

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Biología Animal  
Ecología y Genética

**CAPACIDAD DE ADAPTACION DEL  
METABOLISMO INTERMEDIARIO DE LA  
TRUCHA A VARIACIONES EN LA  
COMPOSICION DE LA DIETA**

TESIS DOCTORAL

María José Sánchez-Muros Lozano



Biblioteca Universitaria de Granada



01533716

Granada, 1990

T. 10-146

T  
12  
64

FACULTAD DE CIENCIAS

CAPACIDAD DE ADAPTACION DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO  
DE LA TRUCHA A VARIACIONES EN LA COMPOSICION  
DE LA DIETA

Maria José Sanchez Muros Lozano

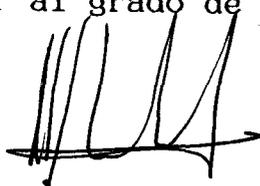
UNIVERSIDAD DE GRANADA

1990

BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	6965518
Nº Copia	21202679

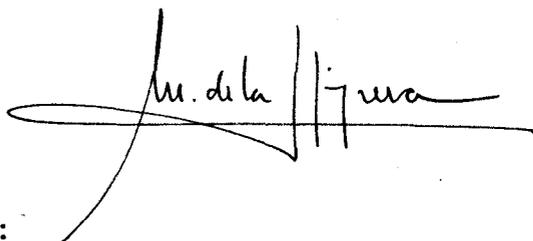
CAPACIDAD DE ADAPTACION DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO  
DE LA TRUCHA A VARIACIONES EN LA COMPOSICION  
DE LA DIETA

Memoria que presenta la licenciada  
en Ciencias Biológicas D<sup>a</sup> Maria  
José Sanchez Muros Lozano para  
aspirar al grado de doctora.

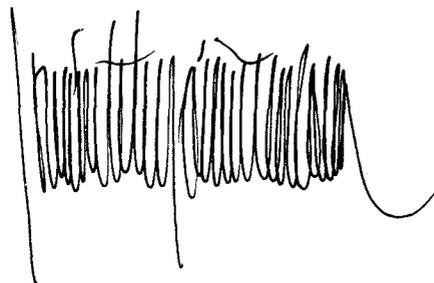


Fdo. M<sup>a</sup> José Sanchez Muros Lozano

DIRECTORES DEL TRABAJO:



Fdo:  
Prof. Dr  
D Manuel de la Higuera Gonzalez



Prof. Dr.  
D. José A. Lupiañez Cara

Este trabajo está incluido en el proyecto de investigación "Influencias nutritivas y hormonales sobre la regulación del metabolismo en hígado y riñón de trucha ". Proyecto 1/2: 1986 subvencionado por la Junta de Andalucía

En esta página quiero expresar mi agradecimiento a todos los que de alguna forma me ayudaron en este trabajo.

En primer lugar a mis directores, D. Manuel De la Higuera Gonzalez y D. Jose Antonio Lupiañez Cara por la dedicación prestada y el apoyo y confianza que me han brindado.

También quiero agradecer la colaboración de Do. Laura Garcia Rejón y Do. A. Encarnación Morales Hernandez, tan ligadas a este trabajo.

Gracias en general a los compañeros de la unidad de Fisiología Animal por su grata compañía, consejos y cariño, así como las colaboraciones recibidas por el Departamento de Bioquímica.

Hago extensivo el agradecimiento a D. Julio Domezaín Fau, de "Piscifactoria Sierra Nevada", por el suministro de todos los animales utilizados en este trabajo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, que con la concesión de una beca del P.F.P.I. facilitó la realización de esta memoria.

Finalmente no me puedo olvidar de JuanRa, por las horas pasadas frente al ordenador, así como por la ayuda y cariño que en los momentos difíciles me ha demostrado.

A mis padres por su inapreciable ayuda

A Claudio, por su tierna desayuda

## ABREVIATURAS

AAT	Alanina aminotransferasa
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMP <sub>c</sub>	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
ATPMg	Adenosín trifosfato magnésico
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
E. C.	Comisión Internacional de Enzimas
EDTA	Acido etiléndiamino-tetraacético
FBP	Fructosa 1,6-bisfosfato
FBPasa	Fructosa 1,6-bisfosfatasa
F6P	Fructosa 6-fosfato
3-GAP	Gliceraldehido 3-fosfato
αGPDH	α-Glicerolfosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOD	Glucosa oxidasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
αKG	α-cetoglutarato
L-Ala	L-Alanina
LDH	Lactato deshidrogenasa
NAD	Nicotín adenín dinucleótido
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
OAA	Oxalacetato
PEP	Fosfoenol piruvato
PFK	Fosfofructo quinasa
2-PG	2-fosfoglicerato
PGI	Fosfoglucosa isomerasa
PK	Piruvato quinasa
POD	Peroxidasa
TPI	Triosa fosfato isomerasa

INDICE

1.-OBJETO.....	1
2.-INFORMACION BIBLIOGRAFICA.....	7
2.1.-LA PROTEINA EN LA NUTRICION DE LOS PECES.....	7
2.1.1.-NECESIDADES PROTEICAS.....	7
2.1.2.-NECESIDADES AMINOACIDICAS.....	12
2.1.2.1.-NECESIDADES CUANTITATIVAS.....	12
2.1.2.2.-NECESIDADES CULITATIVAS.....	13
2.1.3.-SINTESIS PROTEICA.....	15
2.1.3.1.-MECANISMOS DE SINTESIS.....	15
2.1.3.2.-FACTORES QUE LA AFECTAN.....	18
2.1.4.-METABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS.....	20
2.1.4.1.-CATABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS Y EXCRECION DE NITROGENO.....	20
2.1.4.2.-REGULACION DEL METABOLISMO AMINOACIDICO.....	25
2.2.-LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LA NUTRICION DE LOS PECES.....	28
2.2.1.-PAPEL DE LOS GLUCIDOS EN LA ALIMENTACION DE LOS PECES.....	28
2.2.2.-METABOLISMO DE LOS GLUCIDOS.....	31
2.2.2.1.-RUTAS CATABOLICAS.....	31
2.2.2.2.-GLUCONEOGENESIS.....	39
2.3.-LOS LIPIDOS EN LA NUTRICION DE LOS PECES.....	42
2.3.1.-PAPEL ENERGETICO DE LOS LIPIDOS.....	42
2.3.2.-NECESIDADES DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES...	44
2.3.3.-METABOLISMO LIPIDICO.....	46
2.3.3.1.-SINTESIS DE LIPIDOS.....	46

