles, encontrando que las velocidades de incorporación en hígado eran significativamente superiores a las de tejido adiposo. Sin embargo, cuando los niveles de incorporación de sustratos marcados se expresan en términos de ADN, sólo para la [^{14}C]alanina fue mayor en hígado que en tejido adiposo. Si consideramos el ADN como índice del número de células, estos datos sugieren que la velocidad de síntesis de ácidos grasos es similar en adipocitos y hepatocitos, si bien el hígado tiene aproximadamente 25 veces más ADN que el tejido adiposo por unidad de peso, por lo que se considera el hígado de trucha como un tejido de mayor rendimiento en la síntesis de ácidos grasos que el tejido adiposo. Iritani et al., (1984), realizaron un estudio comparativo sobre las velocidades de lipogénesis hepáticas en rata y besugo mediante medida de las actividades de enzimas lipogénicos y de las velocidades de incorporación de sustratos marcados *in vitro*; las velocidades de incorporación de los sustratos marcados a los ácidos grasos de lípidos totales fueron similares en las dos especies, además las actividades hepáticas de la ácido graso sintetasa y de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de besugo fueron superiores a las de rata. Sin embargo, las actividades acetyl-CoA carboxilasa y glicerolfosfato aciltransferasa eran más bajas en el pez que en la rata, mostrando este

último enzima una alta K_m por su substrato en el hígado de pez. Sobre la base de estos resultados este autor sugiere que la síntesis de ácidos grasos y los sistemas de esterificación del pez difieren de los de mamíferos, y que la lipogénesis se da a muy baja velocidad en los poikiloterms tales como los peces.

El tejido adiposo de la trucha arco-iris muestra una alta capacidad para el almacenaje y esterificación de [^{14}C] palmítico en triacilgliceroles *in vitro*, y una mayor capacidad de incorporación de [^{14}C] glucosa al glicerol, que el hígado (Henderson y Sargent, 1981).

Así, el tejido adiposo de trucha arco-iris está adaptado para el uptake y almacenaje, como traicilgliceroles, de los ácidos grasos procedentes bien de la dieta, o a partir de la biosíntesis hepática *de novo*.

La naturaleza y composición del tejido adiposo de peces ha sido descrita con anterioridad (Vague y Tenasse, 1965). La distribución del tejido adiposo varía con las especies, en la trucha aparece rodeando las vísceras, mientras que en el arenque y la caballa se dispone en depósitos subcutáneos que a veces penetran hasta el músculo. Otras especies, como el bacalao, acumulan triglicéridos en el hígado. Christiansen et al., (1965) aislaron adipocitos de trucha procedentes de tejido adiposo mesentérico, encontrando que tenían bajas velocidades de uptake de glucosa y aminoácidos al compararlos con adipocitos de rata o gato.

Existen una serie de factores implicados en el proceso de lipogénesis tales como el desarrollo gonadal, y aunque el contenido y composición de los lípidos de las huevas de pescado varía entre especies, normalmente se encuentran altos niveles de triacilglicéridos en el contenido lipídico de estos tejidos (Tocher y Sargent, 1984b), así por ejemplo, los lípidos transportados a las gónadas desde el hígado, son la principal fuente lipídica de las huevas de pescado, tales como la vitelogenina, precursor de la yema del huevo, o como componentes de determinadas lipoproteínas plasmáticas;

aunque Wiegand e Idler, (1982) evidenciaron que las gónadas, en la trucha arco-iris, son capaces de sintetizar lípidos *de novo*.

De otra parte, hay que hacer notar el papel de la lipogénesis en otros procesos como es el crecimiento celular en el desarrollo de los distintos tejidos de peces; siendo la síntesis de fosfolípidos, el lípido presente en mayor concentración en todas las biomembranas, esencial para la formación de biomembranas ya que el mantenimiento de la correcta composición de los componentes lipídicos es crítica para el óptimo funcionamiento de estas estructuras

2.2 PROPIEDADES DE LOS ENZIMAS REGULADORES

2.2.1. PROPIEDADES Y DISTRIBUCION DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; D-glucosa-6-fosfato: NADP⁺ 1-oxidoreductasa, EC 1.1.1.49) es el enzima que cataliza la reacción de deshidrogenación de la glucosa 6-fosfato en el carbono 1 para formar 6-fosfogluconato y NADPH.

Este enzima actúa en el punto donde la vía de las pentosas fosfato se separa de la glucólisis, considerándose como uno de los principales puntos en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, participando además en la formación del NADPH requerido en distintos tipos de biosíntesis reductoras.

La G6PDH fue detectada inicialmente por Warburg et al., (1931), realizándose posteriormente estudios más detallados por Kornberg et al., (1955), Glock et al., (1953, 1954), y otros. El enzima está ampliamente distribuido en microorganismos,

plantas y animales. En mamíferos presenta una alta actividad en tejido adiposo, glándulas mamarias e hígado, aunque dicha actividad es baja en músculo esquelético.

El pH óptimo está entre 7.5 y 8.5 en hígado de barracuda (Shimeno, 1982), rata (Glocky McLean, 1953), y en otros muchos organismos tanto animales como vegetales. El enzima muestra gran especificidad por el NADP^+ como coenzima y apenas ninguna por el NAD^+ (carpa, barracuda, y seriola), esos resultados son similares a los obtenidos para hígado de rata (Glock y McLean, 1953). La actividad G6PDH aumenta con cationes como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , y Mn^{2+} , siendo completamente inhibida por el Hg^{2+} y en menor medida por PO_4^{3-} .

El patrón de distribución de este enzima parece variar de acuerdo con el tipo de organismo y de tejido estudiado. Así por ejemplo, se encuentra distribuido mayoritariamente en la fracción soluble de hígado de rata (Glock y McLean, 1953), riñón de conejo (Newburgh y Cheldelin, 1956), y otros, aunque esté también presente en una pequeña fracción mitocondrial. Este patrón de distribución probablemente difiera porque la enzima exista en diferentes formas, y porque pueda haber otras enzimas que catalicen la deshidrogenación de la glucosa 6-fosfato.

La actividad G6PDH ha sido detectada en prácticamente la totalidad de los tejidos de diferentes especies de peces, mostrando siempre el mayor nivel de actividad en el tejido hepático (Shimeno, 1982; Nagayama et al., 1972; Nicholls et al., 1976). También en riñón de seriola se detectaba actividad (Shimeno, 1982), aunque siempre de menor magnitud a la observada en hígado; en el intestino la actividad era aún menor que la de riñón; en bazo y agallas (Nagayama et al., 1972) la actividad fue intermedia entre intestino y riñón; y apenas se detectaba actividad -a nivel de trazas- en los ciegos pilóricos, corazón y músculo esquelético (Bostrom et al., 1972).

2.2.2 PROPIEDADES Y DISTRIBUCION DE LA 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA.

La 6-fosfogluconato deshidrogenasa [(6PGDH); 6-fosfo-D-gluconato: NADP⁺ 2-oxidorreductasa (descarboxilante), EC 1.1.1.44] es el enzima que cataliza la descarboxilación y deshidrogenación del 6-fosfogluconato. Este enzima juega un importante papel fisiológico en la suplementación de NADPH y pentosas fosfato junto con con la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, en la ruta de las pentosas fosfato. La 6PGDH fue inicialmente descubierta por Warburg et al., (1931), y ha sido estudiada en detalle por varios investigadores (Horecker, 1951; Glock et al., 1953, 1954; Scott et al., 1953).

Presenta una amplia distribución en microorganismos, plantas y animales. Las características enzimáticas de la 6PGDH de hepatopáncreas de carpa son similares a las del enzima de hígado de rata. Su actividad es relativamente alta en tejidos como hígado, riñón, bazo, tejido adiposo, etc., pero es especialmente baja en músculo esquelético y corazón. Los requerimientos en cuanto a pH, cationes y coenzimas son esencialmente 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).

2.2.3 PROPIEDADES Y DISTRIBUCION DEL ENZIMA MALICO Y DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP.

El enzima málico [(EM); L-Malato: NADP⁺ oxidoreductasa, EC 1.1.1.40] cataliza la descarboxilación reversible de malato para formar piruvato, utilizando como coenzima NADP⁺, y en presencia de cationes divalentes como Mn²⁺ o Mg²⁺.

El malato es uno de los componentes centrales del metabolismo intermediario que participa en los procesos bioenergéticos de organismos acuáticos. La ocurrencia de que el enzima esté presente en las células de los tejidos metabólicamente más activos junto con la presencia de tres formas moleculares diferentes del enzima, dos en la mitocondria y una en el citosol, diferentes no sólo en sus propiedades fisico-químicas, sino también en sus afinidades para coenzimas, y en el ratio de descarboxilación del malato vs carboxilación del piruvato, indica el destacado papel de este enzima (Skorkowski, 1988; Hsu, 1982).

Dependiendo de la especie y del tipo de tejido el enzima málico, en peces, puede presentarse en el citosol (enzima málico NADP dependiente), mitocondria (una forma específica para NADP⁺ como coenzima: enzima málico NADP dependiente, y otra forma que puede utilizar ambos coenzimas pero prefiriendo el NAD⁺: enzima málico NAD(P) dependiente), o en ambos compartimentos celulares (Frenkel, 1975).

La mayoría de los enzima málico NADP dependientes generalmente usan Mg²⁺, Ni²⁺, y Co²⁺ además de Mn²⁺ (Parvin et al., 1964; Massarini y Cazzulo, 1975; Milne y Cook, 1975).

Los enzimas aislados a partir de los dos compartimentos subcelulares tienen diferentes propiedades biofísicas y catalíticas. En este sentido, después de su aislamiento y purificación, las formas mitocondrial y citosólica del enzima málico de músculo de crustáceos mostraron diferencias en sus propiedades cinéticas

(Swierczynski et al., 1980a; Biegniewska y Skorkowski, 1983). Además se observó que las formas citosólicas y mitocondrial no sólo en la constante de Michaelis para malato y piruvato, sino también en las velocidades relativas de descarboxilación del malato vs carboxilación del piruvato. Este ratio era decididamente más alto para el enzima málico NADP dependiente de crustáceos y la forma mitocondrial NAD(P) dependiente de peces. Para el enzima málico NADP dependiente tanto citosólico como mitocondrial de peces, el ratio depende sobre todo del pH del medio de incubación. Sobre un rango de pH de 6.5-7.0, la velocidad de carboxilación del piruvato es igual a la velocidad de descarboxilación del malato, sugiriéndose una función anaplerótica para esas formas (Biegniewska y Skorkowski, 1983, 1986, 1987)

Sauer (1973) y Lin y Davis (1974), fueron los primeros en demostrar que mitocondrias aisladas a partir de glándula adrenal y corazón de conejo, presentaban dos formas moleculares diferentes del enzima málico, una, la de peso molecular más bajo, era específica para el NADP^+ como coenzima, mientras la de peso molecular más alto utilizaba ambos coenzima, pero mostraba mucha mayor actividad en presencia de NAD^+ -NAD(P) dependiente-.

Nagel (1980), examinó la distribución de las dos formas mitocondriales en diversos tejidos de rata, así en testículos y pulmones encontró dichas formas moleculares, en cerebro, corazón, riñón, y músculo esquelético sólo encontró la forma NADP dependiente, mientras que intestino, bazo y timo sólo presentaban la forma NAD(P) dependiente, y dado que estos tres últimos tejidos presentan un alto porcentaje de regenerabilidad celular, parece ser que el papel de esta forma enzimática estaría estrechamente relacionado con el metabolismo de células de rápido desarrollo (Moreadith y Lehninger, 1984b).

La Isocitrato deshidrogenasa-NADP [(IDH-NADP); treo-D-isocitrato: NADP^+ oxidoreductasa descarboxilante, EC 1.1.1.42] cataliza la descarboxilación de

isocitrato a α -cetoglutarato, localizándose tanto en la fracción citoplasmática como mitocondrial. La enzima ha sido aislada a partir de diversas fuentes; en animales presenta dos formas moleculares, una es citosólica y predomina en el hígado, la otra es mitocondrial y se encuentra predominantemente en corazón y músculo esquelético (Bell y Baron, 1968). Se ha purificado y caracterizado a partir hígado y corazón de cerdo (Colman, 1968; Illigworth y Tripton, 1970a), hígado riñón y músculo esquelético de trucha arco-iris (Moon y Hochachka, 1971; Bastrop y Jürss, 1987), hígado y corazón de rata (Islam et al., 1972), hígado y corazón de vaca (Cartier y Pantaloni, 1973; MacFralane et al., 1977), músculo y branquias de mejillón (Head y Gabbott, 1980), e hígado de rodaballo (Munilla-Morán y Stark, 1989), entre otros.

En hígado de trucha no se ha encontrado la forma NAD dependiente, siendo muy bajos en músculo esquelético los niveles de la forma NADP dependiente (Moon y Hochachka, 1971, 1972; Newsholme y Start, 1973). En mamíferos, es la forma NAD dependiente la que se muestra activa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, pero en peces parece ser que la forma NADP dependiente es la operativa, incluso tiene una localización predominantemente citosólica (Driedzic y Hochachka, 1978; Head y Gabbott, 1980; Walton y Cowey, 1982; Moon y Hochachka, 1971; Ruiz-Ruano et al., 1985; Munilla-Morán y Stark, 1989). En este sentido, se ha observado en hígado de trucha arco-iris (Walton, 1985), que el ratio de la forma NADP dependiente entre citosol y mitocondria es de 3.8:1, aunque en oposición a la situación encontrada en anguila (Moon y Quellet, 1979) donde el enzima es predominantemente mitocondrial; no obstante, sólo la forma NADP dependiente ha sido detectada en hígado de trucha y anguila (Moon y Hochachka, 1971; Moon y Quellet, 1979). Dado que este enzima tiene una localización preferentemente citosólica, Moon (1972) sugiere que la mayoría de la oxidación del isocitrato ocurre fuera de al mitocondria.

En el hígado de anguila el isocitrato podría ser generado extramitocondrialmente y seguir una de las siguientes rutas: (1) convertirse en el citosol a α -cetoglutarato (donde el NADPH formado se utilizaría en biosíntesis reductoras como la de ácidos grasos) que sería transportado al interior de la mitocondria, o bien (2) ser transportado dentro de la mitocondria y allí deshidrogenarse a α -cetoglutarato por la NADP-isocitrato deshidrogenasa. En este caso, el NADPH podría ser oxidado directamente por la cadena de transporte electrónico o bien serlo por una transhidrogenasa NADPH:NAD. (Moon y Quellet, 1979) apuntan que al ser la actividad de la forma mitocondrial tres veces superior a la de la citosólica (presentando las dos formas idénticos valores de K_m), sería la opción (2) la predominante en la mayoría de las situaciones, de modo que la ruta (1) sería operativa en aquellas situaciones en que existiera una gran demanda de NADPH como aporte en procesos biosintéticos reductores.

La especificidad coenzimática de la isocitrato deshidrogenasa en la mayoría de las especies marinas, es principalmente para el NADP⁺ (Moon y Hochachka, 1971; Head y Gabott, 1980; Ruiz-Ruano et al., 1985), no detectándose actividad cuando se utilizaba NAD⁺ como coenzima y Mn²⁺, Mg²⁺ como cofactor. En hígado de rodaballo (Munilla-Morán y Stark, 1989), la actividad medida en presencia de Mn²⁺ era 1.3 veces mayor a la encontrada en presencia de Mg²⁺, debiéndose este aumento a los altos blancos originados con el manganeso probablemente debido a la presencia de complejos proteína-bilirrubina formados por un mecanismo dependiente de Mn²⁺, por lo que el papel de ión activador se achaca principalmente al Mg²⁺. Además, si el complejo metal-isocitrato es el verdadero substrato del enzima, y teniendo en cuenta que las constantes de afinidad aparentes de cada complejo (Mg-isocitrato y Mn-isocitrato) son diferentes (Carlier y Pantaloni, 1973) -menor para el complejo Mg-isocitrato-, esta diferencia en las afinidades soporta la idea de que el ión Mg²⁺ es más

importante desde el punto de vista fisiológico (Munilla-Morán y Stark, 1989; Head y Gabott, 1980).

2.3 INTEGRACION CELULAR CON OTROS PROCESOS METABOLICOS.

Además de asegurar las funciones energéticas celulares, el metabolismo de la glucosa cuenta con otras aplicaciones indispensables para el correcto funcionamiento celular. El NADPH producido es imprescindible para el mantenimiento de la integridad celular evitando procesos de peroxidación de lípidos, y en las reacciones de oxidación mixta. También existe una estrecha relación con la ruta glucolítica-gluconeogénica al compartir intermediarios comunes. Como consecuencia de esto existe una permanente implicación con gran número de procesos celulares como crecimiento y proliferación celular, estados de estrés oxidativo, e hipertrofia.

La constancia del almacén intracelular de NADPH es sorprendente, teniendo en cuenta que este coenzima es utilizado a alta velocidad para la monoxigenación, reducción del glutatión oxidado (GSSG), y síntesis de ácidos grasos y colesterol (Conway et al., 1983; Junge y Brand, 1975). Además de la regulación de la velocidad del ciclo por parte de mecanismos dietarios y hormonales relacionados con procesos biosintéticos, existe una clara modulación e interdependencia entre un amplio conjunto de procesos oxidativos y el ciclo de las pentosas fosfato que actúa como verdadero suministrador de NADPH utilizado por el sistema glutatión peroxidasa / reductasa y otros sistemas enzimáticos encargados no sólo de contrarrestar el efecto oxidativo de estos procesos sino también de mantener la integridad celular, por ellos ampliamente amenazada. En este sentido, las enfermedades conocidas como distrofias musculares se caracterizan por daños celulares cuyo mecanismo exacto aún no está conocido (Mizuno, 1985). Entre las teorías que lo explican, están las que suponen que la causa

es la alta toxicidad de especies activadas del oxígeno en virtud de sus fuertes propiedades oxidativas (peroxidación de lípidos de membrana, inactivación de enzimas con grupos sulfidrilos, polimerización de proteínas, inhibición de la reparación del ADN, etc.) (Freeman y Crapo, 1982; Halliwell y Gutteridge, 1984); estas especies se producen durante la reducción secuencial de moléculas de oxígeno. Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y glutatión reductasa, son sistemas enzimáticos de detoxificación que protegen a las células de los daños producidos por estos radicales (Fridovich, 1984). Mizuno (1985), encuentra que en estadios tempranos del desarrollo de pollos distróficos existen incrementos en la actividad G6PDH y 6PGDH paralelos a incrementos en niveles de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y glutatión reductasa, interpretándose como un aumento en la capacidad de turnover de radicales de oxígeno en estos animales.

Shichi et al., (1986) estudiando la actividad del ciclo en condiciones de estrés oxidativo (efecto del t-butyl hidroperóxido, TBHP) en el cuerpo ciliar bovino, encuentra una alta capacidad regeneradora del almacén de NADPH por el ciclo de las pentosas fosfato. En línea con esto, los trabajos de Rush y Alberts (1986) demuestran que el NADPH aportado por la ruta puede ser un importante componente de la actividad de los hepatocitos para resistir los daños inducidos por estrés oxidativo generado a partir del TBHP, ya que animales tratados con 6-aminonicotinamida (potente inhibidor de la 6PGDH) fueron más susceptibles de daños celulares inducidos por TBHP que hepatocitos controles. Schuster et al., (1988) siguiendo un modelo matemático predicen que en condiciones de alta carga celular energética y oxidativa, la carga oxidativa máxima que pueden soportar las células sin que se produzcan daños, es mucho menor que en condiciones normales, existiendo una estrecha relación entre rutas energéticas y ciclo de las pentosas fosfato.

Las oxidaciones de función mixta son otro grupo de reacciones que funcionan con NADPH como cofactor; su misión es la de crear grupos hidroxilo en la desintoxicación frente a drogas, o bien introducir dobles enlaces en la formación de ácidos grasos insaturados. Aunque en hepatocitos intactos, algunos estudios han demostrado que el NADPH puede limitar la oxidación de función mixta (Thurman et al., 1977; Moldeus et al., 1974). Junge y Brand (1975), proponen que el aporte de NADPH vía ciclo de las pentosas fosfato excede las necesidades de la oxidasa de función mixta en el metabolismo de drogas. En este mismo sentido, Kauffman et al., (1979) en animales suministrados, observan que los niveles de NADPH citosólico permanecen constantes o ligeramente incrementados de acuerdo con la idea anterior. Belinsky et al., (1985) inhibiendo casi completamente el ciclo de las pentosas fosfato con 6-aminonicotinamida, observan que no se altera la velocidad de oxidación de función mixta, concluyendo que los equivalentes de reducción para esta reacción no son suministrados por este ciclo en estas condiciones, sino por reacciones de transhidrogenación mitocondrial.

3. MECANISMOS DE REGULACION DE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS PRODUCTORES DE NADPH

3.1 REGULACION METABOLICA Y CELULAR.

Aunque pueda existir un control a medio y largo plazo de la actividad de los enzimas que participan en la producción de NADPH, que consiste en variaciones adaptativas de la cantidad de enzima presente, como la encontrada por Tepperman y Tepperman (1958), Fitch et al., (1959a, b; 1960), y Wimberry y Holten (1977), durante la lipogénesis en ratas alimentadas con exceso de carbohidratos, es lógico pensar en

que, debido a las rápidas variaciones que puedan darse en estas enzimas en algunos tejidos (Kastrouni, 1984), exista un control a más corto plazo capaz de producir estos cambios de forma inmediata.

La reacción catalizada por la G6PDH presenta dos características importantes: (1) el producto intermediario es una lactona que rápidamente se hidroliza hasta 6-fosfogluconato, y por lo tanto se esperaría que toda la glucosa 6-fosfato se transformara rápida y completamente a 6-fosfogluconato, a no ser por (2) el fuerte efecto inhibitorio de uno de sus productos, el NADPH, sobre las actividades G6PDH y 6PGDH (Eggleston y Krebs, 1974). Esta inhibición fue descubierta en levaduras por Negelein y Hass (1935), y confirmada en otros medios (Sapag-Hagar, 1973).

La inhibición es competitiva con el NADP, encontrándose completamente inhibida cuando la relación NADPH/NADP presenta un valor superior a ocho (Eggleston y Krebs, 1974). Aunque existen dificultades para medir las concentraciones de ambas coenzimas en el interior de la célula, Veech et al., (1969), calculan que el valor de la relación $[NADPH \text{ libre}]/[NADP \text{ libre}]$ en el interior de la célula es de 100; indicando por tanto la necesidad de mecanismos de desinhibición para que tengan lugar estas reacciones.

Eggleston y Krebs (1974), ensayan alrededor de cien constituyentes celulares, encontrando que sólo el glutatión (GSSG), y el AMP (a concentraciones no fisiológicas) eran capaces de contrarrestar esta inhibición por el NADPH. Según ellos, el efecto del GSSG no era directo, sino mediado por un cofactor dializable de peso molecular menor de 15.000 d. Descartaron que el efecto del GSSG estuviese mediado por la actividad glutatión reductasa, ya que este enzima se encontraba inhibido en las condiciones del ensayo. Un efecto similar del GSSG y del cofactor fue descrito por Rodríguez-Segade et al., (1978) en hepatopáncreas de mejillón, caracterizando este cofactor en homogenados hiposmóticos de hígado de rata y hepatopáncreas de

mejillón, como un polipéptido de rango molecular 10^4 - 1.5×10^5 d (Rodríguez-Segade et al., 1979). Posteriormente, Nogueira et al., (1986) han purificado parcialmente este cofactor en hígado de rata encontrando ser una proteína de peso molecular 10^5 d. El cofactor más ligero previamente descrito fue aparentemente el resultado de actividad proteolítica generada durante el proceso de homogenización.

González y Lagunas (1977), estudiaron también posibles moduladores de estas enzimas. Ninguno de los estudiados tuvo ningún efecto sobre la inhibición de NADPH, y sólo la ribulosa 5-fosfato y la ribosa 5-fosfato fueron inhibidores de la G6PDH. Sin embargo, esta inhibición pareció no tener significado fisiológico, puesto que las concentraciones fisiológicas de estos compuestos eran menores que las constantes de inhibición encontradas.

No obstante, Levy y Christoff (1983) estudian el fenómeno de forma crítica y proponen que los resultados obtenidos en los ensayos anteriores son producto de algunos artefactos experimentales debidos al empleo de iones que interfieren en la medida de la absorbancia, no encontrando evidencias de la existencia de un cofactor o de un efecto directo del GSSG sobre la G6PDH. Sugieren que el GSSG podría actuar indirectamente, vía glutathion reductasa reoxidando el NADPH a NADP. En este sentido, Llobel et al., (1988), demuestran que la regulación *in vitro* por GSSG de la G6PDH está mediada directamente por la reoxidación del NADPH catalizada por glutathion reductasa, no encontrando efecto desinhibidor directo del GSSG, hasta que no se añade glutathion reductasa.

Otra posibilidad es la activación de la G6PDH por parte de una tioltransferasa, molécula de rango próximo al descrito por Eggleston y Krebs (1974), que formaría una mezcla disulfuro entre GSSG y el enzima (Brigelius, 1985).

Fabregat et al., (1985), proponen que la regulación no estaría producida por ningún tipo de efector alostérico, sino que ésta sería debida únicamente a variaciones

en la razón NADPH/NADP. Esta razón es capaz de producir la regulación de los enzimas, ya que las reacciones que catalizan se encuentran fuertemente desplazadas del equilibrio en la dirección de producción de NADPH, causa por la cual esta razón tiende a mantenerse alta en todas las condiciones fisiológicas. Las reacciones que desplazan el equilibrio son la actuación de la lactonasa para la G6PDH y los mecanismos de eliminación del CO₂ en todos los demás casos (6PGDH, EM, IDH-NADP). Esto permitiría además que todos los enzimas productores de NADPH pudieran estar bajo un sistema de control a corto plazo por la razón NADPH/NADP. Esto ha sido demostrado para la fase oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato en hepatocitos (Fabregat et al., 1985), adipocitos (Fabregat et al., 1986), y acinis (Revilla et al., 19886) también de rata.

Otro elemento regulador de estos enzimas, lo constituye la pareja palmitoil CoA/poliaminas (Mita y Yasumasu, 1979). La G6PDH de distintas fuentes es inhibida por derivados acil-CoA de cadena larga, entre los cuales, el palmitoil-CoA parece ser el más activo (Mita y Yasumasu, 1983). Rodríguez-Torres et al., (1987), detectan un inhibidor potente de G6PDH en homogenados de hígado de rata, que posteriormente identifican con el palmitoil-CoA, actuando como un inhibidor competitivo respecto a la G6P, y no competitivo respecto al NADP. *In vitro*, este mecanismo puede ser considerado como una inhibición feed-back negativa de la lipogénesis, teniendo en cuenta la estrecha relación entre ambos procesos.

Rodríguez-Torres y Ramos-Martínez (1987), estudian el efecto de algunas poliaminas (espermina, espermidina, etilendiamina) sobre la inhibición de la G6PDH por el palmitoil-CoA, tanto en ausencia de NADPH como en relación con el cociente NADPH/NADP, encontrando que la espermina probablemente actúa específicamente sobre el palmitoil-CoA desbloqueando su acción inhibidora y dejando esta función para el NADPH.

De otra parte, la G6PDH de levaduras es inhibida por el amonio, mediante un mecanismo competitivo frente a los dos sustratos (Mangiarotti et al., 1965). Estos autores postulan que este efecto puede tener importancia en el control del metabolismo nitrogenado, regulando la cantidad de síntesis de glutamato dependiente de NADPH vía GDH.

Los efectos de nucleótidos de adenina sobre la G6PDH de levaduras fueron encontrados por diversos autores (Bonsignore et al., 1966; Avigad, 1966). Describiéndose dos tipos de efectos del ATP, independientes el uno del otro; por un lado se comporta como un inhibidor competitivo de la G6P, y por otro se observan modelos de inhibición parcialmente competitiva, caracterizada por interacciones cooperativas entre sitios de unión del AMP y el NADP. Teniendo en cuenta que esta inhibición fue confirmada por otros medios (Avigad, 1966; Brand et al., 1970), y que las concentraciones intracelulares de ATP, ADP, y AMP son de la misma magnitud a al de levaduras, se le ha dado a este mecanismo una gran importancia en la regulación de esta ruta. Rudack y Holten (1975), demuestran que al igual que en otros enzimas lipogénicos, tales como la ácido graso sintetasa y enzima málico, el AMP cíclico (AMPC) regula la velocidad de síntesis de la G6PDH, sin alterar la velocidad de degradación del enzima.

La isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente, en peces, parece inhibirse fuertemente por citrato, y nucleótidos de adenina, aunque las investigaciones realizadas sobre los efectos del ATP, ADP, y AMP son en su mayoría contradictorias (Nicholls y Garland, 1969; Gulyi, 1978; Head y Gabbott, 1980; Ruiz.Ruano et al., 1985), siendo el ATP el causante del mayor efecto inhibidor; aunque la aparente inhibición por adenilatos, particularmente por ATP, parece ser debida a procesos de quelación por Mg^{2+} , ya que a altas concentraciones de Mg^{2+} no se han visto efectos negativos de los adenilatos (Moon y Hochachka, 1971). No obstante, la quelación del Mg^{2+} por

nucleótidos y/o citrato, puede ser el sistema que controle la actividad del enzima. Cuando la concentración de ATP y/o citrato es alta (de modo que hay también un alto nivel energético en la célula) esta quelación del catión divalente puede, por tanto, disminuir la actividad de la isocitrato deshidrogenasa. Un mecanismo regulador similar ha sido propuesto para la piruvato deshidrogenasa (Freeland y Briggs, 1977). De otra parte, las altas concentraciones de citrato favorecen la síntesis de lípidos (y cese de la glucólisis), de modo que se desvíe G6P al ciclo de las pentosas fosfato para así generar el NADPH requerido en la biosíntesis lipídica.

La inhibición competitiva del ATP con el malato es característica de varios enzimas málico, especialmente de aquellos asociados a mitocondrias (hígado y corteza adrenal de rata: Sauer, 1973; tumores celulares: Moreadith y Lehninger, 1984; mucosa intestinal canina: Nagel y Sauer, 1982; E. coli enzima málico NAD dependiente: Milne y Cook, 1979; enzimas málico NAD y NADP dependientes de músculo esquelético de arenque: Skorkowski y Storey, 1988, 1990); aunque el ATP ejerce su efecto inhibidor cuando las concentraciones del catión divalente son bajas, al interferir con el sitio de unión del enzima málico (Ptrucci y Cesare, 1990), ya que aumentando las concentraciones del catión divalente se previene la inhibición por ATP (Brodey y Bishop, 1992).

3.2 INFLUENCIA DE DIVERSOS MACRONUTRIENTES DIETARIOS: REGULACION NUTRICIONAL

Uno de los aspectos, desde el punto de vista metabólico, más importantes para todos los organismos vivos lo constituye la adaptación de las diferentes rutas metabólicas que operan en cada tejido al estado nutricional y hormonal que domina en ese momento. El adecuado balance de estas vías metabólicas se consigue por el continuo intercambio de sustratos y productos entre los distintos órganos y tejidos, la actividad de los enzimas que en ellas participan y el supracontrol que sobre ellos ejercen las diferentes hormonas.

El destino de los nutrientes que proceden de la dieta dependerá de la situación metabólica existente; por ejemplo la glucosa se almacena como glucógeno, se oxidará proporcionando energía, o participará en el mantenimiento de la glucosa circulante.

En condiciones de una dieta rica en carbohidratos, se promueve un incremento de las vías de utilización de estos compuestos. Desde un punto de vista metabólico, esto resulta en una mayor disponibilidad de energía, equivalentes reductores y esqueletos de carbono para los procesos biosintéticos celulares. Una vez satisfechos estos requerimientos se observa un aumento en la formación de material de reserva como glucógeno y triacilglicéridos.

Si es una dieta con exceso de proteínas, éstas se utilizarán como sustrato oxidable previa transformación en carbohidratos o grasa. En cambio, una situación de ayuno requiere una capacidad de adaptación que incluye disminución de enzimas digestivas, de los procesos de absorción intestinal, de la transformación, utilización y distribución de nutrientes y la formación de material de reserva. Por el contrario, se incrementan la movilización de grasa, su oxidación, la cetogénesis, gluconeogénesis y el catabolismo protéico. Cuando el ayuno persiste por más tiempo, el organismo se

adaptará gradualmente tratando de satisfacer prioritariamente el requerimiento energético de los tejidos, proporcionando substratos oxidables como glucosa, ácidos grasos y compuestos cetónicos. Terminado este período viene el de la ingesta, en el que se observaría el patrón metabólico opuesto; así observamos que en cada momento celular, la maquinaria metabólica se adapta a la situación por la que atraviesa.

3.2.1 EFECTO DEL NIVEL DE PROTEINA.

Las proteínas son el componente fundamental (65-70 %) del peso de la materia seca de los peces, y la mayor parte se encuentra en el músculo esquelético. La proteína ingerida es hidrolizada en el digestivo hasta aminoácidos, éstos son absorbidos y distribuidos en los diferentes tejidos, donde son utilizados para la síntesis de nuevas estructuras tisulares (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 mamíferos terrestres. Siendo poikilotermos, los peces no necesitan gastar energía para mantener una temperatura constante; además necesitan menos energía para mantener la posición del cuerpo en el agua en comparación con el aire (Cowey, 1980); sin embargo sí consumen energía en los procesos de respiración y osmorregulación, ya que ambos requieren un paso continuo de agua a través de la gran superficie branquial.

La evidencia del uso de las proteínas de la dieta como una fuente importante de energía ha sido ampliamente estudiada (Atherton y Aiken, 1970; Cowey, 1979, 1980). Los peces tiene una alta ingestión de proteína dietaria que es bien ingerida, es decir, muestran una gran eficacia en la utilización de la energía bruta (Nose, 1971; Ogino y Chen, 1973; Pfeffer, 1982). Sin embargo, la utilización neta de proteínas es menor en

los peces (especialmente adultos) que en muchos mamíferos o aves (Rumsey, 1981; Nijkamp et al., 1974). Así pues, se necesita una mayor cantidad de proteína en la dieta, para producir un incremento de peso, en los peces que en otras especies, ya que una gran cantidad de la proteína ingerida no es utilizada con fines de síntesis, sino que es catabolizada rápidamente.

Normalmente, cuanto mayor es la edad y la talla del pez los requerimientos relativos son menores, así, salmónidos jóvenes requieren un 40%, mientras que para los de un año las necesidades bajan a un 35% (Hilton y Slinger, 1981). Balarin y Haller, (1982), en tilapia, concluyen que peces menores de un gramo requieren de un 35-50% de proteína en la dieta, mientras que para peces mayores de 25 g hay que aportar de un 20-25% de proteína.

Numerosos autores han observado en mamíferos herbívoros y omnívoros, que estos pueden adaptar la actividad de los enzimas catabolizantes de aminoácidos a los cambios en los niveles protéicos de la dieta, mientras que los animales carnívoros como el gato, no parecen sufrir cambios en la actividad de estos enzimas, al variar la proporción de proteína dietaria, y que esta falta de adaptación sería la causa de las altas concentraciones protéicas en las dietas de los carnívoros (Rogers et al., 1977; Rogers y Morris, 1980, Rumsey, 1981). Este mecanismo de adaptación se piensa que podría ocurrir en peces, pues mantienen unas tasas de utilización metabólica de los aminoácidos bastante independientes del nivel protéico de la dieta. Esta incapacidad estaría determinada por adaptación evolutiva a un régimen rico en proteína, por lo que utilizarán éstas como fuente de energía, y en consecuencia, mantienen unos niveles desaminativos bastantes altos e independientes del aporte protéico exógeno, lo cual pone de manifiesto el poco control que ejercen estos animales sobre el metabolismo de aminoácidos, con la consiguiente pérdida de nitrógeno, y por tanto, la necesidad de ingerir grandes cantidades de proteína. En línea con esto, Walton (1986), observa que

la trucha muestra una escasa adaptación en las actividades de los enzimas catabolizantes de aminoácidos a variaciones en la ingesta proteica dietaria.

Los efectos principales derivados del incremento de la proteína en la dieta son aumentos en la concentración de aminoácidos corporales, excreción de amonio, síntesis de proteínas, actividad de los enzimas gluconeogénicos, y descenso de la actividad de los enzimas glucolíticos. El efecto sobre la actividad de los enzimas catabolizantes de aminoácidos es mínimo (Cowey y Walton, 1989).

Walton (1986), encuentra que truchas alimentadas con una dieta rica en proteínas, y de bajo contenido en hidratos de carbono (HP/LC) presentan unos niveles altos de aminoácidos en sangre, frente a una baja proporción de glucosa, además de un bajo índice hepatosomático; sin embargo este mismo autor en otros trabajos (Walton et al., 1982, 1984b) observa que en dietas con una alto porcentaje de aminoácidos cristalinizados, aumenta la relación hepatosomática, así como el contenido de glucógeno en hígado, por lo que en sete sentido, parece ser que el metabolismo de un aminoácido puede estar afectado por la forma en que esté presente en la dieta.

Otra consecuencia importante de la administración de una dieta rica en proteínas es el aumento de aminoácidos libres en los tejidos. Esta relación fue estudiada por Nose (1972), y Zebian (1977), quienes efectivamente encontraron una correlación positiva entre los aminoácidos dietarios y la proporción de aminoácidos libres en los tejidos, si bien la proporción de éstos en los tejidos va a depender de la proporción de aminoácidos esenciales y no esenciales que contenga la dieta, de manera que al ingerir niveles de aminoácidos esenciales por encima de las necesidades, aumenta la oxidación de éstos, ya que el exceso será desviado hacia otras vías diferentes a la síntesis de proteína, mientras que si la concentración es baja sí serán utilizados es la síntesis proteica (Wilson et al., 1977; Hardin et al., 1977; Kaushik, 1979).

Cowey et al., (1981), trabajando con dietas en las que varía la cantidad y al calidad de la proteína, observó que cuando ésta es de alto valor biológico se destina fundamentalmente a la síntesis de nuevas estructuras, mientras que una proteína con un alto nivel de aminoácidos gluconeogénicos producirá un aumento en la síntesis de glucosa, y por tanto, en los depósitos de glucógeno hepático. En este sentido, Herzberg y Rogerson, (1981), y Herzberg (1991), observan que variaciones en el patrón de proteínas utilizado afecta a la actividad de determinados sistemas enzimáticos tales como los sistemas productores de NADPH, además de influir en procesos relacionados. Kurowska y Carroll (1990) observan que la calidad de la proteína puede también influenciar el metabolismo del colesterol de varias maneras, y que esto probablemente sea debido a la composición en aminoácidos de la proteína dietaria.

En el caso de que los aminoácidos no hayan sido utilizados en la síntesis proteica, y se empleen como fuente de energía, o como substratos gluconeogénicos, han de ser desaminados originando así un aumento en la excrección de amonio.

No obstante, los efectos que produce el nivel de proteína dietaria sobre las actividades de ciertos enzimas concernientes al metabolismo intermediario y de aminoácidos de peces, están sujetos a controversia, ya que aunque se ha determinado claramente que los niveles hepáticos de enzimas glucolíticos (fosfofructoquinasa, piruvato quinasa, y lactato deshidrogenasa) disminuyen, mientras que los de enzimas gluconeogénicos (PEP-carboxiquinasa, PEPCK, y fructosa bisfosfatasa) aumentan cuando se comparan los efectos producidos por una dieta alta en proteínas y baja en carbohidratos, frente a otra baja en proteínas y alta en carbohidratos (Walton, 1986; Walton y Cowey, 1989), los efectos son de baja magnitud, incluso cuando se producen, generalmente han sido inferior al doble, lo que contrasta ampliamente con la situación de mamíferos omnívoros y herbívoros, donde cambios similares en la proteína

de la dieta causaron modificaciones de más de diez veces en la actividad de los enzimas catabolizantes de varios aminoácidos (Krebs, 1972; Aebi y Berger, 1980).

Esta controversia también alcanza a la actividad de los sistemas productores de NADPH, ya que los datos publicados en la literatura científica hasta la fecha son contradictorios (Abel et al., 1978; Walton, 1986; Shimeno et al., 1981; Hilton y Atkinson, 1982).

Está bien establecido que en vertebrados superiores, la actividad de estas deshidrogenasas citosólicas en varios órganos, cambia ante diferentes condiciones nutricionales y hormonales (Eggleston y Krebs, 1974; Back et al., 1985; Tomlinson et al., 1988; Peragón et al., 1990a, b), así como también en función de las condiciones de vida (McDonald y Johnson, 1965). En este sentido se sabe que las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato se inducen cuando se ven sometidas a condiciones lipogénicas (Hrezberg, 1983; Tepperman y Tepperman, 1985; Baldwin et al., 1966; Back et al., 1985); en general, la presencia de altas concentraciones de carbohidratos y proteínas en la dieta es esencial para la inducción de enzimas lipogénicos (Zakim et al., 1967; Herzberg, 1983, 1991). En mamíferos una dieta hiperproteica conlleva un aumento de la G6PDH (Ono et al., 1963; Peret, 1975; Herzberg y Rogerson, 1981a; Peragón et al., 1990), sin embargo en peces, los efectos de diferentes contenidos de proteína dietaria sobre los sistemas de producción de NADPH son confusos, así, la actividad de esos sistemas disminuye en animales alimentados con una dieta baja en proteínas / alta en carbohidratos cuando se compara con una dieta alta en proteínas / baja en carbohidratos (Abel et al., 1978; Shimeno et al., 1981; Hilton y Atkinson, 1982; Walton, 1986), aunque también se refiere una ausencia de tales efectos (Abel et al., 1978; Walton, 1986; Lupiáñez et al., 1989), mientras que Jürss et al., (1985) encuentran un aumento de estos sistemas enzimáticos al utilizar una dieta con altos niveles de proteína pero con niveles lipídicos muy bajos. No obstante, Iritani et al.,

(1992), observa que existe una dependencia entre el tipo de macronutriente dietario y la inducción de determinados enzimas lipogénicos, concluyendo que las actividades acetil-CoA carboxilasa, enzima málico, y sintetasa de ácidos grasos eran carbohidrato dependientes, mientras que la inducción de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa era proteína dependiente (Katsurada et al., 1987, 1989, 1990a b), ya que la velocidad transcripcional de la G6PDH, la concentración de mRNA y la inducción del enzima requerían más cantidad de la dieta alta en carbohidratos que los demás enzimas lipogénicos para alcanzar el valor máximo.

Quesney-Huneus et al., (1983), y Siperstein (1984), han indicado que durante el crecimiento celular, la síntesis de colesterol no sólo proporciona el colesterol necesario para la membranogénesis sino que también juega un importante y directo papel en la replicación del DNA. Ledda-Columbano et al., (1985) observan que los procesos de proliferación celular están acompañados por un aumento en la síntesis de colesterol y en la actividad del ciclo de las pentosas fosfato, lo que se traduce en una mayor disponibilidad de NADPH, que es usado en procesos reductivos, incluyendo la formación de desoxirribosas, necesarias para sustentar el aumento de la velocidad de crecimiento celular (Ogawa et al., 1980). Por tanto, en aquellas situaciones de reducido crecimiento celular, como es la ingesta de una dieta baja en proteínas, se verán disminuidos en su actividad todos aquellos procesos que utilizan equivalentes de reducción para su actividad. En este sentido, Peragón et al., (1990), observando los efectos de una dieta alta en proteínas sobre la ruta de las pentosas fosfato, concluye que el aumento de la actividad del ciclo puede deberse a que un exceso de proteína dietaria causaría hipertrofia, estimulación del crecimiento celular y síntesis de proteínas (Smith, 1933; Madwig y Abraham, 1970; Didier et al., 1985), para lo que es necesario un aumento en la síntesis de nucleótidos y en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Además, el exceso de aminoácidos que no son derivados hacia la síntesis de proteínas

pueden ser metabolizados a través de acetil-CoA vía fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, piruvato quinasa, y piruvato deshidrogenasa hacia la síntesis de ácidos grasos y colesterol para ser incorporados en el proceso de membranogénesis de las nuevas células (Eggleston y Krebs, 1974; Tomlinson et al., 1988), y finalmente la generación de radicales libres de oxígeno, tales como el peróxido de hidrógeno, como consecuencia de una alta tasa de oxidación aminoacídica, requiere un aumento de la producción de NADPH con objeto de prevenir severos e irreversibles daños celulares.