2.3.3.2. CATABOLISMO LIPIDICO.....	50
2.4.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO PROTEICO A VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE LA DIETA .....	52
2.4.1.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN PROTEINAS.....	52
2.4.2.-EFECTO DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN HIDRATOS DE CARBBONO....	57
2.4.3.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA.....	59
2.5.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO GLUCIDICO A VARIACIONES EN COMPOSICION DE LA DIETA.....	60
2.5.1.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GLUCIDOS.....	60
2.5.2.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA.....	62
2.5.3.-EFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN PROTEINAS .....	63
2.6.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO LIPIDICO A VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE LA DIETA .....	65
2.6.1.-EFECTOS DELA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA.....	65
2.6.2.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN PROTEINA.....	67
2.6.3.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN HIDRATOS DE CARBONO.....	68
2.7.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO AL AYUNO.....	70
2.8.-INFLUENCIAS HORMONALES SOBRE EL METABOLISMO....	73

2.8.1.-INSULINA.....	73
2.8.2.-GLUCAGON.....	75
2.8.3.-CATECOLAMINAS.....	76
2.8.4.-CORTICOIDES.....	77
3.-MATERIAL Y METODOS.....	79
3.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL.....	81
3.2.-ANIMALES Y MANTENIMIENTO.....	84
3.2.1.-CONTROL DE PESO.....	84
3.2.2.-DIETAS EXPERIMENTALES.....	85
3.3.-METODO ANALITICO.....	86
3.3.1.-COMPOSICION DE INGREDIENTES Y DIETAS.....	86
3.3.2.-DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS..	87
3.3.3.-DETERMINACION DE GLUCOSA EN SANGRE.....	98
3.3.4.-DETERMINACION DE AMINOACIDOS TOTALES EN PLASMA.....	100
3.3.5.-DETERMINACION DE GLUCOGENO HEPATICO.....	101
3.3.6.-DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES.....	102
3.3.7.-INDICES BIOLÓGICOS DE UTILIZACION DE LA DIETA.....	104
3.3.8.-METODO ESTADÍSTICO.....	105
4.-RESULTADOS.....	107
4.1.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE HIGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA A UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN PROTEINAS.....	109
4.2.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE HIGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA A LA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN HIDRATOS DE CARBONO.....	127
4.3.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE	

HIGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA A LA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA.....	143
4.4.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE HIGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA AL AYUNO.....	159
4.5.-INTERRELACION ENTRE EL COMPORTAMIENTO CINETICO DE LOS ENZIMAS ENSAYADOS Y EL NIVEL DE PROTEINA DE LA DIETA.....	175
4.6.-NIVELES DE GLUCOGENO HEPATICO, GLUCOSA Y AMINOACIDOS PLASMATICOS .....	184
5.-DISCUSION .....	185
6.-CONCLUSIONES .....	220
7.-BIBLIOGRAFIA.....	226

1- OBJETO



## 1-OBJETO

El cultivo intensivo de peces depende, fundamentalmente, del desarrollo de dietas ajustadas a las necesidades de la especie, es decir, que cubran las necesidades en nutrientes esenciales y que exista un equilibrio óptimo entre ellos, especialmente entre aquellos que interaccionan positiva o negativamente en cuanto a disponibilidad para crecimiento y fisiologismo óptimos. La dieta supone más del 50% del costo de la producción intensiva de peces, de ahí el interés continuo por la optimización nutritiva y económica de las dietas comerciales.

La trucha arcoiris ha sido el pez tipo utilizado en nuestros ensayos por varios motivos: por una parte, la mayor información disponible relativa al metabolismo intermediario de los peces y su utilización preferente como modelo experimental en estudios de nutrición con estos animales y, por otra, la experiencia del Grupo de Investigación y lo adecuado de sus instalaciones para estudios con salmónidos.

La trucha arcoiris, como carnívoro, en su medio natural ingiere una dieta rica en proteínas a la que parece evolutivamente adaptada, hasta tal punto, que los aminoácidos son el sustrato energético de preferencia. Sin embargo, ese destino energético puede ser sustituido por grasa y/o hidratos de carbono, lo que ha permitido una cierta aproximación, en aquellas especies más estudiadas, a un equilibrio válido, desde el punto de vista de los índices de conversión y rentabilidad de la dieta. Además, el que algunos tejidos utilicen glucosa como metabolito energético básico y el que un régimen carnívoro incluya bajos niveles de hidratos de carbono, hace que la formación de glucosa, a partir de aminoácidos, sea una ruta importante para un carnívoro en su medio natural. En estas circunstancias, la inclusión de hidratos de carbono en la dieta podría sustituir el destino gluconeogénico de los aminoácidos, además de aportar energía directa, aunque en las presumibles bajas proporciones de utilización en

estas especies.

Desde el punto de vista de la nutrición básica, el papel que juegan los lípidos y los hidratos de carbono, en la utilización de "in totum" de la proteína para crecimiento, está suficientemente documentado como para establecer unos mínimos óptimos de proteína y unos máximos óptimos de lípidos y/o de hidratos de carbono que aseguren altas tasas de conversión del alimento. Sin embargo, aún cuando se han estudiado las influencias de la composición de la dieta, a un nivel más íntimo de utilización metabólica de los aminoácidos, ácidos grasos, glucosa y otros metabolitos directamente relacionados con estos tres grupos de nutrientes, esos estudios han sido parciales en cuanto a las rutas metabólicas pulsadas, lo que no ha permitido, para un determinado diseño, relacionar simultáneamente las distintas rutas del metabolismo intermediario.

Por otra parte, cuando los ensayos de utilización nutritiva han descendido a nivel enzimático, éstos se han limitado, generalmente, a determinaciones con niveles saturantes de sustrato, obviando la información que pudiera derivarse de las determinaciones a nivel subsaturante y, especialmente, aquellas con estudios de cinética y valoración de los metabolitos implicados.

En el otro extremo, se dispone de algunos estudios exhaustivos de cinética enzimática "in vitro", limitados a una determinada situación nutritiva experimental previa. En el presente trabajo se pretende abordar ese espacio intermedio que cubre la influencia, sobre la cinética de una determinada enzima, de una situación nutritiva dada, abordando simultáneamente, ese estudio enzimático a nivel de las principales rutas del metabolismo intermediario. En este sentido, la influencia del aumento del nivel proteico, o de un nivel graso más alto, o del mayor contenido en hidratos de carbono, siempre para dietas isocalóricas y en el caso especial del ayuno, sobre el catabolismo aminoacídico, gluconeogénesis, glucólisis, y vía de las pentosas fosfato, ésta última como vía de oxidación de la glucosa y de suministro de equivalentes de

reducción para síntesis de ácidos grasos y otros compuestos, se evaluará a través de enzimas representativos de estas rutas como: glutamato deshidrogenasa, fructosa 1,6-bisfosfatasa, piruvato quinasa, fosfofructoquinasa y glucosa 6-P deshidrogenasa.

Creemos que los resultados que se deriven de este estudio permitirán valorar las capacidades adaptativas, de las principales rutas metabólicas del metabolismo intermediario de la trucha, a cambios sustanciales en la composición de la dieta. Esas capacidades deberán ser parte, al menos, de la base bioquímica para el diseño de las dietas y, en cualquier caso, nos permitirán profundizar en el conocimiento del metabolismo intermediario de la trucha y su interacción con la dieta. En definitiva, creemos que las consideraciones hechas, en los párrafos precedentes, que, por otra parte, coinciden con las conclusiones y recomendaciones para orientar futuras investigaciones, que se derivaron de los grupos de trabajo del reciente " Simposio Internacional Sobre Nutrición y Alimentación de Peces" celebrado, el pasado Septiembre, en Toba (Japón), justifican sobradamente los objetivos de esta memoria.



2-INFORMACION BIBLIOGRAFICA



## 2.1-LA PROTEINA EN LA NUTRICION DE LOS PECES

### 2.1.1-NECESIDADES PROTEICAS

La proteína es, en materia seca, el componente mayoritario de los peces (65-70%), siendo el músculo esquelético el tejido donde se depositan fundamentalmente.

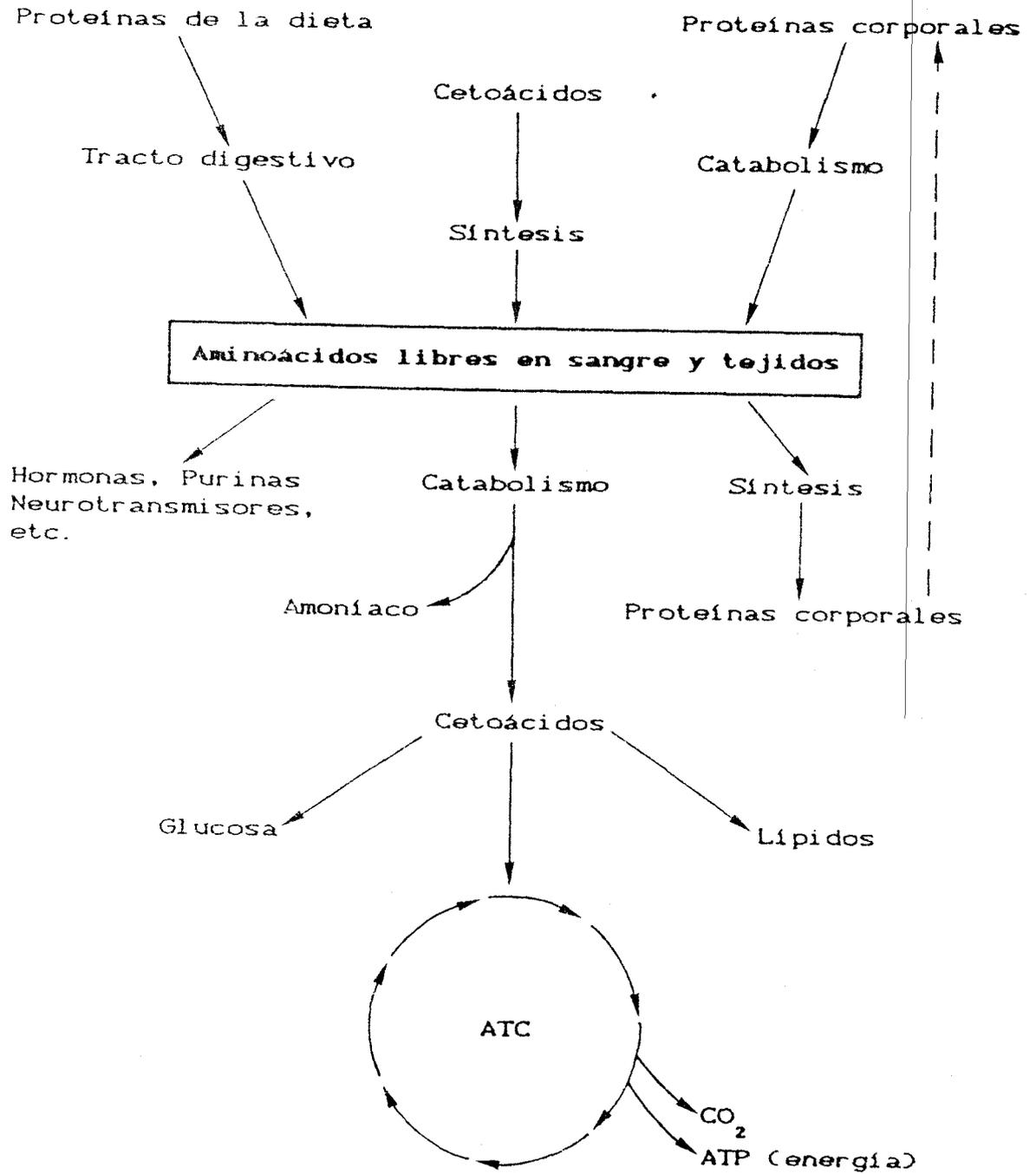
La proteína ingerida es hidrolizada en el digestivo hasta aminoácidos y estos son absorbidos y distribuidos en los diferentes tejidos, donde son utilizados para la síntesis de nuevas estructuras tisulares (crecimiento), para reponer las ya existentes (mantenimiento), o bien pueden ser catabolizados para obtener energía en mayor o menor grado dependiendo del estado fisiológico, edad y condiciones ambientales, igual que en el resto de las especies de interés zootécnico. Sin embargo, los peces, tanto de agua dulce como salada, presentan unas necesidades protéicas mayores que otros animales (De LONG et al. 1958; DUPRE y SNEED, 1966; COWEY 1975; COWEY et al. 1970) y, además, esa proteína ha de ser de gran calidad.

En la FIG 2.1 podemos ver las diferentes rutas metabólicas seguidas por las proteínas así como las distintas fuentes de esta, siendo las proteínas de origen dietario cuantitativamente la más importante en situaciones nutritivas normales.

Las necesidades protéicas hay que contemplarlas de acuerdo con un adecuado balance de aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales y una relación proteína/energía equilibrada. Así, los niveles óptimos de proteína están determinados, en definitiva, como en otros animales, por el balance proteína-energía teniendo gran importancia la calidad de la proteína (proporción aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales y una alta digestibilidad) y la cantidad de energía de origen no protéico que aporta la dieta (grasa y/o hidratos de carbono).