3.2.2 EFECTO DEL NIVEL DE CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS

La utilización de los hidratos de carbono como fuente de energía en peces, al contrario que en mamíferos, es menos efectiva, ya que son mal utilizados sobre todo en peces carnívoros. Esto es debido por una parte, a que tienden a digerirlos mal, sobre todo si no han tenido un tratamiento que aumente su digestibilidad (Singh y Nose, 1967), y por otra parte los peces regulan mal los niveles de glucosa en sangre (Palmer y Ryman, 1972; Bergot, 1979). La glucosa es oxidada muy lentamente por estos animales (Cowey et al., 1975), y de hecho la oxidación aerobia de la glucosa es considerablemente menor que la de mamíferos terrestres (Lin et al., 1978; Cowey y Sargent, 1979), lo que está relacionado con la incapacidad de la trucha para regular de forma rápida y efectiva los niveles plasmáticos de glucosa (Palmer y Ryman, 1972). Aún así, la glucosa es utilizada, como en mamíferos, como substrato energético de numerosos tejidos tales como sistema nervioso, gónadas o eritrocitos, por lo que la inclusión de hidratos de carbono en la dieta podría sustituir el destino gluconeogénico de los aminoácidos, aportaría energía, y supondría un ahorro de las proteínas.

El metabolismo de la glucosa en peces, tiene lugar principalmente en hígado, y en menor extensión en corazón, bazo, y agallas.

Los lípidos tienen un papel relevante en la alimentación de los peces, especialmente como fuente de ácidos grasos esenciales y de energía. Así, 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., 1977; Beamish y Medlan, 1986). También hay una disminución en la tasa de excreción de amoníaco (García et al., 1981), y del consumo de oxígeno (Cho et al., 1982).

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 mamíferos, la síntesis *de novo* de ácidos grasos está muy marcada por los factores nutricionales que, tanto a corto como a largo plazo, actúan sobre la acetil-CoA carboxilasa, ácido graso sintetasa, y otros enzimas lipogénicos (Wakil et al., 1983). Una dieta rica en hidratos de carbono promueve la glucólisis y lipogénesis, y eleva la relación insulina / glucagon por aumentar los niveles plasmáticos de insulina (Peret et al., 1981). Así, ratas alimentadas con este tipo de dietas presentan altas concentraciones de 6-fosfogluconato y fructosa 2,6-bifosfato hepáticas (Sommercorn et al., 1984) que incrementan la glucólisis. Las dietas ricas en hidratos de carbono y bajas en grasas, mantienen la actividad acetil-CoA carboxilasa, y la lipogénesis en general; principalmente en el tejido hepático, y en menor extensión en el tejido adiposo mesentérico (Likimani y Wilson, 1982; Fynn-Aikins et al., 1992). En este sentido, está bien establecido que las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato aumentan en situaciones claramente lipogénicas (Fritz y Kletzien, 1987; Miksicek y Towle, 1983), manteniendo su actividad con este tipo de dietas (Tepperman y Tepperman, 1958, 1965; Zakim et al., 1967).

En peces, la transformación de glucosa en lípidos, a través de acetil-CoA parece muy reducida (Garin y Demael, 1981; Warman y Bottino, 1978). Sin embargo, Lin et al., (1977b), sí encontraron un aumento en la actividad de los enzimas lipogénicos y productores de NADPH, cuando las truchas han sido alimentadas con una dieta hiperglucídica, y se les cambia a una dieta rica en lípidos. Sin embargo, en salmón coho (Lin et al., 1978) se observó una disminución en el nivel de síntesis de ácidos grasos tras la administración de una dieta rica en carbohidratos, ayuno de dos días, y realimentación con una dieta rica en grasas (52%). También Lin et al., (1977c) encuentran una inhibición de la actividad de los sistemas enzimáticos productores de NADPH al aumentar el contenido graso de la dieta y manteniendo el de proteína; a tenor de estos últimos resultados, los autores sugieren que la lipogénesis es principalmente regulada por el nivel lipídico de la dieta y no por el de carbohidratos, haciéndose patente este efecto sólo cuando los niveles de lípidos son superiores al 10%, lo que explicaría los resultados de Warman y Bottino (1978), al no obtener diferencias en sus ensayos, ya que los niveles lipídicos empleados fueron del 1 y 5%. Esta situación contrasta con la de mamíferos, en los que la lipogénesis es inhibida cuando los niveles de grasa en la dieta son inferiores al 2.5% (Farid et al., 1978). La lipogénesis en mamíferos está gobernada tanto por el tipo como por el nivel de lípidos dietarios (Jeffcoat, et al., 1979), y en particular los PUFA inhiben la lipogénesis hepática más que los ácidos grasos saturados.

En varios estudios se ha tratado de establecer el efecto de una dieta con un elevado nivel de grasa sobre el metabolismo lipídico. Lin et al., (1977a), determinaron la respuesta al nivel graso de la dieta, de las actividades de los enzimas lipogénicos citrato liasa y complejo sintetasa de ácidos grasos en hígado y tejido adiposo de salmón (*O. kisutch*); también determinaron las actividades de los sistemas enzimáticos productores de NADPH, relacionados directamente con la síntesis de ácidos grasos, y

excepto la IDH-NADP, que pareció no afectarse, en las demás se produjo un efecto claramente inhibitorio, especialmente para la ATP-citrato liasa. También el enzima málico ha mostrado una clara disminución en su actividad, ya que actúa como enzima limitante en el ciclo de transhidrogenación del NADH-NADP, en reacción acoplada con el enzima cleavage de citrato, el enzima málico proporciona el NADPH y el acetil-CoA extramitocondrial para la síntesis de ácidos grasos.

Jürss et al., (1984), observaron una reducción de la actividad de todos los enzimas en hígado de trucha, pero al contrario que Lin et al., (1977a), también obtuvo una reducción de la actividad IDH-NADP al aumentar el nivel de lípidos dietarios. Shimeno et al., (1981), obtuvieron resultados similares para la seriola, aunque confirmaban los resultados obtenidos por Lin et al., (1978), para los enzimas lipogénicos.

Así, el efecto más patente a nivel del metabolismo de los hidratos de carbono, tras la administración de una dieta rica en grasas es la disminución de la actividad de los sistemas enzimáticos productores de NADPH, demostrado en mamíferos superiores como la rata (Nace et al., 1979; Herzberg, 1983, 1991; Iritani et al., 1992), y en peces como el salmón coho (Lin et al., 1979), seriola (Shimeno et al., 1981), y trucha arcoiris (Jürss et al., 1984, 1985, 1987, 1992; De la Higuera et al., 1977a)

Por tanto podemos establecer, que situaciones lipogénicas aumentan significativamente la actividad de los sistemas enzimáticos productores de NADPH hepático (Fritz y Kletzien, 1987; Miksicek y Towle, 1983). Así, cuando los animales se ven sometidos a situaciones de ayuno, y después han sido realimentados con una dieta rica en carbohidratos, las actividades G6PDH y 6PGDH hepáticas han aumentado significativamente (Miksicek y Towle, 1982; Clarke et al., 1977). Este comportamiento está directamente relacionado con un aumento en la concentración celular de su mRNA, tanto para las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato (Miksicek y

Towle, 1982, 1983), como para el enzima málico (Hutchison y Holten, 1978; Towle et al., 1980; Magnuson y Nikodem, 1983; Jump et al., 1984). No obstante, situaciones claramente antilipogénicas (como la administración de una dieta alta en grasas o un ayuno prolongado) producen una disminución en las actividades hepáticas de estos sistemas enzimáticos, como consecuencia de una represión en la síntesis de dichos enzimas (Clarke et al., 1977; Nace et al., 1979; Herzberg, 1983). Un aumento de los niveles hepáticos de grasas, causa, en mamíferos, una estimulación de la oxidación de ácidos grasos y gluconeogénesis (Williamson, 1967; Friedmann et al., 1967), con la consiguiente disminución en la generación de NADPH, usado principalmente en la síntesis de ácidos grasos y colesterol (Eggleston y Krebs, 1974; Tomlison et al, 1988). Durante el ayuno, las células hepáticas utilizan los ácidos grasos intracelulares como combustible, reduciéndose la actividad del ciclo de las pentosas fosfato y aumentando la síntesis de glucosa (Williamson, 1967; Friedmann et al., 1967, Hers y Hue, 1983).

En el tejido adiposo, la actividad de estos sistemas enzimáticos parece no afectarse al variar el nivel lipídico de la dieta, aunque se mantiene el almacenamiento de triacilglicerol de origen dietario. Los elevados niveles de grasa en la dieta producen un acúmulo de grasa perivisceral, lo que puede indicar una falta de adaptación por parte de la β -oxidación al exceso de grasa dietaria. De hecho, la carnitina parmitoil-transferasa, considerada como limitante en la β -oxidación mitocondrial (McGarry y Foster, 1980), no se afecta al aumentar la grasa dietaria (Henderson y Sargent, 1981), lo que sugiere que la β -oxidación mitocondrial permanece constante y sólo la β -oxidación peroxisomal aumenta, parece provocada por el desbalance entre ácidos grasos saturados e insaturados, más que por el exceso de grasa dietaria.

3.2.3 INFLUENCIA DE LAS SITUACIONES DE AYUNO Y REALIMENTACION.

En peces, la respuesta al ayuno varía a la descrita para mamíferos. En estos últimos, el ayuno aumenta los niveles de glucagon y disminuye los de insulina plasmática (Cahill et al., 1966; Marliss et al., 1970) provocando proteólisis muscular, y la consiguiente liberación de aminoácidos desde el músculo esquelético; además, se estimula la glucogenolisis y gluconeogénesis hepáticas, inhibiéndose la glucólisis.

El diferente patrón de respuesta que presentan los peces respecto de mamíferos, frente a la situación de ayuno, se debe, en gran medida, a las estrategias adoptadas por los primeros ante períodos en que se ha suprimido la ingesta alimenticia.

Los peces pueden sobrevivir a situaciones ocasionales de ayuno más o menos prolongadas sin ningún tipo de aporte exógeno (Love, 1970, 1980). Los períodos de migración, freza, así como las variaciones en la disponibilidad del alimento originada por cambios estacionales, probablemente juegan un papel importante en la evolución de los correspondientes mecanismos metabólicos (Bastrop et al., 1991). Además, la capacidad de supervivencia en períodos de ayuno está influenciada por la edad y el sexo (Stimpson, 1965; Ottolenghi et al., 1981), temperatura (Woo y Fung, 1981; Bastrop y Jürss, 1987), salinidad (Woo y Murat, 1981), así como por factores ambientales y estacionales (Steffens, 1985). Existen no obstante, evidencias de que su tolerancia a la inanición es debida a procesos de reorganización metabólica, o lo que es lo mismo, de adaptación bioquímica (Hochachka y Somero, 1973) regulada mediante la acción de los sistemas nervioso y endocrino (Murat et al., 1981), en los que las hormonas pancreáticas y tiroideas juegan un importante papel (Murat et al., 1981; Moon et al., 1989; Eales, 1988; Sheridan y Mommsen, 1991). En línea con esto, está bien establecido (Wacke et al., 1989), que los animales controlan su capacidad de adaptación a cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de su alimento

(Peter, 1979), de forma que las velocidades de síntesis y degradación de los sistemas enzimáticos implicados, son controladas tanto por mecanismos neuronales (Peter, 1979), como por mecanismos hormonales (Pitot y Yatvin, 1973; Murat et al., 1981), hasta que se alcanza un nuevo estado estacionario (Schimke, 1973). Durante el proceso de adaptación a la nueva situación, los mecanismos bioquímicos son modificados, en el rango que permita la constitución genética del organismo, de forma que se haga el uso más eficiente posible de la nueva fuente de alimento, de la reducción en la disponibilidad del alimento, o en el caso del ayuno, de las reservas del organismo (Wacke et al., 1989).

En animales endotérmicos, los procesos de adaptación normalmente se llevan a cabo en periodos que oscilan de horas a días (Harper, 1965; Freeland, 1967; Katsurada et al., 1986), pero en peces, organismos ectotérmicos, normalmente son necesarios periodos mucho más prolongados de tiempo antes de que los niveles intracelulares de actividad enzimática alcancen un nuevo estado estacionario (Lin et al., 1977a, b; Shimeno et al., 1981a, b; Morata et al., 1982; Jürss et al. 1985, 1986, 1992).

Los peces han adoptado una diversidad de estrategias como respuesta ante situaciones de ayuno, que oscilan desde las especies que no pueden resistir periodos prolongados de ayuno, y muestran patrones metabólicos semejantes a los de mamíferos ayunados (piraña roja; Bellamy, 1968), hasta aquellas que toleran periodos prolongados de ayuno (seis meses o más), y presentan un patrón metabólico único. Así, determinadas especies (*Carassius auratus* (Stimpson, 1965), *Oncorhynchus mykiss* (Bilinski y Gardner, 1968; Leatherland y Nuti, 1981) y *Gadus morhua* (Kamra, 1966)) preservan sus almacenes de glucógeno mientras metabolizan cantidades significativas de lípidos. Otras especies, incluyendo *Tilapia mossambica* (Swallow y Fleming, 1969), y *Notopterus notopterus* (Narasimhan y Sundararaj, 1971), conservan parcialmente sus almacenes de glucógeno, mientras metabolizan cantidades

significativas de proteína. *Esox lucius* (Ince y Thorpe, 1976), y *Ophiocephalus maculatus* (Woo y Cheung, 1980), parecen conservar la proteína y los lípidos mientras utilizan parcialmente el glucógeno almacenado. Unas pocas especies, incluyendo *Protopterus annectans* (Janusens, 1964), *Notothenia coriiceps* (Crawford, 1979), *Cryosphrys major* (Woo y Murat, 1981; Woo y Fung, 1981), *Anguilla anguilla* (Larson y Lewander, 1973), y *A. rostrata* (Butler, 1968; Moon, 1983), parecen conservar sus almacenes de glucógeno mientras metabolizan lípidos y/o proteínas. En definitiva, las estrategias que siguen los peces ante períodos de ayuno respecto a la utilización de los carbohidratos, se pueden dividir en tres categorías: (1) el ayuno rápido induce deplección del glucógeno, de manera similar a lo observado en mamíferos (Cahill et al. 1966); (2) protección parcial de las reservas de glucógeno (50-60% de pérdida); y (3) completa protección de las reservas durante algún tiempo (1-6 meses). En el caso de que el organismo proteja los depósitos de glucógeno parcialmente, parece ser que las demandas energéticas son satisfechas mediante una importante movilización de lípidos (Sheridan y Mommsen, 1991), tal es el caso del salmón (Sheridan y Mommsen, 1991), y trucha arco-iris (Bilinski y Gardner, 1968; Leatherland y Nuti, 1981), en los que se observa hiperlipidemia al cabo de tres semanas de ayuno. En este sentido, se ha observado (Hilton, 1982; Shimeno, 1982; Morata, 1982) en trucha arco-iris, que un ayuno de una semana es suficiente para que se reduzca significativamente el peso del hígado, sin que el número de células del hígado disminuya (Jürss et al., 1986), por lo que la reducción de peso sufrida por el hígado sea debida probablemente a la movilización tanto de glucógeno (Black et al., 1966), como de lípidos (Jeziarska et al., 1982).

También las proteínas junto con los lípidos, son usadas por varias especies de peces que conservan parcialmente el glucógeno hepático en respuesta al ayuno, con

objeto de satisfacer la demanda energética del organismo (Woo y Cheung, 1980; Woo y Fung, 1981).

Cuando los mamíferos son sometidos a condiciones de ayuno, la velocidad de lipogénesis *de novo* disminuye, debido a la caída en la cantidad de substratos disponibles para conversión en ácidos grasos, encontrándose una disminución significativa tanto en las actividades de los sistemas enzimáticos productores de NADPH como en la ácido graso sintetasa (Wakil et al., 1983). En línea con esto, se ha observado en peces, una disminución de los mecanismos implicados en el proceso de lipogénesis, encontrándose en salmón un aumento de la triacilglicerol lipasa (Sheridan y Mommsen, 1991), implicada en la lipólisis hepática, junto a una disminución de los sistemas enzimáticos productores de NADPH hepáticos.

Dado que el hígado de trucha arco-iris, es el sitio principal de síntesis de ácidos grasos (Lin et al., 1977; Henderson y Sargent, 1981), se podría esperar una rápida bajada de los enzimas implicados en la lipogénesis tras la implantación de la situación de ayuno, ya que incluso en anguila, los niveles de síntesis lipídica disminuyen unas seis veces durante la primera semana de ayuno. No obstante, Wacke et al., (1989), encuentran que los niveles de actividad de los sistemas enzimáticos productores de NADPH no alcanzan un nuevo estado estacionario hasta el día treinta y uno de ayuno, aunque el efecto producido por esta situación lipolítica en la IDH-NADP se revertía a temperatura ambiente (Bastrop y Jürss, 1987), concluyendo que este enzima potencialmente lipogénico en hígado de trucha arco-iris, no presenta una relación tan estrecha con el proceso lipogénico como la de los demás sistemas enzimáticos productores de NADPH. Bastrop et al., (1991), observan en hígado de carpa, un aumento de las actividades G6PDH, 6PGDH, IDH-NADP, y EM, de 4.1, 3.1, 1.9, y 1.6 veces en animales alimentados respecto de los ayunados.

Wacke et al.,(1989), atribuyen la baja capacidad de adaptación de los sistemas enzimáticos productores de NADPH a la situación de ayuno, al régimen alimenticio al que habían estado sometidos los animales antes del comienzo del período de ayuno (una dieta con alto porcentaje en grasas), concluyendo por tanto, que la situación de ayuno no induce una rápida disminución en las actividades de los enzimas implicados en la lipogénesis si el nivel de esos enzimas en el hígado era inicialmente bajo debido al régimen previo de alimentación. Este análisis, explicaría en parte, la controversia existente en la literatura científica respecto al comportamiento de estos sistemas enzimático ante una situación claramente lipolítica como es el ayuno. Así, Nagayama et al. (1972), observa un aumento de siete veces en la actividad de la G6PDH durante un ayuno de treinta días. Buhler y Benville (1969), no encuentran reducción de la actividad G6PDH en el hígado de trucha arco-iris incluso después de ocho semanas de ayuno. Yamauchi et al. (1975), también en hígado de trucha arco-iris, sí observa una reducción significativa de las actividades G6PDH y 6PGDH, resultados que coinciden con los publicados por Moon et al. (1989), para trucha arco-iris durante un ayuno de seis semanas. Tranulis et al. (1991), en trucha arco-iris encuentra una disminución de la actividad G6PDH hepática en un 23% tras un ayuno de veinticinco días, a 12°C. Lin et al. (1977a, b) encuentra que las actividades G6PDH y 6PGDH en salmón coho sólo alcanzan un nuevo estado estacionario tras veintitrés días después del cambio en el régimen alimenticio. En carpa y yellowtail, esos enzimas alcanzan un nuevo equilibrio transcurridas cuatro semanas (Shimeno et al., 1981a, b). En *Chrysophrys major*, la actividad G6PDH no se reduce a los cincuenta y cinco días de ayuno a 13°C, y sólo después de transcurridos noventa y dos días de ayuno, se reduce a la mitad de los niveles iniciales (Woo y Fung, 1981). La variación de la actividad G6PDH hepática en anguila es similar a la de *Chrysophrys major* (Aster y Moon, 1981; Abraham et al., 1984). Así pues, Wacke et al. (1989), a raíz de los resultados establecidos a través de

la literatura científica, y de los suyos propios, concluye que los peces teleósteos, como la trucha arco-iris, que están adaptados genéticamente ante situaciones temporales de deficiencia alimentaria, tienden a guardar relativamente altos y estables los niveles de sus actividades enzimáticas.

De otra parte, está bien establecido, que las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, poseen una notable capacidad de fluctuación en su actividad como respuesta a cambios en su patrón de alimentación (Weber y McDonald, 1961; Niemeyer et al., 1982; McDonald y Johnson, 1965).

Como ya se ha mencionado, el ayuno disminuye el nivel de actividad enzimática, especialmente de la G6PDH, mientras que durante la realimentación en diferentes especies de teleósteos, hay un marcado incremento en la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, apreciándose en algunas especies el fenómeno de overshoot típico de mamíferos (Yamauchi et al., 1975; Shimeno, 1982); este comportamiento es similar al observado en mamíferos, como la rata. Se ha estudiado el efecto de la transición ayuno-realimentación sobre las actividades del enzima málico, y las deshidrogenasas del shunt de las hexosas monofosfato en tejidos lipogénicos y no lipogénicos (Zelewski y Swierczynski, 1989). Estos autores encuentran que la situación de ayuno provocaba una disminución de las actividades estudiadas en hígado y tejido adiposo blanco y marrón, mientras que la realimentación con una dieta alta en carbohidratos aumentó varias veces las actividades enzima málico, G6PDH y 6PGDH en esos mismos tejidos. En cambio, la implantación de la situación de realimentación no ejerció ningún efecto significativo sobre las actividades de estos enzimas en tejidos no lipogénicos tales como corteza renal, cerebro, corazón músculo esquelético y bazo.

OBJETO Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO

Existe una estrecha relación entre los procesos metabólicos encargados de la producción celular de equivalentes de reducción en forma de NADPH, y los fenómenos de crecimiento celular. Es por tanto indudable, que el conocimiento lo más profundo posible de los factores que alteren a estos sistemas de producción de NADPH ayudará a comprender mejor los elementos que caracterizan al fenómeno de crecimiento, consiguiéndose a medio plazo mejores condiciones de la producción animal, y por tanto en la rentabilidad comercial.

Por todo ello, el objetivo fundamental de esta memoria es el de alcanzar un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares, así como de las características reguladoras que presentan los diferentes sistemas celulares productores de NADPH en la mayor parte, y más significativas condiciones en las que se encuentra implicado, el fenómeno de crecimiento celular.

Junto a este planteamiento general, que constituye la finalidad principal de la memoria, se estudian una serie de objetivos parciales que intentarán cubrir de forma progresiva y completa el principal objetivo de este trabajo, pudiendo llegar a establecer el mayor número de conclusiones prácticas de aplicabilidad más o menos inmediata.

Entre estos objetivos parciales, merece destacar en primer lugar el correspondiente al estudio del comportamiento cinético de los sistemas de producción de NADPH bajo diferentes estados nutricionales. Es bien conocido que la dieta de la trucha, en condiciones naturales y de piscifactoría, se compone mayoritariamente por proteína. Sin embargo, sólo un tercio de la misma es utilizado para su crecimiento, mientras que el resto se desvía hacia la producción de energía y glucosa. Este hecho implica un considerable derroche de proteína. Se sabe que este macronutriente constituye una fuente alimenticia de alto precio, y por tanto es obvio que la sustitución del destino energético y gluconeogénico de los componentes aminoácidos hacia otras

fuentes de menor costo, tales como carbohidratos y grasas aportaría un beneficio económico inmediato. Teniendo esto en cuenta, pretendemos estudiar seis condiciones nutricionales diferentes, bajo las cuales el conocimiento del comportamiento de los sistemas enzimáticos glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), enzima málico (EM), e isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP (IDH-NADP), de ocho diferentes tejidos de la trucha, podrá aprovecharse para conseguir una situación óptima, tanto desde el punto de vista nutricional como económico, en relación con el tipo y cantidad de macronutrientes y el crecimiento correspondiente.

De otra parte, se llevarán a cabo los estudios necesarios para conocer el comportamiento de los diferentes sistemas de producción celular de NADPH durante el desarrollo del pez. Anteriormente se habían puesto de manifiesto modificaciones en algunos parámetros del metabolismo hepático y muscular de la trucha, encontrándose un aumento significativo de la síntesis de lípidos tanto en hígado como en músculo durante los primeros 10-12 meses de desarrollo. Por otra parte, en mamíferos se ha descrito una disminución significativa con la edad, de las actividades de diferentes enzimas lipogénicos hepáticos, las cuales estaban asociadas con una disminución de los niveles plasmáticos de insulina y T_3 . Teniendo en cuenta éstos y otros antecedentes, la realización de este objetivo se llevará a cabo escogiendo animales de diferentes pesos que reflejen distintos estadios de la fase juvenil y finalmente la fase adulta de la trucha, en la cual, la mayor parte de la energía utilizada por el animal no lo será con fines de crecimiento. Se estudiará el comportamiento de los sistemas de producción de NADPH en cada una de estas etapas, así como en combinación con algunas de las condiciones nutricionales del objetivo anterior. Pensamos que el conocimiento de este apartado será muy útil para relacionar la capacidad que en cada momento del

desarrollo presenta el animal ante determinadas condiciones nutricionales, y por consiguiente con su tipo de alimentación.

MATERIAL Y METODOS

1. ESPECIE ENSAYADA.

La especie utilizada en esta investigación ha sido la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), con un rango de pesos en los ensayos que osciló entre 8.5g y 430g, y procedente de una piscifactoría local (Ríofrío, Granada).

2. MATERIAL UTILIZADO EN LAS DISTINTAS TECNICAS EXPERIMENTALES.

Las pesadas se realizaron en balanzas Mettler AJ 50 (p. máximo = 500 g \pm 0.0001 g), Cobos C-300 (p. máximo = 300 g \pm 0.01 g), y Cobos D-600 (p. máximo = 600 g \pm 0.1 g)

La homogenización tisular se llevó a cabo en un aparato tipo "Potter" mecánico (MSE) provisto de un pistilo recubierto de teflón en tubo de vidrio.

La agitación de los tubos se llevó a cabo mediante un agitador Reax 2000 de la firma Heidolph.

Las determinaciones de pH se realizaron en un pehachímetro Micro pH 2000 de la firma Crimsom.

Las centrifugaciones se realizaron en las centrifugas Beckman J21B, y ultracentrífuga Beckman L8-70M.

La adición de muestras, substratos, y otra serie de reactivos, se realizó con micropipetas Gilson Pipetman de 5000, 1000, 200, 100, 25, 10 μ l, junto con pipetas Afora de 10, 5, y 2 ml.

En la técnica del congelado instantáneo se utilizó un vaso Dewar de 25 l. para contener el nitrógeno líquido. Pinzas de aluminio diseñadas al efecto. Vaso cilíndrico de 10 l. de capacidad para contener el nitrógeno líquido de uso inmediato en el

enfriamiento de las pinzas. Vaso termo de 1.5 l. de capacidad para las adiciones frecuentes de nitrógeno líquido a los morteros de porcelana con pistilos del mismo material.

Las incubaciones realizadas en la determinación de glucógeno tisular se realizaron en un aparato Gallenkamp IH-350, termostatzado y con ajustación variable.

Las determinaciones espectrofotométricas a 340 nm se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-70, con lectura digitalizada y compartimento termostatzado. Para estas medidas se utilizaron cubetas semi-micro de polistireno de 1 cm de espesor y 1ml de volumen.

En la determinación de las proteínas de las dietas se utilizó un mineralizador-digestor Bûchi (mod. 430); en la determinación de las grasas se utilizó un aparato Bûchi de extracción Soxhlet (mod. B-810).

3. PRODUCTOS

Los substratos y coenzimas utilizados fueron suministrados por la firma Bôehringer (Mannheim, Alemania).

Otros reactivos, incluyendo los enzimas purificados, se obtuvieron de la firma Sigma Chemical Co. (USA).

El resto de los reactivos, empleados en la preparación de diversas soluciones, provenía de las casas Panreac, Probus, y Merck (Alemania).

Los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas, como la harina de pescado, aceite de pescado, almidón, celulosa y otros, fueron suministrados por las firmas Musal y Trofic, mientras que los productos necesarios para fabricar los correctores vitamínico y mineral pertenecían a las casas Roche y Merck

4. ANIMALES Y MANTENIMIENTO.

Los animales utilizados en cada ensayo, fueron seleccionados individualmente en la piscifactoría en función del peso, dada la buena correlación existente entre este parámetro y el tamaño del animal. Antes de su recogida, permanecieron sin ingerir alimento el día anterior al traslado; éste se realizó en tanques fabricados en fibra de vidrio, previamente sometidos a un protocolo de desinfección, con una capacidad de 360 l. y con suministro continuo de oxígeno a niveles de saturación. El tiempo empleado en este período, no fue nunca superior a dos horas. Una vez en el laboratorio, los peces se distribuyeron en lotes de 40 - 50 animales en cubas de polietileno (HDP) de 160 l. de capacidad útil, y previamente sometidas a un protocolo de desinfección. El agua de suministro a los tanques, dentro de un sistema de circuito abierto, procedía de la red municipal, y era tratada previamente haciéndola pasar a través de un filtro compuesto de arena de sílice para filtración y carbón activo para decoloración/desodoración del agua; este agua se suministró a cada tanque con un flujo de 1.5 l./min, permitiendo así una renovación continuada al objeto de mantener unas condiciones adecuadas de oxigenación, temperatura, y limpieza, al mismo tiempo que se impidió la acumulación de desechos y sustancias tóxicas, especialmente amoníaco. No obstante, los tanques se sometieron periódicamente a una limpieza de fondo y laterales para evitar para evitar depósitos de residuos y crecimientos algales y de microorganismos.

La oxigenación de los tanques, a niveles de saturación (8-9% de O₂), se realizó mediante difusores conectados a un soplante de aire (Siemens) y provistos de una llave que permitía regular el volumen de salida. La temperatura del agua se mantuvo a 15 ± 1.5°C durante todo el período experimental gracias a un termostato introducido en el agua de los tanques y conectado a un sistema automático de calefacción y refrigeración

del agua. Las instalaciones fueron iluminadas durante 12 horas diarias, a partir de las 8 a. m., mediante un temporizador conectado al sistema de iluminación.

Los animales se mantuvieron durante 24 h en ayuno antes de proceder a su pesada inicial al objeto de homogeneizar los pesos al comienzo de cada ensayo, para ello, los peces fueron pesados individualmente (previa anestesia con MS-222 -tricaina metano sulfonato-, 1:20000 en agua), en seco, en una balanza monoplato y distribuidos en lotes homogéneos, con una carga máxima de 1.5 Kg por tanque. En algunos ensayos, los animales, durante el período de adaptación, manifestaron síntomas de enfermedad, por lo que fueron sometidos a tratamiento profiláctico por inmersión en sulfato de cobre durante 20 sg; en estos casos, se mantuvo el período de adaptación hasta la total recuperación del animal, en caso contrario se procedía a su desecho. A cada lote le fue asignada al azar una situación experimental.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Al objeto de estudiar la influencia de diferentes condiciones nutricionales y estadios del desarrollo sobre la relación entre la producción celular de equivalentes de reducción, NADPH, y el crecimiento celular, se llevaron a cabo una serie de condiciones experimentales que se detallan a continuación:

A) Estudio del comportamiento cinético de los diferentes sistemas de producción de NADPH de la trucha durante su desarrollo.

Para el estudio de este objetivo se llevaron a cabo una serie de ensayos para los cuales se utilizaron truchas pertenecientes a siete estadios diferentes del desarrollo, seis relacionados con la edad juvenil, y uno con la edad adulta, y que corresponden aproximadamente a edades cuyo peso sea de 8-10 g; 30-35 g; 50-55 g; 75-80 g; 100-110 g; 170-180 g, para la edad juvenil, y alrededor de 450 g para la edad adulta. Las

truchas permanecieron durante una semana de aclimatación con una dieta estándar de piscifactoría, y al final de ese tiempo, se analizaron las características cinéticas de los cuatro sistemas enzimáticos de producción de NADPH en los diferentes tejidos seleccionados.

B) Influencia de diferentes condiciones nutricionales sobre el comportamiento cinético de los sistemas productores de NADPH en la trucha.

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron truchas con un peso medio inicial de 120 g, que divididas en siete lotes diferentes fueron sometidas a otras tantas situaciones nutricionales específicas durante un período de tiempo de un mes, y tras un periodo de adaptación de una semana. Durante el periodo de experimentación las diferentes dietas fueron suministradas de forma controlada en un porcentaje del 2% del peso del animal.

Estas situaciones nutricionales (Tabla 1) corresponden a la administración de una dieta control (A), una dieta baja en proteínas (B), una dieta baja en grasas (C), y una dieta exenta de carbohidratos (D). Bajo todas y cada una de estas condiciones se analizó, el comportamiento cinético completo de los cuatro sistemas enzimáticos encargados de la producción celular de NADPH en los diferentes tejidos seleccionados.

Los resultados obtenidos fueron comparados, tanto entre sí como entre cada uno de ellos y los correspondientes a la dieta control.

C) Comportamiento cinético de los sistemas productores de NADPH de la trucha durante el ayuno y la realimentación y la influencia combinada del desarrollo y estas condiciones nutricionales.

Se utilizaron el ayuno y la realimentación como condiciones nutricionales especiales. Las condiciones experimentales en este caso varían de las expuestas anteriormente, ya que se utilizaron truchas con tres tipos de pesos diferentes. 30-35 g,

100-110 g, 175-185 g. A estos animales, y tras un período de adaptación de una semana se les retiró la comida, permaneciendo en esta situación hasta que se produjeron modificaciones significativas en el comportamiento cinético de los sistemas enzimáticos estudiados. En el caso de la realimentación, las truchas estuvieron sometidas a las mismas condiciones de ayuno, y posteriormente se les administró, en un porcentaje del 2% del peso del animal, la dieta baja en grasas utilizada en el experimento anterior, determinando a distintos períodos de tiempo el comportamiento de los sistemas enzimáticos productores de NADPH.

6. ELABORACION DE LAS DIETAS.

Las dietas experimentales fueron íntegramente preparadas en nuestro laboratorio en base a criterios generales de formulación.

Para la fabricación de las fórmulas, y una vez pesados todos los componentes, se mezclaron en una mezcladora comercial hasta homogeneidad, posteriormente se pasaron varias veces, a través de un tamiz provisto de una malla con una luz de de 100 μm . Seguidamente, a la mezcla así obtenida se le adicionó la cantidad de agua necesaria hasta obtener una pasta de consistencia adecuada que se granuló haciéndola pasar por matrices con orificios de distinto diámetro. Una vez obtenidos los gránulos, se secaron sobre hojas de papel de filtro hasta reducir su humedad a un 10 %. Finalmente fueron distribuidas en bolsas opacas que contenían aproximadamente raciones de una semana, en cámara fría a 4°C.

7. CONTROL DE INGESTA Y PESO

Para cada ensayo, y tras un período de adaptación de 7 días, a las condiciones de laboratorio se hicieron controles de peso los días 0, 15, y 30 de cada experimento tomando muestras representativas de la población.

La ingesta se controló diariamente suministrando un 2 % del peso del animal en dos veces (9 a.m. y 4.30 p.m.), siendo actualizado diariamente en función de la ganancia de peso esperada, y del consumo realizado de ese 2 %, ya que la dieta se suministraba paulatinamente y hasta que el animal dejaba de ingerirla, anotando en este caso la cantidad de dieta ingerida; si por el contrario, los animales la consumían en su totalidad, se incrementaba el porcentaje de actualización de la ración.

8. INDICES BIOLOGICOS UTILIZADOS.

El índice hepato-somático (RHS), se considera como la relación existente entre el peso del hígado y el peso corporal total, y valora el estado fisiológico y de salud del pez , ya que alteraciones de los valores normales pueden ser indicativos de alguna variación en la alimentación normal, que ha determinado un incremento en la glucogenia hepática o en la infiltración grasa .Este índice viene definido por la expresión:

$$\text{R.H.S.} = \frac{\text{Peso hígado (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \times 100$$

Además del índice hepato-somático, también se determinaron las relaciones somáticas de tejidos como el riñón, músculo esquelético, intestino, corazón (ventrículo), bazo, y agallas, con una expresión similar a la descrita para el R.H.S.

Tabla 1. Composición general de las dietas experimentales utilizadas en las diferentes condiciones nutricionales (g/Kg).

DIETAS	A	B	C	D
	(40/18/23)	(20/18/23)	(40/8/23)	(40/18/0)
Harina de pescado	508.7	254.3	508.7	508.7
Proteínas solubles	47.8	23.9	47.8	47.8
Aceite de pescado	54.2	72.1	4.2	54.2
Aceite de maíz	90.0	90.0	40.0	90.0
Almidón cocido	230.0	230.0	230.0	-----
Suplemento vitamínico	20.0	20.0	20.0	20.0
Suplemento mineral	50.0	50.0	50.0	50.0
Carboximetilcelulosa	-----	-----	-----	20.0
α -Celulosa	-----	259.7	99.3	209.3
Composición aproximada				
(% materia seca)				
Proteínas	40.0	20.0	40.0	40.0
Lípidos	18.0	18.0	8.0	18.0
Carbohidratos digestibles	23.0	23.0	23.0	-----
Energía bruta (KJ/g)	18.91	14.99	14.96	14.95

La harina de pescado estaba compuesta de 6.53 % de grasa, 70.77 % de proteína, y 8.72 % de agua. Las proteínas solubles estaban compuestas de 5.36 % de grasa, 83.55 % de proteína, y 9.65 % de agua. Se asumió que el valor energético de la proteína, lípidos, y carbohidratos fue de 19.6, 39.5, y 17.2 KJ/g respectivamente. El suplemento mineral contenía (g/800 g de 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. El suplemento vitamínico contenía (g/300 g): 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 0.00112, vitamina E 3.75, vitamina K 0.375, y sacarosa hasta 300 g de mezcla.

9. METODOS ANALITICOS

9.1. DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE LAS DIETAS.

Humedad: En estufa de desecación a $105 \pm 0.5^\circ\text{C}$, hasta que el peso se mantuvo constante.

Cenizas: Se obtuvieron incinerando la muestra en un horno mufla a 500°C hasta peso constante.

Proteínas (nitrógeno): Se determinaron por el método Kjeldahl. La mineralización de la muestra se hizo en sulfúrico utilizando un mineralizador - digestor Büchi, y como catalizador una mezcla de sulfato potásico, sulfato cúprico

pentahidratado, y selenio metálico (100:6:1). La muestra se destiló con NaOH al 30 % recogién dose el nitrógeno en un matraz, hasta un volumen total de 150 ml, habiéndose incorporado previamente 40 ml de indicador Bûchi preparado a partir de una solución madre mezcla de dos, la primera formada por rojo de metilo en alcohol al 0.1 %, y la segunda compuesta por verde bromocresol disuelto en alcohol y agua destilada (50/50) al 0.2 %. El destilado obtenido se valoró con CIH 0.5 N, hasta que viró el color al tono inicial. Se empleó el factor 6.25 para la conversión de nitrógeno en proteína.

Grasa: Se determinó mediante extracción continua con eter etílico por el método Soxhlet.

9.2. TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LA DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

Las determinaciones de la actividad de los cuatro sistemas enzimáticos productores de NADPH se realizaron en los extractos citosólicos de ocho tejidos distintos de trucha arco-iris (hígado, riñón, músculo esquelético, intestino, tejido adiposo, corazón, bazo, y agallas).

Para la obtención de estos extractos, los peces fueron sacrificados, a ls 9 a.m., en la realización de todos los ensayos, mediante un golpe seco en la base del cráneo. Rápidamente se procedió a la extracción de los órganos, para ello se practicó una incisión longitudinal en el abdomen, abriendo después una ventana que sube por el ano, hacia la línea lateral, orientándose después paralelamente a esta última dirección a la cabeza, y abriendo a continuación la ventana a la altura de los pectorales. Seguidamente se extrajo la masa visceral y se procedió a la extirpación de los órganos y tejidos utilizados. En primer lugar se extirpó el hígado ligando la vesícula biliar al objeto de impedir el vertido de su contenido, después el tejido adiposo perivisceral e

intestino, teniendo atención en eliminar en este último la tira de tejido adiposo que lo rodea, así como de vaciarlo de contenido fecal, pero sin eliminar el mucus de su interior; seguidamente se extraían bazo, riñón y corazón, desechándose en este último el vulvo aórtico y el atrio y conservando el ventrículo, por lo que, aunque se haga referencia al corazón a lo largo de este trabajo, en realidad el tejido utilizado es el ventrículo; posteriormente se extraía una tira de músculo esquelético justo 1 cm por delante de la aleta dorsal; a continuación se extirpaban las agallas, concretamente los filamentos branquiales ya que se desechaba el arco branquial.

Inmediatamente después, se colocaron en solución salina al 0.9 %, y a 4°C. A continuación se procedió a la homogenización en frío de los tejidos en tampón isotónico de pH 7.6 (Tris-ClH 100 mM; sacarosa 250 mM; EDTA 1mM; NADP 0.1 mM; PMSF 0.57 mM) en las siguientes proporciones (p/v): hígado, riñón, y bazo (1/10), intestino, agallas, músculo esquelético y cardíaco (1/5), y tejido adiposo (1/2).

Los homogenados fueron centrifugados a 105.000xg a 4°C durante 60 minutos, previamente el homogenado de tejido adiposo había sido centrifugado a baja velocidad (8.000xg durante 15 minutos a 4°C) para eliminar el contenido en grasa. Las fracciones del sobrenadante, correspondientes al extracto de citosol, obtenidas de la centrifugación a alta velocidad fueron utilizadas en la determinación de las actividades enzimáticas. Estas fueron medidas, tras realizar el protocolo descrito, el mismo día de la toma de muestras de tejidos y órganos.

9.3 TRATAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DE INTERMEDIARIOS METABOLICOS.

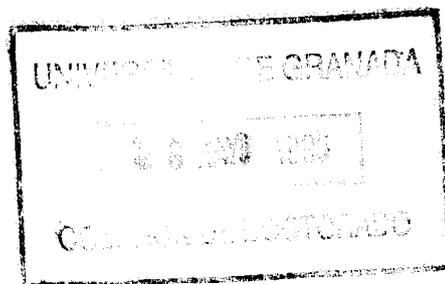
Para que las concentraciones de los metabolitos sean lo más aproximadas al valor que tienen *in vivo*, y evitar que haya cambios en los momentos inmediatamente

después de la muerte se utilizó la técnica del "congelado instantáneo" (Wollemberg et al., 1967; Williamson et al., 1967). En el "congelado instantáneo", el animal se sacrifica mediante un golpe seco en la base del cráneo, inmediatamente se practica una incisión abdominal de diferente recorrido, en función del órgano en cuestión, y se procede a su extracción, comprimiéndose entre dos placas de aluminio enfriadas en nitrógeno líquido, pasándose rápidamente a morteros con nitrógeno líquido. Se considera que el tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la congelación no debe superar los ocho segundos.

Los órganos congelados se pulverizan bien, añadiendo cada cierto tiempo nitrógeno líquido al mortero para que todo el proceso se mantenga a la temperatura del nitrógeno líquido. A continuación, el polvo al que ha quedado reducido el órgano se pesa por diferencia en un tubo de centrifuga y se le añade ClO_4H al 2 % en proporción 1/5 (p/v), e inmediatamente se homogeniza en un dispositivo Potter-Elvehjem manual con pistilo de vidrio.

Para separar el precipitado protéico de los homogenados se centrifuga a 30.000xg a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante es decantado y se neutraliza en

frío con KOH al 20 %, hasta pH 3.5 visualizado con el indicador interno naranja de metilo. Se vuelve a centrifugar para eliminar el precipitado de ClO_4K formado. El sobrenadante se emplea en la determinación de metabolitos. Se conserva congelado y no se debe congelar-descongelar más de una vez.

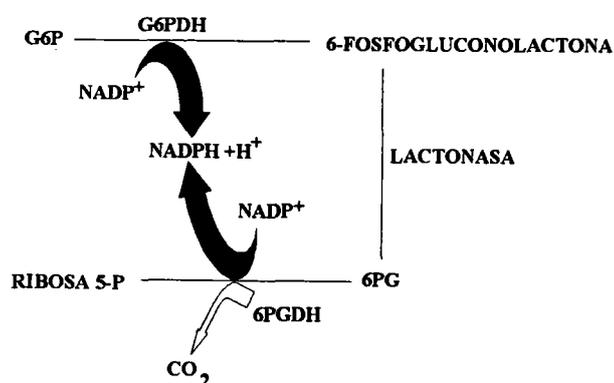


9.4. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

9.4.1. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA Y 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA.

Fundamento.

La determinación de las actividades G6PDH y 6PGDH está basada en la medida espectrofotométrica a 340 nm, de la aparición del NADPH producido en la siguiente secuencia de reacciones:



Ambos enzimas se encuentran acoplados en un sistema de reacciones, por lo que la medida de NADPH es el resultado de la actividad de ambos enzimas.

Reactivos.

- Tampón HEPES 76.92 mM, pH 7,6.
- MgCl₂ 3.07 mM.
- NADP 8.0 mM (solución extemporánea).
- G6P o 6PG, en concentraciones variables.

Técnica.

Se utilizaron cubetas de 1 ml preparadas según el protocolo que a continuación se detalla:

	Volumen cubeta	Concentración cubeta
Tampón HEPES	0.65 ml	50.00 mM
MgCl ₂	0.10 ml	2.00 mM
NADP ⁺	0.10 ml	0.80 mM
Extracto	variable	—
H ₂ O	variable	—
Sustrato	0.10 ml	variable

De forma que se preparan dos tipos de cubetas que difieren en el tipo de sustrato:

- cubetas A: G6P + 6PG
- cubetas B: 6PG

Con lo que la actividad G6PDH se obtiene por diferencia de las actividades obtenidas en las cubetas A y B, y la actividad 6PGDH directamente de las cubetas B, (Lupiáñez et al., 1987; Peragón et al., 1990).

La reacción de especificidad enzimática se iniciaban por la adición del sustrato, del cual se utilizaron siete concentraciones diferentes: 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, y 5 mM, tanto de G6P como de 6PG; determinándose la aparición de NADPH como $\Delta D.O./min$. Todas las determinaciones fueron realizadas a 25 ± 0.5 °C.

Cálculos.

Una mUnidad de actividad se define como la cantidad de enzima que se necesita para reducir un nmol de NADP durante un minuto y a 25 °C. Las proteínas se determinaron de acuerdo con el método de Lowry et al., (1951).

La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima / mg de proteína, o nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteína; se determina según la siguiente expresión:

$$\text{mU / mg (nmol / mg x min)} = \frac{\Delta\text{D.O. / min} \times \text{V}}{10^{-9} \times \epsilon \times \text{d} \times \text{v} \times \text{P}}$$

$\Delta\text{D.O. / min}$: incremento de densidad óptica por minuto.

V : volumen total de la cubeta (ml).

ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH ($6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{mol}$).

d : espesor de la cubeta (1 cm).

v : volumen de extracto.

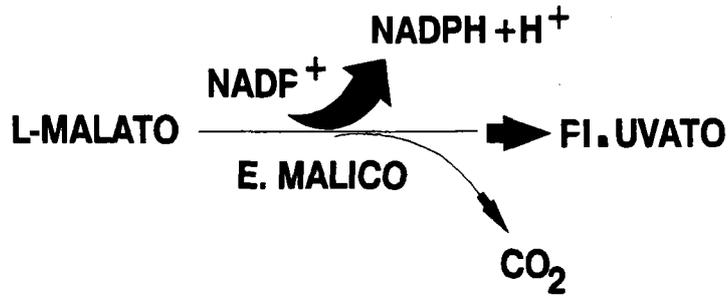
P : mg de proteína.

10^{-9} : factor de conversión a nanomoles.

9.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMA MÁLICO.

Fundamento.

La determinación de la actividad enzima málico (EM) está basada en la medida espectrofotométrica a 340 nm, de la aparición del NADPH producido en la descarboxilación del malato. El ensayo se realizó según describe Ochoa et al., (1955), con algunas modificaciones.



Reactivos.

- Tampón HEPES 76.92 mM, pH 7,6.
- MgCl₂ 3.07 mM.
- NADP 8.0 mM (solución extemporánea).
- L-MALATO, en concentraciones variables.

Técnica.

Se utilizaron cubetas de 1 ml preparadas según el protocolo que a continuación se detalla:

	Volumen cubeta	Concentración cubeta
Tampón HEPES	0.65 ml	50.00 mM
MgCl ₂	0.10 ml	2.00 mM
NADP ⁺	0.10 ml	0.80 mM
Extracto	variable	—
H ₂ O	variable	—
Sustrato	0.10 ml	variable

La reacción de especificidad enzimática se iniciaban por la adición del sustrato, del cual se utilizaron siete concentraciones diferentes: 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.5, 1.0, y 10 mM, de l-malato; determinándose la aparición de NADPH como $\Delta D.O./min$. Todas las determinaciones fueron realizadas a 25 ± 0.5 °C.

Cálculos.

Una mUnidad de actividad se define como la cantidad de enzima que se necesita para reducir un nmol de NADP durante un minuto y a 25 °C. Las proteínas se determinaron de acuerdo con el método de Lowry et al ., (1951).

La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima / mg de proteína, o nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteína; se determina según la siguiente expresión:

$$\text{mU / mg (nmol / mg x min)} = \frac{\Delta\text{D.O. / min} \times \text{V}}{10^{-9} \times \epsilon \times \text{d} \times \text{v} \times \text{P}}$$

$\Delta\text{D.O. / min}$: incremento de densidad óptica por minuto.

V : volumen total de la cubeta (ml).

ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH ($6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{mol}$).

d : espesor de la cubeta (1 cm).

v : volumen de extracto.

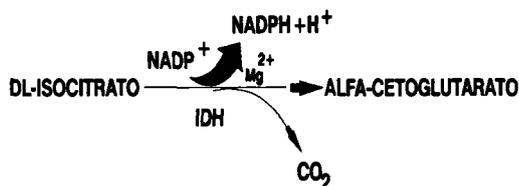
P : mg de proteína.

10^{-9} : factor de conversión a nanomoles.

9.4.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP.

Fundamento.

La determinación de la actividad isocitrato deshidrogenasa (IDH-NADP) está basada en la medida espectrofotométrica a 340 nm, de la aparición del NADPH producido en la descarboxilación oxidativa del isocitrato. El ensayo se realizó según describen Bernt y Bergmeyer (1983), con modificaciones.



Reactivos.

- Tampón HEPES 76.92 mM, pH 7,6.
- MgCl₂ 3.07 mM.
- NADP 8.0 mM (solución extemporánea).
- THREO-Ds-ISOCITRATO, en concentraciones variables.

Técnica.

Se utilizaron cubetas de 1 ml preparadas según el protocolo que a continuación se detalla:

	Volumen cubeta	Concentración cubeta
Tampón HEPES	0.65 ml	50.00 mM
MgCl ₂	0.10 ml	2.00 mM
NADP ⁺	0.10 ml	0.80 mM
Extracto	variable	—
H ₂ O	variable	—
Sustrato	0.10	variable

La reacción de especificidad enzimática se iniciaban por la adición del sustrato, del cual se utilizaron siete concentraciones diferentes: 0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.2, 1, y

10 mM, de Threo-Ds-Isocitrato; determinándose la aparición de NADPH como $\Delta D.O.$ /min. Todas las determinaciones fueron realizadas a 25 ± 0.5 °C.

Cálculos.

Una mUnidad de actividad se define como la cantidad de enzima que se necesita para reducir un nmol de NADP durante un minuto y a 25 °C. Las proteínas se determinaron de acuerdo con el método de Lowry et al., (1951).

La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima / mg de proteína, o nmoles de sustrato transformado por minuto y por mg de proteína; se determina según la siguiente expresión:

$$\text{mU / mg (nmol / mg x min)} = \frac{\Delta D.O. / \text{min} \times V}{10^{-9} \times \epsilon \times d \times v \times P}$$

$\Delta D.O. / \text{min}$: incremento de densidad óptica por minuto.

V : volumen total de la cubeta (ml).

ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH (6.22×10^6 cm² / mol).

d : espesor de la cubeta (1 cm).

v : volumen de extracto.

P : mg de proteína.

10^{-9} : factor de conversión a nanomoles.

9.4.4. PARAMETROS CINETICOS.

Los datos procedentes del estudio cinético se analizaron mediante un paquete de software compuesto por dos programas de análisis de regresión no-lineal: **Enzfitter**, (Elsevier Biosoft), y **EZ-FIT**, (E.I. Dupont de Nemours, Glenolden Lab.).

La razón de actividad se define como la relación entre la actividad del enzima a concentración subsaturante de sustrato y la velocidad máxima. La eficiencia catalítica, obtenida mediante la razón entre la actividad del enzima y la constante de Michaelis (K_m), fue determinada a concentración saturante de sustrato (V_{max}/K_m). Este parámetro relaciona la concentración total de enzima $[E_T]$ con la interacción entre el enzima y el sustrato.

9.5. DETERMINACION ENZIMATICA DE METABOLITOS.

9.5.1. DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUCOSA 6-FOSFATO, FRUCTOSA 6-FOSFATO, Y 6-FOSFOGLUCONATO.

Fundamento.

La observación de la cantidad de la cantidad de 6-fosfogluconato, glucosa 6-fosfato, y fructosa 6-fosfato de una muestra preparada según la sección 9.3 se ha realizado espectrofotométricamente por la formación de NADPH paralela a la oxidación de 6-fosfogluconato, glucosa 6-fosfato, y fructosa 6-fosfato seguida a la adición de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), y fosfogluconato isomerasa (PGI) a pH 7.5 según el método de Lang y Michal (modificado de Hohorst), con algunas modificaciones.

Reactivos.

- Tampón Trietanolamina, 0.2 M, pH 7.5.
- Solución de Cl_2Mg 0.01 M
- Solución extemporánea de NADP 0.02 M
- 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC. 1.1.1.4.1) comercial.
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC. 1.1.1.4.9) comercial.
- Fosfoglucosa isomerasa (EC. 5.3.1.9) comercial.
- Muestra preparada según la sección 9.3.

Técnica.

Se prepararon las cubetas con el siguiente protocolo:

	Muestra	Blanco
Tampón	500 μl	1000 μ
NADP	25 μl	—
Cl_2Mg	10 μl	—
Muestra	300 μl	—
6PGDH	10 μl	—
G6PDH	10 μl	—
PGI	10 μl	—
H_2O	135 μl	—

La lectura se hace a 340 nm y temperatura ambiente. El ΔE_1 aparecido tras la adición de 6PGDH corresponde al 6-fosfogluconato de la muestra. El $\Delta E_2/2$ seguido de la adición de G6PDH corresponde a la glucosa 6-fosfato de la muestra. El $\Delta E_3/2$ seguido de la adición de PGI corresponde a la fructosa 6-fosfato de la misma muestra.

Cálculos.

La concentración de 6-fosfogluconato, glucosa 6-fosfato, y fructosa 6-fosfato se ha expresado en μmoles por ml.

$$\mu\text{moles / ml} = \frac{(\text{D.O.} - \text{D.O.b}) \times V_c \times V_n}{\epsilon \times 10^{-6} \times V_m \times d \times P \times 0.8}$$

D.O.: D.O. final de la muestra - D.O. inicial de la muestra.

D.O.b: D.O. final del blanco - D.O. inicial del blanco.

V_c: volumen final de la cubeta.

V_n: volumen de neutralización en ml; es el volumen del sobrenadante que queda después de centrifugar el resultado de la neutralización con KOH al 20 %.

ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH ($6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{mol}$).

V_m: volumen de la muestra.

d: espesor de la cubeta (1 cm).

P: peso en gramos de tejido fresco.

9.5.2. DETERMINACION ENZIMÁTICA DE L-MALATO.**Fundamento.**

El L-malato se ha determinado oxidándolo enzimáticamente a oxalacetato mediante la enzima malato deshidrogenasa a pH 9.0 según el protocolo descrito por Gutmann y Wahlefeld (1983).

Reactivos.

- Tampón hidrazina/glicina (hidrazina 0.4 M; glicina 0.5 M; pH 9.5)
- Solución extemporánea de NAD 0.04 M.

- Malato deshidrogenasa (EC. 1.1.1.37) comercial.

Técnica.

Las cubetas fueron preparadas según el protocolo descrito a continuación.

	Muestra	Blanco
Tampón	650 μ l	650 μ l
NAD	100 μ l	—
Muestra	150 μ l	—
H ₂ O	80 μ l	350 μ l
MDH	20 μ l	—

La determinación espectrofotométrica se realiza a 340 nm y temperatura ambiente anotando el ΔE debido a la formación del NADH paralelo al consumo de malato.

Cálculos.

La cantidad de malato existente se expresa μ moles por ml, tal y como se determinó en la sección anterior.

9.5.3. DETERMINACION ENZIMATICA DE ISOCITRATO.

Fundamento.

El isocitrato se ha determinado oxidándolo enzimáticamente a α -cetoglutarato mediante la isocitrato deshidrogenasa (IDH), a pH 7.5 según ha descrito Siebert (1983), con modificaciones.

Reactivos.

- Tampón HEPES 0.05 M; Cl₂Mg 0.002 M;
- Solución de sulfato de manganeso 0.002 M
- Solución extemporánea de NADP 0.005 M

- Isocitrato deshidrogenasa-NADP (IDH-NADP) (EC. 1.1.1. 42) comercial.

Técnica.

Las cubetas se prepararon según el protocolo descrito a continuación.

	Muestra	Blanco
Tampón	650 μ l	650 μ l
NADP	100 μ l	
Muestra	100 μ l	
H ₂ O	140 μ l	350 μ l
MnSO ₄	100 μ l	
IDH-NADP	10 μ l	

La determinación espectrofotométrica se realizó a 340 nm y temperatura ambiente, anotando el ΔE debido a la formación del NADPH paralelo al consumo de isocitrato.

Cálculos.

La cantidad de isocitrato existente se expresa μ moles por ml, tal y como se determinó en la sección 9.5.1.

9.5.4. DETERMINACION ENZIMATICA DE GLUCOSA.

Fundamento.

La determinación de glucosa se ha realizado por el método enzimático de la hexokinasa (HK), y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), según la técnica descrita por Bergmeyer et al., (1983).

Reactivos.

- Tampón Trietanolamina 0.2 M, MgCl₂ 0.01 M, pH 7.5.
- Solución extemporánea de NADP 0.02 M.

- Solución de MgATP 0.1 M.
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), (EC. 1.1.1.49) comercial.
- Hexokinasa (HK), (EC 2.7.1.1) comercial.

Técnica.

	Muestra
Tampón	500 μ l
NADP	25 μ l
MgATP	10 μ l
H ₂ O	355 μ l
Muestra	100 μ l
G6PDH	5 μ l
HK	5 μ l

La lectura se realiza a 340 nm y a temperatura ambiente. El ΔE_1 aparecido tras la adición de G6PDH corresponde a la glucosa 6-fosfato de la muestra. El ΔE_2 seguido de la adición de HK corresponde a la glucosa presente en esa misma muestra.

Cálculos.

La cantidad de glucosa existente se expresa μ moles por ml, tal y como se determinó en la sección 9.5.1.

9.5.5 DETERMINACION ENZIMÁTICA DE NADP.

Fundamento.

La determinación de la cantidad de NADP se ha realizado espectrofotométricamente por la formación de NADPH paralela a la oxidación de la glucosa 6-fosfato, tal y como se describe en la sección 9.5.1.

Reactivos.

- Tampón HEPES 0.05 M, pH 7,6.
- $MgCl_2$ 0.002 M.
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC. 1.1.1.4.9) comercial.
- Glucosa 6-fosfato 0.005 M..

Técnica.

Se utilizaron cubetas de 1 ml preparadas según el protocolo que a continuación se detalla:

	Muestra
Tampón HEPES	0.65 ml
$MgCl_2$	0.10 ml
G6P	0.10 ml
G6PDH	0.005 ml
Muestra	0.10 ml

La lectura se hace a 340 nm y temperatura ambiente. El ΔE aparecido tras la adición de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa corresponde al contenido en NADP de la muestra.

Cálculos.

La cantidad de NADP existente la muestra se expresa μ moles por ml, tal y como se determinó en la sección 9.5.1.

9.5.6. DETERMINACION DE LA GLUCOSA SANGUINEA.**Fundamento.**

La sangre se extrajo del vaso dorsal de la trucha con jeringa heparinizada, depositándose en un vial con anticoagulante. De aquí se toma una muestra que se

desproteíniza con ácido perclórico al 2 % en proporción 0.5 ml de sangre : 4ml ClO_4H . La muestra se centrifuga a 8.000 xg durante 15 minutos, y el sobrenadante se neutraliza con CO_3Na_2 1M usando indicador universal; seguidamente se vuelve a centrifugar durante 5 minutos a 8.000 xg, y en el sobrenadante obtenido se determina la glucosa tal y como se explicitó en la sección 9.5.4.

Los resultados se expresan en μmoles de glucosa por ml de sangre.

9.5.7. DETERMINACION DE GLUCOGENO.

Fundamento.

El glucógeno hepático y muscular se determinaron al estado de glucosa después de la hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa, siguiendo el método propuesto por Bergmeyer (1974).

El enzima libera glucosa a partir de glucógeno, hidrolizando las uniones $\alpha\text{-D}$ (1 \rightarrow 4) y $\alpha\text{-D}$ (1 \rightarrow 6). El carácter específico de este enzima permite efectuar la hidrólisis en homogenado de órgano y células sanguíneas sin necesidad de aislar el glucógeno. La glucosa formada es específicamente determinada con hexokinasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Reactivos.

- Solución de CO_3HK 1 M.
- Amiloglucosidasa (EC. 3.2.1.3) comercial.
- Tampón acetato 0.2 M, pH 4.8
- ATP
- NADP
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), (EC. 1.1.1.49) comercial.
- Hexokinasa (HK), (EC. 2.7.1.1) comercial.

- Acido perclórico 0.6 N.

Técnica.

1.- Hidrólisis del glucógeno.

Se extrae rápidamente el tejido del animal, y se pesa por diferencia, en un tubo de centrífuga. Se añade ácido peclórico 0.6 N en la proporción 1 : 5 (p/v), e inmediatamente se homogeniza en un Potter-Elvehjem con pistilo de vidrio. A continuación, se pipetea 0.2 ml del homogenado en un tubo de centrifuga, y se conserva en baño de hielo. Esta alícuota se utiliza para la hidrólisis del glucógeno.

El resto del homogenado se centrifuga durante 15 minutos y, después de neutralizar con CO_3HK sólido, se toman 0.05 ml para determinar la glucosa preexistente en el homogenado.

Al objeto de realizar la hidrólisis del glucógeno se procede a incubar los 0.2 ml que se tomaron del homogenado con 0.1 ml de CO_3HK 1 M y 2 ml de una solución de amiloglucosidasa al 0.02 % en tampón acetato, en un tubo de centrífuga tapado con agitación, a 40 °C durante dos horas. La reacción se para añadiendo 1 ml de ácido perclórico; posteriormente se ecentrifugan los tubos y se toman 0.05 ml del sobrenadante para determinar la glucosa.

2.- Determinación de glucosa.

Se prepara una cubeta para el blanco de glucosa y otra para el hidrolizado de glucógeno, siguiendo el protocolo que a continuación se describe.

	Muestra	B. Glucosa	Blanco
Cocktail	2.00 ml	2.00 ml	—
Muestra hidrolizado	0.05 ml	—	—
Muestra inicial	—	0.05 ml	—
H ₂ O	—	—	2.00 ml

Hexoquinasa	0.005 ml	0.005 ml	—
-------------	----------	----------	---

El cocktail se prepara disolviendo en tampón trietanolamina el ATP en concentración 1mM/ml; el NADP en concentración 0.9 mM/ml, y la G6PDH en concentración 5.0 µg/ml. El curso de la reacción se sigue espectrofotométricamente midiendo a 340 nm el ΔE debido a la formación de NADPH.

Cálculos.

El glucógeno se expresa como µmoles de glucosa por gramo de tejido húmedo.

$$\mu\text{moles/g} = \frac{\Delta E_p \times 2.055 \times 3.3 \times V_T}{\epsilon \times 10^{-6} \times 0.05 \times 0.2 \times P} - \frac{\Delta E_b \times 2.05 \times V_{TI}}{10^{-6} \times 0.05 \times P}$$

donde:

E_p = medida del incremento en la D.O. correspondiente al hidrolizado.

E_b = medida del incremento en la D.O. correspondiente al blanco de glucosa.

2.055 = volumen del medio de reacción (determinación de glucosa).

3.3 = volumen total del hidrolizado de glucógeno.

ε = coeficiente de extinción molar aproximado del NADP.

0.05 = volumen de muestra en la cubeta.

0.2 = volumen del homogenado en el hidrolizado de glucógeno.

P = peso, en gramos, de la muestra de tejido fresco.

V_T = volumen total del extracto ácido.

V_{TI} = volumen final de neutralización.

RESULTADOS

1. INFLUENCIA DEL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS PRODUCTORES DE NADPH EN DISTINTOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS (*O. mykiss*).

Se estudió la influencia del tamaño corporal, y por consiguiente del estadio de desarrollo, sobre el comportamiento cinético de los sistemas productores de NADPH, al objeto de determinar su capacidad adaptativa frente a esta variable.

1.1 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA .

Se realizó un estudio de los parámetros cinéticos de este sistema enzimático en hígado, riñón, tejido adiposo, intestino, músculo esquelético, corazón, bazo, y agallas, a lo largo de animales con diferentes pesos, como reflejo del tamaño corporal, que oscilaban en un rango desde 8,5g hasta los 430g, no apreciándose ninguna modificación significativa en los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados (Tablas 1 y 2).

De otra parte, se observó que la actividad G6PDH prácticamente no se detecta en músculo blanco e intestino, siendo muy baja en músculo cardíaco.

La velocidad máxima (V_{max}) del enzima es significativamente mayor en hígado que en riñón, siendo la de éste último ligeramente superior a la de bazo; de forma que la V_{max} de bazo es significativamente superior a la de agallas y tejido adiposo.

En cuanto al resto de los parámetros cinéticos no varían significativamente entre los pesos y tejidos estudiados, salvo la eficiencia catalítica y de acuerdo con el comportamiento cinético entre tejidos descrito anteriormente para la V_{max} .

No se apreció modificación significativa alguna entre los parámetros cinéticos de cada tejido a lo largo de los diferentes pesos estudiados

1.2 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA

El comportamiento de los parámetros cinéticos de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en los tejidos estudiados, no experimentó cambios significativos en ninguno de los diferentes pesos investigados (Tablas 3 y 4).

La actividad 6PGDH prácticamente no se detecta en músculo blanco, siendo muy baja en corazón.

La velocidad máxima del enzima es significativamente mayor en hígado que en riñón, siendo la de éste último significativamente superior a la de tejido adiposo, bazo, y agallas, y la de éstos similar entre ellos y significativamente superior a la de intestino.

No se apreció por tanto ningún tipo de modificación significativa entre los parámetros cinéticos de los pesos de los pesos y tejidos estudiados, a excepción, y de acuerdo con el comportamiento cinético descrito entre tejidos, de la eficiencia catalítica.

1.3 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMA MALICO.

La actividad enzima málico prácticamente no se detecta en bazo, siendo muy baja en riñón, tejido adiposo, intestino, músculo esquelético, y agallas.

Tabla 1. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos de la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
HIGADO	Vmax	165.14 ± 14.60	165.72 ± 18.23	166.88 ± 13.28	177.26 ± 12.16	183.71 ± 13.78	170.67 ± 9.56	200.00 ± 18.57
	Km	15.02 ± 1.86	17.06 ± 1.80	17.00 ± 1.80	21.80 ± 2.30	14.89 ± 1.60	18.00 ± 1.90	16.10 ± 1.70
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	11.01 ± 1.10	10.47 ± 1.20	9.82 ± 1.10	8.06 ± 0.90	12.24 ± 1.35	9.48 ± 1.00	12.50 ± 1.30
RIÑÓN	Vmax	88.75 ± 10.15	116.58 ± 12.15	95.76 ± 9.40	105.00 ± 11.62	95.56 ± 9.40	89.03 ± 9.26	104.10 ± 12.30
	Km	14.99 ± 1.50	16.00 ± 1.65	16.10 ± 1.70	15.03 ± 1.60	13.88 ± 1.40	15.11 ± 1.60	14.00 ± 1.43
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	7.40 ± 0.80	7.29 ± 0.80	6.00 ± 0.65	7.00 ± 0.70	6.82 ± 0.70	6.60 ± 0.70	7.43 ± 0.80
T. ADIPOSO	Vmax	36.76 ± 4.26	42.81 ± 5.22	41.06 ± 6.12	38.75 ± 4.10	35.22 ± 4.02	38.22 ± 3.50	45.99 ± 7.56
	Km	11.22 ± 1.20	13.00 ± 1.28	16.98 ± 1.70	15.00 ± 1.54	13.12 ± 1.40	15.88 ± 1.63	14.00 ± 1.51
	Razón de actividad	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	3.34 ± 0.37	3.29 ± 0.35	2.41 ± 0.26	2.58 ± 0.30	2.71 ± 0.32	2.39 ± 0.25	3.28 ± 0.37
INTESTINO	Vmax	0.72 ± 0.23	0.80 ± 0.15	0.40 ± 0.15	0.79 ± 0.16	0.65 ± 0.12	0.92 ± 0.17	0.75 ± 0.21
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM . La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. $\text{M} \cdot 10^{-4}$. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados.

Tabla 2. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos de la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
MUSCULO	Vmax	1.20 ± 0.16	1.00 ± 0.15	0.96 ± 0.12	1.43 ± 0.21	0.92 ± 0.14	0.93 ± 0.09	1.26 ± 0.10
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CORAZON	Vmax	6.24 ± 0.85	6.35 ± 0.76	4.58 ± 0.56	6.39 ± 0.75	5.80 ± 0.67	6.85 ± 0.81	7.10 ± 0.90
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BAZO	Vmax	nd	89.08 ± 17.60	82.02 ± 15.16	76.07 ± 10.14	71.67 ± 9.18	64.68 ± 8.16	74.53 ± 9.85
	Km	nd	18.00 ± 1.86	20.10 ± 2.10	17.00 ± 1.65	17.89 ± 1.80	18.99 ± 2.01	17.00 ± 1.81
	Razón de actividad	nd	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	nd	4.95 ± 0.56	4.10 ± 0.47	4.47 ± 0.40	3.98 ± 0.40	3.40 ± 0.37	4.38 ± 0.50
AGALLAS	Vmax	55.40 ± 6.23	55.57 ± 7.21	42.61 ± 5.20	46.23 ± 5.22	49.41 ± 6.01	51.99 ± 7.18	44.37 ± 7.21
	Km	20.10 ± 1.98	21.10 ± 2.00	20.00 ± 1.76	18.88 ± 1.80	18.08 ± 1.65	19.00 ± 1.78	23.00 ± 2.10
	Razón de actividad	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	2.77 ± 0.37	2.65 ± 0.30	2.13 ± 0.26	2.43 ± 0.18	2.74 ± 0.20	2.74 ± 0.24	1.93 ± 0.25

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. M. 10⁻⁴. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados.

Tabla 3. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) , en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
HIGADO	Vmax	165.25 ± 17.20	190.68 ± 20.20	171.60 ± 19.20	177.81 ± 18.60	167.30 ± 17.95	170.31 ± 19.36	190.70 ± 22.33
	Km	11.00 ± 1.00	13.10 ± 1.18	11.00 ± 1.00	15.12 ± 1.48	12.99 ± 1.30	13.01 ± 1.20	15.80 ± 1.48
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.004	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	15.02 ± 1.32	14.67 ± 1.25	15.60 ± 1.51	11.85 ± 1.23	12.86 ± 1.20	13.10 ± 1.27	11.91 ± 1.00
RIÑÓN	Vmax	78.83 ± 9.21	77.64 ± 8.24	83.24 ± 10.31	89.61 ± 10.78	85.88 ± 9.16	90.03 ± 10.44	87.14 ± 9.02
	Km	11.02 ± 1.10	14.88 ± 1.45	11.00 ± 1.01	13.10 ± 1.00	12.20 ± 1.18	13.10 ± 1.17	14.00 ± 1.40
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	7.17 ± 0.67	5.18 ± 0.62	7.57 ± 0.81	6.89 ± 0.70	7.15 ± 0.66	6.92 ± 0.65	6.22 ± 0.60
T. ADIPOSO	Vmax	40.13 ± 4.52	41.35 ± 5.23	43.32 ± 4.81	43.63 ± 6.10	40.10 ± 5.12	42.96 ± 5.86	49.36 ± 7.13
	Km	15.00 ± 1.34	18.00 ± 1.90	18.88 ± 1.90	14.10 ± 1.37	16.05 ± 1.50	17.10 ± 1.80	19.87 ± 2.00
	Razón de actividad	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	2.67 ± 0.24	2.29 ± 0.28	2.28 ± 0.24	3.09 ± 0.38	2.51 ± 0.26	2.53 ± 0.26	2.47 ± 0.26
INTESTINO	Vmax	22.16 ± 3.51	20.46 ± 3.10	18.01 ± 2.57	21.10 ± 3.20	18.98 ± 5.44	23.86 ± 4.10	17.94 ± 2.69
	Km	23.16 ± 2.40	24.00 ± 2.28	22.00 ± 2.18	19.79 ± 2.00	21.13 ± 2.00	22.00 ± 2.00	24.10 ± 2.51
	Razón de actividad	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	0.96 ± 0.08	0.85 ± 0.08	0.82 ± 0.07	1.05 ± 0.91	0.90 ± 0.08	1.08 ± 0.09	0.75 ± 0.08

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en µM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. M. 10⁻⁴. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados.

Tabla 4. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
MUSCULO	Vmax	1.99 ± 0.09	2.51 ± 0.36	2.65 ± 0.31	2.24 ± 0.27	2.38 ± 0.32	3.01 ± 0.40	2.37 ± 0.26
	Km	nd						
	Razón de actividad	nd						
	Eficiencia catalítica	nd						
CORAZON	Vmax	9.98 ± 1.12	10.61 ± 1.75	11.00 ± 1.41	9.50 ± 1.41	8.44 ± 1.01	8.30 ± 0.90	10.02 ± 1.20
	Km	nd						
	Razón de actividad	nd						
	Eficiencia catalítica	nd						
BAZO	Vmax	nd	36.66 ± 4.12	39.80 ± 4.20	40.20 ± 5.18	38.54 ± 4.00	36.79 ± 3.68	41.12 ± 5.26
	Km	nd	16.00 ± 1.61	13.00 ± 1.32	13.98 ± 1.40	15.00 ± 1.51	15.00 ± 1.33	18.89 ± 1.90
	Razón de actividad	nd	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	nd	2.29 ± 0.24	3.06 ± 0.31	2.87 ± 0.27	2.60 ± 0.25	2.45 ± 0.23	2.16 ± 0.22
AGALLAS	Vmax	51.21 ± 6.12	42.03 ± 5.01	42.61 ± 4.81	46.79 ± 5.12	41.61 ± 4.52	45.35 ± 4.81	50.21 ± 4.78
	Km	13.00 ± 1.22	17.89 ± 1.80	16.00 ± 1.64	14.09 ± 1.33	14.10 ± 1.48	16.89 ± 1.60	16.00 ± 1.70
	Razón de actividad	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	3.94 ± 0.45	2.33 ± 0.26	2.64 ± 0.30	3.34 ± 0.40	2.97 ± 0.31	2.67 ± 0.28	3.14 ± 0.3

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. M. 10⁻⁴. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados.

La V_{max} y la eficiencia catalítica son significativamente superiores en hígado que en músculo cardíaco, siendo la constante de Michaelis (K_m) de éste último tejido significativamente superior a la de hígado.

No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de cada tejido a lo largo de los diferentes pesos estudiados (Tablas 5 y 6).

1.4 EFECTO DE LA VARIACION EN EL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LA ACTIVIDAD ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP.

La actividad isocitrato deshidrogenasa-NADP es muy baja en bazo y prácticamente indetectable en intestino.

La V_{max} del corazón es significativamente superior a la de tejido hepático, de modo que la V_{max} de este último también es significativamente mayor que la encontrada en riñón, tejido adiposo, músculo esquelético, y agallas, y la de éstos prácticamente similar entre ellos.

La constante de Michaelis de músculo cardíaco es significativamente superior a la de tejido adiposo y músculo esquelético, y la de éstos similar entre ellos y significativamente superior a la de hígado y riñón. La razón de actividad en hígado, riñón, y tejido adiposo, y significativamente superior a la de músculo esquelético, y la de éste significativamente superior a la encontrada en músculo cardíaco.

Con respecto a la eficiencia catalítica, es similar en corazón e hígado, y significativamente mayor que la de riñón, siendo la de éste último significativamente superior a la de músculo esquelético y tejido adiposo.

No obstante, no se observaron diferencias significativas en los parámetros cinéticos de cada tejido entre los diferentes pesos objetos de estudio (Tablas 7 y 8).

Tabla 5. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos del Enzima Máfico (EM), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
HIGADO	Vmax	70.28 ± 8.31	79.38 ± 9.10	75.36 ± 8.24	88.50 ± 10.23	74.13 ± 6.42	86.34 ± 9.15	84.84 ± 9.27
	Km	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.03
	Razón de actividad	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	0.39 ± 0.04	0.44 ± 0.04	0.50 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.53 ± 0.05
RIÑÓN	Vmax	5.23 ± 0.61	7.67 ± 1.15	4.83 ± 0.81	5.10 ± 0.62	4.95 ± 0.52	5.25 ± 0.71	4.63 ± 0.65
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T. ADIPOSO	Vmax	5.92 ± 0.75	6.73 ± 0.67	6.71 ± 0.72	5.63 ± 0.71	6.01 ± 0.72	5.91 ± 0.77	6.42 ± 0.70
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
INTESTINO	Vmax	8.18 ± 1.21	8.27 ± 0.93	8.93 ± 1.10	8.25 ± 0.56	7.12 ± 0.84	7.93 ± 1.20	7.61 ± 0.83
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en mM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. M. 10⁻⁴. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados; nd, no determinado.

Tabla 6. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos del Enzima Málico (EM), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
MUSCULO	Vmax	6.66 ± 0.81	7.31 ± 0.91	7.14 ± 0.81	8.00 ± 0.95	7.64 ± 0.83	7.19 ± 0.81	8.26 ± 0.91
	Km	nd						
	Razón de actividad	nd						
	Eficiencia catalítica	nd						
CORAZON	Vmax	40.00 ± 5.10	35.75 ± 4.21	35.02 ± 3.64	35.23 ± 4.51	33.09 ± 4.16	32.53 ± 4.03	42.63 ± 5.16
	Km	0.31 ± 0.04	0.31 ± 0.032	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.03
	Razón de actividad	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01
BAZO	Vmax	nd	2.70 ± 0.35	2.79 ± 0.31	2.66 ± 0.30	2.56 ± 0.30	2.52 ± 0.29	2.71 ± 0.31
	Km	nd						
	Razón de actividad	nd						
	Eficiencia catalítica	nd						
AGALLAS	Vmax	6.18 ± 0.75	7.08 ± 0.83	5.47 ± 0.71	5.63 ± 0.73	5.49 ± 0.70	5.75 ± 0.71	7.03 ± 0.85
	Km	nd						
	Razón de actividad	nd						
	Eficiencia catalítica	nd						

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en mM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. M. 10⁻⁴. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados; nd, no determinado.

Tabla 7. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos de la Isocitrato deshidrogenasa-NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
HIGADO	Vmax	172.71 ± 20.64	190.00 ± 21.50	147.29 ± 17.64	184.32 ± 21.19	181.31 ± 22.60	192.86 ± 23.00	180.00 ± 20.70
	Km	5.00 ± 0.48	8.01 ± 0.73	5.00 ± 0.35	7.02 ± 0.60	6.02 ± 0.58	6.00 ± 0.50	6.00 ± 0.55
	Razón de actividad	0.43 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.41 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	34.54 ± 4.14	23.75 ± 3.01	29.46 ± 3.00	26.33 ± 2.90	30.22 ± 2.90	32.14 ± 3.00	30.00 ± 2.81
RIÑÓN	Vmax	51.04 ± 6.10	47.94 ± 4.81	50.23 ± 4.16	53.13 ± 6.10	51.65 ± 6.02	51.93 ± 5.21	47.21 ± 5.18
	Km	5.01 ± 0.30	5.00 ± 0.40	6.10 ± 0.53	5.00 ± 0.34	6.00 ± 0.55	5.12 ± 0.30	5.10 ± 0.33
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	10.19 ± 1.20	9.50 ± 0.91	8.37 ± 0.81	10.63 ± 1.02	8.61 ± 0.90	10.39 ± 1.03	9.44 ± 0.83
T. ADIPOSEO	Vmax	37.91 ± 4.67	41.91 ± 5.16	41.52 ± 6.03	51.45 ± 7.16	40.78 ± 5.86	44.03 ± 5.18	39.56 ± 4.81
	Km	10.12 ± 1.02	10.00 ± 1.04	10.20 ± 1.00	11.10 ± 1.23	9.80 ± 0.90	10.23 ± 1.00	10.10 ± 1.02
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	3.79 ± 0.40	4.19 ± 0.46	4.15 ± 0.45	4.67 ± 0.50	4.08 ± 0.38	4.40 ± 0.45	3.95 ± 0.39
INTESTINO	Vmax	0.65 ± 0.07	0.54 ± 0.06	0.71 ± 0.08	0.72 ± 0.11	0.65 ± 0.06	0.81 ± 0.10	0.56 ± 0.07
	Km	nd						
	Razón de actividad	nd						
	Eficiencia catalítica	nd						

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM . La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. $\text{M} \cdot 10^{-4}$. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados; nd, no determinado.

Tabla 8. Influencia del tamaño corporal sobre los parámetros cinéticos de la Isocitrato deshidrogenasa-NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Pesos						
		8.5 g	35 g	50 g	70 g	100 g	175 g	430 g
MUSCULO	Vmax	44.71 ± 6.16	60.51 ± 9.17	54.14 ± 6.07	51.89 ± 6.17	65.71 ± 8.01	52.00 ± 6.17	49.35 ± 6.57
	Km	9.02 ± 0.81	9.18 ± 0.95	9.00 ± 0.83	11.08 ± 1.25	10.95 ± 1.19	10.12 ± 1.12	11.01 ± 1.00
	Razón de actividad	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.28 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	4.97 ± 0.52	6.72 ± 0.78	6.01 ± 0.65	4.72 ± 0.51	6.00 ± 0.75	5.20 ± 0.46	4.49 ± 0.40
CORAZON	Vmax	651.76 ± 67.33	719.09 ± 82.8	695.39 ± 72.17	584.43 ± 64.29	674.17 ± 70.78	620.31 ± 70.10	696.56 ± 75.10
	Km	18.23 ± 2.00	23.00 ± 3.00	19.09 ± 2.00	22.10 ± 2.00	19.00 ± 1.58	20.13 ± 2.00	24.10 ± 2.35
	Razón de actividad	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	36.21 ± 4.00	31.26 ± 3.25	36.60 ± 3.82	26.56 ± 2.81	35.48 ± 4.21	31.01 ± 3.22	29.02 ± 3.27
BAZO	Vmax	nd	11.47 ± 1.32	10.51 ± 1.23	11.07 ± 1.16	11.64 ± 1.40	9.78 ± 1.07	10.70 ± 1.18
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AGALLAS	Vmax	61.00 ± 7.18	62.18 ± 8.32	51.05 ± 6.22	63.36 ± 9.18	51.66 ± 6.12	59.23 ± 6.18	57.11 ± 7.10
	Km	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en µM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot. M. 10⁻⁴. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de los pesos y tejidos estudiados; nd, no determinado.

1.5 CONTRIBUCION DE LOS DISTINTOS ORGANOS Y TEJIDOS A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH

Al objeto de estudiar la contribución de cada tejido a los sistemas de producción de NADPH, y dada la falta de respuesta encontrada en estos sistemas enzimáticos a lo largo de diferentes estadios corporales, se escogió un peso estándar de 175 g sobre el que se realizó el presente estudio de contribución.

1.5.1 CONTRIBUCION RELATIVA DE LOS DISTINTOS TEJIDOS A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH.

Tal como se aprecia en las Figuras 1 y 2, el tejido que contribuye en mayor grado a la producción de estos sistemas enzimáticos es el hígado con un 40,5% , 47,2%, y un 69,3% para la G6PDH, 6PGDH, y EM respectivamente, excepto en el caso de la actividad IDH-NADP, en el que aunque contribuye con un 31%, es menor que la observada para el corazón, que lo hace con un 46,3%.

En las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, la contribución de los demás tejidos sigue un patrón similar, llevando el grueso de la aportación entre agallas, bazo, y riñón, mientras que los tejidos restante reúnen unos porcentajes muy bajos que oscilan entre el 1,9% para la G6PDH, y el 6,8% para la 6PGDH.

Respecto las actividades enzima málico e isocitrato deshidrogenasa-NADP, el grueso de la aportación se realiza entre hígado y corazón; en el caso del enzima málico, la producción hepática es casi cinco veces la de corazón, quedando el resto de los tejidos en un 18,3%, destacando la baja aportación del tejido adiposo con un 2,4%. En

cuanto a la actividad isocitrato deshidrogenasa-NADP, la aportación del músculo cardíaco es superior a la hepática, reuniendo entre los tejidos restantes un 22,4%, apreciándose la baja aportación del tejido adiposo, y la prácticamente inexistente del intestino.

1.5.2 CONTRIBUCION ABSOLUTA DE LOS DISTINTOS TEJIDOS Y ORGANOS A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH.

En las actividades G6PDH y 6PGDH, la aportación hepática es significativamente superior a la de los demás tejidos, con un 71,4% y 60,6% respectivamente (Fig. 3). El riñón y el músculo se reparten el porcentaje restante, mientras que bazo, intestino, y corazón, sólo reúnen al rededor de un 3%.

El hígado y el músculo son los tejidos que contribuyen principalmente, tanto a la actividad del enzima málico, como a la de la actividad isocitrato deshidrogenasa. NADP dependiente (Fig. 4) , aunque en ambos casos el papel relevante lo asume el músculo esquelético, con un 66,5% y 84,9% respectivamente. El resto de los tejidos (corazón, intestino, riñón, y bazo) sólo constituyen un porcentaje minoritario (alrededor de un 2 %)

1.5.3 CONTRIBUCION RELATIVA HEPATICA A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH EN ANIMALES CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.

La contribución del hígado en estos sistemas productores de NADPH en animales con diferente tamaño corporal (desde 8,5g hasta 430g), sigue un patrón de características muy similares, en los cuatro sistemas enzimáticos, de forma que en cada

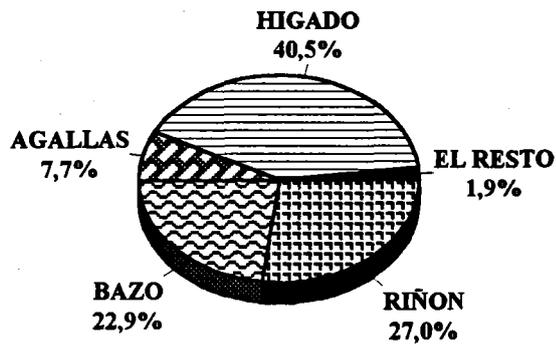
actividad, el tejido hepático aporta aproximadamente el mismo porcentaje en cada uno de los pesos estudiados (Figs. 5 y 6).

1.5.4 CONTRIBUCION ABSOLUTA HEPATICA A LOS SISTEMAS DE PRODUCCION DE NADPH EN ANIMALES CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.