En peces, uno de los principales destinos de los aminoácidos dietarios, aparte de los descritos antes para

FIG. 2.1.-Principales rutas del metabolismo de aminoácidos (WALTON, 1987)



proteínas, es la producción de energía (COWEY, 1979 y 1980; CHO y KAUSHIK, 1985) y ,además son utilizados como sustrato energético,preferentemente a los hidratos de carbono (TACON y COWEY, 1985).Numerosos autores han obtenido una mayor utilización de la proteína con fines de crecimiento al mejorar la relación proteína/energía, disminuyendo el aporte protéico,con las ventajas que esto supone,y aumentando el lipídico o incluso sustituyendo parte de la proteína por grasa.Los mejores resultados se han obtenido en salmónidos (RINGROSE, 1971; de la HIGUERA et al, 1977 a; LEE y PUTMAN, 1973; TAKEUCHE et al. 1978 b y c; YU y SINNHUBER, 1981),carpa (VIOLA y RAPPORT, 1979) y tilapia (WINFREE y STICKNEY, 1981).

La utilización de los hidratos de carbono como fuente de energía en peces,al contrario que en mamíferos,es menos efectiva ya que estos, son mal utilizados, sobre todo en carnívoros,pués,por una parte, tienden a digerirlos mal, y sobre todo si no han tenido un tratamiento que aumente su digestibilidad (PHILLIPS y BROCKAWAY,1959 ;SINGH y NOSE,1967) y por otra parte los peces regulan mal los niveles de glucosa en sangre (PALMER y RYMAN,1972 ;BERGOT,1979 a).Aún así,las necesidades de glucosa en algunos tejidos y su cierta, aunque escasa, acción de ahorro de proteínas hacen necesaria su inclusión en dietas para peces.

Es importante, en cualquier caso, mantener una relación equilibrada entre la energía que aporta cada nutriente y el aporte total de energía ;un exceso de densidad de energía en la dieta puede limitar la ingesta proteica ya que los peces,como otros animales,comen hasta satisfacer sus necesidades de energía (LEE y PUTMAN,1973 ;PAGE y ANDREWS,1973), lo que podría causar deficiencias protéicas al no ingerir la cantidad necesaria de este nutriente.

Como apuntábamos antes existen otros factores que afectan a las necesidades de proteína.Normalmente cuanto mayor es la edad y la talla del pez los requerimientos relativos son menores,por ejemplo salmónidos jóvenes

requieren un 40%, mientras que para los de un año las necesidades bajan a un 35% (HILTON y SLINGER, 1981; NCR, 1981). BALARIN y HALLER (1982), en una revisión sobre tilapia, concluyen que peces menores de 1 gramo requieren del 35-50% de proteína en la dieta, los de 1 a 5 gramos necesitan un 30-40%, en los de 5 a 25 gramos el nivel de proteína necesario está alrededor del 25-30% y para peces mayores de 25 gramos hay que aportar de un 20 a un 25% de proteína. La temperatura también influye en las necesidades protéicas de algunas especies de peces: en el salmón chinook aclimatado a 8°C las necesidades protéicas son del 40% y suben al 55% para los aclimatados a 15°C (De LONG et al. 1958), mientras que en la trucha arcoiris alimentada con dietas diferentes en el porcentaje de proteína (35, 40 y 45%) y variando la temperatura de 9 a 18°C no se hallaron diferencias en los requerimientos protéicos (NCR, 1981). Al variar con la temperatura, en casi todas las especies, el nivel de ingesta y la tasa de crecimiento, es conveniente determinar una temperatura óptima para el mejor aprovechamiento de la dieta.

La salinidad también puede alterar las necesidades protéicas en las especies de peces eurihalinas y estenohalinas. De hecho en la trucha arcoiris se han encontrado unas necesidades mayores en los animales mantenidos con una salinidad del 20%, frente a los mantenidos en un medio al 10%, (ZEITOUN et al. 1974) lo que se considera como un mecanismo necesario en el proceso de osmoregulación, frente a medios hiperosmóticos. En *Raja erinacea* hay una disminución de aminoácidos libres en músculo esquelético y glóbulos rojos al disminuir la salinidad del agua (GOLDSTEIN et al., 1975). Para otros autores, como VENKATACHARI (1974), el aumento de aminoácidos libres se debe a un aumento de la proteólisis, sin un aumento de las necesidades protéicas. JURSS et al. (1985) obtienen, en truchas cultivadas a 8% y 20% de salinidad, crecimientos similares con una dieta conteniendo 50% de proteína, sólo si los animales han sido alimentados "ad libitum". En términos generales, se puede decir que el efecto de la salinidad sobre los requerimientos protéicos es escaso.

Lo que sí parece claro es que las necesidades protéicas, así como las mejores tasas de crecimiento, no son absolutas sino que varían en función de la interacción de los factores antes estudiados (temperatura, salinidad, edad, etc.), encontrándose variaciones en los niveles óptimos por modificación e interacción de estos factores. En este sentido, ALLIOT et al. (1983) han observado en la lubina una cierta relación entre la temperatura y la salinidad: a 22°C obtuvieron mayor crecimiento con salinidades del 6 y 37%, mientras que para salinidades del 11 y 24%, la temperatura óptima, para máximo crecimiento, fue de 15°C. ARIAS (1976) obtiene mejores crecimientos en juveniles de lubina a salinidades bajas. ALLIOT y PASTOUREAU (1979) han propuesto mecanismos diferentes de regulación osmótica, según sean juveniles o adultos, que explicarían estas diferencias.

Un aspecto interesante, en relación a las necesidades protéicas de los peces, es las elevadas necesidades que mantienen, incluso los adultos, lo que no se observa en otros animales de granja. Teniendo en cuenta que las necesidades protéicas se pueden considerar como suma de las necesidades de aminoácidos esenciales y no esenciales, parece lógico pensar que pudieran ser debidas a la elevada necesidad de alguno o algunos aminoácidos esenciales, pero cuando estas se comparan, expresadas en tanto por ciento de proteína, con las de otros animales, no aparecen diferencias importantes que justifiquen las mayores necesidades protéicas de algunas especies de peces.

Para otros autores, las altas necesidades protéicas pueden ser reflejo de unos diferentes mecanismos bioquímicos. 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 ésta 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). Esto mismo 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 proteínas, por lo que utilizan estas como fuente de energía y, en consecuencia, mantienen unos niveles desaminativos bastante altos e independientes del aporte protéico exógeno. Esto, junto con la alta afinidad que presentan, las transaminasas hepáticas de los peces, por su sustrato (WALTON y COWEY, 1979 b) y el hecho de que los peces presenten una elevada tasa de oxidación de los aminoácidos esenciales, aún con un escaso aporte protéico (COWEY y SARGENT, 1979) ponen de manifiesto el poco control que ejercen estos animales sobre el metabolismo de los aminoácidos, con la consiguiente pérdida de Nitrógeno y, por tanto, la necesidad de ingerir grandes cantidades de proteína.