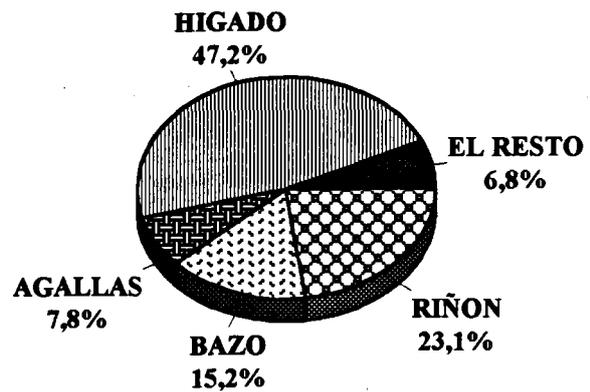
La aportación hepática absoluta (Unidades/hígado) a los sistemas productores de NADPH en el rango de pesos estudiado, sigue un patrón ascendente , y similar en los cuatro sistemas enzimático, oscilando entre un 0,9% para los animales de 8,5 g hasta llegar a un 30%-40%, en los animales de 430g (Fig. 7 y 8)

CONTRIBUCION RELATIVA (Unidades/g)

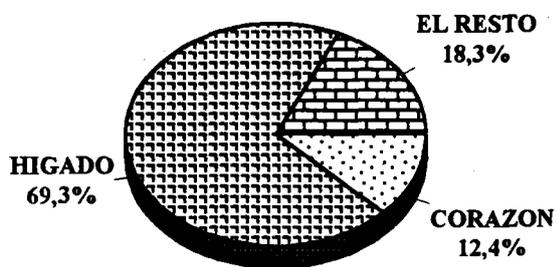
ACTIVIDAD G6PDH



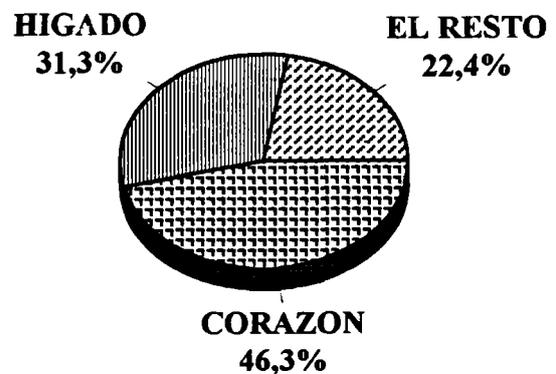
ACTIVIDAD 6PGDH



ACTIVIDAD E. MALICO

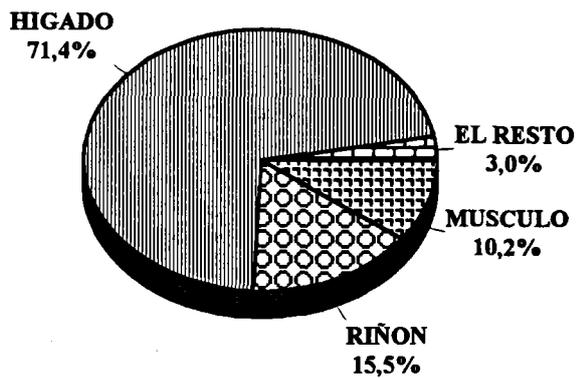


ACTIVIDAD IDH-NADP

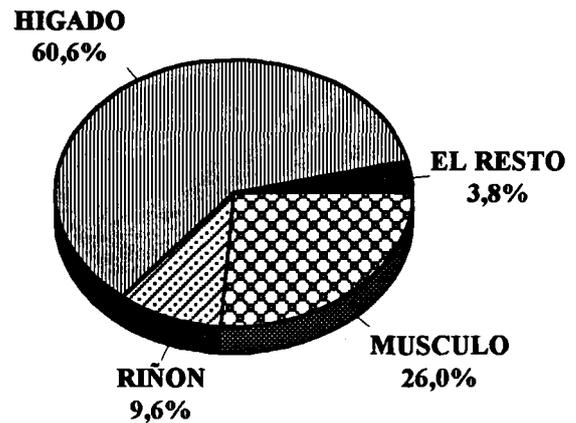


CONTRIBUCION TOTAL (Unidades/tejido)

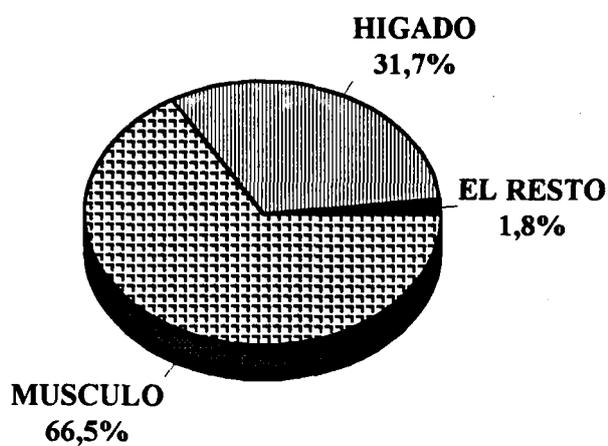
ACTIVIDAD G6PDH



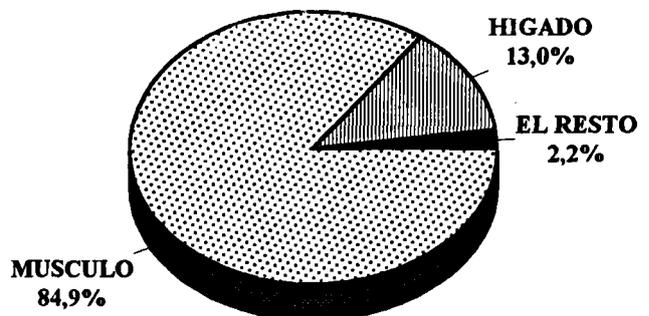
ACTIVIDAD 6PGDH



ACTIVIDAD E. MALICO

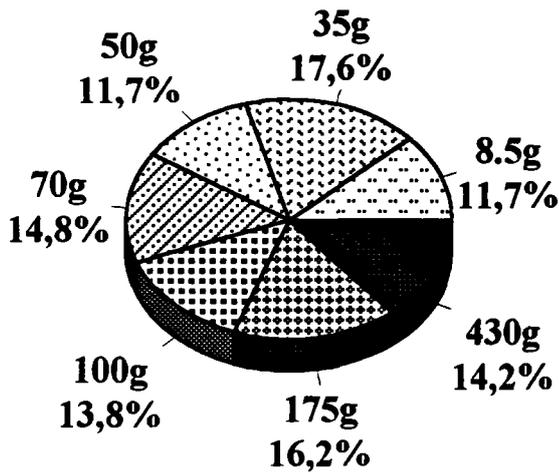


ACTIVIDAD IDH-NADP

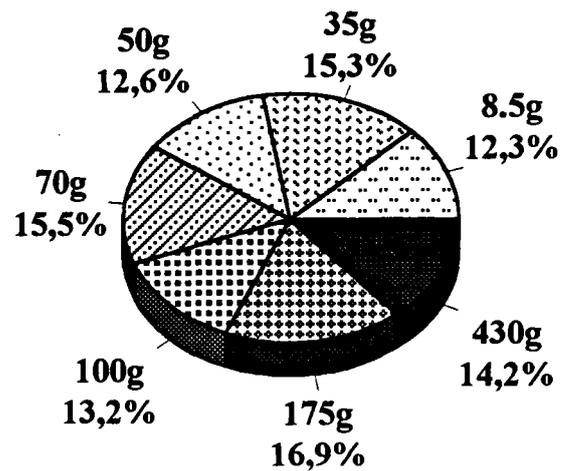


CONTRIBUCION RELATIVA HEPATICA (Unidades/g)

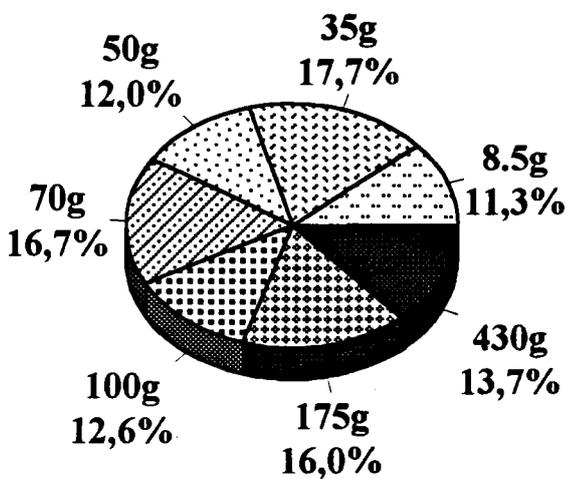
ACTIVIDAD G6PDH



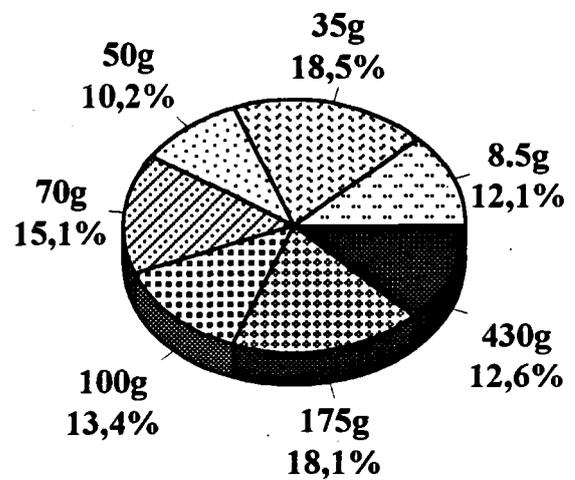
ACTIVIDAD 6PGDH



ACTIVIDAD E. MALICO

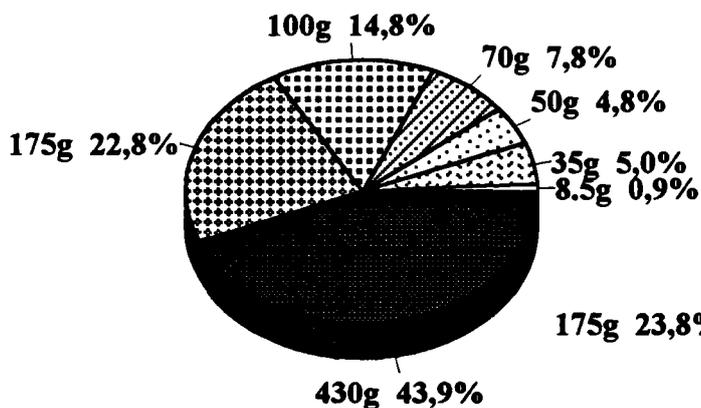


ACTIVIDAD IDH-NADP

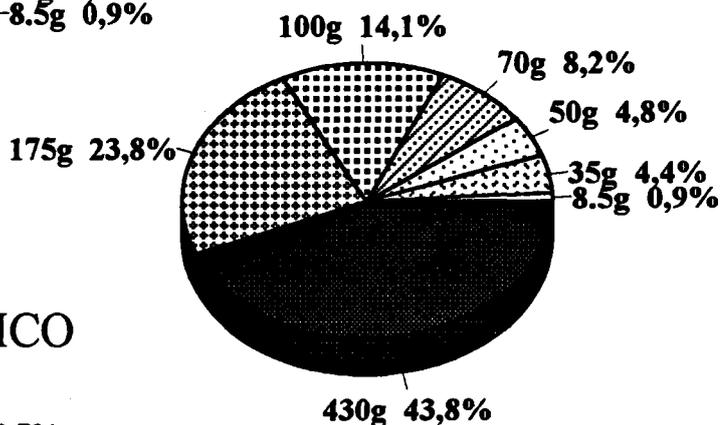


CONTRIBUCION TOTAL HEPATICA (Unidades/tejido)

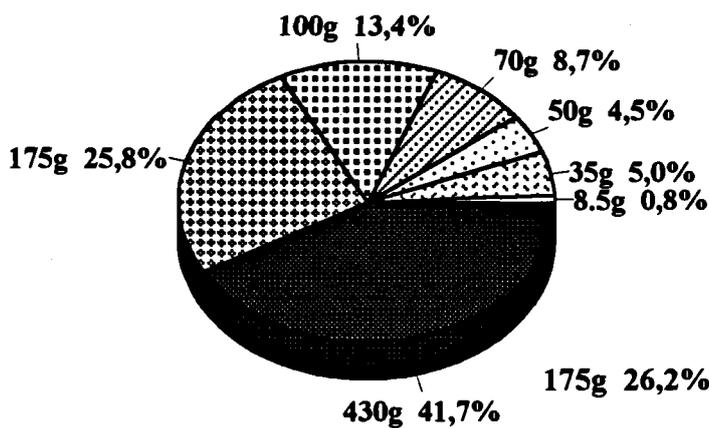
ACTIVIDAD G6PDH



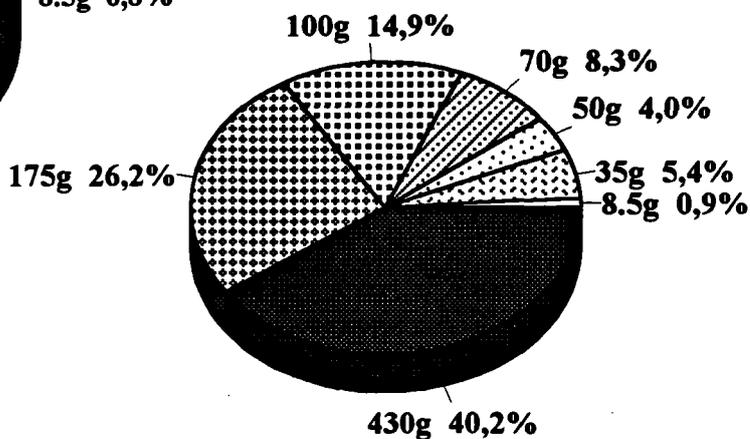
ACTIVIDAD 6PGDH



ACTIVIDAD E. MALICO



ACTIVIDAD IDH-NADP



2. INFLUENCIA DE DIFERENTES MACRONUTRIENTES DIETARIOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS.

2.1 INFLUENCIA DEL NIVEL DE PROTEÍNA DE LA DIETA.

2.1.1 EFECTO DE LAS PROTEÍNAS.

Se ha investigado la influencia de una disminución del 50% en el nivel de proteína de la dieta sobre el comportamiento cinético de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), isocitrato deshidrogenasa NADP (IDH-NADP), y enzima málico (EM), con objeto de determinar la capacidad adaptativa de esos cuatro enzimas productores de NADPH a esta situación nutricional.

La influencia de la disminución en el contenido de proteína dietaria sobre la velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato en esos sistemas enzimáticos de tejido hepático se muestra en las Figuras 9-12. En todos los casos se obtuvieron típicas curvas hiperbólicas de saturación para la actividad de estos enzimas. La representación de dobles recíprocos de las variaciones en la velocidad inicial del enzima en función de la concentración de sustrato muestran una relación claramente lineal (Fig. 9-12), lo que también excluye cualquier efecto de tipo cooperativo.

Los parámetros cinéticos de estos enzimas bajo las diferentes condiciones nutricionales utilizadas se muestran en las Tablas 9-16.

Se encontró que la administración de una dieta baja en proteínas durante cuatro semanas produjo una disminución significativa en los valores de velocidad máxima

(Vmax) de todos los sistemas enzimáticos de hígado estudiados. La disminución para las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato (G6PDH y 6PGDH), fue de un 35% y 50% respectivamente, mientras que para el enzima málico e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente fue alrededor de un 35% y 25% respectivamente (Fig. 13). No se encontraron cambios significativos en la constante de Michaelis (Km), indicando una disminución significativa en la eficiencia catalítica de esos enzimas. Este comportamiento cinético confirma el que la razón de actividad de todos los sistemas enzimáticos hepáticos permanezcan sin experimentar modificaciones.

De otra parte, se observó como la administración de la dieta baja en proteínas producía un aumento significativo en los valores de Vmax de la G6PDH e IDH-NADP de tejido adiposo (Fig. 13), de 1,7 y 1,6 veces respectivamente, no encontrándose ninguna modificación significativa en los restantes parámetros cinéticos, salvo en los valores de la eficiencia catalítica de esos enzimas.

Los restantes sistemas enzimáticos de tejido adiposo, no experimentaron ningún cambio significativo en sus parámetros cinéticos.

De otra parte, los parámetros cinéticos de los cuatro sistemas enzimáticos productores de NADPH en los restantes tejidos (riñón, intestino, músculo esquelético, corazón, bazo, y agallas) no sufrieron, sin embargo, ningún cambio significativo bajo estas condiciones nutricionales.

2.1.2 SUSTITUCION DE GRASAS POR PROTEINA.

Los parámetros cinéticos de los cuatro sistemas productores de NADPH bajo estas condiciones nutricionales se muestran en las Tablas 9-16.

La administración de una dieta a la que se le sustituye parte de su contenido graso por proteína, aumentando por tanto el nivel de proteína y disminuyendo el de

grasa (dieta B vs dieta C), produjo un aumento significativo en los valores de V_{max} para la G6PDH, 6PGDH, e IDH-NADP hepáticos de 2, 2.5, y 1.74 veces respectivamente (Fig. 13), mientras que no se observó ninguna modificación significativa en los parámetros cinéticos del enzima málico para ninguno de los tejidos estudiados.

En estos casos, se obtuvieron típicas curvas hiperbólicas de saturación, así como una estrecha correlación en la representación de dobles recíprocos (Fig. 9-12); además, los restantes parámetros cinéticos no experimentaron ningún cambio significativo, lo que está de acuerdo con un incremento significativo en la eficiencia catalítica de estos enzimas.

La sustitución de grasa por proteína modificó los valores de V_{max} de la G6PDH e IDH-NADP en el tejido adiposo (Fig. 13), produciendo una disminución significativa de dichos enzimas, de un 33% y 35% respectivamente, sin que se produjese ninguna modificación en los restantes parámetros cinéticos, a excepción de la eficiencia catalítica, que sufre una disminución significativa en ambos casos. Ni la 6PGDH, ni el EM de tejido adiposo experimentaron ninguna modificación significativa en sus parámetros cinéticos.

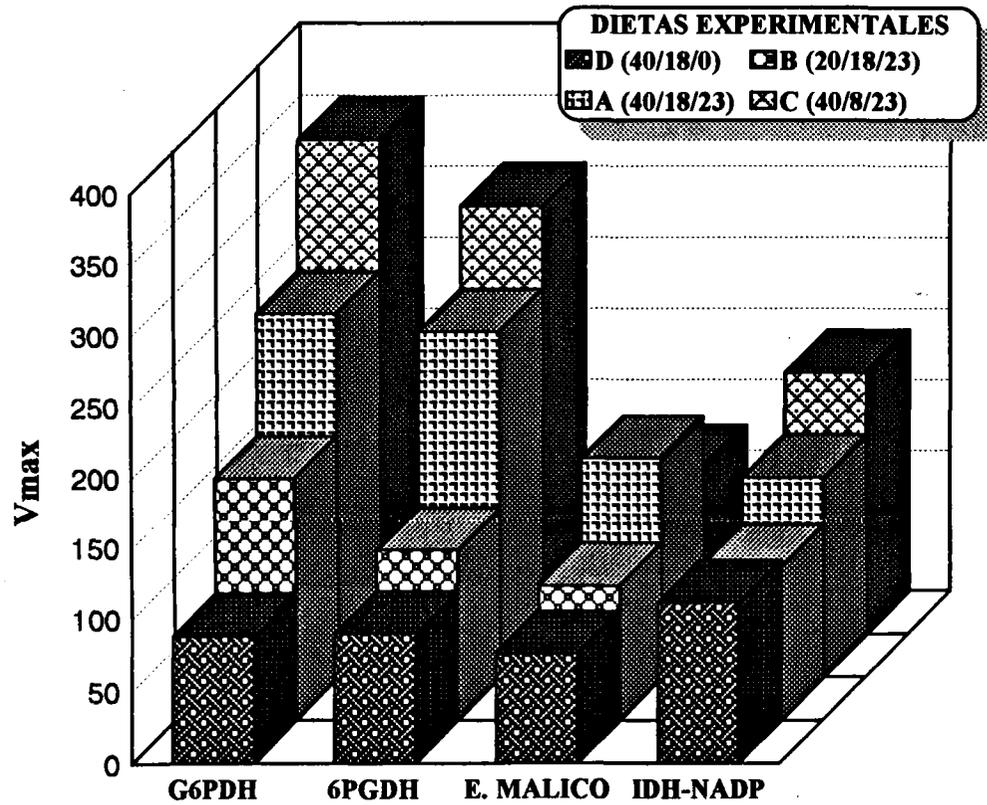
Finalmente, no se encontró cambio alguno en los parámetros cinéticos de estos enzimas en los restantes tejidos sujetos a estudio.

2.1.3 SUSTITUCION DE CARBOHIDRATOS POR PROTEINA .

Se estudió la influencia de la sustitución total de los carbohidratos de la dieta por un nivel de proteína equivalente, y manteniendo el nivel de grasa, sobre los parámetros cinéticos de los sistemas enzimáticos productores de NADPH. Estos resultados se muestran en las Tablas 9-16.

SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH

HIGADO



T. ADIPOSO

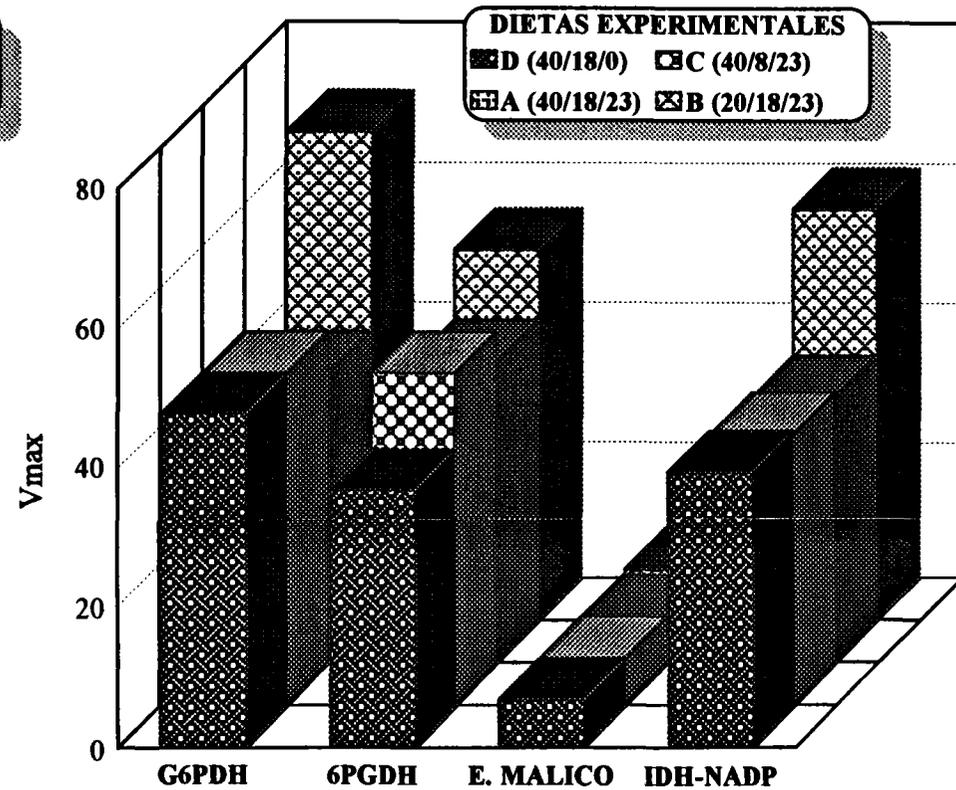


FIGURA 13

Tabla 9. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

	Parámetros cinéticos	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
HIGADO	Vmax	255.74 ± 13.17	169.41 ± 5.40 [ⓐ]	348.39 ± 12.37 ^{ⓐ,ⓑ}	88.10 ± 2.97 ^{ⓐ,ⓑ,ⓓ,ⓔ}
	Km	16.01 ± 1.23	15.10 ± 1.20	15.07 ± 1.56	15.11 ± 1.36
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.45 ± 0.05
	Eficiencia catalítica	15.98 ± 1.35	11.30 ± 0.85 [ⓐ]	19.35 ± 1.35 ^{ⓐ,ⓑ}	5.87 ± 0.47 ^{ⓐ,ⓓ,ⓔ,ⓕ}
RIÑÓN	Vmax	107.36 ± 6.61	91.91 ± 6.37	108.61 ± 5.35	104.32 ± 7.25
	Km	17.04 ± 1.71	12.10 ± 1.35	13.03 ± 1.28	12.01 ± 1.27
	Razón de actividad	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.43 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	6.31 ± 0.58	7.60 ± 0.66	8.35 ± 0.75	8.69 ± 0.80
T. ADIPOSO	Vmax	41.74 ± 2.09	70.30 ± 2.40 [ⓑ]	47.55 ± 4.50 [ⓑ]	47.78 ± 4.43 [ⓑ]
	Km	13.01 ± 1.03	12.00 ± 1.10	12.04 ± 1.00	15.01 ± 1.23
	Razón de actividad	0.40 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.45 ± 0.05	0.34 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	3.21 ± 0.21	5.86 ± 0.42 [ⓓ]	3.96 ± 0.27 [ⓑ]	3.18 ± 0.23 [ⓓ]
INTESTINO	Vmax	0.75 ± 0.15	1.09 ± 0.18	0.80 ± 0.12	0.81 ± 0.17
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en µM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ⓐ Efecto de las proteínas -A vs B-; ⓑ Efecto de las grasas -A vs C-; ⓒ Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (**) los cambios producidos por la sustitución de ⓐ grasas por proteínas -B vs C-; ⓓ carbohidratos por proteínas -B vs D-; ⓔ carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P< 0.05 (a); P< 0.01 (b); P< 0.005 (c); P< 0.001 (d); P< 0.0005 (e); P< 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

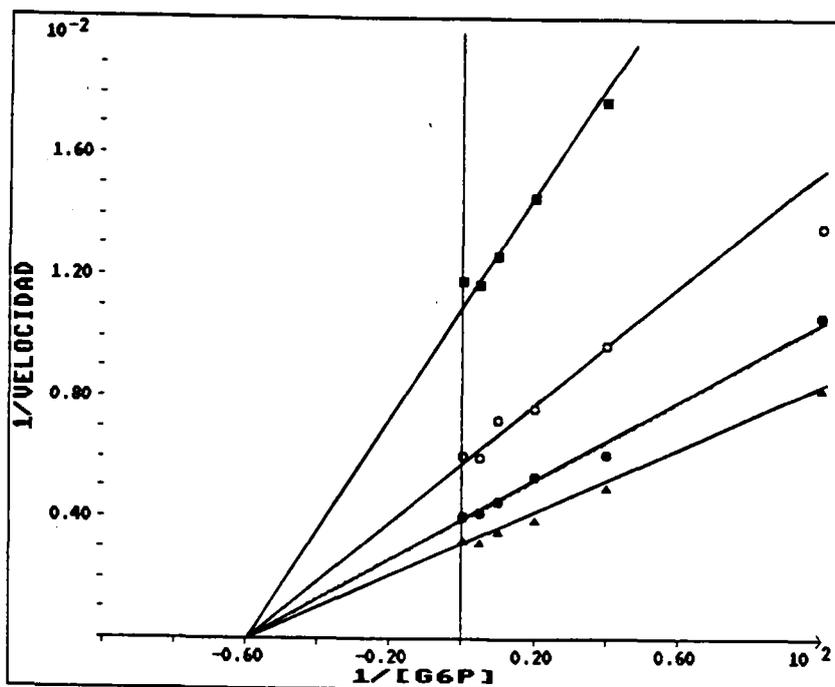
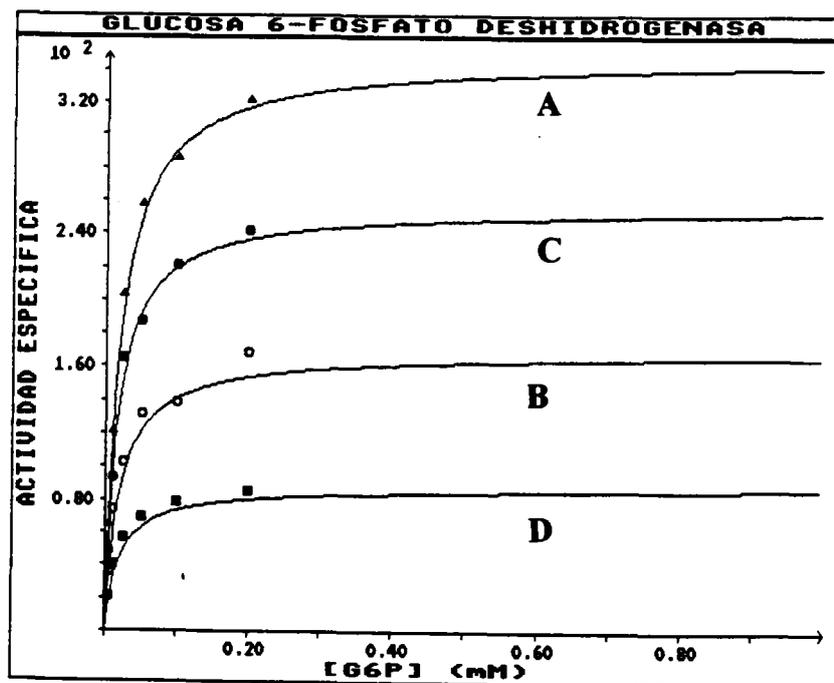


FIGURA 9

Tabla 10. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
MUSCULO	Vmax	0.56 ± 0.06	0.82 ± 0.15	0.90 ± 0.26	0.76 ± 0.15
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
CORAZON	Vmax	5.85 ± 0.62	6.07 ± 0.63	7.81 ± 1.18	6.35 ± 0.71
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
BAZO	Vmax	71.09 ± 4.77	76.92 ± 4.22	70.10 ± 8.10	80.49 ± 9.10
	Km	19.05 ± 1.45	16.04 ± 1.55	19.00 ± 1.56	20.07 ± 1.83
	Razón de actividad	0.34 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	3.74 ± 0.34	4.81 ± 0.46	3.68 ± 0.30	4.02 ± 0.33
AGALLAS	Vmax	46.07 ± 5.16	46.35 ± 5.86	41.69 ± 6.10	50.81 ± 6.12
	Km	23.09 ± 2.00	21.10 ± 1.90	18.00 ± 1.66	22.10 ± 1.90
	Razón de actividad	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.29 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	2.00 ± 0.15	2.21 ± 0.17	2.32 ± 0.16	2.31 ± 0.19

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ① Efecto de las proteínas -A vs B-; ② Efecto de las grasas -A vs C-; ③ Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (**) los cambios producidos por la sustitución de ④ grasas por proteínas -B vs C-; ⑤ carbohidratos por proteínas -B vs D-; ⑥ carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P< 0.05 (a); P< 0.01 (b); P< 0.005 (c); P< 0.001 (d); P< 0.0005 (e); P< 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

Tabla 11. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

	Parámetros cinéticos	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
HIGADO	Vmax	243.26 ± 12.50	118.70 ± 4.41 ^{ⓑf}	301.83 ± 9.73 ^{ⓑb; ⓑf}	89.81 ± 3.19 ^{ⓑf; ⓑd; ⓑf}
	Km	14.00 ± 1.26	12.08 ± 1.15	12.10 ± 1.18	13.00 ± 1.19
	Razón de actividad	0.33 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.35 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	17.37 ± 1.30	9.89 ± 0.74 ^{ⓑc}	25.15 ± 1.89 ^{ⓑb; ⓑe}	6.91 ± 0.52 ^{ⓑe; ⓑa; ⓑf}
RIÑÓN	Vmax	72.75 ± 6.09	66.80 ± 5.81	74.95 ± 7.52	78.73 ± 8.15
	Km	12.00 ± 1.08	11.08 ± 1.45	12.00 ± 1.16	12.10 ± 1.00
	Razón de actividad	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	6.06 ± 0.51	6.03 ± 0.45	6.24 ± 0.56	6.56 ± 0.55
T. ADIPOSO	Vmax	43.32 ± 5.16	53.38 ± 6.12	47.69 ± 5.10	36.81 ± 4.71
	Km	15.00 ± 0.75	16.02 ± 1.01	15.00 ± 1.20	14.01 ± 1.01
	Razón de actividad	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.43 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	2.89 ± 0.23	3.33 ± 0.25	3.19 ± 0.24	2.63 ± 0.20
INTESTINO	Vmax	18.00 ± 2.41	25.70 ± 2.81	20.04 ± 3.00	22.41 ± 2.71
	Km	19.11 ± 1.41	21.10 ± 1.65	18.01 ± 1.46	25.00 ± 2.15
	Razón de actividad	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	0.94 ± 0.08	1.22 ± 0.10	1.11 ± 0.11	0.90 ± 0.08

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ⓑ Efecto de las proteínas -A vs B-; ⓑ Efecto de las grasas -A vs C-; ⓑ Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (**) los cambios producidos por la sustitución de ⓑ grasas por proteínas -B vs C-; ⓑ carbohidratos por proteínas -B vs D-; ⓑ carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P< 0.05 (a); P< 0.01 (b); P< 0.005 (c); P< 0.001 (d); P< 0.0005 (e); P< 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

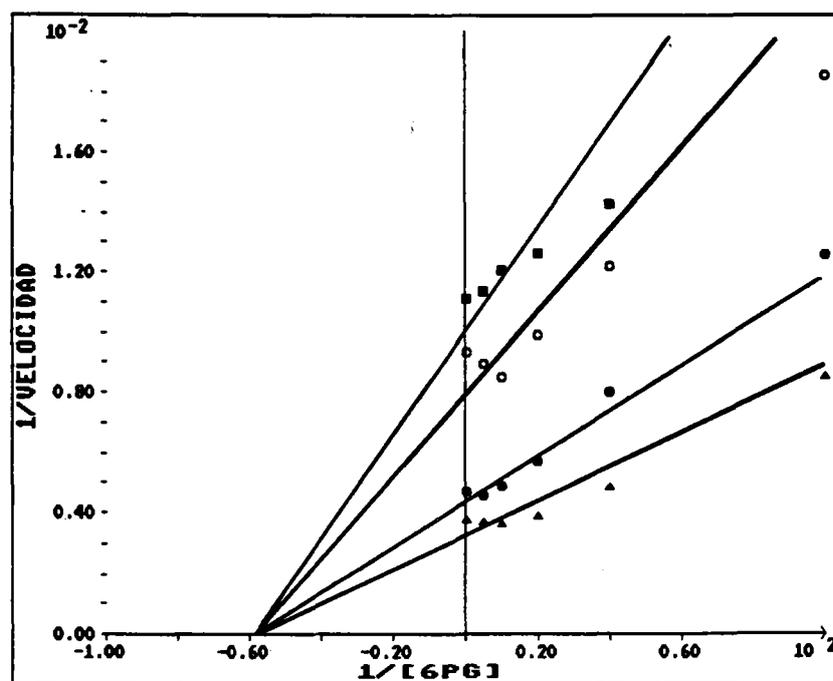
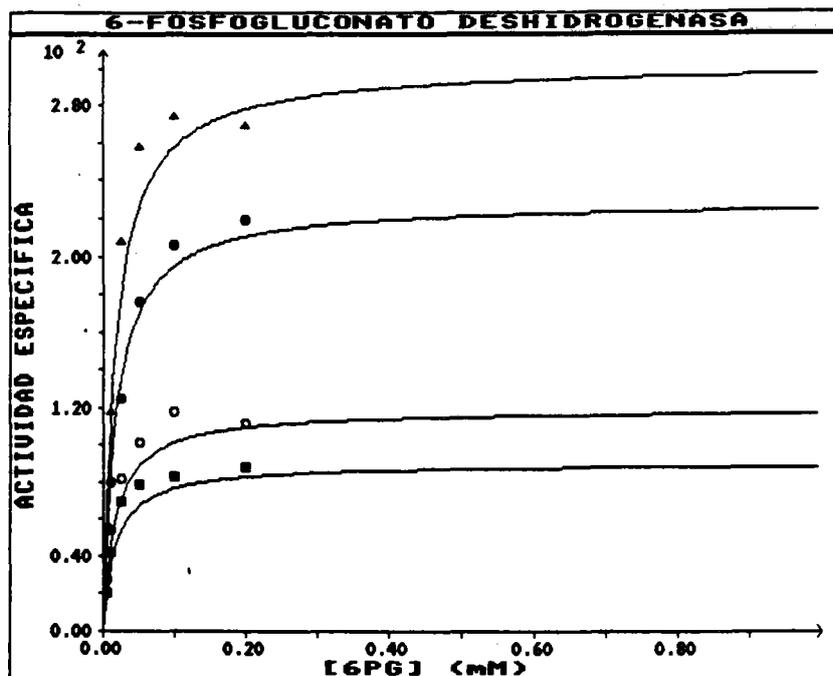


FIGURA 10

Tabla 12. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
MUSCULO	Vmax	2.12 ± 0.18	2.28 ± 0.19	2.30 ± 0.35	2.09 ± 0.24
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
CORAZON	Vmax	8.31 ± 0.69	8.80 ± 0.91	10.73 ± 1.26	8.51 ± 0.81
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
BAZO	Vmax	39.52 ± 4.20	36.64 ± 4.12	38.57 ± 4.10	46.34 ± 5.31
	Km	12.00 ± 1.18	12.10 ± 1.00	11.09 ± 1.02	12.09 ± 1.10
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	3.29 ± 0.28	3.05 ± 0.26	3.51 ± 0.29	3.86 ± 0.40
AGALLAS	Vmax	38.03 ± 4.09	36.03 ± 3.96	35.02 ± 3.61	39.10 ± 4.10
	Km	16.00 ± 1.33	16.10 ± 1.41	14.03 ± 1.22	16.00 ± 1.32
	Razón de actividad	0.38 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	2.38 ± 0.21	2.25 ± 0.19	2.50 ± 0.20	2.44 ± 0.18

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM . La eficiencia catalítica (V_{max}/K_m) viene expresada en $\text{mU/mg prot.M.10}^{-4}$. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ① Efecto de las proteínas -A vs B-; ② Efecto de las grasas -A vs C-; ③ Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (***) los cambios producidos por la sustitución de ④ grasas por proteínas -B vs C-; ⑤ carbohidratos por proteínas -B vs D-; ⑥ carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P < 0.05 (a); P < 0.01 (b); P < 0.005 (c); P < 0.001 (d); P < 0.0005 (e); P < 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

Tabla 13. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos del enzima málico (EM), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

	Parámetros cinéticos	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
HIGADO	Vmax	153.98 ± 16.22	93.32 ± 7.66 [ⓑ]	117.65 ± 3.90	75.69 ± 3.38 ^{ⓐ, ⓑ}
	Km	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	Razón de actividad	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	0.81 ± 0.08	0.50 ± 0.05 [ⓐ]	0.62 ± 0.06	0.42 ± 0.03 ^{ⓐ, ⓑ}
RIÑÓN	Vmax	4.61 ± 0.51	4.80 ± 0.51	4.71 ± 0.26	4.35 ± 0.28
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
T. ADIPOSO	Vmax	6.55 ± 0.72	7.13 ± 0.85	6.61 ± 0.75	6.74 ± 0.82
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
INTESTINO	Vmax	8.52 ± 1.19	8.72 ± 0.70	8.52 ± 1.10	8.48 ± 2.69
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en mM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ⓐ Efecto de las proteínas -A vs B-; ⓑ Efecto de las grasas -A vs C-; ⓒ Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (**) los cambios producidos por la sustitución de ⓐ grasas por proteínas -B vs C-; ⓑ carbohidratos por proteínas -B vs D-; ⓒ carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P < 0.05 (a); P < 0.01 (b); P < 0.005 (c); P < 0.001 (d); P < 0.0005 (e); P < 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

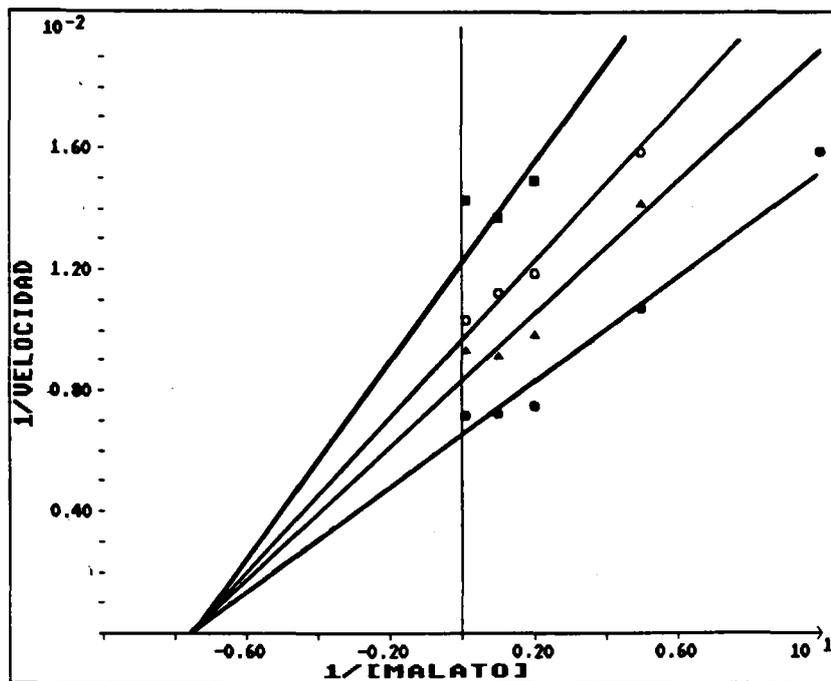
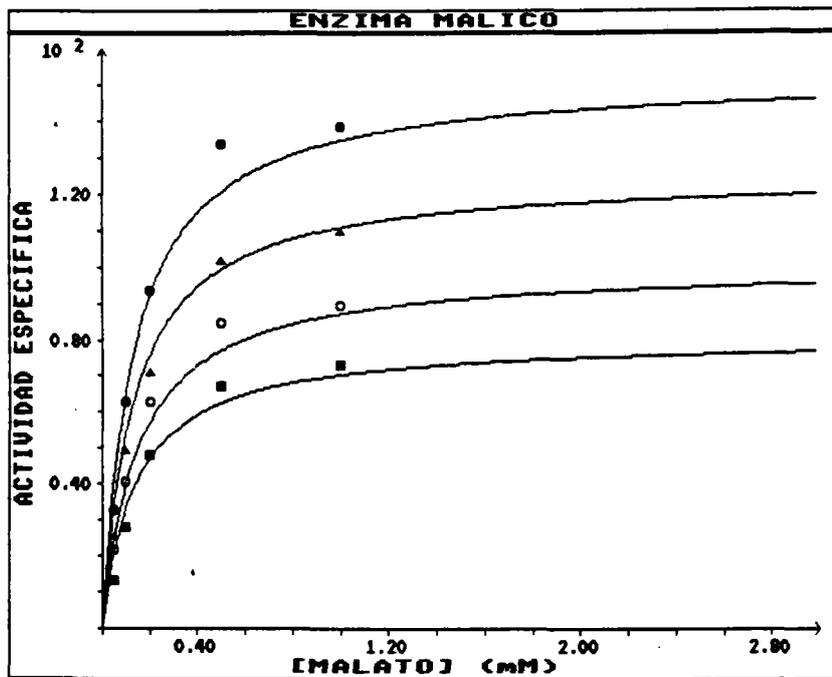


FIGURA 11

Esta situación provocó una disminución significativa en los valores de velocidad máxima (V_{max}) de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato (G6PDH, y 6PGDH) hepáticas de un 48% y 25% respectivamente (Fig. 13); sin embargo, no se observó ningún cambio significativo de este parámetro en los restantes sistemas productores de NADPH hepáticos, y aunque se observa una tendencia a la caída en la V_{max} del enzima málico, ésta no es significativa.

En ambos casos se obtuvieron cinéticas hiperbólicas (Fig. 9-12), así como una estrecha linearidad en las respectivas representaciones de dobles recíprocos. No se encontró, salvo en la eficiencia catalítica, ninguna modificación significativa, tanto en la constante de Michaelis (K_m), como en la razón de actividad.

En el tejido adiposo (Fig. 13), esta situación nutricional produjo una disminución significativa en los valores de V_{max} de la G6PDH e IDH-NADP de un 33% en ambos casos, sin que se observe ningún cambio significativo en los restantes sistemas enzimáticos, aunque existe una ligera disminución, no significativa, en el caso de la 6PGDH.

El comportamiento de los restantes parámetros cinéticos es similar al descrito en los casos anteriores, con modificaciones significativas sólo en los valores de la eficiencia catalítica.

Los parámetros de estos sistemas enzimáticos no se afectaron de manera significativa bajo esta situación nutricional en los restantes tejidos.

2.2 INFLUENCIA DEL NIVEL DE GRASA DE LA DIETA.

2.2.1 EFECTO DE LAS GRASAS.

Se determinó la influencia de una disminución del 55% en el nivel de grasa de la dieta, sobre el comportamiento cinético de los sistemas enzimáticos productores de NADPH.

Los efectos de la disminución en el contenido de grasa de la dieta sobre la velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato en esos sistemas enzimáticos en tejido hepático se muestran en las Fig. 9-12. Los parámetros cinéticos de estos sistemas enzimáticos, en esta situación nutricional se muestran en las Tablas 9-16.

La administración de esta dieta baja en grasas durante un período de cuatro semanas, produjo un aumento significativo en los valores de V_{max} de todos los sistemas enzimáticos estudiados en tejido hepático (Fig. 13), con la excepción del enzima málico, en el que no se observó ningún cambio significativo; al contrario, se aprecia una caída en los valores de V_{max} de este enzima aunque ésta no es significativa.

El aumento significativo en los valores de V_{max} hepáticos descrito para la G6PDH, 6PGDH, e IDH-NADP es de 1.4, 1.2, y 1.3 veces respectivamente, mientras que no se encontraron cambios significativos en la constante de Michaelis (K_m), indicando así un aumento significativo en la eficiencia catalítica de estos enzimas. Este comportamiento cinético confirma el que la razón de actividad en estos sistemas enzimáticos de hígado permanezca sin modificar.

Los parámetros cinéticos de los sistemas de producción de NADPH en el resto de los tejidos, ante esta situación nutricional, no experimentó ningún cambio significativo.

2.2.2 SUSTITUCION DE CARBOHIDRATOS POR GRASAS.

La sustitución de carbohidratos dietarios por grasas, provocó una disminución significativa en los valores de V_{max} de todos los sistemas enzimáticos en hígado. La disminución experimentada por las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato (G6PDH y 6PGDH) fue de un 75% y 70% respectivamente, mientras que para el enzima málico e isocitrato deshidrogenasa-NADP la bajada se concretó en un 35% y 40% respectivamente (Fig. 13). En la totalidad de las situaciones se obtuvieron típicas curvas de saturación hiperbólica para la actividad de estos enzimas, lo que junto con la estrecha linearidad observada en la representación de dobles recíprocos, excluye cualquier efecto de tipo cooperativo para estas actividades enzimáticas (Figs. 9-12).

Los parámetros cinéticos de los sistemas enzimáticos ante esta situación nutricional se muestran en las Tablas 9-16, no encontrándose modificaciones significativas ni en la constante de Michaelis (K_m), ni en la razón de actividad, salvo en la eficiencia catalítica que experimentó una disminución significativa en todos los casos estudiados. Estos parámetros cinéticos en los sistemas enzimáticos de los restantes tejidos no experimentaron ningún tipo de modificación significativa.

2.3 INFLUENCIA DEL NIVEL DE CARBOHIDRATOS DE LA DIETA.

2.3.1 EFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS.

En esta situación nutricional, se investigó la influencia del nivel de carbohidratos de la dieta, sobre la capacidad de adaptación de los sistemas enzimáticos productores de NADPH, para lo cual se administró a los animales una dieta exenta de

carbohidratos, frente a otra con un alto nivel de carbohidratos, y manteniendo los niveles del resto de macronutrientes.

La influencia de la dieta exenta de carbohidratos sobre la velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato en esos sistemas enzimáticos de tejido hepático, se muestra en las Figuras 9-12. Los parámetros cinéticos de estos enzimas, bajo esta condición nutricional, se muestran en las Tablas 9-16.

Tal y como se recoge en dichas Tablas, la administración de la dieta exenta de carbohidratos, produjo una disminución significativa de los valores de velocidad máxima en todos los enzimas hepáticos (Fig. 13); esta caída en las actividades enzimáticas G6PDH y 6PGDH fue de un 65% y 63% respectivamente, mientras que era de 51% y 21% para el enzima málico y la isocitrato deshidrogenasa -NADP.

El comportamiento cinético fue el característico de enzimas con cinética hiperbólica, excluyéndose cualquier posible efecto cooperativo tal y como se desprende además, de la representación de dobles recíprocos para estas actividades enzimáticas (Figs. 9-12).

No se apreciaron cambios significativos en la constante de Michaelis (K_m), indicando una disminución significativa en la eficiencia catalítica de dichos enzimas, lo que confirma la falta de modificación en los valores de la razón de actividad de todos los sistemas enzimáticos en el tejido hepático de estos animales.

No se observó ningún tipo de adaptación de estos enzimas ante esta situación nutricional, en los restantes tejidos, lo que se refleja en la inexistencia de cambios significativos en la totalidad de sus parámetros cinéticos.

Tabla 14. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos del enzima málico (EM), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

Parámetros cinéticos		Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
MUSCULO	Vmax	7.13 ± 0.83	7.75 ± 0.91	7.83 ± 0.89	8.87 ± 0.81
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
CORAZON	Vmax	33.11 ± 4.17	38.16 ± 5.12	36.71 ± 4.81	39.00 ± 4.71
	Km	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.03
	Razón de actividad	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01
BAZO	Vmax	2.15 ± 0.22	2.73 ± 0.27	2.59 ± 0.23	2.49 ± 0.29
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
AGALLAS	Vmax	5.24 ± 0.74	5.75 ± 0.69	5.79 ± 0.53	6.41 ± 0.69
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en mM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ① Efecto de las proteínas -A vs B-; ② Efecto de las grasas -A vs C-; ③ Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (***) los cambios producidos por la sustitución de ④ grasas por proteínas -B vs C-; ⑤ carbohidratos por proteínas -B vs D-; ⑥ carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P< 0.05 (a); P< 0.01 (b); P< 0.005 (c); P< 0.001 (d); P< 0.0005 (e); P< 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

Tabla 15. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos de la isocitrato deshidrogenasa NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

	Parámetros cinéticos	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
HIGADO	Vmax	140.58 ± 6.50	106.02 ± 8.99 [ⓐ]	184.67 ± 6.58 [ⓐ] ; [ⓔ]	111.42 ± 5.20 [ⓑ] ; [ⓕ]
	Km	5.04 ± 0.35	5.00 ± 0.30	5.01 ± 0.30	5.00 ± 0.31
	Razón de actividad	0.43 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.42 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	28.12 ± 1.35	21.20 ± 1.80 [ⓐ]	36.93 ± 2.86 [ⓐ] ; [ⓔ]	22.28 ± 1.73 [ⓐ] ; [ⓔ]
RIÑÓN	Vmax	49.06 ± 5.16	47.42 ± 5.22	47.93 ± 6.12	42.07 ± 5.33
	Km	5.06 ± 0.24	5.10 ± 0.23	5.00 ± 0.31	5.00 ± 0.48
	Razón de actividad	0.41 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.37 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	9.81 ± 0.89	9.48 ± 0.80	9.60 ± 0.97	8.41 ± 0.76
T. ADIPOSO	Vmax	38.34 ± 4.12	59.25 ± 4.31 [ⓑ]	39.01 ± 4.20 [ⓑ]	39.53 ± 4.12 [ⓐ]
	Km	10.10 ± 1.00	9.08 ± 0.88	10.00 ± 0.89	9.00 ± 0.87
	Razón de actividad	0.38 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	3.83 ± 0.41	6.58 ± 0.47 [ⓔ]	3.90 ± 0.42 [ⓔ]	4.39 ± 0.46 [ⓐ]
INTESTINO	Vmax	0.63 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.64 ± 0.06	0.72 ± 0.08
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en µM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ⓐ Efecto de las proteínas -A vs B-; ⓑ Efecto de las grasas -A vs C-; ⓒ Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (**) los cambios producidos por la sustitución de ⓔ grasas por proteínas -B vs C-; ⓕ carbohidratos por proteínas -B vs D-; ⓖ carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P < 0.05 (a); P < 0.01 (b); P < 0.005 (c); P < 0.001 (d); P < 0.0005 (e); P < 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

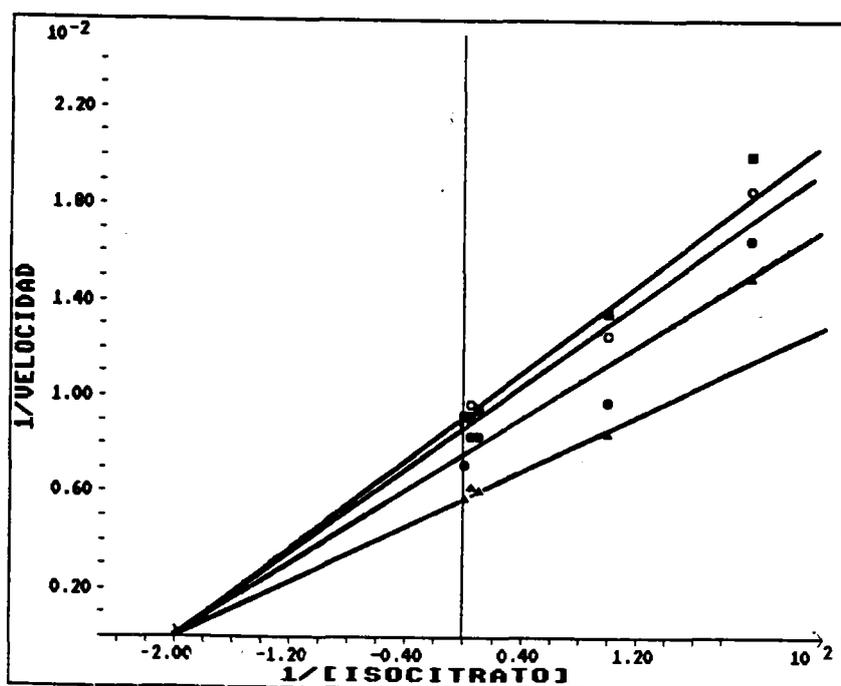
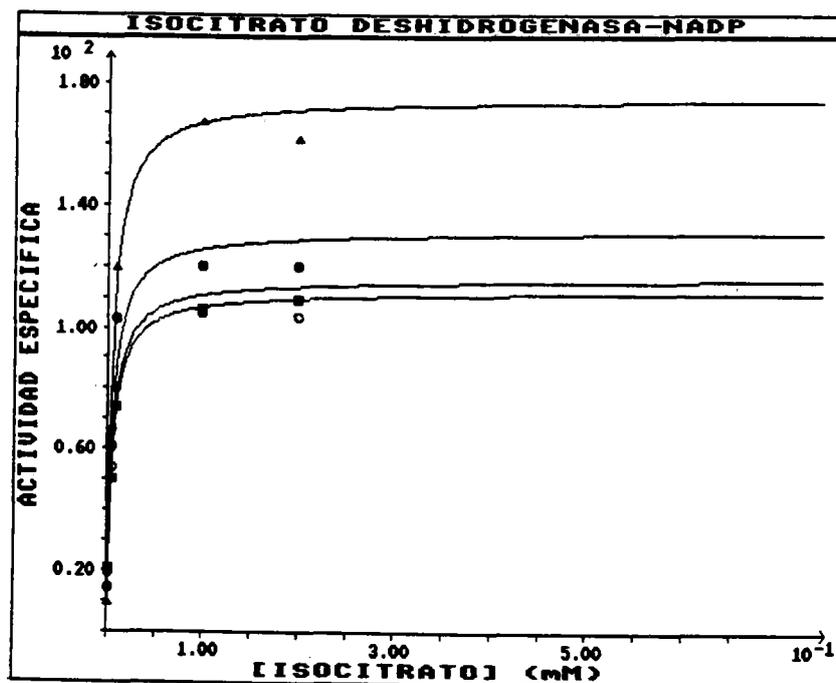


FIGURA 12

Tabla 16. Efecto de distintos macronutrientes dietarios sobre los parámetros cinéticos de la isocitrato deshidrogenasa-NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*).

	Parámetros cinéticos	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
MUSCULO	Vmax	40.42 ± 4.87	43.21 ± 5.21	47.06 ± 5.36	41.97 ± 5.41
	Km	7.10 ± 0.58	8.03 ± 0.70	8.00 ± 0.76	8.00 ± 0.75
	Razón de actividad	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	5.77 ± 0.61	5.40 ± 0.45	5.88 ± 0.45	5.25 ± 0.40
CORAZON	Vmax	622.60 ± 65.81	620.11 ± 67.10	675.27 ± 71.10	664.81 ± 74.80
	Km	20.00 ± 1.56	20.01 ± 1.32	20.00 ± 1.78	20.10 ± 1.49
	Razón de actividad	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	31.13 ± 2.59	31.00 ± 2.09	33.76 ± 2.67	33.24 ± 2.88
BAZO	Vmax	9.83 ± 0.92	8.20 ± 0.61	7.91 ± 0.91	8.75 ± 0.87
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd
AGALLAS	Vmax	52.83 ± 5.60	52.12 ± 6.12	56.53 ± 6.18	49.30 ± 5.31
	Km	nd	nd	nd	nd
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de cinco animales. La actividad específica del enzima se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis-Menten (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias significativas encontradas entre las distintas situaciones nutricionales se expresan mediante (*) los cambios producidos por variaciones en los niveles de: ● Efecto de las proteínas -A vs B-; ● Efecto de las grasas -A vs C-; ● Efecto de los Carbohidratos -A vs D-; (**) los cambios producidos por la sustitución de ● grasas por proteínas -B vs C-; ● carbohidratos por proteínas -B vs D-; ● carbohidratos por grasas -C vs D-. El grado de significación encontrado se expresa por: P< 0.05 (a); P< 0.01 (b); P< 0.005 (c); P< 0.001 (d); P< 0.0005 (e); P< 0.0001 (f). En los casos restantes las diferencias no fueron significativas; nd, no determinado.

3. INFLUENCIA DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH EN TRUCHA ARCO-IRIS (*O. mykiss*), CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.

3.1 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.

Se estudió el efecto de las situaciones de ayuno y realimentación sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en varios tejidos de trucha arco-iris con diferentes pesos (180g, 100g, y 30g), al objeto de determinar la capacidad adaptativa del enzima a dichas situaciones.

Los parámetros cinéticos del enzima en los distintos tejidos se muestran en las Tablas 17-19. Los datos obtenidos, en los tres pesos estudiados, demuestran que existe una disminución significativa en los valores de velocidad máxima del enzima, en los tejidos hepático, adiposo e intestinal. En los animales de peso superior (180g), (Tablas 17a, 17b), se encontró una disminución significativa de la V_{max} de en hígado y tejido adiposo de un 65%, respecto de valores controles, a partir del día 98 del experimento (Fig. 14), sin que hasta entonces hubiese habido ningún cambio significativo de este parámetro.

A partir de este día, se alcanza un nuevo equilibrio en el estado estacionario del enzima, de forma que, al día 155 del experimento, iniciada ya la realimentación el día 133, se produce un incremento significativo en los valores de V_{max} por encima de valores controles, de casi 5,4 veces y 5 veces, para el hígado y tejido adiposo respectivamente (Fig. 14), con la diferencia de que el tejido adiposo responde a la realimentación más rápida y progresivamente que el hígado, ya que a los 8 días de

realimentación, el primero ha experimentado un incremento significativo en sus valores de V_{max} de tres veces respecto de valores ayunados, mientras que es a partir del octavo día de realimentación cuando experimentan un incremento significativo los valores de velocidad máxima del enzima hepático.

Con respecto al otro tejido modulado, el intestino, la situación de ayuno produce un aumento significativo de casi veinte veces en los valores de V_{max} del enzima respecto de valores controles a partir del día 35 del experimento, los cuales se mantienen hasta que, una vez iniciada la realimentación, se alcanzan de nuevo los valores controles en el octavo día de realimentación (Fig. 15).

De acuerdo con este comportamiento cinético, en ninguno de los tejidos modulados se encontraron cambios significativos, a lo largo de las situaciones estudiadas, ni en la constante de Michaelis (K_m), ni en la razón de actividad, al contrario de lo que ocurre con la eficiencia catalítica de hígado y tejido adiposo, en la que sí se encontraron diferencias significativas con un patrón de respuesta similar al descrito anteriormente para los valores de velocidad máxima (Tablas 17a, 17b).

El comportamiento cinético de la actividad G6PDH en riñón, músculo, bazo, agallas, y corazón, exhibió una enorme falta de respuesta adaptativa, ya que no experimentó ningún cambio significativo bajo estas condiciones experimentales; destacando además, la baja actividad del enzima en músculo tanto esquelético como cardíaco con unos valores, a lo largo de ambas situaciones, de 1 mUnidad y 4 mUnidades respectivamente.

El comportamiento cinético frente a la situación de ayuno de la actividad G6PDH en los animales de 100g (Tablas 18a, 18b), fue similar al descrito para los animales de 180g, aunque el patrón de respuesta varía, ya que el tiempo en que se alcanza el nuevo estado estacionario del enzima es considerablemente menor que en el caso de los animales de 180g

Tabla 17a. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)							
		DIAS	0	7	14	28	35	42	49
HIGADO	Vmax		170.83 ± 18.21	200.22 ± 21.16	180.46 ± 19.23	176.44 ± 16.31	178.43 ± 18.12	184.23 ± 19.10	161.13 ± 18.3
	Km		12.00 ± 1.37	17.25 ± 1.83	16.20 ± 1.71	16.11 ± 1.77	15.23 ± 1.66	15.10 ± 1.60	15.16 ± 1.60
	Razón de actividad		0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.33 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		14.23 ± 1.52	11.77 ± 1.30	11.27 ± 1.30	11.03 ± 1.18	11.89 ± 1.23	12.28 ± 1.30	10.74 ± 1.20
RIÑÓN	Vmax		116.33 ± 11.24	102.68 ± 18.9	107.32 ± 12.15	100.35 ± 13.5	104.48 ± 12.30	104.25 ± 11.10	100.68 ± 11.01
	Km		17.00 ± 1.81	15.08 ± 1.57	15.00 ± 1.60	17.32 ± 1.80	16.09 ± 1.70	15.16 ± 1.60	14.07 ± 1.50
	Razón de actividad		0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		6.84 ± 0.72	6.84 ± 0.70	7.15 ± 0.81	6.69 ± 0.70	6.53 ± 0.75	6.95 ± 0.72	6.71 ± 0.69
T. ADIPOSEO	Vmax		36.46 ± 4.15	39.38 ± 4.13	30.94 ± 3.52	27.95 ± 3.16	33.24 ± 3.89	29.36 ± 3.53	31.79 ± 3.45
	Km		15.11 ± 1.57	16.33 ± 1.67	13.10 ± 1.40	12.00 ± 1.22	13.10 ± 1.43	13.00 ± 1.38	15.00 ± 1.54
	Razón de actividad		0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		2.43 ± 0.25	2.46 ± 0.26	2.38 ± 0.25	2.32 ± 0.24	2.56 ± 0.26	2.26 ± 0.23	2.12 ± 0.22
INTESTINO	Vmax		0.50 ± 0.06	2.40 ± 0.35	0.55 ± 0.06	0.50 ± 0.06	20.06 ± 2.56 [⊙]	23.17 ± 2.34	18.56 ± 2.01
	Km		nd	nd	nd	nd	14.88 ± 1.50	14.00 ± 1.39	14.98 ± 1.50
	Razón de actividad		-	-	-	-	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		-	-	-	-	1.34 ± 0.12	1.65 ± 0.20	1.24 ± 0.13
BAZO	Vmax		84.46 ± 8.23	94.38 ± 9.51	80.63 ± 7.16	99.56 ± 8.16	84.61 ± 9.10	80.30 ± 7.32	75.40 ± 6.16
	Km		21.12 ± 0.23	19.00 ± 2.00	15.87 ± 1.61	22.57 ± 2.37	20.99 ± 2.19	21.07 ± 2.27	19.28 ± 2.00
	Razón de actividad		0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.36 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		4.01 ± 0.42	4.99 ± 0.51	5.03 ± 0.55	4.41 ± 0.47	4.03 ± 0.51	3.81 ± 0.40	3.91 ± 0.40
AGALLAS	Vmax		50.10 ± 5.53	52.12 ± 5.54	49.87 ± 6.12	57.47 ± 5.89	53.12 ± 5.46	51.99 ± 5.56	55.69 ± 6.01
	Km		17.89 ± 1.82	18.00 ± 1.80	17.00 ± 1.67	18.87 ± 1.90	18.99 ± 1.90	18.00 ± 1.86	18.89 ± 1.90
	Razón de actividad		0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		2.78 ± 0.28	2.89 ± 0.29	2.93 ± 0.30	3.02 ± 0.38	2.79 ± 0.29	2.89 ± 0.30	2.93 ± 0.31

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM . La eficiencia catalítica ($V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$) viene expresada en $\text{mU}/\text{mg prot} \cdot \text{M} \cdot 10^{-4}$. Las diferencias eran significativas para : [⊙] $p < 0.05$; [⊙] $p < 0.005$; [⊙] $p < 0.001$; nd, no determinado.

Tabla 17b. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)					REALIMENTACION		
		DIAS	77	98	119	133	141	155	170
HIGADO	Vmax	143.86 ± 13.10	63.87 ± 7.21 ^①	61.52 ± 7.89 ^①	67.32 ± 7.45 ^①	90.68 ± 11.21	363.59 ± 40.18 ^①	171.10 ± 15.25	
	Km	17.10 ± 1.80	16.12 ± 1.71	18.00 ± 1.91	16.32 ± 1.70	17.01 ± 1.80	16.30 ± 1.71	15.10 ± 1.56	
	Razón de actividad	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.34 ± 0.04	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	8.46 ± 0.96	3.99 ± 0.41 ^①	3.42 ± 0.38 ^①	4.21 ± 0.49 ^①	5.33 ± 0.60	22.72 ± 2.31 ^①	11.41 ± 1.20	
RIÑÓN	Vmax	104.11 ± 14.01	89.87 ± 9.21	92.08 ± 10.10	113.53 ± 12.30	115.63 ± 13.21	100.89 ± 14.23	114.63 ± 12.15	
	Km	14.66 ± 1.50	14.13 ± 1.48	14.10 ± 1.52	18.11 ± 1.90	16.33 ± 1.72	18.12 ± 1.99	16.00 ± 1.58	
	Razón de actividad	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	7.10 ± 0.72	6.43 ± 0.70	6.58 ± 0.70	6.30 ± 0.71	7.04 ± 0.71	6.73 ± 0.80	7.16 ± 0.80	
T. ADIPOSO	Vmax	29.77 ± 3.69	14.03 ± 1.42 ^①	10.42 ± 1.20 ^①	13.30 ± 1.23 ^①	39.08 ± 4.13 ^①	66.47 ± 6.79 ^①	32.23 ± 4.18	
	Km	13.02 ± 1.38	17.00 ± 1.76	14.99 ± 1.50	16.89 ± 1.70	16.00 ± 1.64	13.91 ± 1.43	15.00 ± 1.47	
	Razón de actividad	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.05	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.29 ± 0.30	0.82 ± 0.09 ^①	0.69 ± 0.07 ^①	0.78 ± 0.08 ^①	2.44 ± 0.25 ^①	4.75 ± 0.49 ^①	2.15 ± 0.23	
INTESTINO	Vmax	19.85 ± 2.10	19.88 ± 1.89	22.15 ± 2.30	24.04 ± 2.45	0.50 ± 0.06 ^①	1.05 ± 0.13	0.95 ± 0.08	
	Km	16.00 ± 1.70	14.88 ± 1.50	16.00 ± 1.58	14.78 ± 1.55	nd	nd	nd	
	Razón de actividad	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	nd	nd	nd	
	Eficiencia catalítica	1.24 ± 0.14	1.32 ± 0.14	1.38 ± 0.14	1.60 ± 1.78	nd	nd	nd	
BAZO	Vmax	82.93 ± 9.10	77.10 ± 8.11	81.44 ± 9.16	70.54 ± 8.44	78.36 ± 9.34	76.35 ± 9.97	87.65 ± 9.09	
	Km	20.08 ± 2.10	17.68 ± 1.82	19.52 ± 2.00	17.63 ± 1.80	21.35 ± 2.33	19.62 ± 2.00	20.86 ± 2.00	
	Razón de actividad	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	4.13 ± 0.43	4.36 ± 0.48	4.17 ± 0.49	4.00 ± 0.43	3.67 ± 0.45	3.89 ± 0.45	4.17 ± 0.47	
AGALLAS	Vmax	60.18 ± 7.02	57.32 ± 5.89	56.87 ± 5.98	60.54 ± 6.54	52.32 ± 5.87	60.23 ± 6.57	53.19 ± 5.98	
	Km	19.10 ± 2.00	17.88 ± 1.88	19.00 ± 1.98	17.86 ± 1.82	18.23 ± 1.85	18.99 ± 1.90	18.00 ± 1.74	
	Razón de actividad	0.30 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.03	
	Eficiencia catalítica	3.16 ± 0.32	3.18 ± 0.34	2.99 ± 0.33	3.36 ± 0.35	2.91 ± 0.31	3.17 ± 0.35	2.95 ± 0.32	

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ①p<0.05; ②p<0.005; ③p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 18a. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (100g)					
		DIAS	0	7	28	70	77
HIGADO	Vmax		185.50 ± 19.00	181.93 ± 17.85	124.69 ± 13.06 ^①	67.85 ± 7.36 ^②	65.14 ± 7.12
	Km		14.17 ± 1.58	14.36 ± 1.75	16.7 ± 1.78	15.23 ± 1.70	16.23 ± 1.80
	Razón de actividad		0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		13.09 ± 1.33	12.66 ± 1.30	7.47 ± 0.85 ^③	4.45 ± 0.45 ^③	4.01 ± 0.43
RIÑÓN	Vmax		104.97 ± 11.20	95.76 ± 10.1	101.09 ± 9.46	86.10 ± 9.11	97.44 ± 9.88
	Km		13.18 ± 1.41	14.81 ± 1.40	15.13 ± 1.64	13.00 ± 1.37	15.33 ± 1.74
	Razón de actividad		0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		7.96 ± 0.81	6.46 ± 0.71	6.68 ± 0.71	6.62 ± 0.78	6.35 ± 0.68
T. ADIPOSO	Vmax		40.99 ± 4.23	42.16 ± 4.53	33.26 ± 3.58	20.34 ± 2.13 ^③	22.16 ± 2.33
	Km		14.13 ± 1.52	15.23 ± 1.63	16.22 ± 1.71	15.99 ± 1.60	14.88 ± 1.51
	Razón de actividad		0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		2.90 ± 0.31	2.77 ± 0.28	2.05 ± 0.23	1.27 ± 0.13 ^③	1.31 ± 0.12
INTESTINO	Vmax		0.53 ± 0.06	0.86 ± 0.09	25.35 ± 3.16 ^③	22.56 ± 3.00	20.44 ± 2.13
	Km		nd	nd	15.23 ± 1.48	14.59 ± 1.62	16.08 ± 1.70
	Razón de actividad		nd	nd	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		nd	nd	1.66 ± 0.18	1.54 ± 0.16	1.45 ± 0.14
BAZO	Vmax		71.45 ± 8.16	66.18 ± 7.24	73.12 ± 7.69	80.12 ± 9.01	68.39 ± 7.58
	Km		18.75 ± 1.56	17.28 ± 1.66	18.22 ± 1.99	16.37 ± 1.77	17.65 ± 1.88
	Razón de actividad		0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.44	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		3.81 ± 0.40	3.82 ± 0.46	4.01 ± 0.40	4.28 ± 0.50	3.87 ± 0.41
AGALLAS	Vmax		52.71 ± 6.00	49.98 ± 5.27	53.67 ± 5.64	48.58 ± 5.00	54.94 ± 5.73
	Km		17.23 ± 1.84	17.00 ± 1.66	18.39 ± 1.77	17.10 ± 1.88	18.30 ± 1.89
	Razón de actividad		0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		3.06 ± 0.34	2.94 ± 0.30	2.92 ± 0.30	2.84 ± 0.30	3.00 ± 0.02

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μ M. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 18b. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		REALIMENTACION (100g)						
DIAS		77 (2h)	81	85	92	99	114	
HIGADO	Vmax	62.41 ± 7.10	73.41 ± 7.12	97.57 ± 10.45 ^①	270.44 ± 25.42 ^②	193.31 ± 17.14	179.36 ± 15.40	
	Km	16.10 ± 1.89	16.70 ± 1.75	14.60 ± 1.55	14.03 ± 1.50	15.79 ± 1.89	14.16 ± 1.55	
	Razón de actividad	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	3.88 ± 0.42	4.39 ± 0.55	6.68 ± 0.71 ^①	19.27 ± 2.01 ^②	12.24 ± 1.30	12.66 ± 1.31	
RIÑÓN	Vmax	100.46 ± 9.17	111.68 ± 11.20	88.26 ± 9.09	95.63 ± 9.88	98.77 ± 9.07	88.00 ± 7.12	
	Km	15.00 ± 1.40	17.02 ± 1.66	13.32 ± 1.49	13.22 ± 1.79	15.32 ± 1.49	13.69 ± 1.49	
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	6.69 ± 0.71	6.56 ± 0.70	6.62 ± 0.69	7.23 ± 0.75	6.45 ± 0.71	6.43 ± 0.68	
T. ADIPOSO	Vmax	23.16 ± 2.66	29.25 ± 3.00	37.30 ± 3.81 ^①	66.30 ± 5.63 ^②	45.64 ± 4.65	42.33 ± 4.71	
	Km	16.00 ± 1.59	14.56 ± 1.47	15.22 ± 1.55	14.12 ± 1.71	15.14 ± 1.66	14.58 ± 1.50	
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	1.44 ± 0.12	2.01 ± 0.18	2.45 ± 0.22 ^①	4.69 ± 0.55 ^②	3.01 ± 0.30	2.90 ± 0.30	
INTESTINO	Vmax	24.39 ± 2.56	0.20 ± 0.02 ^②	3.66 ± 0.41	0.50 ± 0.06	0.88 ± 0.09	1.56 ± 0.25	
	Km	16.89 ± 1.55	nd	nd	nd	nd	nd	
	Razón de actividad	0.32 ± 0.03	nd	nd	nd	nd	nd	
	Eficiencia catalítica	1.44 ± 0.13	nd	nd	nd	nd	nd	
BAZO	Vmax	72.16 ± 7.22	70.19 ± 8.06	65.64 ± 7.69	66.91 ± 7.89	78.67 ± 8.13	72.91 ± 7.99	
	Km	18.99 ± 1.66	17.00 ± 1.73	17.68 ± 1.59	17.23 ± 1.52	18.23 ± 1.70	18.82 ± 1.59	
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	3.79 ± 0.41	4.12 ± 0.45	3.71 ± 0.39	3.88 ± 0.40	4.31 ± 0.48	3.87 ± 0.44	
AGALLAS	Vmax	52.79 ± 5.44	57.75 ± 5.66	48.52 ± 5.16	55.16 ± 4.99	49.41 ± 5.00	55.88 ± 6.03	
	Km	16.10 ± 1.77	19.20 ± 2.00	18.09 ± 1.84	17.63 ± 1.83	16.71 ± 1.67	17.88 ± 1.66	
	Razón de actividad	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.27 ± 0.03	
	Eficiencia catalítica	3.27 ± 0.34	3.00 ± 0.31	2.68 ± 0.28	3.13 ± 0.35	2.96 ± 0.31	3.12 ± 0.33	

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

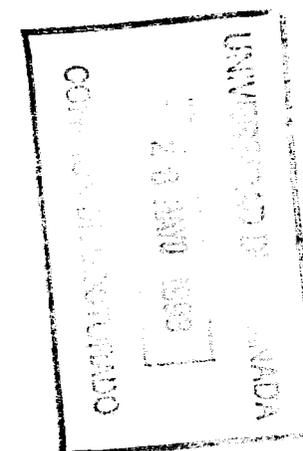


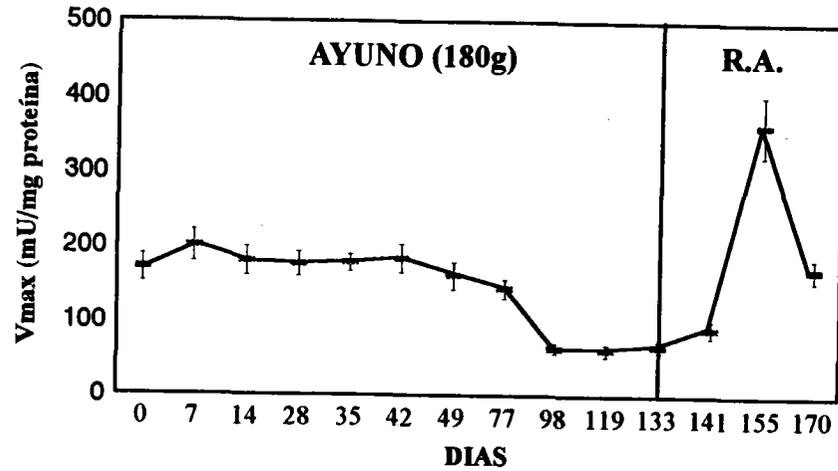
Tabla 19. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (30g)			REALIMENTACION				
		DIAS	0	35	39	43	50	57	72
HIGADO	Vmax	178.02 ± 18.65	94.98 ± 10.11 ^①	87.36 ± 9.16	89.17 ± 8.97	139.38 ± 14.16 ^②	245.62 ± 18.32 ^③	168.33 ± 15.13	
	Km	14.13 ± 1.31	15.12 ± 1.67	14.13 ± 1.55	15.14 ± 1.66	14.17 ± 1.52	14.14 ± 1.57	14.19 ± 1.49	
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.41 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	12.60 ± 1.20	6.28 ± 0.65 ^③	6.18 ± 0.55	5.88 ± 0.50	9.84 ± 0.91 ^①	17.37 ± 1.65 ^③	11.89 ± 1.10	
RIÑÓN	Vmax	89.36 ± 9.16	80.19 ± 7.69	96.77 ± 8.17	93.47 ± 8.69	101.38 ± 11.00	87.37 ± 9.00	95.37 ± 10.01	
	Km	14.48 ± 1.34	13.18 ± 1.51	15.36 ± 1.94	15.36 ± 1.63	16.37 ± 1.70	14.32 ± 1.57	15.34 ± 1.44	
	Razón de actividad	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	6.17 ± 0.55	6.08 ± 0.50	6.30 ± 0.57	6.08 ± 0.60	6.19 ± 0.60	6.10 ± 0.55	6.21 ± 0.50	
T. ADIPOSO	Vmax	42.81 ± 4.36	24.21 ± 2.56 ^③	22.39 ± 2.47	38.92 ± 4.00 ^③	51.34 ± 5.00	80.71 ± 7.16 ^③	38.79 ± 4.29	
	Km	15.27 ± 1.30	15.18 ± 1.49	15.10 ± 1.61	16.04 ± 1.78	16.13 ± 1.60	13.09 ± 1.49	15.23 ± 1.67	
	Razón de actividad	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.39 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.80 ± 0.30	1.59 ± 0.12 ^③	1.48 ± 0.12	2.43 ± 0.18 ^③	3.18 ± 0.32	6.16 ± 0.56 ^③	2.54 ± 0.24	
INTESTINO	Vmax	0.55 ± 0.06	19.68 ± 2.07 ^③	0.92 ± 0.09 ^③	0.88 ± 0.09	1.23 ± 0.15	0.90 ± 0.09	1.00 ± 0.01	
	Km	nd	15.67 ± 1.64	nd	nd	nd	nd	nd	
	Razón de actividad	nd	0.31 ± 0.03	nd	nd	nd	nf	nd	
	Eficiencia catalítica	nd	1.25 ± 0.12 ^③	nd	nd	nd	nd	nd	
BAZO	Vmax	81.36 ± 8.25	88.25 ± 9.16	73.80 ± 7.00	82.64 ± 7.16	78.61 ± 9.37	80.00 ± 7.65	76.37 ± 8.17	
	Km	18.29 ± 1.86	20.00 ± 2.13	18.36 ± 1.56	19.32 ± 1.86	17.88 ± 1.99	19.33 ± 1.85	20.13 ± 2.22	
	Razón de actividad	0.35 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.35 ± 0.03	
	Eficiencia catalítica	4.44 ± 0.50	4.41 ± 0.48	4.01 ± 0.37	4.50 ± 0.39	4.40 ± 0.40	4.14 ± 0.37	5.79 ± 0.51	
AGALLAS	Vmax	56.71 ± 5.69	49.74 ± 5.67	57.12 ± 6.00	55.77 ± 5.67	56.92 ± 5.00	49.64 ± 5.10	52.88 ± 4.99	
	Km	20.87 ± 2.00	18.55 ± 1.78	19.37 ± 1.99	19.00 ± 1.88	20.00 ± 2.34	18.37 ± 1.97	17.33 ± 2.22	
	Razón de actividad	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.03	
	Eficiencia catalítica	2.72 ± 0.26	2.68 ± 0.21	2.95 ± 0.25	2.93 ± 0.20	2.85 ± 0.26	2.70 ± 0.26	3.05 ± 0.35	

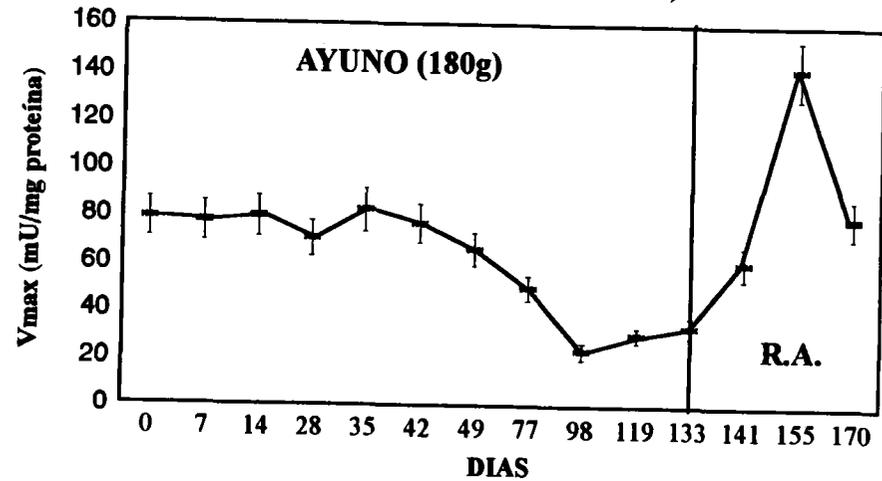
Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μ M. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

AYUNO Y REALIMENTACION

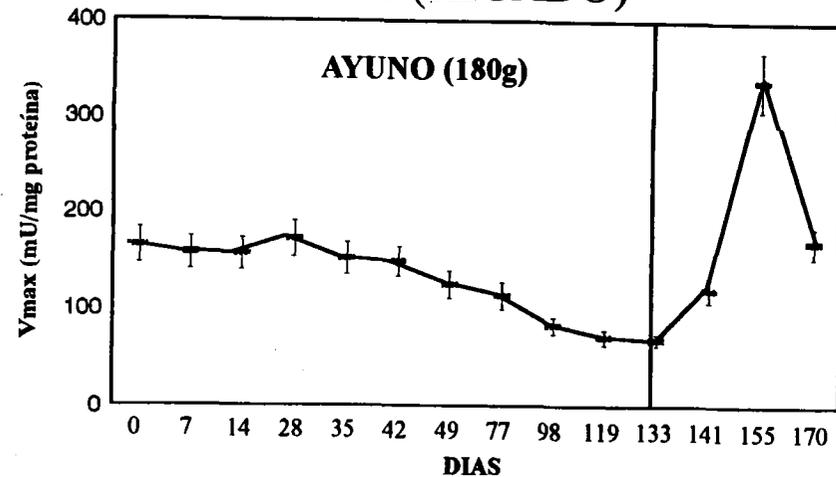
G6PDH (HIGADO)



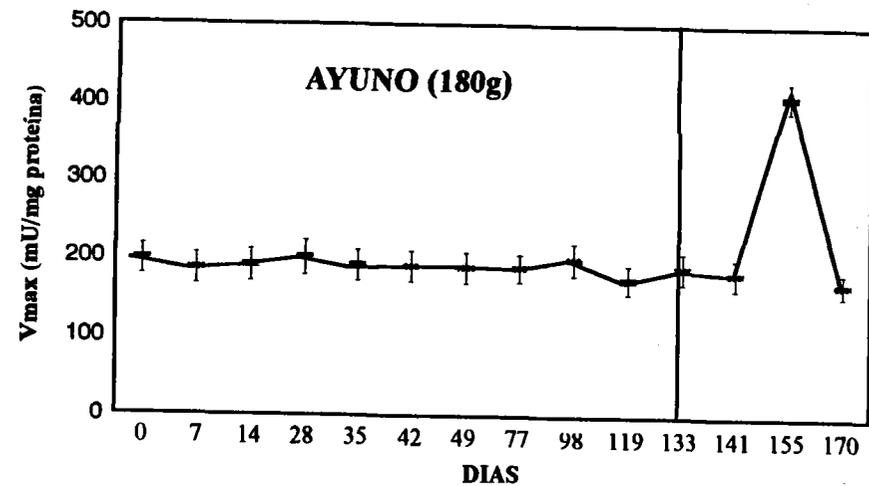
E. MALICO (HIGADO)



6PGDH (HIGADO)



IDH-NADP (HIGADO)



En este peso, tanto la velocidad máxima en hígado como en tejido adiposo experimenta una disminución significativa de un 65% y un 52% respectivamente, siendo en estos animales, a partir del día 28 de ayuno en el caso del hígado, y del día 70 para el tejido adiposo, cuando se produce sea disminución en los valores de V_{max} , mientras que en el peso anterior, hasta el día 98 de la situación de ayuno, no se producía una modificación significativa de la actividad enzimática en ambos tejidos.

De otra parte, en la situación de realimentación, el patrón de respuesta es similar en ambos tejidos, ya que hasta transcurridos 8 días desde el inicio de la realimentación (día 77), no se observan cambios significativos en ninguno de los parámetros cinéticos. Se produce un incremento significativo en los valores de V_{max} de 4.5 veces y 3.3 veces para hígado y tejido adiposo respectivamente en el día 92 de la situación experimental; los valores de este parámetro cinético han ido aumentando progresiva y proporcionalmente una vez iniciada la realimentación en ambos tejidos, tal y como se observa en las Tablas 18a y 18b, exhibiendo el tejido hepático una capacidad de respuesta mucho más rápida que en el peso de 180g (en este último, el incremento significativo en los valores de V_{max} respecto de valores ayunados, ocurría el día 23 de la realimentación).

Tanto el comportamiento cinético, como el patrón de respuesta adaptativo en intestino, son similares a los descritos para el peso anterior (Tablas 18a y 18b).

No se encontraron diferencias significativas, ni en la constante de Michaelis (K_m) ni en la razón de actividad; consecuentemente, sí se obtuvieron diferencias significativas en los valores de eficiencia catalítica del enzima, en las dos situaciones estudiadas, que acompañaban a los cambios descritos para los valores de velocidad máxima. Tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguno de los

parámetros cinéticos de esta actividad enzimática en el resto de los tejidos estudiados en el presente estadio corporal.

Anteriormente, se ha descrito una mayor prontitud en la respuesta adaptativa del enzima hepático y de tejido adiposo para los animales de 100g que para los de 180g; dicha capacidad de adaptación se acentúa al estudiar el comportamiento de la actividad G6PDH durante la situación de ayuno y en animales con un peso de 30g (Tabla 19). En este caso, los valores de V_{max} disminuyen significativamente tan sólo transcurridos 35 días, para el hígado y el tejido adiposo, en un 47% y 56% respectivamente (aunque en el peso de 100g los valores de V_{max} del enzima hepático sí disminuían significativamente respecto de valores controles a los 28 días de ayuno, el tejido adiposo no lo hacía hasta los 70 días).

En cuanto al comportamiento cinético del enzima durante el transcurso de la realimentación, se observa un incremento gradual de los valores de V_{max} del tejido adiposo a partir del octavo día de realimentación hasta alcanzar unos valores de casi 3.5 veces respecto de valores ayunados, a los 23 días del inicio de la realimentación; mientras que la respuesta del hígado es menos progresiva, ya que es a los 15 días de realimentación cuando se produce un incremento significativo en sus valores de velocidad máxima, hasta alcanzar el día 23 de esta situación unos valores casi tres veces los obtenidos en la situación de ayuno.

El intestino sigue mostrando en este peso la misma capacidad de respuesta que en pesos precedentes (Tabla 19), produciéndose un incremento significativo de los valores de V_{max} en la situación de ayuno de casi 40 veces respecto de los valores controles; además, estos valores se restablecen a los cuatro días del comienzo de la realimentación.