## 2.12.-NECESIDADES DE AMINOACIDOS

La proteína ingerida tras la digestión libera los aminoácidos que la constituyen y estos son absorbidos, incorporándose al pool endógeno, para ser utilizados con distintos fines.

Si las necesidades protéicas son altas en peces, las de los correspondientes aminoácidos también lo serán, aunque no en términos relativos, que son muy parecidos a las de especies terrestres de interés, manteniendo unas proporciones adecuadas para la fabricación de sus propias proteínas estructurales y funcionales que permitan mantener un estado fisiológico y un crecimiento óptimo.

### 2.1.2.1.- NECESIDADES CUALITATIVAS

Los primeros estudios para establecer la esencialidad de algunos aminoácidos fueron realizados por HALVER et al., (1957) en el salmón *Oncorhynchus tshawytscha*, encontrando como esenciales la arginina, fenilalanina, histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina. La

esencialidad de estos diez aminoácidos ha sido posteriormente demostrada en *Oncorhynchus nerka* (HALVER y SHANKS, 1960), *Salmo gairdneri* (SHANKS et al., 1969), *Anguilla japonica* y *Anguilla anguilla* (ARAI et al., 1972), *Cyprinus carpio* (NOSE et al., 1974), *Chrysophrus major* (YONE, 1975) y *Solea solea* (COWEY et al., 1970).

#### 2.1.2.2. -NECESIDADES CUANTITATIVAS

Para minimizar el nivel de proteínas en la dieta es necesario el conocimiento previo de los requerimientos cuantitativos de los aminoácidos esenciales, posibles antagonismos y la capacidad de algunos de ellos de ser sustituidos, parcialmente, por aminoácidos no esenciales; además, la síntesis de proteínas exige la presencia, en el lugar de síntesis, de un patrón de aminoácidos adecuado.

La determinación de las necesidades cuantitativas de aminoácidos esenciales se ha venido haciendo tradicionalmente mediante la obtención de curvas dosis-respuesta (concentración de aminoácidos cuyas necesidades se pretende establecer-crecimiento de los animales). Diferentes métodos se vienen empleando en la cuantificación de las necesidades de aminoácidos esenciales. En este sentido numerosos investigadores han usado el método desarrollado por HALVER et al., (1957), que ensaya la eficacia de una mezcla gelatina-caseína que producía las mejores tasas de crecimiento e índices de conversión. Para la cuantificación de los requerimientos, el equipo de HALVER y otros autores que siguieron esta metodología, modificaron la dieta de referencia, añadiendo aminoácidos libres a la base de caseína-gelatina, hasta el nivel de proteínas correspondiente a las necesidades para crecimiento óptimo, hasta alcanzar una composición en aminoácidos equivalente a la proteína del huevo (MERT, 1972). Por otra parte, NOSE (1979) observó, en la carpa, una estrecha relación entre la composición corporal de aminoácidos y el patrón de requerimientos aminoacídicos. Esto ha llevado a varios investigadores a formular dietas experimentales para peces usando como fuente protéica harina de pescado más otra

proteína de calidad, además de un aporte importante de aminoácidos libres que les permitiera la preparación de dietas con distintos niveles de un solo aminoácido esencial, cuyos requerimientos se pretendían establecer (JACKSON y CAPPER, 1982; HUGHES y RUMSEY, 1983; WALTON et al., 1984 a, b). La respuesta obtenida en incremento de peso y conversión del alimento, para las dietas formuladas con aminoácidos libres, parece inferior (ANDREWS y PAGE, 1974 ;ANDREWS et al., 1977 ;MURAI et al., 1981) a la obtenida cuando estos aminoácidos están incorporados a la proteína, o protegidos de una absorción precoz (MURAI et al., 1982), o bien libres pero aportados con mayor frecuencia de alimentación (YAMADA et al., 1981), lo que favorece la coincidencia de un patrón adecuado de aminoácidos en el lugar de síntesis .Los salmónidos son más aptos para la utilización de aminoácidos libres adicionados a la dieta (DRABOWSKA y WOJNO, 1977; KETOLA, 1982; POSTON et al. 1977; TIEW et al. 1976) que otras especies de peces, especialmente las marinas (THEBAULT, 1985).

KETOLA (1982) propone después de comparar dietas formuladas a partir de patrones de aminoácidos basados en la composición de harinas de pescado, carcasa y huevo de trucha o salmón con las formuladas de acuerdo con las ingestas recomendadas para el salmón (NRC, 1981) que, aunque el contenido en aminoácidos del huevo difiere del patrón de necesidades establecidos, la composición del huevo es útil para suplementar con éxito las proteínas dietarias en salmón (*Salmo salar*) y trucha arcoiris (*Salmo gairdneri* ) inquiriendo su uso potencial como patrón de aminoácidos en estudios de necesidades de aminoácidos esenciales (KETOLA, 1982).

Un aspecto importante para ajustar las necesidades en aminoácidos esenciales es la capacidad de algunos de estos aminoácidos de ser sustituidos parcialmente por aminoácidos no esenciales concretos. Este es el caso de la metionina-cisteína, siendo la metionina un aminoácido especialmente limitante cuando se usan fuentes protéicas de origen vegetal (KETOLA, 1982; POSTON et al. 1977; RUMSEY et al. 1983). La sustitución de metionina por

et al.1977) y del 50% en la trucha arcoiris (KIM et al.1984) y 30% en lubina (HIDALGO y ALLIOT, 1988). Este tipo de reemplazo también se dá para la pareja fenilalanina-tirosina en niveles de hasta el 50% en pez gato (ROBINSON et al., 1980).

Otro fáctor importante a la hora de cuantificar las necesidades de aminoácidos esenciales es el antagonismo existente entre algunos de ellos, como en el caso de la pareja lisina-arginina y la interacción de los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina). En el caso de la interacción arginina-lisina, demostrada en algunas especies terrestres (MAYNARD y COOSLI, 1962) no está tan clara en los peces ya que por ejemplo en la trucha arcoiris no ha sido detectada (KAUSHIK y FAUCONEAU, 1984) mientras que en el pez gato se hace evidente (ROBINSON et. al., 1981).

Las interacciones nutritivas y metabólicas entre leucina, isoleucina y valina han sido demostradas en especies como *Oncorhynchus tshawytscha* (CHANCE et al.1964) y *Salvelinus fontinalis* (HUMGUES y RUMSEY, 1983) y son debidas fundamentalmente a una competencia por los sistemas de transporte a nivel de membrana modificando, el que está en mayor concentración, la disponibilidad de los otros dos en los lugares de síntesis protéica y, por tanto, afectando al crecimiento.