En concordancia con los resultados obtenidos en los pesos anteriores, tampoco se encontraron cambios significativos en el resto de los parámetros cinéticos de los

tejidos modulados, salvo en el caso de la eficiencia catalítica que manifestaba un comportamiento similar al referido para los pesos de 180g y 100g.

En el resto de los tejidos (riñón, músculo esquelético, bazo, agallas, y corazón), no se evidenciaron diferencias significativas en el comportamiento de ninguno de sus parámetros cinéticos (Tabla 19).

De otra parte, hay que destacar la trayectoria seguida por el índice hepatosomático (IHS), a lo largo de las dos situaciones experimentales. Este parámetro, en los animales de 180g, sufre una disminución significativa de casi un 50% en la primera semana de ayuno (Fig. 15), no experimentando ningún cambio significativo, hasta transcurridos 8 días de iniciada la realimentación, para aumentar de manera gradual y significativa, hasta alcanzar unos valores máximos, de casi 4.5 veces respecto de valores ayunados, a los 23 días de realimentación. Posteriormente cae hasta valores controles, a los 37 días de realimentación.

3.2 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LA ACTIVIDAD 6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.

Los efectos del ayuno a largo plazo y la realimentación, sobre los parámetros cinéticos de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en tejidos de animales con un peso de 180g se muestra en las Tablas 20a y 20b.

Los enzimas hepático y de tejido adiposo, sufren una disminución significativa en sus valores de velocidad máxima de un 59% y 37% respectivamente. Esta caída es significativa con respecto a valores controles, a partir del día 98 de ayuno para el enzima hepático, y del día 119 de ayuno para el enzima de tejido adiposo (Fig. 16).

Tabla 20a. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)							
		DIAS	0	7	14	28	35	42	49
HIGADO	Vmax		164.50 ± 18.14	156.70 ± 16.50	155.68 ± 16.53	170.85 ± 18.53	151.15 ± 16.54	147.45 ± 15.16	124.38 ± 13.69
	Km		13.10 ± 0.14	13.90 ± 1.42	13.00 ± 1.40	13.88 ± 1.43	13.16 ± 1.40	11.99 ± 1.31	13.16 ± 1.40
	Razón de actividad		0.33 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.33 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		12.65 ± 1.31	11.19 ± 1.20	11.97 ± 1.30	12.20 ± 1.30	11.62 ± 1.23	12.28 ± 1.35	9.57 ± 1.15
RIÑÓN	Vmax		81.42 ± 8.43	92.08 ± 10.42	90.03 ± 9.16	83.54 ± 9.16	92.75 ± 9.23	92.03 ± 8.98	85.36 ± 9.21
	Km		11.89 ± 1.30	14.87 ± 1.50	12.99 ± 1.30	13.10 ± 1.35	14.00 ± 1.50	14.10 ± 1.48	12.00 ± 1.33
	Razón de actividad		0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		6.79 ± 0.73	6.14 ± 0.70	6.92 ± 0.71	6.42 ± 0.70	6.62 ± 0.70	6.57 ± 0.67	7.11 ± 0.73
T. ADIPOSO	Vmax		40.31 ± 4.04	46.08 ± 4.24	41.54 ± 4.21	41.50 ± 4.64	39.47 ± 3.74	31.37 ± 3.65	30.97 ± 3.75
	Km		15.88 ± 1.66	14.00 ± 1.49	15.89 ± 1.64	13.99 ± 1.41	15.98 ± 1.60	16.00 ± 1.68	14.00 ± 1.50
	Razón de actividad		0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		2.52 ± 0.26	3.29 ± 0.40	2.59 ± 0.28	2.96 ± 0.35	2.47 ± 0.27	1.96 ± 0.22	2.21 ± 0.24
INTESTINO	Vmax		19.06 ± 2.01	23.61 ± 2.41	21.10 ± 1.96	22.16 ± 2.34	1.12 ± 0.13 [ⓐ]	1.39 ± 0.15	0.64 ± 0.08
	Km		22.06 ± 2.21	20.11 ± 2.19	21.00 ± 2.20	23.79 ± 2.40	nd	nd	nd
	Razón de actividad		0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.29 ± 0.03	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica		0.87 ± 0.09	1.18 ± 0.12	1.00 ± 0.12	0.92 ± 0.09	nd	nd	nd
BAZO	Vmax		40.21 ± 4.12	36.66 ± 3.45	40.23 ± 4.58	36.54 ± 3.45	42.97 ± 4.27	42.91 ± 4.17	38.54 ± 4.11
	Km		15.16 ± 1.60	15.00 ± 1.54	15.99 ± 1.60	12.86 ± 1.38	16.01 ± 1.70	16.00 ± 1.63	14.87 ± 1.51
	Razón de actividad		0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		2.68 ± 0.30	2.44 ± 0.26	2.51 ± 0.26	2.81 ± 0.33	2.68 ± 0.30	2.68 ± 0.30	2.57 ± 0.26
AGALLAS	Vmax		40.40 ± 4.33	43.17 ± 4.12	42.19 ± 4.74	40.40 ± 4.13	44.23 ± 4.14	42.35 ± 5.00	50.15 ± 5.11
	Km		14.08 ± 1.50	15.00 ± 1.52	16.10 ± 1.62	15.87 ± 1.60	15.00 ± 1.50	14.09 ± 1.60	16.00 ± 1.62
	Razón de actividad		0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		2.88 ± 0.31	2.88 ± 0.30	2.64 ± 0.28	2.52 ± 0.26	2.95 ± 0.31	3.02 ± 0.33	3.13 ± 0.35

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM . La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en $\text{mU/mg prot.M.10}^{-4}$. Las diferencias eran significativas para : [ⓐ]p<0.05; [ⓑ]p<0.005; [ⓒ]p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 20b. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*), con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)				REALIMENTACION			
		DIAS	77	98	119	133	141	155	170
HIGADO	Vmax	112.74 ± 13.45	87.72 ± 8.31 [●]	70.67 ± 7.56	67.89 ± 5.46	118.59 ± 12.34 [●]	338.64 ± 30.54 [●]	167.46 ± 15.63	
	Km	13.25 ± 1.34	13.97 ± 1.44	13.07 ± 1.40	16.00 ± 1.70	13.92 ± 1.40	13.08 ± 1.33	14.12 ± 1.50	
	Razón de actividad	0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	8.67 ± 0.90	6.26 ± 0.67 [●]	5.44 ± 0.61	4.24 ± 0.45	8.47 ± 0.91 [●]	26.05 ± 2.71 [●]	11.96 ± 1.27	
RIÑON	Vmax	84.71 ± 8.61	89.08 ± 8.21	85.54 ± 8.78	78.65 ± 9.01	83.54 ± 9.12	87.74 ± 8.12	86.52 ± 8.34	
	Km	13.17 ± 1.40	14.00 ± 1.42	13.98 ± 1.46	13.10 ± 1.40	14.00 ± 1.50	12.89 ± 1.30	13.00 ± 1.40	
	Razón de actividad	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.01	
	Eficiencia catalítica	6.52 ± 0.68	6.36 ± 0.70	6.11 ± 0.68	6.05 ± 0.71	5.97 ± 0.70	6.75 ± 0.71	6.65 ± 0.69	
T. ADIPOSEO	Vmax	33.45 ± 3.78	35.49 ± 4.10	25.32 ± 2.98 [●]	26.45 ± 2.74	34.04 ± 3.67	81.47 ± 8.63 [●]	42.74 ± 4.32	
	Km	14.00 ± 1.43	14.88 ± 1.57	16.00 ± 1.73	16.13 ± 1.60	15.04 ± 1.55	15.00 ± 1.51	15.98 ± 1.60	
	Razón de actividad	0.43 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.39 ± 0.24	2.37 ± 0.24	1.58 ± 0.20 [●]	1.65 ± 0.19	2.27 ± 0.25	5.43 ± 0.60 [●]	2.67 ± 0.27	
INTESTINO	Vmax	0.64 ± 0.08	3.46 ± 0.40	0.66 ± 0.07	0.88 ± 0.09	23.96 ± 3.14 [●]	23.35 ± 2.58	20.17 ± 2.17	
	Km	nd	nd	nd	nd	19.16 ± 1.97	21.10 ± 2.18	20.17 ± 2.15	
	Razón de actividad	nd	nd	nd	nd	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	
	Eficiencia catalítica	nd	nd	nd	nd	1.26 ± 0.13	1.11 ± 0.12	1.01 ± 0.12	
BAZO	Vmax	42.17 ± 4.32	38.56 ± 3.89	43.54 ± 4.51	39.54 ± 3.17	48.56 ± 4.16	40.20 ± 4.52	38.78 ± 3.64	
	Km	15.10 ± 1.55	15.97 ± 1.60	16.00 ± 1.71	14.00 ± 1.48	15.88 ± 1.61	16.08 ± 1.70	14.99 ± 1.53	
	Razón de actividad	0.35 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.40 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.81 ± 0.31	2.41 ± 0.30	2.72 ± 0.28	2.82 ± 0.30	3.03 ± 0.35	2.51 ± 0.30	2.58 ± 0.28	
AGALLAS	Vmax	47.77 ± 4.23	41.36 ± 4.64	47.84 ± 4.87	51.36 ± 4.68	46.79 ± 4.71	50.70 ± 4.97	43.24 ± 4.61	
	Km	15.00 ± 1.53	15.97 ± 1.63	16.10 ± 1.70	16.00 ± 1.70	15.01 ± 1.55	15.88 ± 1.60	15.00 ± 1.52	
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.88 ± 0.29	2.58 ± 0.30	2.99 ± 0.31	3.21 ± 0.30	3.10 ± 0.35	3.17 ± 0.33	2.87 ± 0.31	

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ●p<0.05; ●p<0.005; ●p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 21a. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (100g)					
		DIAS	0	7	28	70	77
HIGADO	Vmax		170.83 ± 17.56	168.23 ± 15.69	139.85 ± 14.59	84.02 ± 9.16 ^②	70.17 ± 6.89 ^②
	Km		11.56 ± 1.23	12.36 ± 1.35	11.23 ± 1.55	13.50 ± 1.44	13.42 ± 1.28
	Razón de actividad		0.36 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		14.77 ± 1.55	13.61 ± 1.40	12.45 ± 1.32	6.22 ± 0.73 ^②	5.23 ± 0.61 ^②
RIÑÓN	Vmax		86.87 ± 9.16	73.58 ± 8.16	80.86 ± 8.55	79.16 ± 7.89	89.41 ± 9.35
	Km		11.16 ± 1.33	11.37 ± 1.45	13.16 ± 1.44	11.16 ± 1.54	13.17 ± 1.49
	Razón de actividad		0.40 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		7.78 ± 0.81	6.47 ± 0.70	6.14 ± 0.69	7.09 ± 0.80	6.78 ± 0.70
T. ADIPOSO	Vmax		42.39 ± 4.49	39.18 ± 4.29	41.25 ± 3.69	17.91 ± 1.84 ^②	18.28 ± 1.92
	Km		15.37 ± 1.63	15.37 ± 1.73	16.59 ± 1.44	16.24 ± 1.79	15.37 ± 1.47
	Razón de actividad		0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		2.76 ± 0.30	2.55 ± 0.26	2.48 ± 0.25	1.10 ± 0.13 ^②	1.19 ± 0.14
INTESTINO	Vmax		25.16 ± 2.64	24.42 ± 2.51	2.16 ± 0.27 ^②	2.47 ± 0.31	2.26 ± 0.37
	Km		20.16 ± 2.20	21.39 ± 2.00	nd	nd	nd
	Razón de actividad		0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	nd	nd	nd
	Eficiencia catalítica		1.25 ± 0.13	1.00 ± 0.11	nd	nd	nd
BAZO	Vmax		41.23 ± 4.28	37.28 ± 4.44	36.09 ± 4.10	38.59 ± 4.89	42.16 ± 4.54
	Km		13.16 ± 1.42	14.12 ± 1.50	15.23 ± 1.63	14.23 ± 1.62	14.57 ± 1.59
	Razón de actividad		0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		3.13 ± 0.35	2.64 ± 0.31	2.37 ± 0.25	2.71 ± 0.30	2.89 ± 0.33
AGALLAS	Vmax		43.72 ± 4.59	43.78 ± 4.57	44.49 ± 5.00	46.46 ± 5.00	44.18 ± 4.27
	Km		14.13 ± 1.41	15.16 ± 1.62	16.23 ± 1.72	16.73 ± 1.70	13.47 ± 1.64
	Razón de actividad		0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		3.09 ± 0.31	2.88 ± 0.30	2.74 ± 0.30	2.77 ± 0.29	3.27 ± 0.35

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ①p<0.05; ②p<0.005; ③p<0.001; nd, no determinado.

En la situación de realimentación se produjo un incremento significativo en los valores de este parámetro cinético, de casi 5 y 3 veces para hígado y tejido adiposo respectivamente, transcurridos 23 días del principio de la realimentación, alcanzándose dichos valores de velocidad máxima de forma más paulatina en hígado que en tejido adiposo (Fig. 16).

En concordancia con esta pauta de comportamiento, no se encontraron diferencias significativas, ni en la constante de Michaelis ni en la razón de actividad. Sin embargo, la eficiencia catalítica siguió el mismo modelo de expresión. que la V_{max} , tanto en la situación de ayuno como en la de realimentación

El comportamiento de la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa en el intestino (Fig. 17), es diametralmente opuesto al encontrado en ese mismo tejido para la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Así, los valores de V_{max} a los 35 días de ayuno sufren una disminución significativa de aproximadamente 18 veces respecto de valores controles, manteniéndose invariable durante el curso del período de ayuno. Posteriormente, se alcanzan los valores controles a los 8 días del inicio de la realimentación.

En cuanto a lresto de los tejidos estudiados, no presentaron modificaciones en ninguno de sus parámetros cinéticos, a lo largo tanto del ayuno como de la realimentación.

El comportamiento de los parámetros cinéticos del enzima hepático y de tejido adiposo en los animales de 100g (Tablas 21a, 21b), durante el ayuno y la realimentación, fue similar al encontrado en los animales de 180g, salvo en que la respuesta adaptativa fue más temprana en el tiempo.

Los valores de V_{max} experimentaron una disminución significativa de un 58%, tanto en hígado como en tejido adiposo, a partir del día 70 de ayuno. Dichos valores se

Tabla 21b. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		REALIMENTACION (100g)						
		DIAS	77 (2h)	81	85	92	99	114
HIGADO	Vmax		77.45 ± 7.88	70.55 ± 7.64	125.06 ± 11.33 [●]	247.16 ± 22.96 [●]	196.93 ± 20.29	177.83 ± 18.49
	Km		14.12 ± 1.33	13.16 ± 1.67	14.31 ± 1.49	13.12 ± 1.45	14.28 ± 1.37	13.51 ± 1.46
	Razón de actividad		0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		5.48 ± 0.61	5.36 ± 0.60	8.73 ± 0.91 [●]	18.84 ± 2.00 [●]	13.79 ± 1.45	13.16 ± 0.41
RIÑÓN	Vmax		83.16 ± 9.34	77.16 ± 8.11	87.14 ± 8.88	80.16 ± 8.17	77.22 ± 6.59	82.36 ± 7.98
	Km		11.16 ± 1.37	12.68 ± 1.54	11.23 ± 1.39	13.44 ± 1.51	12.21 ± 1.67	13.23 ± 1.37
	Razón de actividad		0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		7.45 ± 0.66	6.08 ± 0.70	7.75 ± 0.81	7.01 ± 0.75	6.32 ± 0.70	6.22 ± 0.69
T. ADIPOSO	Vmax		20.16 ± 2.67	24.82 ± 2.78	43.67 ± 4.52 [●]	57.58 ± 5.55 [●]	37.69 ± 4.13	42.16 ± 4.99
	Km		17.38 ± 2.00	15.87 ± 1.67	13.18 ± 1.49	14.69 ± 1.79	14.39 ± 1.54	15.37 ± 1.60
	Razón de actividad		0.36 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		1.15 ± 0.12	1.56 ± 0.16	3.31 ± 0.35 [●]	3.92 ± 0.40 [●]	2.62 ± 0.20	2.74 ± 0.25
INTESTINO	Vmax		2.18 ± 0.30	21.47 ± 2.26 [●]	22.37 ± 2.35	24.71 ± 27.39	23.78 ± 4.31	24.39 ± 2.51
	Km		nd	20.16 ± 2.01	21.16 ± 2.00	22.15 ± 2.37	18.16 ± 1.97	24.37 ± 2.32
	Razón de actividad		nd	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		nd	1.06 ± 0.12	1.06 ± 0.13	1.11 ± 0.13	1.31 ± 0.13	1.00 ± 0.89
BAZO	Vmax		46.34 ± 5.89	42.04 ± 4.18	35.29 ± 3.69	39.64 ± 4.00	38.72 ± 3.91	45.16 ± 6.79
	Km		16.19 ± 1.72	13.44 ± 1.47	14.57 ± 1.52	16.27 ± 1.64	15.27 ± 1.61	14.37 ± 1.58
	Razón de actividad		0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		2.86 ± 0.29	3.12 ± 0.33	2.42 ± 0.21	2.44 ± 0.26	2.53 ± 0.24	3.14 ± 0.28
AGALLAS	Vmax		45.91 ± 5.00	50.29 ± 5.52	51.33 ± 4.37	42.37 ± 4.64	44.27 ± 4.55	49.54 ± 5.16
	Km		14.37 ± 1.44	16.33 ± 1.72	16.88 ± 1.78	15.27 ± 1.56	14.17 ± 1.51	17.22 ± 1.84
	Razón de actividad		0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		3.19 ± 0.32	3.08 ± 0.33	3.08 ± 0.27	2.77 ± 0.30	3.12 ± 0.28	2.88 ± 0.29

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM . La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en $\text{mU}/\text{mg prot} \cdot \text{M} \cdot 10^{-4}$. Las diferencias eran significativas para : [●]p<0.05; ^{●●}p<0.005; ^{●●●}p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 22. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (30g)			REALIMENTACION				
		DIAS	0	35	39	43	50	57	72
HIGADO	Vmax	192.37 ± 15.34	95.75 ± 8.79 [●]	92.91 ± 8.99	93.52 ± 9.45	194.71 ± 22.37 [●]	257.97 ± 22.16 [●]	176.39 ± 18.63	
	Km	14.16 ± 1.32	12.16 ± 1.33	12.14 ± 1.18	14.16 ± 1.53	13.12 ± 1.49	12.19 ± 1.33	14.10 ± 1.55	
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.35 ± 0.03	
	Eficiencia catalítica	13.58 ± 1.22	7.87 ± 0.66 [●]	7.65 ± 0.60	6.60 ± 0.71	14.84 ± 1.31 [●]	21.16 ± 1.80 [●]	12.50 ± 1.00	
RIÑÓN	Vmax	86.86 ± 9.17	78.83 ± 8.10	83.71 ± 8.56	75.37 ± 8.00	78.51 ± 7.00	83.20 ± 9.00	84.37 ± 7.69	
	Km	13.28 ± 1.40	12.16 ± 1.33	12.18 ± 1.29	11.68 ± 1.50	11.29 ± 1.39	14.28 ± 1.51	11.39 ± 1.40	
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	7.70 ± 0.70	6.48 ± 0.70	6.87 ± 0.70	6.45 ± 0.06	6.95 ± 0.70	6.26 ± 0.50	7.40 ± 0.70	
T. ADIPOSEO	Vmax	41.69 ± 4.19	25.88 ± 2.67 [●]	23.59 ± 2.40	41.10 ± 4.00 [●]	43.80 ± 4.12	64.11 ± 6.37 [●]	39.57 ± 4.00	
	Km	15.37 ± 1.79	15.00 ± 1.60	17.38 ± 1.89	15.37 ± 1.60	14.19 ± 1.13	16.00 ± 1.54	13.89 ± 1.40	
	Razón de actividad	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.41 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.81 ± 0.26	1.72 ± 0.15 [●]	1.36 ± 0.12	2.67 ± 0.25 [●]	3.09 ± 0.24	3.77 ± 0.30 [●]	2.85 ± 0.23	
INTESTINO	Vmax	20.46 ± 2.16	2.01 ± 0.29 [●]	19.38 ± 2.24 [●]	25.63 ± 3.00	20.18 ± 2.34	23.87 ± 2.43	26.37 ± 3.59	
	Km	18.69 ± 1.89	nd	19.37 ± 2.00	20.39 ± 2.00	22.37 ± 2.31	21.37 ± 1.99	20.00 ± 1.96	
	Razón de actividad	0.29 ± 0.03	nd	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.03	
	Eficiencia catalítica	1.09 ± 0.10	nd	1.00 ± 0.09	1.26 ± 0.11	0.90 ± 0.09	1.12 ± 0.10	1.32 ± 0.11	
BAZO	Vmax	39.60 ± 4.00	36.02 ± 4.00	38.34 ± 4.10	40.19 ± 4.30	37.39 ± 3.97	43.37 ± 5.00	37.00 ± 4.10	
	Km	15.37 ± 1.77	14.68 ± 1.50	15.00 ± 1.56	19.34 ± 2.22	15.24 ± 1.60	14.39 ± 1.60	14.40 ± 1.80	
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.35 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.58 ± 0.22	2.45 ± 0.23	2.56 ± 0.20	2.08 ± 0.20	2.45 ± 0.23	3.01 ± 0.27	2.57 ± 0.26	
AGALLAS	Vmax	42.62 ± 5.00	45.34 ± 4.67	47.63 ± 5.10	39.57 ± 5.00	50.00 ± 6.10	46.00 ± 4.89	38.37 ± 4.00	
	Km	15.23 ± 2.00	16.37 ± 1.70	14.37 ± 1.57	16.00 ± 1.55	16.00 ± 1.49	15.39 ± 1.60	15.00 ± 1.80	
	Razón de actividad	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	2.79 ± 0.23	2.76 ± 0.23	3.31 ± 0.28	2.47 ± 0.20	3.12 ± 0.26	2.98 ± 0.24	2.56 ± 0.28	

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ●p<0.05; ●p<0.005; ●p<0.001; nd, no determinado.

mantienen sin cambios significativos durante el resto del período de ayuno, empezando a incrementar de manera significativa frente a valores ayunados, a partir del octavo día de realimentación (día 85 de experimento), alcanzando un incremento significativo de 3.5 veces y 3 veces, para hígado y tejido adiposo respectivamente a los 15 días del período de realimentación. La consecución de los valores controles de velocidad máxima se restablecen más lentamente en el hígado -se alcanzan a los 23 días de producido el aumento por encima de valores controles-, que en el tejido adiposo, ya que en este último se alcanzan a la semana de haberse producido el incremento máximo en los valores de velocidad máxima.

El comportamiento del intestino (Tablas 21a, 21b) es en el mismo sentido que el reseñado en los animales de peso superior, experimentando una disminución significativa en los valores de V_{max} de alrededor de trece veces a partir del día 28 de ayuno, y que se mantiene constante durante el resto del período de ayuno, hasta el cuarto día de realimentación, en que se restauran los valores controles.

No se observaron diferencias significativas en el resto de los parámetros cinéticos objeto de estudio, excepto en la eficiencia catalítica; mientras que en los tejidos restantes siguieron un patrón similar al seguido en los animales de 180g.

El curso de la adaptación del enzima hepático y de tejido adiposo, en los animales de 30g, durante las situaciones de ayuno y realimentación, se realizó de manera más rápida a la obtenida en los pesos anteriormente descritos. Así, los valores de velocidad máxima sufren una disminución significativa de un 50% y 40%, en hígado y tejido adiposo respectivamente, a los 35 días de iniciado el período de ayuno. La repuesta del enzima de tejido adiposo ante la realimentación se produce antes que en hígado, ya que se alcanzan valores controles a los 8 días de implantada la realimentación; no obstante, se produce un aumento significativo de casi 3 veces, por encima de los valores controles de velocidad máxima, a los 23 días de la

realimentación, para posteriormente caer hasta el nivel de los valores controles, a los 37 días del período de realimentación.

La respuesta del enzima hepático en la realimentación es similar, aunque los valores controles de V_{max} se alcanzan más tarde, a los 15 días del comienzo de la realimentación. También este enzima experimenta un incremento significativo, por encima de valores controles, de alrededor de 3 veces, para a los 37 días del período de realimentación, caer hasta valores controles

La actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa de tejido intestinal presenta una disminución significativa en sus valores controles de velocidad de un 90% una vez transcurridos 35 días de la situación de ayuno, y restableciéndose dichos niveles transcurridos 4 días de realimentación, sin volver a experimentar ningún cambio significativo a lo largo de dicho período de realimentación.

Los demás parámetros cinéticos siguieron la misma pauta de comportamiento que en las observaciones realizadas en los pesos anteriores.

Finalmente, el resto de los tejidos no experimentó ninguna modificación significativa en sus parámetros cinéticos ante las dos situaciones experimentales.

3.3 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMA MALICO EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.

La actividad enzima málico sólo ha experimentado modificaciones significativas ante las situaciones de ayuno y realimentación, en el rango de pesos estudiado, en el tejido hepático. En los demás tejidos la actividad del enzima es muy baja (excepto en corazón), y no ha sufrido modificación alguna en ninguno de sus parámetros cinéticos.

Los resultados obtenidos para el enzima málico de tejido hepático y corazón, en el rango de pesos investigado, se muestra en las Tablas 23a, 23b, y 24.

El enzima hepático, en el peso de 180g (Tablas 23a, 23b), exhibió una disminución significativa en sus valores de V_{max} , de un 60% transcurridos 98 días del periodo de ayuno; no obstante, al día 77 de ayuno ya había caído en sus valores de velocidad en un 37% (Fig. 17), indicando una bajada gradual de este parámetro en el enzima hepático, por lo menos a partir de ese punto de ayuno. Dichos valores se mantienen durante el resto del ayuno hasta el octavo día de la realimentación en que prácticamente se alcanzan los valores controles con un aumento de casi 2 veces sobre los valores ayunados transcurridos 23 días del comienzo de la realimentación se produce un incremento significativo de casi 5 veces respecto de valores de ayuno, y por encima de valores controles, en la velocidad máxima del enzima, para alcanzar nuevamente dichos valores transcurridos 37 días desde la implantación de la situación de realimentación.

En cuanto a los restantes parámetros cinéticos del enzima hepático, no se produce ningún cambio significativo, ni en la constante de Michaelis (K_m), ni en la razón de actividad; observándose una evolución paralela de la eficiencia catalítica a la de la V_{max} , tanto en la situación de ayuno como en la de realimentación.

En el siguiente peso estudiado, de 100g, los valores de velocidad del enzima hepático (Tabla 24), sufren una disminución significativa de un 60%, una vez transcurridos 70 días desde el inicio del periodo de ayuno. Estos valores se mantienen constantes durante el resto del ayuno, y hasta el día 15 de la realimentación, en que se alcanzan los valores controles, sin que posteriormente experimenten modificaciones significativas hasta la conclusión de dicha situación. Los restantes parámetros cinéticos han seguido el mismo patrón descrito para los animales de 180 g.

Tabla 23a. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de el enzima málico (EM), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)						
DIAS		0	7	14	28	35	42	49
HIGADO	Vmax	78.65 ± 8.16	77.15 ± 8.23	79.38 ± 8.45	70.19 ± 7.45	82.34 ± 9.27	76.49 ± 8.18	65.89 ± 6.81
	Km	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.02
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	0.44 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.49 ± 0.05	0.37 ± 0.04	0.48 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04
CORAZON	Vmax	33.52 ± 3.48	43.46 ± 5.10	38.42 ± 4.87	37.78 ± 4.00	35.43 ± 4.00	33.47 ± 3.47	36.61 ± 3.88
	Km	0.25 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.03
	Razón de actividad	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01

Parámetros cinéticos		AYUNO (100g)				
DIAS		0	7	28	70	77
HIGADO	Vmax	78.71 ± 8.16	79.55 ± 9.14	57.08 ± 6.10	31.62 ± 3.16 [●]	30.51 ± 3.69
	Km	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.32 ± 0.03	0.17 ± 0.02 [●]	0.18 ± 0.02
CORAZON	Vmax	33.30 ± 3.16	40.16 ± 4.56	38.49 ± 4.13	39.12 ± 4.58	40.82 ± 4.23
	Km	0.25 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.29 ± 0.03
	Razón de actividad	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en µM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ●p<0.05; ●p<0.005; ●p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 23b. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de el enzima málico (EM), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)				REALIMENTACION			
DIAS		77	98	119	133	141	155	170	
HIGADO	Vmax	49.60 ± 5.22 ^①	23.35 ± 3.52 ^②	30.17 ± 3.20	33.35 ± 4.11	60.70 ± 7.01 ^③	141.86 ± 12.14 ^③	79.38 ± 8.18	
	Km	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02	
	Razón de actividad	0.40 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	
	Eficiencia catalítica	0.27 ± 0.03 ^①	0.14 ± 0.01 ^③	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.32 ± 0.03 ^③	0.79 ± 0.08 ^③	0.46 ± 0.04	
CORAZON	Vmax	41.00 ± 4.20	41.45 ± 4.26	37.16 ± 3.87	43.35 ± 4.51	41.47 ± 5.26	46.15 ± 5.63	38.99 ± 4.11	
	Km	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.26 ± 0.03	
	Razón de actividad	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	
	Eficiencia catalítica	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	

Parámetros cinéticos		REALIMENTACION (100g)					
DIAS		77 (2h)	81	85	92	99	114
HIGADO	Vmax	32.14 ± 3.31 ^①	33.82 ± 3.41	28.38 ± 3.45	75.65 ± 8.11 ^③	70.28 ± 7.08	76.77 ± 8.04
	Km	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	0.17 ± 0.02 ^③	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.38 ± 0.04 ^③	0.39 ± 0.03	0.40 ± 0.03
CORAZON	Vmax	43.21 ± 4.87	40.37 ± 4.31	55.16 ± 6.75	41.65 ± 4.00	41.56 ± 4.22	38.24 ± 4.01
	Km	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.03
	Razón de actividad	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 24. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de el enzima málico (EM), en varios tejidos de trucha arco iris (*O. mykiss*), con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (30g)		REALIMENTACION					
		DIAS	0	35	39	43	50	57	72
HIGADO	Vmax		75.43 ± 7.69	51.43 ± 5.16 ^①	56.22 ± 5.79	57.10 ± 6.00	89.80 ± 9.10 ^①	168.13 ± 14.29 ^①	85.39 ± 8.12
	Km		0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.02
	Razón de actividad		0.43 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.44 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		0.42 ± 0.03	0.27 ± 0.03 ^②	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.49 ± 0.04 ^③	0.88 ± 0.09 ^③	0.47 ± 0.03
CORAZON	Vmax		38.59 ± 4.16	44.10 ± 4.52	43.01 ± 4.98	37.61 ± 4.00	41.46 ± 4.56	35.97 ± 4.00	36.89 ± 4.16
	Km		0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03
	Razón de actividad		0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02
	Eficiencia catalítica		0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

En el peso de 30g, la velocidad máxima del enzima hepático muestra una disminución significativa de un 32% a los 35 días de ayuno, manteniéndose constante una vez transcurridos 15 días de la situación de realimentación, en que se alcanzan los valores controles. Aunque en este peso sí se produce un incremento significativo por encima de los valores controles de casi 3 veces a los 23 días de realimentación. Finalmente, se restablecen los valores controles transcurridos 37 días del período de realimentación. Los restantes parámetros cinéticos exhiben una respuesta similar a la descrita en pesos anteriores.

El enzima málico de corazón, en los tres pesos investigados, no ha sufrido ningún cambio significativo en sus parámetros cinéticos, para ninguna de las situaciones experimentales ensayadas.

3.4 EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACION SOBRE LA ACTIVIDAD ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP EN VARIOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS CON DIFERENTE TAMAÑO CORPORAL.

Los efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la actividad isocitrato deshidrogenasa-NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris, con diferentes pesos se muestran en las Tablas 25-27.

Los valores de velocidad del enzima hepático no experimentan cambios significativos a lo largo del período de ayuno, en ninguno de los pesos estudiados. No obstante, transcurridos 23 días del comienzo de la realimentación, la velocidad máxima del enzima hepático sufre un incremento significativo de 2.5 veces en el caso de los animales de 180g, y de 1.4 veces en los animales de 100g y 30g, para al final del curso de la realimentación restablecerse los valores de dicho parámetro (Fig. 18).

Tabla 25a. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la isocitrato deshidrogenasa NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)							
		DIAS	0	7	14	28	35	42	49
HIGADO	Vmax		196.43 ± 19.43	185.46 ± 19.36	189.99 ± 20.36	200.10 ± 22.36	190.51 ± 19.54	189.58 ± 19.58	187.88 ± 19.41
	Km		5.22 ± 0.61	6.00 ± 0.70	5.32 ± 0.63	6.25 ± 0.70	6.20 ± 0.62	5.48 ± 0.60	6.19 ± 0.71
	Razón de actividad		0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.04	0.45 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.42 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		37.63 ± 4.10	30.91 ± 0.36	35.71 ± 0.48	32.02 ± 0.34	30.73 ± 0.36	34.59 ± 0.37	30.35 ± 0.34
RIÑÓN	Vmax		43.65 ± 4.22	45.35 ± 4.56	45.42 ± 4.67	48.43 ± 5.23	41.94 ± 4.22	47.85 ± 4.81	44.64 ± 4.71
	Km		4.63 ± 0.52	5.02 ± 0.65	5.10 ± 0.52	4.68 ± 0.57	5.30 ± 0.60	5.12 ± 0.60	5.18 ± 0.57
	Razón de actividad		0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		9.43 ± 0.97	9.03 ± 0.09	8.94 ± 0.09	10.35 ± 1.12	7.91 ± 0.83	9.34 ± 1.00	8.62 ± 0.91
T. ADIPOSO	Vmax		41.52 ± 4.78	40.75 ± 4.18	44.14 ± 4.29	53.50 ± 5.22	41.47 ± 4.54	43.66 ± 4.73	42.46 ± 4.87
	Km		10.23 ± 1.18	8.64 ± 0.97	8.79 ± 0.99	10.91 ± 0.95	10.12 ± 1.02	8.91 ± 0.83	9.50 ± 0.97
	Razón de actividad		0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		4.06 ± 0.41	4.71 ± 0.54	5.02 ± 0.57	4.90 ± 0.52	4.09 ± 0.43	4.90 ± 0.59	4.49 ± 0.58
INTESTINO	Vmax		0.18 ± 0.02	39.02 ± 4.56 ^①	39.36 ± 4.16	46.84 ± 5.16	40.25 ± 4.19	46.63 ± 5.46	40.07 ± 4.63
MUSCULO	Vmax		54.70 ± 5.66	52.95 ± 5.68	59.41 ± 5.33	58.07 ± 6.13	52.16 ± 5.41	51.95 ± 5.43	50.04 ± 5.71
	Km		11.44 ± 1.16	11.61 ± 1.20	11.12 ± 1.12	10.22 ± 1.10	10.25 ± 0.91	10.15 ± 0.97	9.20 ± 0.98
	Razón de actividad		0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		4.78 ± 0.49	4.56 ± 0.50	5.34 ± 0.60	5.68 ± 0.61	5.22 ± 0.60	5.11 ± 0.55	5.43 ± 0.61
CORAZON	Vmax		680.46 ± 70.44	720.97 ± 80.12	708.72 ± 75.66	686.60 ± 72.44	709.66 ± 74.18	647.53 ± 66.32	659.06 ± 70.01
	Km		18.41 ± 2.01	20.14 ± 2.21	23.31 ± 2.22	20.48 ± 2.15	19.41 ± 2.00	18.14 ± 1.95	22.10 ± 2.33
	Razón de actividad		0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02
	Eficiencia catalítica		36.96 ± 4.02	35.80 ± 4.10	30.53 ± 3.88	33.52 ± 3.71	36.56 ± 4.00	35.69 ± 3.81	29.82 ± 3.19

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM . La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 25b. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la isocitrato deshidrogenasa NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*) con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (180g)				REALIMENTACION		
		DIAS	77	98	119	133	141	155
HIGADO	Vmax	187.55 ± 17.44	199.45 ± 20.32	173.91 ± 18.33	188.57 ± 19.33	181.55 ± 19.24	409.56 ± 18.63 ^①	168.71 ± 17.22
	Km	5.66 ± 0.67	5.75 ± 0.61	5.22 ± 0.60	5.75 ± 0.60	5.64 ± 0.60	5.54 ± 0.60	5.88 ± 0.61
	Razón de actividad	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.40	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.43 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	33.14 ± 3.61	34.69 ± 3.59	33.32 ± 3.50	32.79 ± 0.37	32.20 ± 3.42	73.93 ± 8.16 ^②	28.69 ± 3.51
RIÑÓN	Vmax	49.69 ± 5.30	51.81 ± 6.03	46.18 ± 4.78	56.45 ± 7.28	45.31 ± 4.66	50.66 ± 4.99	48.56 ± 5.17
	Km	5.30 ± 0.51	5.32 ± 0.60	5.20 ± 0.51	5.47 ± 0.60	5.68 ± 0.61	4.87 ± 0.55	5.33 ± 0.60
	Razón de actividad	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	9.37 ± 0.98	9.74 ± 1.00	8.88 ± 0.91	10.32 ± 1.10	7.97 ± 0.86	10.40 ± 1.12	9.11 ± 0.97
T. ADIPOSO	Vmax	54.46 ± 6.45	41.51 ± 4.56	44.77 ± 4.79	44.97 ± 4.84	58.66 ± 6.56	132.89 ± 14.51 ^①	46.17 ± 4.79
	Km	11.00 ± 0.96	8.79 ± 0.91	9.68 ± 0.95	9.51 ± 0.98	11.60 ± 1.20	10.00 ± 1.03	9.55 ± 1.00
	Razón de actividad	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.36 ± 0.04
	Eficiencia catalítica	4.95 ± 0.51	4.72 ± 0.50	4.62 ± 0.53	4.73 ± 0.50	5.06 ± 0.55	13.29 ± 1.37 ^②	4.83 ± 0.46
INTESTINO	Vmax	40.05 ± 4.46	44.52 ± 4.98	37.33 ± 4.30	44.54 ± 4.61	1.18 ± 0.12 ^③	0.44 ± 0.05	0.66 ± 0.07
MUSCULO	Vmax	51.15 ± 6.43	48.42 ± 5.22	48.85 ± 6.54	52.54 ± 5.47	55.44 ± 5.47	55.19 ± 5.77	52.28 ± 5.44
	Km	10.10 ± 1.16	9.19 ± 0.97	9.19 ± 0.99	10.12 ± 0.97	9.68 ± 1.11	10.49 ± 1.17	9.55 ± 0.91
	Razón de actividad	0.31 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.31 ± 0.03
	Eficiencia catalítica	5.06 ± 0.53	5.26 ± 0.53	5.31 ± 0.50	5.19 ± 0.63	5.72 ± 0.66	5.26 ± 0.60	5.47 ± 0.60
CORAZÓN	Vmax	700.14 ± 72.98	727.06 ± 75.55	764.15 ± 80.19	727.55 ± 76.99	700.11 ± 80.10	674.20 ± 70.10	695.52 ± 70.18
	Km	19.67 ± 2.01	20.03 ± 2.11	22.30 ± 2.39	22.22 ± 2.18	20.10 ± 2.22	20.18 ± 2.19	19.55 ± 2.00
	Razón de actividad	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	Eficiencia catalítica	35.59 ± 3.62	36.30 ± 3.81	34.27 ± 3.60	32.74 ± 3.40	34.83 ± 3.50	33.41 ± 3.44	36.58 ± 3.71

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 26a. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la isocitrato deshidrogenasa NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*), con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (100g)					
		DIAS	0	7	28	70	77
HIGADO	Vmax		180.54 ± 19.27	190.63 ± 18.57	176.89 ± 18.64	191.34 ± 20.17	179.46 ± 18.64
	Km		5.12 ± 0.62	5.51 ± 0.57	5.21 ± 0.68	4.86 ± 0.57	5.00 ± 0.57
	Razón de actividad		0.43 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		35.26 ± 3.68	34.60 ± 3.81	34.48 ± 3.30	39.37 ± 4.10	35.89 ± 3.66
RIÑÓN	Vmax		52.37 ± 5.36	52.41 ± 6.18	50.44 ± 5.17	47.24 ± 0.52	56.53 ± 5.79
	Km		5.11 ± 0.86	4.50 ± 0.57	5.80 ± 0.61	4.79 ± 0.55	5.18 ± 0.61
	Razón de actividad		0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		10.25 ± 1.16	11.64 ± 1.20	8.70 ± 0.91	9.86 ± 0.97	10.87 ± 1.10
T. ADIPOSO	Vmax		44.69 ± 4.78	40.16 ± 4.52	38.56 ± 4.16	44.16 ± 4.56	49.17 ± 5.26
	Km		11.12 ± 1.24	10.28 ± 1.10	9.14 ± 0.93	10.89 ± 1.12	9.76 ± 1.01
	Razón de actividad		0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		4.02 ± 0.41	3.91 ± 4.00	4.22 ± 0.41	4.05 ± 0.37	5.03 ± 0.52
INTESTINO	Vmax		0.79 ± 0.08	51.10 ± 6.39 [●]	38.08 ± 5.25	39.49 ± 4.56	47.64 ± 6.18
MUSCULO	Vmax		50.18 ± 5.19	60.58 ± 7.16	55.36 ± 5.63	48.27 ± 5.39	51.27 ± 5.50
	Km		9.16 ± 0.99	12.12 ± 1.28	9.54 ± 1.16	11.24 ± 1.35	9.67 ± 1.09
	Razón de actividad		0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		5.48 ± 0.61	4.99 ± 0.50	5.80 ± 0.60	4.29 ± 0.48	5.30 ± 0.53
CORAZON	Vmax		650.18 ± 68.33	700.69 ± 74.37	718.37 ± 69.37	650.39 ± 66.65	724.19 ± 77.25
	Km		18.22 ± 2.00	19.36 ± 2.03	18.22 ± 1.98	19.37 ± 2.16	24.13 ± 2.38
	Razón de actividad		0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.18 ± 0.02
	Eficiencia catalítica		35.68 ± 3.42	36.19 ± 3.55	39.43 ± 4.51	33.58 ± 3.41	30.01 ± 3.51

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM . La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en $\text{mU/mg prot.M.10}^{-4}$. Las diferencias eran significativas para : ●p<0.05; ●p<0.005; ●p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 26b. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la isocitrato deshidrogenasa NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*), con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		REALIMENTACION (100g)						
		DIAS	77 (2h)	81	85	92	99	114
HIGADO	Vmax		185.16 ± 17.45	176.43 ± 18.12	180.19 ± 18.63	201.36 ± 19.78	245.63 ± 20.13 ^①	167.37 ± 15.16
	Km		5.42 ± 0.51	5.10 ± 0.58	5.96 ± 0.61	4.87 ± 0.56	5.21 ± 0.48	5.52 ± 0.55
	Razón de actividad		0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		34.16 ± 3.38	34.92 ± 2.91	30.20 ± 3.16	41.35 ± 3.67	47.14 ± 4.36 ^①	30.28 ± 3.10
RIÑÓN	Vmax		60.35 ± 7.84	51.34 ± 5.61	55.12 ± 5.43	51.17 ± 5.16	48.16 ± 5.17	50.16 ± 5.15
	Km		4.18 ± 0.50	5.85 ± 0.60	4.59 ± 0.49	4.89 ± 0.56	5.63 ± 0.59	5.13 ± 0.60
	Razón de actividad		0.36 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		11.28 ± 1.13	8.77 ± 0.91	12.00 ± 1.18	10.46 ± 1.00	8.55 ± 0.90	9.77 ± 0.89
T. ADIPOSO	Vmax		45.16 ± 6.00	47.39 ± 4.68	40.36 ± 4.69	50.16 ± 5.13	106.81 ± 5.89 ^②	46.38 ± 5.13
	Km		12.31 ± 1.33	12.84 ± 1.18	9.37 ± 1.13	10.27 ± 1.22	11.11 ± 1.12	10.78 ± 1.20
	Razón de actividad		0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		3.67 ± 0.32	3.69 ± 0.35	4.30 ± 0.38	4.45 ± 0.41	9.61 ± 0.89 ^②	4.30 ± 0.40
INTESTINO	Vmax		40.36 ± 5.00	0.79 ± 0.08 ^③	0.83 ± 0.08	0.60 ± 0.07	0.58 ± 0.06	0.81 ± 0.08
MUSCULO	Vmax		53.69 ± 5.67	61.28 ± 6.89	56.37 ± 6.00	53.89 ± 5.37	51.74 ± 6.24	52.39 ± 5.55
	Km		10.25 ± 1.46	11.79 ± 1.22	10.00 ± 1.09	9.99 ± 0.89	9.23 ± 1.11	12.16 ± 1.22
	Razón de actividad		0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.27 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		5.23 ± 0.53	5.19 ± 0.45	5.64 ± 0.48	5.31 ± 0.49	5.60 ± 0.61	4.31 ± 0.37
CORAZON	Vmax		700.59 ± 68.33	686.37 ± 55.36	712.32 ± 66.89	675.37 ± 75.69	666.39 ± 58.39	704.35 ± 67.89
	Km		22.33 ± 2.34	19.34 ± 2.00	18.37 ± 1.98	20.00 ± 1.85	18.56 ± 1.78	19.00 ± 1.86
	Razón de actividad		0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.02
	Eficiencia catalítica		31.37 ± 3.20	35.49 ± 3.00	38.78 ± 3.56	33.77 ± 3.21	35.90 ± 3.44	37.07 ± 3.51

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en µM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ^①p<0.05; ^②p<0.005; ^③p<0.001; nd, no determinado.