## 2.13.-SINTESIS DE PROTEINAS

### 2.1.3.1.-MECANISMOS DE SINTESIS PROTEICA

Para la síntesis proteica los aminoácidos utilizados proceden de la dieta, y en pequeña proporción, de la degradación de la proteína endógena.

Los mecanismos de síntesis protéica en peces son similares a los descritos en otros animales. Se requiere la presencia simultánea en el lugar de síntesis de todos los aminoácidos necesarios. La primera etapa es la activación

de los aminoácidos con ATP y su unión a un ARN de transferencia por la acción del acetil-t-ARN sintetasa:



El siguiente proceso ocurre en un complejo ribosomal ligado a una molécula de ARN mensajero que porta el código para la proteína que se va a sintetizar. Las diversas etapas de síntesis, iniciación, elongación y terminación, se denominan genéricamente como traducción y la estructura completa (ribosomas + ARNm) se denomina polisoma o polirribosoma.

La regulación de la síntesis protéica está muy relacionada con la temperatura del medio y parece realizarse a dos niveles diferentes. Uno sería a nivel de transcripción de genes; en peces árticos se aprecia una mayor cantidad de ARNm en invierno que en verano (PICKETT et al. 1983) ya que en estos peces parece estimularse la síntesis de determinadas proteínas (SAGP) cuando la temperatura cae por debajo de cero grados, proteínas que aumentan la osmolaridad y por tanto disminuyen el punto de congelación. El otro punto de control estaría a nivel de traducción.

Se ha observado que los peces aclimatados a bajas temperaturas y transferidos a agua con temperaturas más altas presentan una mayor proteosíntesis que los aclimatados a temperaturas altas (HASCHEMEYER, 1969) si bien la tasa de transporte de aminoácidos libres (HASCHEMEYER, 1968;) y la síntesis protéica (MATHEWS y HASCHEMEYER, 1978 ; HASCHEMEYER y MATHEWS, 1982) aumentan con la temperatura. Además la síntesis protéica está directamente relacionada con la concentración del factor de elongación I que presentan los diferentes tejidos (NIELSEN et al. 1977), observándose mayor la concentración de factor de elongación I en peces aclimatados a temperaturas bajas (15-30 unidades/mg en peces árticos frente a 2.5-10 unidades/mg en peces tropicales) y de

hecho aún teniendo en cuenta la diferencia de temperatura y un  $Q_{10}$ -2.5 la proteosíntesis es mayor en peces árticos que en tropicales.

Numerosos estudios han demostrado que los órganos de mayor síntesis protéica, en los peces, son hígado, branquias, digestivo, riñón y bazo frente a corazón, músculo rojo y músculo blanco (DAS y POSSER, 1967; DEAN y BERLIN, 1969; SMITH y HASCHEMEYER, 1974; NARAYANSINGH y EALES, 1975), siendo, por ejemplo, esta 10-20 veces mayor en hígado y branquias que en músculo (DAS y KRISHAMOORTHY, 1969; HASCHEMEYER, 1968, 1969; SOMERO y DOYLE, 1973; SMITH, 1981) Si la eficacia de síntesis se expresa en términos de ARN las diferencias se hacen menores pero aún significativas (COWEY y LUQUET, 1983). Sin embargo es el músculo el órgano de mayor deposición protéica (FAUCONEAU et al. 1981; SMITH, 1981) alcanzando para la trucha arcoiris proporciones superiores al 50% (FAUCONEAU et al. 1981) debido a la pequeña tasa de "turn-over" protéico, al contrario que en mamíferos en que esta puede llegar a ser del 60% (REEDS y LOBLEY, 1980). De hecho una de las características del crecimiento muscular en los peces es que tiene lugar principalmente por hiperplasia (WEATHERLEY y GRILL, 1985).

En hígado de carpa y trucha la degradación protéica medida a 15°C (BOUCHE, 1975) es similar a la síntesis protéica medida a la misma temperatura, lo que hace suponer que la proteosíntesis hepática está principalmente dirigida a la renovación protéica. Esto también ocurre en branquias y digestivo donde la deposición proteica es muy baja comparada a la síntesis. En trucha la contribución que hace el digestivo al total de síntesis protéica se estima en un 5-10% del total (FAUCONEAU y ARNAL, 1985). En general se puede decir que aunque la velocidad de síntesis en estos órganos es alta (hígado, branquias, intestino, riñón y bazo) el porcentaje de reciclaje es muy elevado (90%) por lo que hay poco crecimiento (WALTON, 1987) y, además, que la síntesis de proteínas es menor en peces que en mamíferos: 7-8 g/Kg P 0.75/día en trucha frente a 12-16 g/Kg P 0.75/día en mamíferos (REEDS y LOBLEY, 1980).

### 2.1.3.2. -FACTORES QUE AFECTAN LA SINTESIS PROTEICA

La temperatura es uno de los factores principales que afectan a la síntesis proteica en tejidos tales como hígado, branquias, digestivo y riñón de varias especies ensayadas (HASCHEMEYER et al. 1979; MATHEWS y HASCHEMEYER, 1978; POORNJINC et al. 1983). Los cambios ocurren con una  $Q_{10}$ -2.5, teniendo el metabolismo basal, medido como consumo de  $O_2$  (que es temperatura-dependiente), una  $Q_{10}$ -2.3. Se puede decir que el gasto de "turn-over" de los tejidos activos al metabolismo basal es constante. Sin embargo, para el músculo, el comportamiento proteosintético frente a la temperatura no está claro, mientras que en truchas alimentadas disminuye al aumentar la temperatura (FAUCONEAU et al. 1981), en pez tigre (HASCHEMEYER et al. 1979) y pejesapo (POORNJINC et al. 1983) ayunados parece aumentar el "turn-over" proteico.

Por otra parte, parece que los niveles relativos de síntesis proteica entre tejidos no se afectan. En cuanto a las necesidades, aumentan con la temperatura, lo que hace difícil determinar si existe un cambio en los requerimientos de aminoácidos.

El oxígeno es un factor limitante en la proteosíntesis ya que está estrechamente unida al consumo de  $O_2$ . En *Fundulus heteroclitus* JACKIM y LAROCHE (1973) encuentran que la síntesis proteica es alterada al disminuir la concentración de  $O_2$  en agua por debajo de los 2.5 mg/l, sin embargo, por encima de este umbral una pequeña disminución en el nivel de  $O_2$  parece estimular la síntesis proteica, con solo un pequeño cambio en la degradación de proteínas. No obstante este mismo autor no encontró un cambio en la síntesis proteica en truchas aclimatadas al 50% y al 100% de  $O_2$ .