Tabla 27. Efectos del ayuno y la realimentación sobre los parámetros cinéticos de la isocitrato deshidrogenasa NADP (IDH-NADP), en varios tejidos de trucha arco-iris (*O. mykiss*), con diferente tamaño corporal.

Parámetros cinéticos		AYUNO (30g)			REALIMENTACION				
		DIAS	0	35	39	43	50	57	72
HIGADO	Vmax		191.63 ± 17.39	186.87 ± 15.68	170.58 ± 16.00	200.00 ± 21.37	206.33 ± 18.79	262.61 ± 24.39 [●]	175.37 ± 16.37
	Km		5.18 ± 0.62	6.08 ± 0.71	5.95 ± 0.62	6.08 ± 0.71	7.05 ± 0.50	5.51 ± 0.45	5.26 ± 0.60
	Razón de actividad		0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		36.99 ± 3.31	30.73 ± 2.98	28.63 ± 3.00	32.89 ± 3.00	29.25 ± 3.01	47.66 ± 4.16 [●]	33.34 ± 3.00
RIÑON	Vmax		58.16 ± 5.98	52.19 ± 5.39	48.32 ± 5.00	50.79 ± 4.22	44.39 ± 5.32	55.16 ± 6.79	48.67 ± 5.00
	Km		4.81 ± 0.51	5.00 ± 0.55	4.39 ± 0.53	5.38 ± 0.71	4.00 ± 0.53	5.26 ± 0.60	5.01 ± 0.58
	Razón de actividad		0.40 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		12.09 ± 1.00	10.44 ± 1.16	11.01 ± 1.10	9.44 ± 0.97	11.09 ± 1.10	10.49 ± 1.00	9.71 ± 1.00
T. ADIPOSEO	Vmax		40.83 ± 4.00	45.69 ± 5.01	48.56 ± 5.12	52.37 ± 6.58	57.81 ± 7.10	98.88 ± 8.86 [●]	43.91 ± 4.56
	Km		10.59 ± 1.06	11.16 ± 1.23	11.28 ± 1.00	12.30 ± 1.43	13.69 ± 1.50	10.13 ± 1.22	9.38 ± 1.10
	Razón de actividad		0.37 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.04
	Eficiencia catalítica		3.89 ± 0.30	4.09 ± 0.35	4.30 ± 0.37	4.25 ± 0.36	4.22 ± 0.40	9.76 ± 0.88 [●]	4.68 ± 0.32
INTESTINO	Vmax		0.54 ± 0.06	44.51 ± 4.68 [●]	0.60 ± 0.07	0.40 ± 0.05	0.59 ± 0.06	0.56 ± 0.06	0.88 ± 0.09
MUSCULO	Vmax		56.38 ± 6.34	47.98 ± 5.16	53.71 ± 8.19	55.26 ± 5.78	49.33 ± 5.00	55.89 ± 6.00	49.16 ± 5.37
	Km		10.22 ± 0.91	9.32 ± 0.99	10.11 ± 1.40	11.00 ± 1.22	9.39 ± 0.98	10.98 ± 1.29	9.18 ± 1.17
	Razón de actividad		0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.03
	Eficiencia catalítica		5.52 ± 0.50	5.15 ± 0.45	5.31 ± 0.45	5.02 ± 0.40	5.25 ± 0.50	5.09 ± 0.52	5.35 ± 0.47
CORAZON	Vmax		766.37 ± 81.64	695.36 ± 70.39	719.55 ± 66.37	677.81 ± 65.89	682.73 ± 71.19	711.33 ± 80.37	681.99 ± 69.19
	Km		21.37 ± 1.95	22.37 ± 2.51	20.11 ± 2.19	19.37 ± 2.16	18.00 ± 2.09	21.00 ± 2.09	18.08 ± 1.97
	Razón de actividad		0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02
	Eficiencia catalítica		35.86 ± 3.37	31.08 ± 2.88	35.78 ± 3.00	34.99 ± 3.10	37.93 ± 3.44	33.87 ± 3.00	37.72 ± 3.39

Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco observaciones, cada una con un mínimo de seis animales. La actividad específica se expresa como mUnidades de enzima por mg de proteína (mU/mg prot). La constante de Michaelis (Km) en μM. La eficiencia catalítica (Vmax/Km) viene expresada en mU/mg prot.M.10⁻⁴. Las diferencias eran significativas para : ●p<0.05; ●p<0.005; ●p<0.001; nd, no determinado.

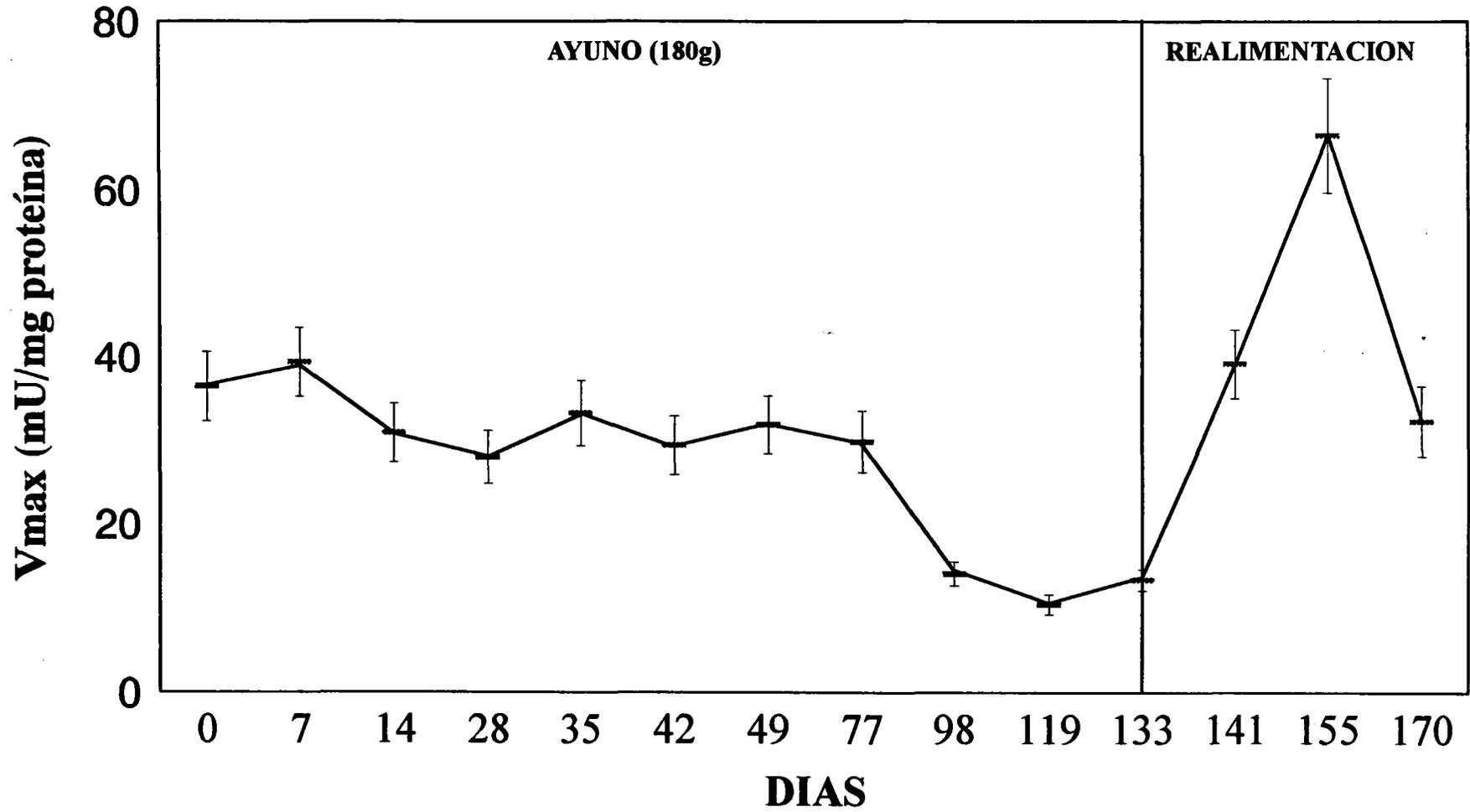
También el enzima de intestino sufre una modificación significativa en sus valores de velocidad, ya que a los 7 días del comienzo del período de ayuno, experimenta un incremento significativo en el valor de dicho parámetro con respecto de valores controles de casi 50 veces, manteniéndose constante durante todo el período de ayuno (Fig 19), y restaurándose los valores controles al octavo día de realimentación; este comportamiento es similar todo el rango de pesos investigado (Tablas 25-27).

En cuanto al enzima de tejido adiposo, las modificaciones a nivel de sus valores de velocidad siguen el mismo comportamiento que en el enzima hepático de cada uno de los pesos experimentales (Tablas 25-27). En este caso, los valores de velocidad no se alteran significativamente durante el transcurso del ayuno, y sí lo hacen en la realimentación, sufriendo un aumento significativo en los valores de V_{max} a los 23 días (Fig. 18), de 2.5 veces en los animales de 180g, y de alrededor de 2 veces en los animales de 100g y 30g., para volver a valores controles al final de dicho período.

No se detecta ninguna modificación significativa en los parámetros cinéticos a lo largo de las situaciones experimentales estudiadas, salvo en la eficiencia catalítica que, de acuerdo con el comportamiento cinético del enzima sí sufre modificaciones significativas en dichas situaciones.

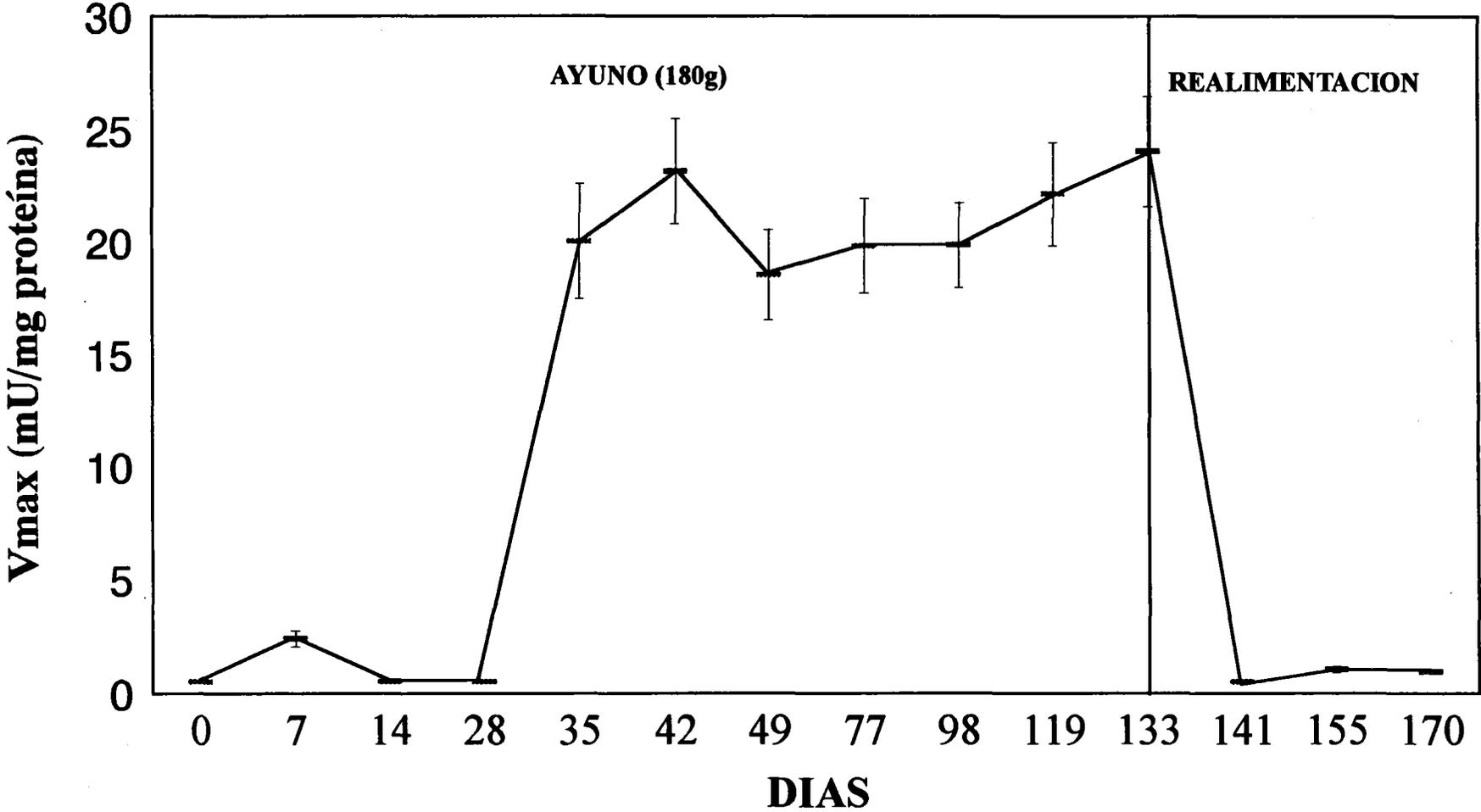
En los restantes tejidos, no se han detectado cambios significativos en ninguno de los parámetros cinéticos del enzima.

G6PDH (T.ADIPOSO)



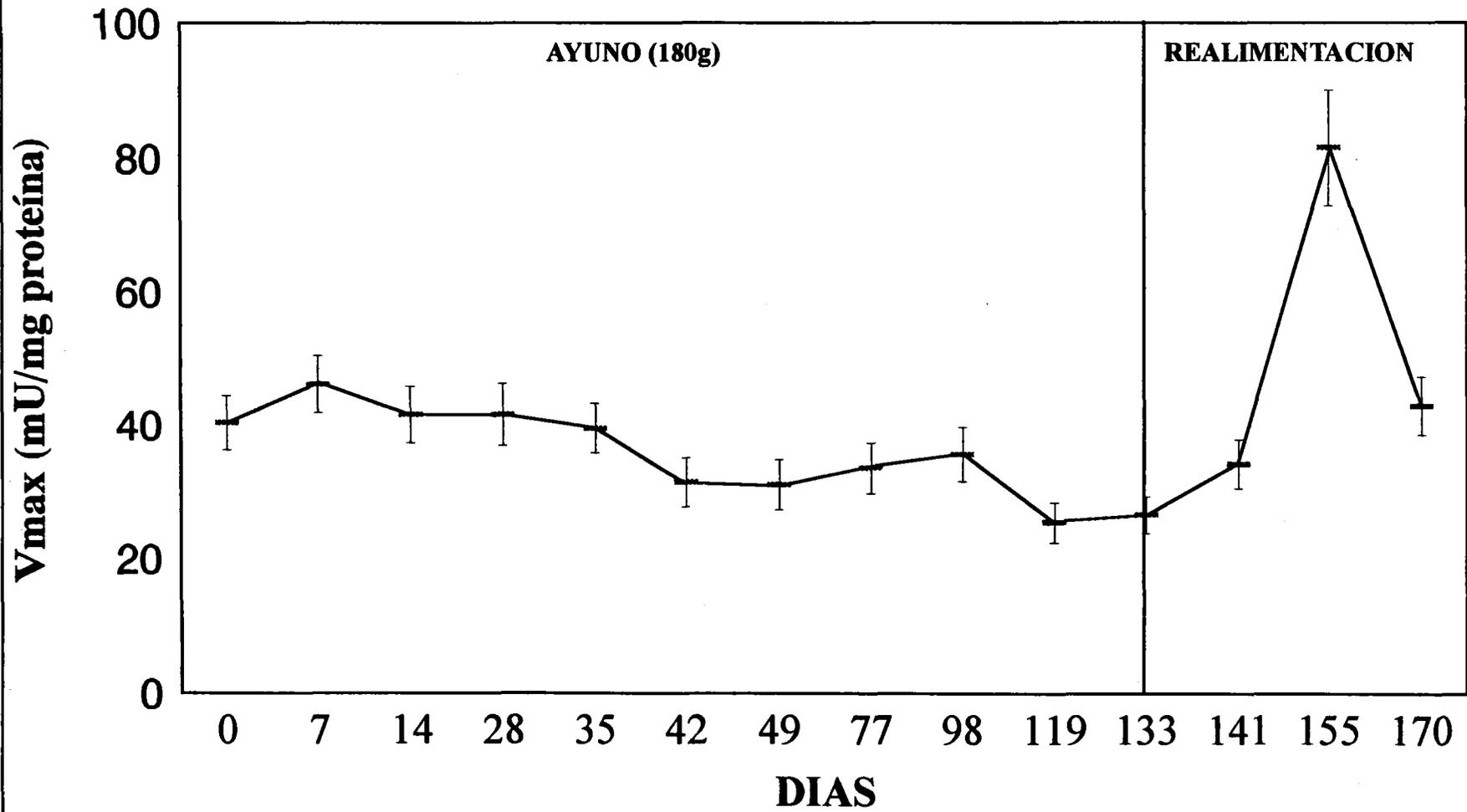
Juan Bautista Barroso Albarracín

G6PDH (INTESTINO)

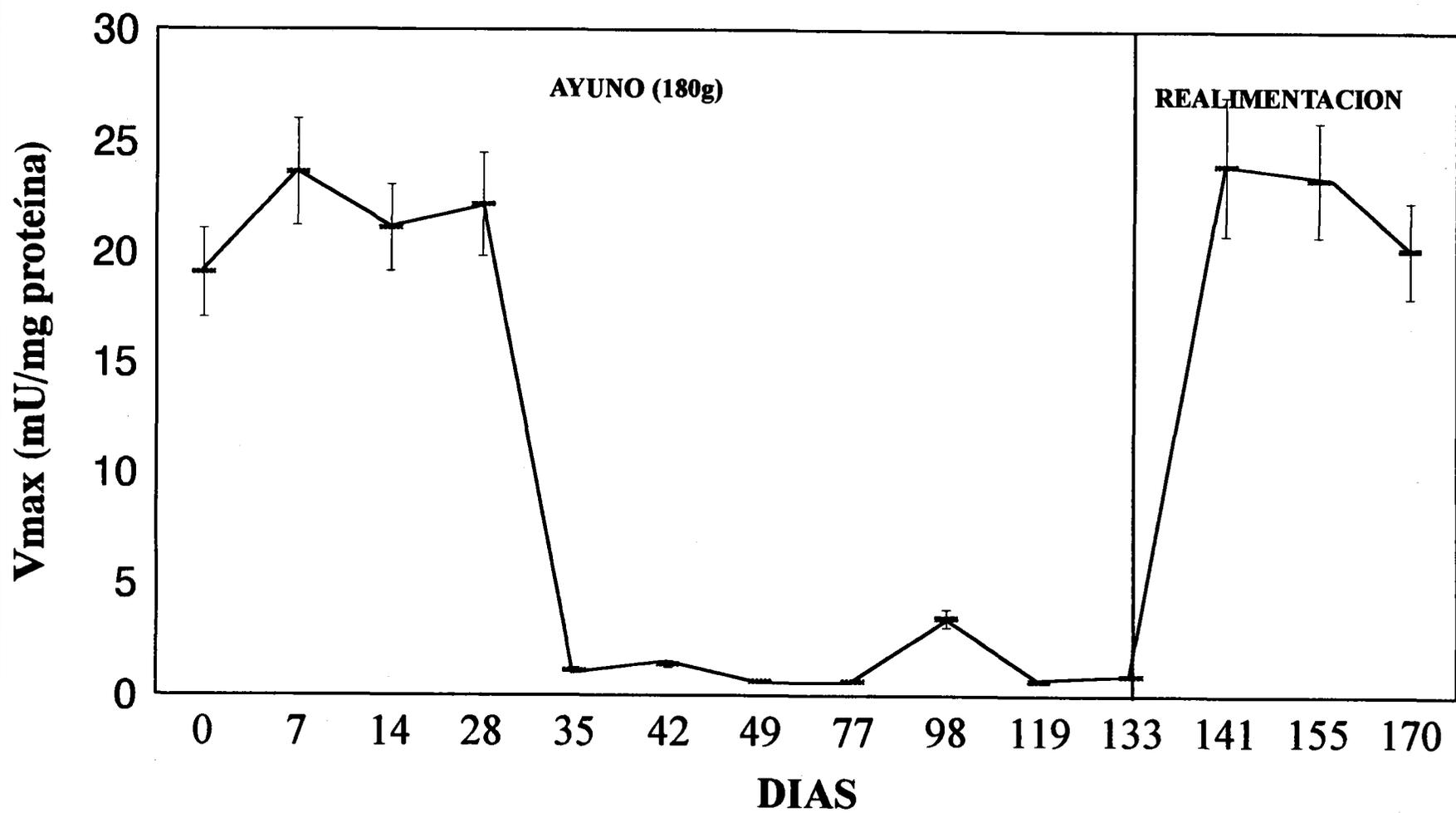


Tesis doctoral

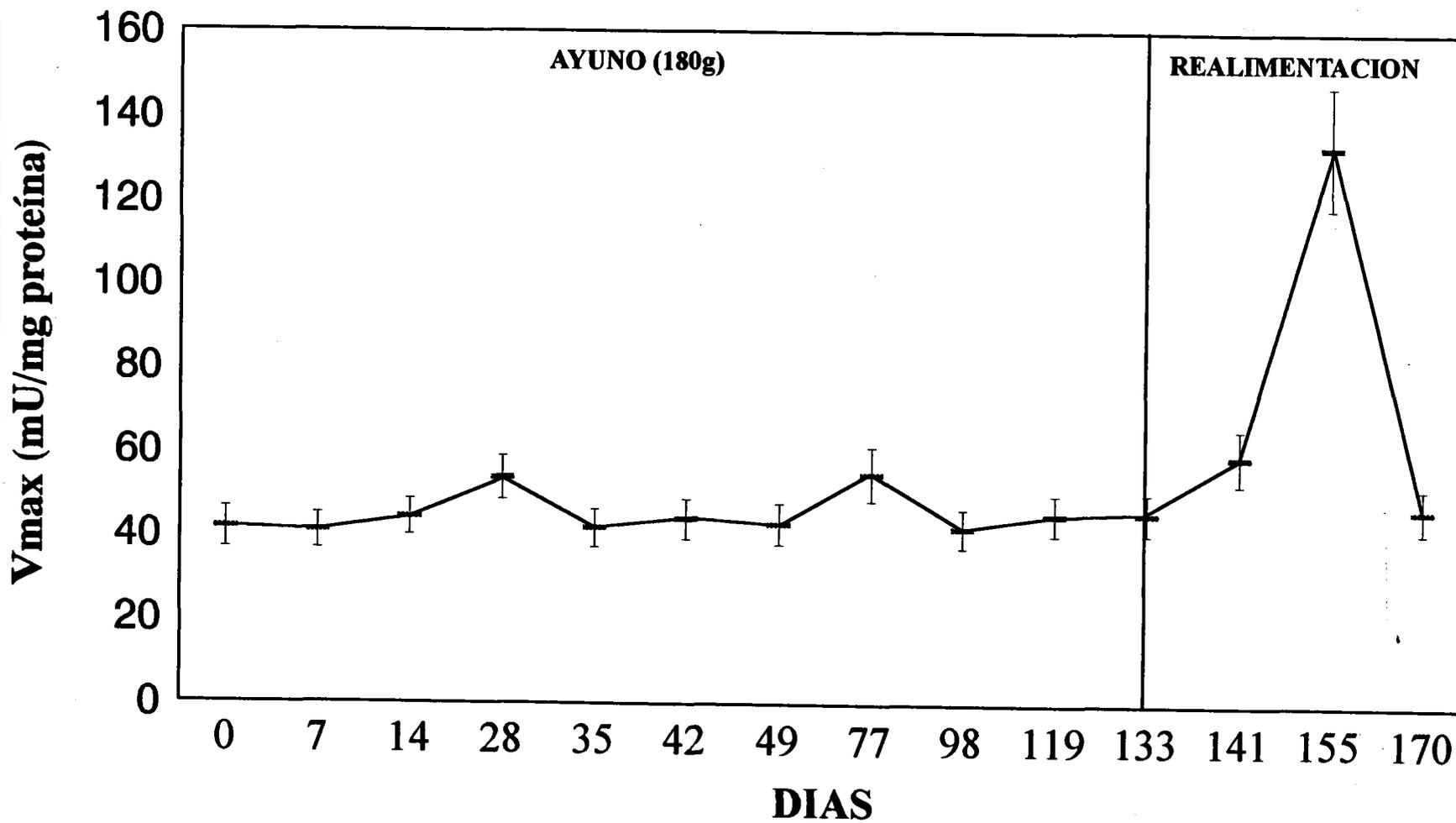
6PGDH (T.ADIPOSO)



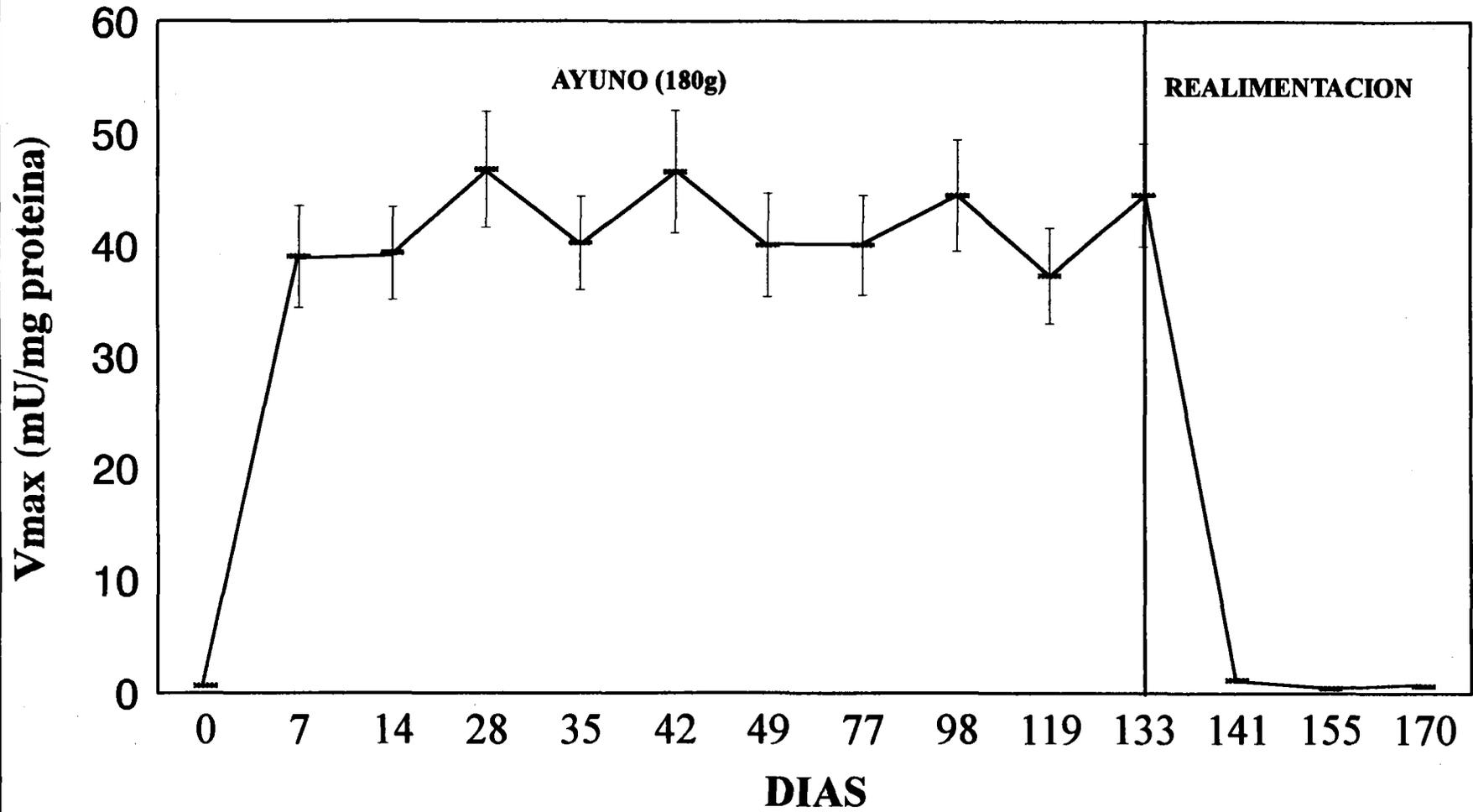
6PGDH (INTESTINO)



IDH-NADP (T.ADIPOSO)

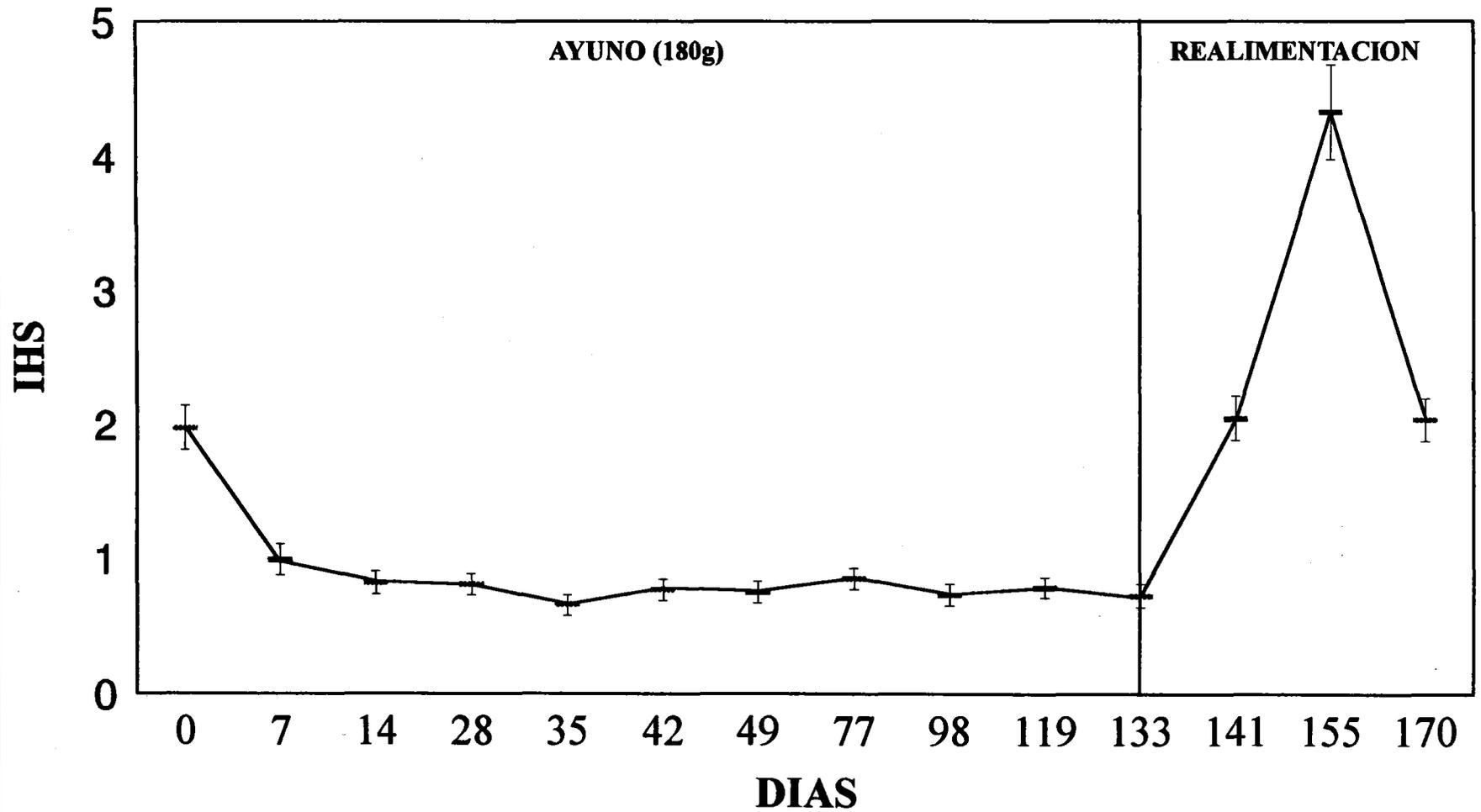


IDH-NADP (INTESTINO)



Tesis doctoral

INDICE HEPATO-SOMATICO



Juan Bautista Barroso Albarracin

DISCUSION

1. INFLUENCIA DEL TAMAÑO CORPORAL SOBRE LOS SISTEMAS ENZIMATICOS PRODUCTORES DE NADPH EN DISTINTOS TEJIDOS DE TRUCHA ARCO-IRIS

Se estudió la influencia del tamaño corporal, como reflejo del estadio del desarrollo del animal, sobre el comportamiento cinético de los sistemas productores de NADPH, al objeto de determinar la capacidad de adaptación de estos sistemas en diferentes estadios del desarrollo de la trucha arco-iris. Está bien establecido que existe un incremento de todos aquellos procesos anabólicos implicados en el crecimiento celular durante los estadios del desarrollo más tempranos del pez, tal y como se refleja en el aumento de la síntesis proteica que tiene lugar en estas etapas del desarrollo (Houligan, 1992). De forma que en estados ya adultos esta capacidad disminuye hasta estabilizarse en niveles exclusivamente de mantenimiento y conservación de estructuras corporales.

Los procesos de crecimiento y proliferación celular se caracterizan por la demanda de constituyentes celulares implicados en la síntesis de nuevas macromoléculas correlacionándose todos estos procesos con un aumento en la síntesis de ácidos nucleicos y demás componentes celulares que van a sostener en última instancia este amplio grupo de reacciones. En los últimos años, se está reconociendo una fuerte relación entre los niveles del ciclo de las pentosas fosfato y este tipo de procesos, poniéndose de manifiesto claramente el papel que juega esta ruta como suministrador de metabolitos en relación con el resto del metabolismo celular. Por un lado se ha demostrado que el aporte de ribosa 5-fosfato es imprescindible para abastecer el exceso de demanda de bases púricas en otros procesos de proliferación celular. Pilz et al., (1984), ponen de manifiesto la fuerte relación existente entre la producción de ribosa 5-fosfato y las concentraciones de fosforribosilpirofosfato y

purinas en cultivos de linfoblastos estimulados con un mitógeno. Estos autores encuentran que las concentraciones intracelulares de ribosa 5-fosfato pueden ser determinantes de la velocidad de síntesis *de novo* de purinas, y por lo tanto del crecimiento de estas células.

De la misma forma, se ha relacionado el aumento en la actividad de la G6PDH y 6PGDH con el exceso de producción de colesterol existente en estos procesos. Es bien conocido que la biosíntesis de colesterol está implicada en la proliferación celular, tanto es así, que tejidos como el intestino, muy proliferativos, presentan altos niveles de síntesis de colesterol, mientras que en órganos como el riñón, con poco recambio celular, esta síntesis es prácticamente inexistente (Siperstein, 1984). Además de su necesidad en la formación de nuevas membranas, el colesterol, o algún intermediario de su metabolismo juega un papel importante en la regulación de la síntesis de ADN (Siperstein, 1984; Quesney-Huneus et al., 1983), y por tanto en el crecimiento celular.

También, Ledda-Columbano et al., (1985), han demostrado un aumento en la síntesis de colesterol en hiperplasias hepáticas inducidas relacionado con un incremento en las actividades G6PDH y 6PGDH y un incremento en la incorporación de timidina marcada al ADN, concluyendo que el ciclo del fosfogluconato juega un importante papel en esta situación como suministrador de desoxirribosas y NADPH.

Teniendo en cuenta las consideraciones descritas anteriormente, era de esperar un aumento en la actividad de los sistemas productores de NADPH en los estadios del desarrollo más tempranos del animal (reflejado en los animales de peso inferior), ya que en éstos se requeriría un aporte extra de equivalentes de poder reductor en forma de NADPH, necesario para que se llevaran a cabo todas las biosíntesis reductoras potenciadas en estos estadios tempranos del desarrollo. De modo que, conforme el animal alcanza el estado de madurez, iría disminuyendo el aporte extraordinario de

NADPH, puesto que no se da un crecimiento como tal, sino sólo mantenimiento de estructuras.

Al estudiar los niveles de los sistemas enzimáticos productores de NADPH en seis estadios juveniles de la trucha, y uno considerado como adulto, en función de la hipótesis de trabajo mencionada, no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros cinéticos de cada tejido a lo largo de los diferentes pesos y para cada uno de los sistemas enzimáticos estudiados. No obstante, sí se observaron diferencias significativas en los valores de velocidad de cada enzima en función del tejido estudiado; para ello se investigó la contribución relativa y absoluta de cada enzima, en cada uno de los tejidos objeto de estudio. Así, el hígado contribuye (en Unidades por gramo de tejido) mayoritariamente en cada una de las actividades enzimáticas descritas, mientras que este papel lo comparte con el músculo cuando se estudia la contribución total en Unidades de enzima por tejido completo.

No obstante, y dado que los peces teleósteos tienden a guardar relativamente altos y estables los niveles de sus actividades enzimáticas (Wacke et al., 1989), no sorprendería el que durante las etapas del desarrollo de estos animales la producción de NADPH, fuese tal que estuviesen cubiertas las demandas de equivalentes de poder reductor en forma de NADPH en cada una de dichas etapas, lo que explicaría los resultados obtenidos en esta memoria.

2. INFLUENCIA DEL NIVEL DE PROTEÍNA DE LA DIETA SOBRE EL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH.

Al investigar la influencia de una disminución del 50 % en el nivel de proteína de la dieta sobre el comportamiento cinético la G6PDH, 6PGDH, EM, e IDH-NADP, con objeto de determinar la capacidad adaptativa de esos cuatro sistema enzimáticos productores de NADPH a esta situación nutricional, se encontró que la administración de una dieta baja en proteínas durante cuatro semanas produjo una disminución significativa en los valores de velocidad de todas las actividades estudiadas en el hígado, mientras que no se encontraron cambios significativos en la constante de Michaelis, indicando un incremento significativo en la eficiencia catalítica de esos enzimas. Este comportamiento cinético confirma que la razón de actividad de todos los sistemas hepáticos permanezca sin modificarse, sugiriendo que la respuesta en la actividad enzimática durante esas condiciones nutricionales, es probablemente debida a cambios en las concentraciones intracelulares de los cuatro sistemas de producción de NADPH, y no a procesos de polimerización del enzima (Martins et al., 1985), lo que requeriría un menor tiempo que la síntesis de las proteínas.

De otra parte, el comportamiento cinético de estos enzimas en los restantes tejidos permaneció sin presentar cambios significativos ante esta situación nutricional. Esta pérdida de respuesta probablemente del relativamente menor papel de esos tejidos en la producción de equivalentes de reducción (Zelewski, y Swierczinsky, 1985; Peragón et al., 1990b).

Quesney-Huneus et al., (1983), y Siperstein, (1984), indican que durante los procesos que impliquen crecimiento celular, la síntesis de colesterol no sólo proporciona el colesterol necesario para la membranogénesis, ya que también

presenta una implicación directa en la replicación del DNA. Es razonable creer por tanto, que ante condiciones de crecimiento reducido como es la administración de una dieta baja en proteínas, aquellos procesos que utilizan equivalentes de reducción en mecanismos implicados en procesos de crecimiento, disminuyan en su actividad.

No obstante, los efectos de diferentes contenidos en proteína dietaria sobre la actividad hepática de estos sistemas productores de NADPH descritos en la literatura científica hasta la fecha son objeto de controversia. Las principales conclusiones que se desprenden de esos trabajos, son que la actividad de estos enzimas disminuye en animales alimentados con una dieta alta en proteína/baja en carbohidratos cuando se compara con la obtenida en animales alimentados con una dieta alta en proteína/baja en carbohidratos (Abel et al., 1978; Hilton y Atkinson, 1982; Jürss et al., 1985; Walton, 1986). aunque también se ha descrito una ausencia de tales efectos (Abel et al. 1978; Walton, 1986; Lupiáñez et al., 1989). Esas diferencias pueden ser explicadas por diversas razones, como diferencias en la edad de los animales y en el tiempo de tratamiento, las condiciones experimentales, la frecuencia en la alimentación, e incluso la composición de las dietas experimentales, teniendo en cuenta que el patrón de aminoácidos de la fuente de proteínas utilizadas puede provocar cambios significativos en la actividad de esos enzimas (Herzberg y Rogerson, 1981; Herzberg, 1991). En línea con esto se ha demostrado que la calidad de la proteína puede influenciar el metabolismo del colesterol, debido probablemente a la composición aminoacídica de las proteínas /Kurowska y Carroll, 1990). Por último, es significativo el que muchas de esas investigaciones se hayan realizado solamente a concentraciones saturantes de sustrato.

En definitiva, nosotros concluimos que la disminución en la actividad de los sistemas enzimáticos productores de NADPH hepáticos, causada por el bajo nivel de proteína de la dieta, puede ser debido a una caída concomitante en la utilización del

NADPH implicado en gran número de biosíntesis reductoras, como la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Eggleston y Krebs, 1974; Tomlinson et al., 1988), así como de la disminución en la suplementación de ribosas fosfato necesarias implicadas en la síntesis de nucleótidos, ambas esenciales para el proceso de crecimiento celular.

Cuando administramos una dieta a la que se le sustituye parte de su contenido graso por proteína, aumentando por tanto el nivel de proteína y disminuyendo el de grasa (dieta B vs dieta C), se produjo un aumento significativo en los valores de velocidad, sin cambios en la afinidad por el sustrato a lo largo de toda la curva de saturación, para la G6PDH, 6PGDH, e IDH-NADP hepáticas, lo que concuerda con la situación lipogénica establecida al disminuir el nivel de grasa de la dieta, y provocando consecuentemente un incremento en la necesidad de equivalentes de reducción usados en la biosíntesis de ácidos grasos hepáticos. Sin embargo, no se observó ninguna modificación significativa en los parámetros cinéticos del enzima málico ante esta situación nutricional. En línea con esto, Iritani et al., (1992), en hígado de rata, describen que la actividad enzima málico junto con la acetil-CoA carboxilasa, y la sintasa de ácidos grasos son carbohidrato-dependientes, mientras que la inducción de la G6PDH es proteín-dependiente (Katsurada et al., 1987, 1989, 1990), ya que la velocidad transcripcional de la G6PDH, la concentración de ARN mensajero, y la inducción del enzima, requieren la ingestión de grandes cantidades de una dieta alta en carbohidratos para alcanzar los mismos niveles que los otros enzimas lipogénicos descritos por estos autores. Este comportamiento está de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que como se describe más adelante, las situaciones en que el enzima málico presenta modificaciones significativas, son en su gran mayoría las relacionadas con las variaciones en el contenido de carbohidratos de la dieta, lo que sugiere la regulación del enzima málico a nivel transcripcional por estos azúcares al igual que ocurre en rata (Iritani et al., 1992).