La salinidad afecta a los tejidos que intervienen en el intercambio iónico (branquias, riñón y digestivo). La proteosíntesis en branquias de mujol, medida en agua salada, es mayor cuando se compara a otras especies y el consumo de  $O_2$  es mínimo cuando la osmolaridad es la misma que el resto de fluidos corporales (NORDLIE y LEFFLER,

1975). TONDEUR y SARGENT (1979) observaron en la anguila que la salinidad afecta a las necesidades cualitativas de proteína.

El ayuno parece que afecta poco a la síntesis protéica en tejidos tales como hígado, branquias etc. (SMITH y HASCHENMEYER, 1974; SMITH, 1981; POGRNJIC et al., 1983), por el contrario, en carpas sometidas a ayuno durante seis meses se observa un aumento de la degradación protéica, junto con una disminución del contenido en proteínas de hígado y plasma (BOCHE, 1975). En músculo numerosos autores sí han observado una caída en la síntesis protéica. (SMITH y HASCHENMEYER, 1983; HASCHENMEYER, 1983; POGRNJIC et al., 1983) En la trucha arcoiris va asociada con un aumento de la degradación protéica sin que aumente la tasa de "turn-over" (SMITH, 1981).

Considerando la actividad de los ribosomas como un reflejo de la capacidad de síntesis, LIED et al., (1982) obtuvieron una reducción de ésta del 87%, en salmones, tras diez días de ayuno, frente a los alimentados normalmente, hasta que los niveles de energía que aporta la proteína, al total de la energía dietaria, no superen el 48% (LIED y ROSENLUND, 1984). Sin embargo, existe una correlación entre la síntesis protéica y el nivel de ingesta. La calidad de la proteína parece ser otro factor que afecta a la síntesis protéica. Una deficiencia en lisina disminuye la proteínosíntesis en músculo de trucha (FAUCONEAU y KAUSHIK, 1985).

En general un desbalance aminoacídico en la dieta provoca una disminución en la síntesis protéica, de hecho, FAUCONEAU (1985), obtuvo en juveniles de *Coregonus Schinzi pallea*, menor síntesis de proteína en los animales alimentados con una dieta desequilibrada en aminoácidos, comparados con los que ingirieron una dieta control.

## 2.1.4.-METABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS

### 2.1.4.1.-CATABOLISMO DE LOS AMINOACIDOS Y EXCRECION DE NITROGENO

El catabolismo de los aminoácidos ocurre en dos etapas fundamentales, siendo la primera la eliminación del grupo amino y la formación de un compuesto intermediario que pueda entrar en el TCA. La segunda etapa es la oxidación del compuesto intermediario hasta H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub>.

Los grupos aminos producidos en la primera fase pueden ser utilizados esporádicamente en alguna reacción de síntesis, pero principalmente se excretan como amoniaco; éste, en su forma no iónica NH<sub>3</sub>, es muy tóxico, pero a pH fisiológico prácticamente todo el amoniaco está en forma de NH<sub>4</sub>, que lo es mucho menos. El amoniaco se excreta a través de las branquias por difusión o intercambio de sodio (EVANS, 1984). El carácter amoniotélico de los peces hace que el rendimiento energético de las proteínas sea mayor que en otros animales, cuyo producto de excreción mayoritario sea la urea o el ácido úrico.

Del Nitrógeno total excretado se ha visto que del 60-90% lo hace como amoniaco mientras que una pequeña parte lo hace en forma de urea, ácido úrico, trimetilamina, creatina y otros compuestos nitrogenados. HUGGINS et al. (1969) y DEPECHE et al. (1979) detectaron todos los enzimas del ciclo de la urea en diferentes tejidos de teleósteros, aunque sólo la arginasa se encuentra en cantidades significativas. Además, parece que no existe correlación entre la excreción de urea y la ingestión de nitrógeno (BRETT y ZALA, 1975; KAUSHIK et al. 1984).

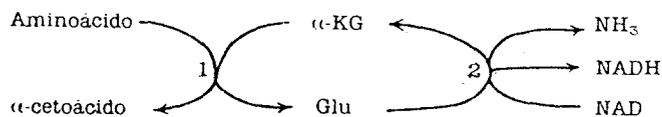
El primer paso en el catabolismo aminoacídico puede ser, o bien desaminación directa catalizada por una amino-oxidasa, histidasa, serina desaminasa, glutaminasa o glutamato deshidrogenasa, siendo ésta la que parece tener un papel más importante (VAN WAARDEN, 1983), o bien usando un mecanismo desaminativo que en el que el grupo amino es transferido a un aceptor común posteriormente es

desaminado (desaminación indirecta).

Para la desaminación indirecta se han propuesto dos tipos de esquemas posibles :uno basado en el ciclo de los nucleótidos purínicos, propuesto por LOWENSTEIN (1972).FIG 2.2..Pero la baja actividad que presentan los enzimas del ciclo de los purin-nucleótidos,así como el estudio del metabolismo mitocondrial,usando precursores marcados con  $N^{15}$  (WALTON y COWEY,1977),parecen indicar que el ciclo de los nucleótidos purínicos no es muy efectivo en cuanto a la producción de amoniaco, en el hígado de trucha; sin embargo, podría ser importante en el músculo, donde la producción de amoniaco es proporcional a la carga de trabajo (VAN WAARDEN,1983),siendo el esquema propuesto por BRAUNSTEIN (1957) el más efectivo para la formación de amoniaco en el hígado de peces.Este esquema se basa en la transdeaminación del grupo amino al  $\alpha$ -cetoglutarato , catalizada por una amino-transferasa, formándose otro cetoácido y glutamato que, inmediatamente después es desaminado por la glutamato deshidrogenasa.

FIG. 2.2- Principales vías de desaminación y producción de amoniaco (WALTON, 1987).

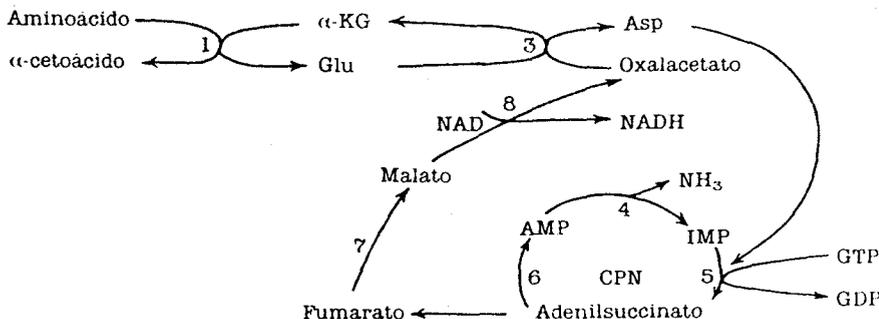
A) Transdeaminación



Reacción neta:  
 $\text{Aminoácido} + \text{NAD} \rightarrow \alpha\text{-cetoácido} + \text{NADH} + \text{NH}_3$