En esta situación nutricional no se encontró cambio alguno en los parámetros cinéticos de estos enzimas, y en los restantes tejidos objeto de estudio, determinándose, una vez más, la falta de adaptación en el establecimiento de situaciones lipogénicas que presentan estos tejidos, tal y como describen Zelewski y Swierzcinsky, (1989), de modo que se podría hablar de regulación órgano específica en la modulación de estos sistemas enzimáticos productores de NADPH.

Si por el contrario, se suministra una dieta en la que se ha realizado la sustitución total de los carbohidratos por un nivel de proteína equivalente, y manteniendo el de grasa constante, (dieta B vs dieta D), se provoca, bajo nuestras condiciones experimentales, una disminución significativa en los valores de velocidad de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, sin que se observe ninguna modificación en los restantes sistemas productores de NADPH hepáticos, y aunque se aprecia una tendencia a la caída en la actividad del enzima málico, ésta no es significativa. Tampoco se observó ningún cambio significativo de los restantes parámetros cinéticos, pudiendo concluir que la eliminación de los carbohidratos dietarios conduce al establecimiento de una situación lipolítica que origina una disminución significativa de la G6PDH y 6PGDH hepáticas, como consecuencia del establecimiento de fenómenos de represión de la síntesis de estos enzimas (Clarke et al., 1977; Nace et al. 1979; Herzberg, 1983). No se observaron alteraciones significativas en los parámetros cinéticos de estos sistema enzimáticos en el resto de los tejidos.

3. INFLUENCIA DEL NIVEL DE GRASA DE LA DIETA SOBRE EL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH EN LA TRUCHA ARCO-IRIS.

Al determinar la influencia de una disminución del 55 % en el nivel de grasa de la dieta, manteniendo constantes los niveles de proteína y carbohidratos, se observó un aumento significativo en los valores de velocidad de todos los sistemas enzimáticos estudiados en tejido hepático, a excepción del enzima málico en el que no se apreció ningún cambio significativo, ya que incluso se observó una caída en los valores de velocidad de este enzima aunque no fue significativa. En esta situación no hubo alteraciones significativas de los parámetros cinéticos hepáticos de la G6PDH, 6PGDH, e IDH-NADP.

El comportamiento descrito, originado por la drástica disminución del nivel de grasa de la dieta, está de acuerdo con la necesidad de sintetizar lípidos endógenos al objeto de llenar este vacío metabólico; así, bajo nuestras condiciones experimentales, los resultados obtenidos concuerdan con los descritos por otros autores en mamíferos (Fritz y Kletzien, 1987; Miksicek y Towle, 1983), y peces (Lin et al., 1977a; Jürss et al., 1984, 1992; Shimeno et al., 1981).

La ausencia de cualquier tipo de modificación significativa en la actividad del enzima málico ante una situación claramente lipogénica como ésta, también ha sido observada por otros autores, aunque en condiciones de transición ayuno-realimentación (Zelewski y Swierczinsky, 1989), asumiendo estos autores que además del papel que juega el enzima málico en la lipogénesis, podría intervenir muy activamente en otras vías que consumen equivalentes de reducción. En este sentido, Ayala et al., (1989), apuntan la posibilidad de que este enzima juegue un papel

relevante en procesos de destoxificación, además de la ya relatada intervención ante el establecimiento de condiciones claramente lipogénicas.

De otra parte, la sustitución de los carbohidratos dietarios por grasas, provocó una disminución significativa en los valores de velocidad de todos los sistemas enzimáticos objetos de estudio, en el tejido hepático, sin que se apreciase ningún tipo de modificación en los restantes tejidos. En todas las situaciones se obtuvieron típicas curvas de saturación hiperbólicas para la actividad de estas enzimas sin que se modificaran los demás parámetros cinéticos. Como ya se ha comentado anteriormente, una de las primeras consecuencias manifestadas tras la administración de una dieta alta en grasas es el aumento constante de los niveles plasmáticos e intracelulares, en cantidad y calidad, de ácidos grasos de acuerdo con el contenido de los mismos en la dieta. Como cabría esperar, el aumento intracelular de ácidos grasos procedentes de la dieta provoca una fuerte inhibición de todos los sistemas enzimáticos relacionados con su síntesis. Estas modificaciones en las actividades enzimáticas están relacionadas con una drástica reducción de los niveles de proteína enzimática a consecuencia de la puesta en marcha de un claro fenómeno de represión enzimática. En este caso, la extraordinaria capacidad de adaptación de estas enzimas en el tejido hepático de trucha, es semejante al que tiene lugar bajo estas condiciones antilipogénicas en mamíferos. Es en estos animales, en los que más se ha estudiado esta capacidad de adaptación, demostrándose que el cambio de una situación lipogénica a otra lipolítica, provoca cambios del orden de 15-30 veces en la actividad hepática de la G6PDH en rata. El mecanismo molecular de estas variaciones está relacionado con fenómenos de inducción y represión enzimática, puestos de manifiesto a través de cambios en las concentraciones intracelulares de ARN mensajero para este enzima (Prostko et al., 1989). No obstante, y bajo nuestras condiciones experimentales, destaca la disminución significativa sufrida por el enzima málico en esta condición antilipogénica, respecto de

cuando se considera el efecto de las grasas sin modificación en el nivel de carbohidratos dietarios; por tanto estos resultados en trucha arco-iris confirman las observaciones de Iritani et al., (1992), sobre la regulación carbohidrato dependiente del enzima málico en hígado de rata.

4. INFLUENCIA DEL NIVEL DE CARBOHIDRATOS DE LA DIETA SOBRE EL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH EN TRUCHA ARCO-IRIS.

Finalmente, se investigó la influencia del nivel de carbohidratos de la dieta, sobre la capacidad de adaptación de los sistemas enzimáticos productores de NADPH, para lo cual se administró a los animales una dieta exenta de carbohidratos frente a otra con un alto nivel de carbohidratos (dieta A vs dieta D), y manteniendo constantes el resto de macronutrientes.

La utilización de los hidratos de carbono como fuente de energía en peces, al contrario que en mamíferos, es menos efectiva ya que son mal utilizados, sobre todo en peces carnívoros. Esto se debe, por una parte a que tienden a digerirlos mal, sobre todo si no han tenido un tratamiento que aumente su digestibilidad (Singh y Nose, 1967), y por otra, a que los peces regulan mal los niveles de glucosa sanguínea (Palmer y Ryman, 1972; Bergot, 1979).

Una dieta rica en hidratos de carbono promueve la glucólisis y lipogénesis, y eleva la relación insulina/glucagón por aumentar los niveles plasmáticos de insulina (Peret, 1981); así, las dietas ricas en hidratos de carbono y bajas en grasas, mantienen la actividad acetil-CoA carboxilasa y la lipogénesis en general, principalmente en hígado, y en menor extensión en tejido adiposo mesentérico (Likimani y Wilson, 1982; Fynn-Aikins et al., 1992). En este sentido, está bien establecido en mamíferos, que las

deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato aumentan ante situaciones claramente lipogénicas (Fritz y Kletzien, 1987; Miksicek y Towle, 1983), manteniendo su actividad con este tipo de dietas (Tepperman y Tepperman, 1958, 1965; Zakim et al., 1967).

No obstante, en peces, la transformación de glucosa en lípidos está sujeta a controversia; así Lin et al., (1977c) que la lipogénesis es principalmente regulada por el nivel lipídico de la dieta, y no por el de carbohidratos, haciéndose patente este efecto sólo cuando los niveles de lípidos son superiores al 10 %. De otra parte, Hilton y Atkinson, pusieron de manifiesto que un aumento en los niveles de carbohidratos digestibles de hasta 110 g /Kg en la dieta, suministrados durante 16 semanas, provoca un incremento significativo de la actividad G6PDH para el suministro de equivalentes de reducción requeridos para la síntesis de ácidos grasos. También Fynn-Aikins et al., (1992), ponen de manifiesto un aumento de dos a tres veces en todos los sistemas enzimáticos productores de NADPH , en hígado de esturión, de los animales alimentados con dietas que contenían de un 28-35 % de D-glucosa, frente a los que fueron alimentados con dietas que contenían de un 0-7 % de D-glucosa, y manteniendo constantes los niveles de proteína y lípidos, encontrando además en los primeros, altos niveles de triacilglicéridos plasmáticos. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por otros autores (Hilton et al., 1982; Likimani y Wilson, 1982; Hung et al., 1989).

Nuestros resultados están en concordancia con los descritos por estos autores ante este tipo de situación, de forma que la administración de la dieta exenta de carbohidratos, produjo una disminución significativa en los valores de velocidad de todos los enzimas hepáticos, siendo el comportamiento cinético el característico de enzimas con cinética hiperbólica. Al igual , que en todas y cada una de las situaciones descritas con anterioridad, no se apreciaron cambios significativos en la constante de

Michaelis, indicando una modificación significativa de la eficiencia catalítica de estos enzimas, y confirmando así la ausencia de cualquier tipo de modificación en los valores de la razón de actividad de estos sistema enzimáticos en el hígado de trucha. Tampoco se observó ningún tipo de adaptación de estos enzimas ante esta situación nutricional, en los restantes tejidos , lo que se refleja en la inexistencia de cambios significativos en la totalidad de sus parámetros cinéticos, demostrando una vez más, la falta de capacidad adaptativa de estos tejidos ante situaciones que modifican el status lipogénico normal de estos animales.

5. RESPUESTA METABOLICA DE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH EN LA SITUACION DE AYUNO

Los peces pueden sobrevivir a situaciones ocasionales de ayuno más o menos prolongadas sin ningún tipo de aporte exógeno (Love, 1970, 1980). Existen, no obstante evidencias de que su tolerancia a la inanición es debida a procesos de adaptación metabólica (Hochachka y Somero, 1973), en la que intervienen además los sistemas nervioso y endocrino (Moon et al., 1989; Eales, 1988; Sheridan y Mommsen, 1991), entre otros.

La situación de ayuno provocó en los cuatro sistemas productores de NADPH, una respuesta metabólica similar en prácticamente todos los tejidos estudiados, sin embargo, el patrón adaptativo de estos sistemas enzimáticos ha sido diferente, en función del estadio del desarrollo estudiado (reflejado en el tamaño corporal).

Una situación claramente lipolítica como el ayuno prolongado, implica entre otros procesos, movilización del depósito de grasa, por lo que parece lógico que la biosíntesis lipídica esté deprimida en tales circunstancias. <en este sentido, el suministro de equivalentes de reducción, necesarios para la síntesis de ácidos grasos y

otros procesos tales como los sistemas de destoxificación, y los procesos de crecimiento y proliferación celular entre otros, deben estar igualmente inhibidos. Así, en vertebrados superiores se ha descrito la enorme capacidad adaptativa de las deshidrogenasas del ciclo del fosfogluconato para modificar su actividad en respuesta diferentes regímenes alimentarios, disminuyendo su actividad durante el ayuno (Niemeyer et al., 1962; McDonald y Johnson, 1965). También en aves y peces (Shrago et al., 1971; Greenbaum et al., 1971; Pearce, 1971; Lin et al., 1977a,b), se ha demostrado la implicación de estos cuatro sistemas enzimáticos productores de NADPH en la producción de equivalentes de reducción en forma de NADPH, necesarios para el desarrollo del proceso de lipogénesis. En línea con esto, parece ser que el hígado es el principal sitio de lipogénesis en peces teleósteos, (Lin et al., 1977c; Henderson y Sargent, 1981; Henderson y Tocher, 1987; Greene y Selinovichik, 1987; Bastrop et al., 1991), mientras que el tejido adiposo está dedicado principalmente a la incorporación y almacenaje de los ácidos grasos originados *de novo* en el tejido hepático (Sargent et al., 1989). No obstante bajo nuestras condiciones experimentales, un ayuno prolongado (133 días), provocó una disminución significativa en la actividad de las dos deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato en hígado, tejido adiposo e intestino de trucha arco-iris. Los enzimas de hígado y tejido adiposo, presentaron un patrón de respuesta similar, con disminuciones significativas en los parámetros cinéticos de velocidad y eficiencia catalítica, y sin cambios en la K_m y la razón de actividad.

Este comportamiento cinético podría estar relacionado con una disminución en la concentración celular de esos enzimas, como consecuencia de fenómenos de represión enzimática que tienen lugar en estas condiciones nutricionales (Miksicek et al., 1982; Tomlinson et al., 1988), y es consistente con la disminución de la capacidad lipogénica, característica de esta situación nutricional, de la misma manera que ocurre en mamíferos (Nace et al., 1979; Prostko et al., 1989).

En la actualidad no se conocen cuáles son los mediadores específicos de la transcripción génica de la G6PDH frente a diversas situaciones nutricionales. Los azúcares por sí mismos, algunos de sus metabolitos, y/o hormonas segregadas en respuesta a las diferentes manipulaciones nutricionales pueden ser en general, consideradas como los principales candidatos. En línea con esto, se ha podido comprobar, que los efectos de diferentes situaciones nutricionales sobre la transcripción génica y la estabilización del ARN mensajero, ha sido observado también para otros enzimas relacionados con el proceso de lipogénesis, incluyendo a la sintasa de ácidos grasos (Back et al., 1986), y enzima málico (Godman et al., 1985).

De otra parte, la respuesta metabólica de la actividad de ambas enzimas en el intestino, ha sido diametralmente opuesta a la que muestra cada enzima en situaciones de régimen nutricional normal; así, la G6PDH aumentó su velocidad en aproximadamente veinte veces, mientras que la 6PGDH disminuyó su velocidad en un orden de magnitud prácticamente similar, manteniéndose este comportamiento durante todo el período de ayuno.

Está bien establecido que durante el ayuno, el metabolismo proteico no sólo cursa con incrementos en los esqueletos hidrocarbonados de los diferentes aminoácidos, sino también en la síntesis de poliaminas derivadas de la acción de diferentes descarboxilasas sobre ellos. Se ha observado que diferentes poliaminas, como putrescina, espermina, espermidina, y etilendiamina, ejercen efectos desinhibidores sobre la actividad de la G6PDH en diversos tejidos, de ahí que puedan potenciar esta ruta metabólica (Dodds et al., 1986; Rodríguez-Torres y Ramos-Martínez, 1987). Además, los aminoácidos pueden verse afectados también por desaminaciones oxidativas mediadas por D y L-aminoácido oxidasas, lo que incrementaría la producción de oxígeno, que tendría que ser eliminado a fin de evitar que dañase las estructuras celulares, para ello es necesario el NADPH que puede ser

producido, entre otros sistemas, por la vía de las pentosas fosfato. Es por esto que, las poliaminas generadas durante esta situación nutricional potenciarían la actividad G6PDH, normalmente baja en un régimen nutricional normal, produciéndose además una disminución significativa en la actividad de la 6PGDH con objeto de compensar el flujo a través de la ruta.

No obstante, y en función del comportamiento obtenido para ambas deshidrogenasas en el intestino, nos inclinamos a pensar que el incremento encontrado en la actividad de la G6PDH durante el ayuno, pueda estar mediado por una parte, por la acción desinhibidora de las poliaminas resultantes de la descarboxilación de determinados aminoácidos, y de otra, por las necesidades de poder reductor para neutralizar el oxígeno formado por la acción combinada de las oxidasas y peroxidasas, y que puede ser el responsable de la producción de daños celulares importantes.

Los restantes sistemas enzimáticos productores de NADPH, han diferido en su comportamiento frente a la situación de ayuno prolongado. El enzima málico hepático presentó una disminución significativa a lo largo de toda la curva de saturación, sin cambios significativos en los valores de afinidad para su sustrato, por lo que podemos asemejar su respuesta a la descrita para las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, estableciéndose una clara implicación de estos tres sistemas enzimáticos en el proceso de lipogénesis hepática (Kanungo y Prosser, 1959b; Hochachka, 1969; Hazel y Prosser, 1974; Yamauchi et al., 1975; Jürss et al., 1987, 1991; Wacke et al., 1989).

En contraste con este comportamiento, tanto la IDH-NADP hepática como de tejido adiposo, otro enzima potencialmente lipogénico, no presentó modificaciones significativas a lo largo de todo el período de ayuno. Este comportamiento, y a diferencia de los observado por otros autores (Bastrop y Jürss, 1987), indicaría una menor implicación en el proceso lipogénico que los sistema enzimáticos descritos anteriormente, lo que concuerda con las observaciones realizadas por Sheridan y

Momsen (1991), (ya que la disminución en la actividad IDH-NADP observada por Bastrop y Jürss (1987), se revertía a temperatura ambiente).

No obstante, Bastrop et al., encuentran un aumento en la actividad IDH-NADP de 1.9 veces en animales alimentados respecto de los ayunados.

De otra parte, hay que destacar la falta de respuesta de estos cuatro sistemas enzimáticos productores de NADPH en los restantes tejidos objeto de estudio ante la situación de ayuno, y al igual que en otras situaciones nutricionales estudiadas en esta memoria. Este comportamiento ante una situación claramente lipolítica como el ayuno, indica la poca relación existente entre estos tejidos y el proceso de lipogénesis.

Dado que, como hemos mencionado anteriormente, el hígado de trucha arco-iris es el órgano principal de síntesis *de novo* de ácidos grasos, se podría esperar una rápida bajada de los enzimas implicados en la lipogénesis tras la implantación de la situación de ayuno, ya que incluso en anguila, los niveles de síntesis lipídica disminuyen unas seis veces durante la primera semana de ayuno (Abraham et al., 1984). Sin embargo, Wacke et al., (1989), encuentran que los niveles de actividad de los sistemas enzimáticos productores de NADPH, no alcanzan un nuevo estado estacionario hasta el día 31 de ayuno. Este autor atribuye la baja capacidad de adaptación de estas actividades enzimáticas a la situación de ayuno, al régimen alimenticio al que habían estado sometidos los animales antes del comienzo de esta situación (una dieta con alto porcentaje de grasa), concluyendo por tanto, que la situación de ayuno no induce una rápida disminución en las actividades de los enzimas implicados en la lipogénesis si el nivel de esos enzimas en el hígado era inicialmente bajo, debido al régimen previo de alimentación. Este análisis explicaría, en parte, la controversia existente en la literatura científica respecto al comportamiento de estos sistemas enzimáticos ante una situación claramente lipolítica como es el ayuno. Así, Nagayama et al., (1972), encuentra un aumento de siete veces en la actividad de la G6PDH durante un ayuno de treinta días.

Buhler y Benville (1969), no encuentran reducción de la actividad G6PDH en el hígado de trucha arco-iris incluso después de ocho semanas de ayuno. Yamauchi et al., (1975), también en hígado de trucha arco-iris, sí observa una reducción significativa de las actividades G6PDH y 6PGDH, resultados que coinciden con los publicados por Moon et al., (1989), para trucha arco-iris durante un ayuno de seis semanas. Tranulis et al., (1991), en hígado de trucha arco-iris, observa una disminución de la actividad G6PDH de un 23 % tras un ayuno de 25 días. Lin et al., (1977a, b) encuentran que las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato en salmón coho sólo alcanzan un nuevo estado estacionario tras 23 días después de la implantación de la nueva situación. En carpa, esas enzimas alcanzan un nuevo equilibrio transcurridas cuatro semanas de ayuno (Shimeno et al., 1981a, b). Así pues, Wacke et al., (1989), a raíz de los resultados establecidos a través de la literatura científica, y de los suyos propios, concluye que los peces teleósteos, como la trucha arco-iris, que están adaptados genéticamente ante situaciones temporales de deficiencia alimentaria, tienden a guardar relativamente altos y estables los niveles de sus actividades enzimáticas.

Como ya se ha mencionado y establecido en nuestros resultados, el ayuno disminuye el nivel de actividad enzimática de la G6PDH, 6PGDH, y EM, tanto hepáticas como de tejido adiposo (sólo en las dos primeras).

En organismos ectotérmicos como los peces, normalmente son necesarios periodos mucho más prolongados de tiempo antes de que los niveles intracelulares de actividad enzimática alcancen un nuevo equilibrio (Lin et al., 1977a, b; Shimeno et al., 1981a, b; Morata et al., 1982; Jürss et al., 1985, 1986, 1992). Existe, como ya se ha descrito, una gran controversia en cuanto al desarrollo e implantación del nuevo estado estacionario de las actividades enzimáticas, así como de los factores que afectan dicho proceso. Con objeto de intentar esclarecer este aspecto, se sometió a esta situación nutricional a truchas con diferente tamaño corporal, encontrando que la capacidad de

adaptación, reflejada en el establecimiento de un nuevo estado estacionario de las actividades G6PDH, 6PGDH, y EM, consecuencia de una disminución significativa en sus actividades, variaba en función del estadio del desarrollo del animal. De modo que conforme disminuía el tamaño corporal del animal, se apreció una disminución en el tiempo de implantación de ese nuevo equilibrio en la actividad de los enzimas, ya que en animales con un peso de 180 g, las actividades no se modificaban hasta el día 98 de ayuno, mientras que a las cinco semanas ya se había producido una disminución significativa en los valores de actividad para los animales de 30 g y 100 g en tejido hepático.

Al haber mantenido todos los animales en las mismas condiciones nutricionales, se intentó eliminar la influencia de la variable nutricional, ya establecida en la literatura (Wacke et al., 1989), encontrando, bajo nuestras condiciones experimentales, que el estadio de desarrollo del pez afecta extraordinariamente a la capacidad de adaptación de estos sistemas enzimáticos a una situación claramente lipolítica como es el ayuno, de forma que, aunque los peces teleósteos tienden a mantener estables los niveles de sus actividades enzimáticas, tal y como se refleja en los resultados obtenidos en este experimento, esta capacidad disminuye, pudiendo modificarse más rápidamente, conforme disminuye el estadio de desarrollo del pez. Así pues, estos resultados contribuyen a esclarecer el desconcierto existente respecto a la capacidad de adaptación de estos enzimas lipogénicos a la situación de ayuno.

6. RESPUESTA METABOLICA DE LOS SISTEMAS PRODUCTORES DE NADPH EN LA SITUACION DE REALIMENTACION.

Está bien establecido que en mamíferos estos sistemas productores de NADPH disminuyen su actividad frente a la situación de ayuno. Así, Zelewski y Swierzcinsky, (1989), observan que la situación de ayuno causa una disminución significativa de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, y de el enzima málico en hígado y tejido adiposo marrón de rata, mientras que la realimentación con una dieta rica en carbohidratos origina un aumento significativo, por encima de los valores controles (fenómeno de overshoot) de los niveles de estas actividades. Un comportamiento similar se ha descrito para peces (Shimeno, 1982; Yamauchi et al., 1975), aunque no se ha encontrado para estas actividades el fenómeno de overshoot descrito para mamíferos (Yamauchi et al., 1975).

Sin embargo, aunque nuestros resultados concuerdan con los descritos anteriormente, encontrándose un aumento significativo respecto de valores ayunados a los 8 días del comienzo de la situación de realimentación, para los enzimas de hígado y tejido adiposo en las actividades G6PDH, 6PGDH, e IDH-NADP, y de hígado solamente para la actividad enzima málico, difieren en el orden de magnitud encontrado en los niveles de actividad de estos enzimas durante el periodo de realimentación, y en los tres estadios de desarrollo estudiados, ya que todos los sistemas enzimáticos productores de NADPH, a los 23 días de realimentación, presentaban un aumento significativo de casi 2.5 veces de sus niveles de actividad con respecto a valores controles en los tejidos descritos, para transcurridos 37 días de implantada la realimentación, restablecer los valores controles iniciales.

Si en mamíferos, durante la situación de realimentación, gran parte del pool de hexosas 6-fosfato son dirigidas hacia la síntesis de glucógeno, lo que provoca una disminución en su concentración (Boix-Joyeux et al., 1986). No obstante, en peces la disminución encontrada en la concentración de hexosas 6-fosfato podría explicarse (De Frutos et al., 1991), por una activación del ciclo de las pentosas fosfato durante esta situación nutricional, de forma que estas deshidrogenasas proporcionarían el NADPH requerido para la síntesis de novo de ácidos grasos, incrementándose esta tendencia, para posteriormente volver a los niveles controles.

Como hemos comentado anteriormente, la IDH-NADP de tejido hepático y adiposo sufre un aumento significativo durante la realimentación respecto de los valores ayunados, y teniendo en cuenta su comportamiento invariable durante el ayuno respecto de valores controles, se puede colegir, tal y como expone Shimeno, (1982), para los enzimas PGI, FDPasa, y PFK de hepatopáncreas de carpa, que en vez de asumir que el enzima no se influencia por la situación de ayuno, en realidad lo que ocurriría es que no se produce ningún aumento en la actividad durante el ayuno, y sí durante la realimentación

En el intestino, una vez implantada la realimentación se restauran los niveles normales de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, al desaparecer el efecto potenciador de las poliaminas, retomando la actividad 6PGDH el peso del flujo a través de la rama oxidativa de esta vía.

En los restantes tejidos, no se produce ningún tipo de modificación significativa durante la realimentación. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Yamauchi et al., (1975), para las dos deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato en corazón de trucha, y por Zelewski y Swierzcinsky, (1989), en corteza de riñón, cerebro, corazón músculo esquelético, y bazo de arata, concluyendo estos autores que no se produce una regulación coordinada de estos sistemas enzimáticos ante estados de

transición de situaciones lipolíticas/lipogénicas, en estos tejidos en principio no lipogénicos.

CONCLUSIONES

1. Al estudiar los sistemas enzimáticos productores de NADPH en diferentes estadios del desarrollo de la trucha arco-iris, no se encontraron modificaciones significativas entre los parámetros cinéticos de cada tejido, a lo largo de los diferentes pesos, y para cada uno de los sistemas enzimáticos estudiados.

2. Las diferentes condiciones nutricionales ensayadas, produjeron de forma general, cambios adaptativos importantes en el comportamiento cinético de los sistemas enzimáticos productores de NADPH. Siendo el hígado el tejido que experimentó los cambios adaptativos y metabólicos más pronunciados, de acuerdo con el papel que ejerce este órgano en el control del metabolismo

3. La variación en el nivel de proteína de la dieta, originó importantes cambios adaptativos en las actividades de las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, al estudiar tanto el efecto de la proteína, la sustitución de grasas por proteína, como la sustitución de carbohidratos por proteína, confirmándose la regulación de tipo proteína dependiente sugerida para estas actividades enzimáticas. Las actividades enzima málico e isocitrato deshidrogenasa-NADP también presentaron cambios adaptativos aunque no en la totalidad de las situaciones, destacando la regulación ejercida por las modificaciones en el nivel de carbohidratos sobre la capacidad de modulación de la actividad del enzima málico.

4. La administración de dietas que presentaban variaciones en los niveles tanto de grasas como de carbohidratos, también produjo importantes cambios adaptativos en las actividades G6PDH, 6PGDH e IDH-NADP hepáticas. La actividad enzima málico también se modificó ante la implantación de estas situaciones nutricionales, aunque estos cambios adaptativos se originaron en aquellas condiciones que implicaban

directamente modificaciones en el nivel de carbohidratos dietarios, confirmándose una vez más, la participación de estos macronutrientes en la regulación de esta actividad, junto con el papel añadido que este enzima pueda desempeñar en otras vías consumidoras de NADPH.

5. Los parámetros cinéticos de estos sistemas enzimáticos productores de NADPH, en riñón, músculo esquelético, intestino, corazón, bazo, y agallas, de trucha arco-iris, no sufrieron ningún cambio significativo bajo estas condiciones nutricionales, confirmándose la regulación órgano específica que presentan estos sistemas enzimáticos en la trucha arco-iris

6. Durante las situaciones de ayuno y realimentación, se produjo una modificación sustancial en las actividades de estos sistemas enzimáticos productores de NADPH, en hígado, tejido adiposo, e intestino de trucha arco-iris, sin que se apreciase ningún cambio significativo en el resto de los tejidos. Estas actividades, tanto en hígado como en tejido adiposo, con excepción de la actividad IDH-NADP, presentaron un patrón de respuesta similar, mientras que las actividades G6PDH, 6PGDH, e IDH-NADP en intestino, sufrieron las modificaciones más drásticas de todas la observadas.

7. El comportamiento experimentado por las actividades de estos sistemas enzimáticos durante las situaciones de ayuno y realimentación, presentó un patrón similar al estudiar dichas situaciones en animales pertenecientes a distintos estadios del desarrollo de la trucha arco-iris; aunque el tiempo de adquisición del nuevo estado estacionario en la actividad de estos sistemas enzimáticos, se redujo conforme disminuía el tamaño del animal utilizado en esas condiciones nutricionales.

8. Aunque no se aprecian diferencias significativas al estudiar los niveles de actividad de estos sistemas enzimáticos productores de NADPH en distintos estadios del desarrollo del pez, sí existen modificaciones significativas en la capacidad de adaptación de estas actividades en diferentes estadios juveniles del desarrollo de la trucha arco-iris, ante una situación nutricional tan especial como el ayuno prolongado.

CONCLUSION FINAL

Finalmente, y teniendo en cuenta las situaciones estudiadas en la presente Memoria, podemos concluir que, los sistemas enzimáticos productores de NADPH, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzima málico, e isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente, presentan una extraordinaria capacidad de adaptación ante distintos tipos de situaciones nutricionales y en distintos estadios del desarrollo de la trucha arco-iris.

BIBLIOGRAFIA

-
- Abrahan, S.; Hanse, H.J.M. y Hansen, F.N. (1984). **Comp. Biochem. Physiol.** 79B: 285-289.
- Aster, P. L., y Moon, T. W.(1981). **J. Nutr.** 111, 346-354.
- Atherton, W.D., Aitken, A. (1970). **Comp. Biochem. Physiol.** 36, 719-747.
- Avigad, G. (1966). **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 56, 1543-1551.
- Bachand, L., y Leary, C. (1975). **Comp. Biochem. Physiol.** 50 B: 567- 570.
- Baldwin, J. y Reed, K.C. (1976a). **Comp Biochem. Physiol.** 54B: 527-529.
- Baldwin, J. y Reed, K.C. (1976b). **Comp Biochem. Physiol.** 54B: 531-535.
- Ballarin, J.D., y Haller, R.D. (1982). **Recent advances in Aquaculture** (Muir, J.F., y Roberts, R.J. eds.), 256-356, Croom Helm, Londres.
- Belinsky, S.A., Reinke, L.A., Scholz, R., Kauffman, F.C., y Thurman, R.C.(1985). **Molecular Pharmacology** 28, 371-376.
- Bell, J. L. y Baron, D. N. (1968). **Enzymol. Biol. Clin.**, 9, 393-399.
- Biegiewska, A., y Skorkowski, E. F. (1983). **Comp. Biochem. Physiol.** 74 B, 627-632.
- Biegiewska, A., y Skorkowski, E. F. (1986). **21 European Mar. Bio. Symposium**, Gdansk, Abstr., p.84.
- Biegiewska, A., y Skorkowski, E. F. (1987). **Comp. Biochem. Physiol.** 86 B, 731-735.
- Biegiewska, A., y Skorkowski, E. F., y Storey, K. B. (1990). **Comp. Biochem. Physiol.** 95 B, 817-820.
- Bonsignore, A., De Flora, A., Mangiarotti, M.A., y Lorenzoni, I. (1966). **Ital. J. Biochem.** 15, 453-456.
- Böstrom, S. L., y Johansson, R. G. (1972). **Comp. Biochem. Physiol.**, 428, 533-542.
- Brigelius, R. (1985). **Oxidative Stress** (Sies, H. ed.)243-272. Academic Press.
-

-
- Carlier, M. F., y Pantaloni, D. (1973). **Eur. J. Biochem.**, 37, 341-354.
- Christiansen, D. G., Skarstein, L., y Klungsoyr, L. (1985). **Comp. Biochem. Physiol.** 82 A, 201-206.
- Colman, R. F. (1968). **J. Biol. Chem.**, 243, 2454-2464.
- Colman, R. F. (1975). **Adv. Enz. Reg.**, 13, 413-433.
- Conway, J. G., Kauffman, F. C., y Thurman, R. G. (1983). **J. Biol. Chem.**
- Cowey, C.B., (1979). En **Finfish nutrition and fishfeed technology**. Eds. Halver, J.E., y Tiews. I, 3-16, Heeheman, Berlín.
- Cowey, C.B., (1980). Eds. P.J. Buttery, y D.B. Lindsay. 271-288. Butterworths, Londres.
- Cowey, C. B., y Walton, M. J. (1989). **Fish Nutrition**, 2nd ed. Academic Press, 259-329.
- Driedzic, W. R., y Hochachka, P. (1978). **Fish Physiology**, 7, 503-543. Academic Press.
- Eggleston, L y Krebs, H.A. (1974). **Biochem. J.** 138: 425-435.
- Ekberg, D. R. (1958). **Biol.Bull.Mar.Bio.Lab.** Woods Hole, 114: 308-316, 326.
- Fabregat, I., Vitorica, J., Satrústegui, J., y Machado, A. (1985). **Arch. Biochem. Biophys.** 236, 110-118.
- Fitch. W.M., y Chaikoff, I.L. (1960). **J. Biol. Chem.** 235, 554-557.
- Freeman, B. A., y Crapo, J. D. (1982). **Lab. Invest.** 47, 312-426.
- Frenkel, R. (1972). **Arch. Biochem. Biophys.** 152, 136-143.
- Frenkel, R. (1975). Ed. Horecker y Stadtman. In **Current Topics in Cellular Regulation**. Academic Press, 9, 157-181.
- Fridovich, I. (1984). **Adv. Enzymol.** 41, 35-97.
- Glock, G. E., y McLean, P. (1953). **Biochem. J.**, 55. 400-408.
-

-
- Glock, G. E., y McLean, P. (1954). *Ibid.*, 56, 171-175.
- González, A.M, y Lagunas, R. (1977), *Mol. Cell. Biochem.* 17, 147-149.
3825-3831
- Greenbaum A. L., Gumaa,, K. A., y McLean P. (1971). *Archs. Biochem. Biophys.* 143, 617-663.
- Gross, M., Rubino, M.S. y Starm, T.K. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 12486-12492
- Gulyi, M.F. (1978). *UKr. Biokhim. Zh.* 49, 115-129.
- Halliwell, B. y Gutteridge, M. C. (1984). *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Harding, D.E., Allen, O.W., y Wilson, R.P. (1977). *J. Nutr.* 107, 2031-2035.
- Hazel, J.R., y Prosser, C.L. (1974). *Physiol. Rev.*, 54: 620-677.
- Head, E. J. H., Y Gabbott, P. A. (1980). *Comp. Biochem. Physiol.* 66B, 285-289.
- Henderson, R. J., y Sargent, J. R. (1981). *Comp. Biochem. Physiol.* 82B, 79-85.
- Hilton , J.W., y Slinger, S.J. (1981). *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 55, 15p.
- Hochachka, P-W. (1962). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2: 499-505.
- Hochachka, P. W., Teal, J. M., y Telford, M. (1962). *Can. J. Biochem. Physiol.* 40, 1043-1050.
- Hochachka, P. W. (1967). *Symposium of the American association.*
Publication nº 84. Washington 177-203.
- Horecker, B. L. (1951). Ed. McElroy y Glass. 1, 138-144.
- Hsu, R. Y. (1982). *Molec. Cell. Biochem.* 43, 3-26.
- Illingworth, J. A., y tipton, K. F. (1970a). *Biochem. J.* 118, 253-258.
- Iritani, N., Ikeda, Y., Fukuda, H., y Katsurada, A. (1984). *Lipids*, 19, 828-835.
-

-
- Islam, K., Bell, J. L., y Baron, D. N. (1972). **Biochem. J.** 129, 1003-1011.
- Junge, O., y Brand, K. (1975). **Arch. Biochem. Biophys.** 171, 398-406.
- Jürss, K., Bittorf Th., Vökler Th., y Wacke R. (1987), **Comp. Biochem. Physiol.** 87B, 241-253.
- Kan, B., London, I.M. y Levin, D.H. (1988). **J. Biol. Chem.** 263: 15652-15656.
- Katz, J. y Wood, H. G. (1960). **J. Biol. Chem.**, 325: 2165-2177.
- Kauffmann, F.C., Evans, R.K., Reinke, L.A., y Thurman, R.G. (1979). **Biochem. J.** 184, 675-681.
- Kaushik, S.J. (1979). En **Finfish Nutrition and Fish Feed Technology**. Ed. Halver- Tiews, 1, 197-207.
- Kornberg, A. y Horecker, B. L. (1955). Ed. Kaplan, Academic Press, 1, 323-334.
- Levy, H.R., y Chritoff, M. (1983). **Biochem. J.** 214, 959-965.
- Likimani, T.A., y Wison, R.R. (1982). **J. Nutr.** 112: 112-117.
- Lin , H., Romsos, D.R., Tack, P.I., y Leveille, G.A., (1977a). **J. Nutr.**: 846-854.
- Lin , H., Romsos, D.R., Tack, P.I., y Leveille, G.A., (1977b). **J. Nutr.**: 1477-1483.
- Lin , H., Romsos, D.R., Tack, P.I., y Leveille, G.A., (1977c). **J. Nutr.**: 1677-1682.
- Lin, R. C., y Davis, E. J. (1974). **J. Biol. Chem.** 249, 3867-3875.
- LLobel, A., López-Ruiz, A., Peinado, J., y López-Barea, J. (1988). **Biochem. J.** 249, 293-296.
- Love, R. M. (1980). 2nd. Ed. Academic Press, London.
- Lowry, O. H. (1951). **J. Biol. Chem.** 193, 265- 275.
-

-
- MacFarlane, N., Mathews, B., y Dalziel, K. (1977). **Eur. J. Biochem.** 74,553-557.
- Mangiarotti, G., Garre, C., De Flora, A., Y Bonsignore, A. (1965). **Ital. J. Biochem.** 14, 67-75.
- Massarini, E., y Cazzulo, J. J. (1975). **Experientia**, 31, 1126-1128.
- McDonald, B. E. y Johnson, B.C. (1965). **J Nutr.** 87: 161-167
- Milne, J. A., y Cook, R. A. (1979). **Biochemistry**, 18, 3604-3610.
- Mita, M., y Yasumasu, I. (1979). **Biochem. Biophys. Res. Commn.** 86, 961-967.
- Mita, M. y Yasumasu, I. (1983). **Arch. Biochem. Biophys.** 226, 19-26.
- Mizuno, Y. (1985). **J. Neurol. Sci.** 68, 47-60.
- Moldeus, P., Grundin, R., Vadi, H., y Orrenius, S. (1974). **Eur. J. Biochem**, 46, 351-360.
- Moon, T. W., y Hochachka, P. W. (1971) **Biochem. J.** 123, 695-705.
- Moon, T W. (1972). **Comp. Biochem. Physiol.** 43B, 525-538.
828.
- Moon, T. W., y Quellet, G. (1979). **Archs. Biochem. Biophys.**, 195, 438-452.
- Moreadith, R. W., y Lehninger, A. L. (1984). **J. Biol. Chem.**, 259, 6222-6227.
- Munilla-Morán, R., y Stark, J. R. (1989) **Comp. Biochem. Physiol.** 93B
- Nagai, M. e Ikeda, S. (1972). **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 38: 137-143.
- Nagayama, F., Oshima, K., y Umesawa, (1972). **Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.**, 38: 589-593.
- Nagayama, F., Oshima, E., Umesawa, I., y Umitama, K. (1972). **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, 38, 595-598.
- Nagel, W. O., y Sauer, L. A. (1982). **J. Biol. Chem.**, 257, 12405-12411.
- Negelein, E., y Haas, E. (1935). **Biochem. Z.** 282, 206-220.
-

- Nicholls, F., Nicholls, P., y Sand, O. (1976). **Comp. Biochem. Physiol.**, 54 B, 461-466.
- Nicholls, D. G., y Garland, P.B. (1969). **Biochem. J.** 114, 215-225.
- Nogueira, M., García, G., Mejuto, C., y Freire, M. (1986). **Biochem. J.** 239, 553-558.
- Nose, T. (1972). **Bull. Fresh. Fish. Res. Lab.** 22, 137-144.
- Parvin, R., Pande, S., y Venkitasubramanian, T. A. (1964). **Biochim. biophys. Acta**, 92, 260-277.
- Pearce, J. (1980). **Br. J. Nutr.** 44: 315-324.
- Peragón, J., Aranda, F., García-Salguero, L., y Lupiáñez J. A. (1989). **Int. J. Biochem.**, 6, 689-694.
- Rodríguez-Segade, S., Freire, M., y Carrión, A. (1978). **Biochem. J.** 170, 557-582.
- Rodríguez-Torres, A. M., Villamarín, A., Carballal, C., Vázquez-Illanes, MD., y Ramos-Martínez, J.I. (1987). **Rev. Esp. Fisiol.** 43, 7-12.
- Rogers, Q.R., Morris, J.G., y Freeland, R.A. (1977). **Enzymes** 22, 348-356.
- Rogers, Q.R., y Morris, J.G. (1980). (Ed Anderson) Pergamon Press. Oxford.
- Ruiz-Ruano, A., Herranz-Santos, M. J., y Ruiz Amil, M. (1985). **Comp. Biochem. Physiol.** 81B, 953-957.
- Rumsey, G.L. (1981). **Salmonid**, 5, 20-24.
- Rush, G.F., y Alberts, D. (1986). **Toxicol. and Appl. Pharmacol.** 85, 324-331.
- Sapag-Hagar, M., Lagunas, R., y Sols, A. (1973). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 50, 179-185.
- Sauer, L. A. (1973). **Biochem. biophys. Res. Commun.**, 50, 524-531.

-
- Schuster, R., Holzhütter, H., y Jacobasch, G. (1988). **BioSystems** 22, 19-36.
- Scott, D. B., y Cohen, S. S. (1953). **Biochem. J.**, 55, 23-26.
- Shichi, H., Hodder, W. A., y Giblin, F.J. (1986). **J. Ocular Pharmacol.** 2, 59-66.
- Shimeno, S., y Takeda, M. (1972). **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 38: 645-650.
- Shimeno, S., y Takeda, M. (1973). **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 39: 461-466.
- Shimeno, S. (1982). V.S. Kotherkar, p.: 123.
- Skorkowski, E. F., y Storey, K. B. (1990). **Fish. Physiol. Biochem.** 8, 475-484.
- Skorkowski, E. F., y Storey, K. B. (1988). **Fish. Physiol. Biochem.**, 5, 241-258.
- Skorkowski, E. F., y Storey, K. B. (1990). **Int. J. Biochem.**, 22, 471-475.
- Swierczynski, J., Scislowski, P. W. D., y Skorkowski, E. F. (1980). **Comp. Biochem. Physiol.** 67 B , 49-55.
- Thurman, R.G., Marazzo, D.P., Jones, L.S., y Kauffman, F.C. (1977). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 201, 498-506.
- Tocher, D. R., y Sargent, J. R. (1984b). **Lipids** 19, 492-499.
- Tranulis, M. A., Christophersen, B., Blom, A. K., y Borrebaek, B. (1991). **Comp. Biochem. Physiol.** 99B, 687-691.
- Vague, J., y Fenasse, R. (1965). Renol y Cahill eds. p. 25. **Amer. Physiol. Soc.**, Washington, D. C.
- Veech, R.L., Eggleston, L.V., y Krebs, H.A. (1969). **Biochem. J.** 115, 609-619.
- Vernon, R. G. (1980). **Biochem. Soc. Trans.** 8, 291-292.
- Walton, M. J., y Cowey, C. B. (1982). **Comp. Biochem. Physiol.** 73B, 59.
- Walton, M. (1985). **Comp. Biochem. Physiol.** 82B, 87-90.
-

- Walton, M.J.(1986) **Fish. Physiol. Biochem.** 1, 7-15.
- Warburg, O., y Christian, W. (1931). **Biochem. Z.**, 242, 206-227.
- Ward, C. W., y Schofield, P. J. (1967). **Comp. Biochem. Physiol.** 23, 335-339.
- Wiegand, M. D. e Idler, S. R. (1982). **Can. J. Zool.** 60, 2683-2693.
- Wilson, R.P. (1973). **Comp. Biochem. Physiol.** 46B, 617-624.
- Yamauchi, T., Stegeman, J. J., y Goldberg, D. M. (1975). **Arch. Biochem. Biophys.** 167: 13-20.
- Zebian, M.F. (1977). These Doct. Spec. Tolouse, 89 p.