- 1-Aminoácido transaminasa
- 2-GDH
- 3-GOT
- 4-AMP desaminasa
- 5-Adenilsuccinato sintetasa
- 6-Adenilsuccinasa
- 7-Fumarasa
- 8-Malato-DH

B) Ciclo de los nucleótidos purínicos (CPN)



Reacción neta:  
 $\text{Aminoácido} + \text{NAD} + \text{GTP} \rightarrow \alpha\text{-cetoácido} + \text{NADH} + \text{NH}_3 + \text{GDP} + \text{Pi}$

Tanto en el esquema propuesto por BRAUNSTEIN como en el de LOWENSTEIN, la primera reacción es catalizada por una amino-transferasa, algunas de las cuales son muy específicas, mientras que otras pueden catalizar la reacción de varios aminoácidos diferentes. Las transaminasas han sido detectadas, en la mayoría de los tejidos de peces, en el hígado, riñón y músculo (McBEAN et al. 1966; CREACH, 1967; BELL, 1968; JANICKI y LINGIS, 1970; VAN WAARDE, 1981), pero la presencia de un sistema enzimático que interviene en la primera etapa del catabolismo aminoacídico aún no ha sido detectado para todos los aminoácidos, siendo desconocidas las vías catabólicas que emplean alguno de estos aminoácidos (VELLAS y PARENT, 1983).

En general, la mayoría de las transaminasas precisan  $\alpha$ -oxoglutarato como aceptor del grupo amino siendo, prácticamente siempre el glutamato el producto final que actuará como dador del grupo amino en la formación del  $\text{NH}_3$ . Todas las transaminasas parecen tener el mismo grupo prostético, el fosfato de piridoxal, y comparten el mismo mecanismo de acción.

De todos los enzimas implicados en la formación de amoníaco son la Glutamato piruvato transaminasa o Alanina aminotransferasa (E.C.2.6.1.2.), la Glutamato oxalacetato transaminasa (E.C.2.6.1.1.) junto con la Glutamato deshidrogenasa (E.C.1.4.1.2.) las que juegan un papel más importante.

Alanina aminotransferasa (GPT ó AAT E.C.2.6.1.2. glutamato piruvato transaminasa).

Cataliza la reacción:

Alanina +  $\alpha$ -ketoglutarato  $\longrightarrow$  piruvato + glutamato

La AAT es de localización fundamentalmente citoplasmática aunque tiene una pequeña porción intramitocondrial. Sin embargo, la sonicación disminuye su

actividad significativamente debido, probablemente, a un efecto competitivo de la GDH por el NADH y el  $\alpha$ -ketoglutarato (D'APOLLONIA y ANDERSON, 1980). Esta enzima ha sido detectada en varios tejidos, pero es el hígado el que la presenta en mayor concentración. Necesita piridoxina (B<sub>6</sub>) como cofactor, y además requiere la presencia de NADH, alcanzando el máximo de actividad a concentración de 0.1 mM. El pH óptimo es de 7.2 y la actividad se satura con concentraciones de alanina mayores de 50 mM (D'APOLLONIA y ANDERSON, 1980). La temperatura es otro factor que modifica la actividad de esta enzima; la aclimatación a baja temperatura aumenta claramente su actividad en músculo blanco de *Carasius auratus* (LEHMAN, 1970), *Idus idus* (LEHMAN, 1970) y *Misgurnus fossilis* (MESTER y IODACHESCU, 1972). Sin embargo, JÜRSS (1979), no detecta ningún aumento de la actividad AAT en truchas aclimatadas a 6°C. Más tarde, este mismo autor comprueba, en truchas arcoiris mantenidas a 6, 11 y 18°C, que la actividad es mayor en los animales aclimatados a 11°C, debido probablemente a que es la temperatura más cercana a la óptima de la especie (JÜRSS, 1981 a).

Tanto la actividad como los niveles de enzimas están influenciados por la situación nutritiva y hormonal del animal, pero los aspectos relativos a la capacidad de adaptación de esta enzima, a cambios nutritivos u hormonales, serán tratados en los apartados 2.4. y 2.8..

Aspartato aminotransferasa (GOT E.C.2.6.1.1. Glutamato oxal-acetato transaminasa):

Cataliza la siguiente reacción:

Aspartato +  $\alpha$ -ketoglutarato  $\longrightarrow$  oxal-acetato + glutamato

Ha sido detectada en la mayoría de los tejidos de peces, pero es en corazón, hígado y músculo rojo donde presenta mayor concentración (BELL, 1968; JÜRSS, 1978 y 1981 b; JÜRSS et al. 1985). Su localización, en hepatocitos de trucha, es citoplasmática y mitocondrial (WALTON y COWEY,

1979 c ; CASEY et al., 1983). Es en general más activa que la AAT (ZIMMERMAN et al., 1968; ZNIKL et al., 1971; CORNISH et al., 1978), como se ha demostrado en especies tales como *Ictalurus punctatus* (WILSON, 1973; McCORKLE et al., 1979) y en platija (MOON y JOHNSTON, 1981). Sin embargo, en hígado de carpa ocurre al contrario, AAT presenta mayor actividad que GOT (WITTEMBERGER y GIURGEA, 1973) mientras que en hígado y riñón de trucha ambas enzimas presentan niveles similares de actividad (GAUDET et al., 1973; CORNISH et al., 1978; WALTON y COWEY, 1979 c). Se ha descubierto cierta relación entre la capacidad oxidativa del tejido y la actividad enzimática, relación también descrita en ratas y palomas (CORNISH et al., 1978).

La GOT necesita también la presencia de piridoxina y NADH (0.15 mM) como cofactor, el pH óptimo es de 7.2 y presenta máxima actividad con una concentración 0.1 mM de aspartato. La temperatura ambiental parece no afectar la actividad GOT. En hígado y músculo de trucha (JÜRSS, 1979) se muestra totalmente independiente de la temperatura, mientras que en *Idus idus* y *Carassius auratus* aclimatados a agua caliente, la actividad GOT se incrementa sólo un ligeramente.

Glutamato deshidrogenasa (GDH E.C.1.4.1.2.L-Glutamato:NAD oxidoreductasa desaminasa).

Cataliza la segunda reacción de transdeaminación en la formación de NH<sub>3</sub>, que es una desaminación oxidativa:



Es de localización intramitocondrial (WALTON y COWEY, 1979 c), siendo el hígado el tejido donde se encuentra en mayor concentración, seguido de riñón y branquias. En músculo esquelético apenas se detecta actividad (McBEAN et al., 1966; WALTON y COWEY, 1977).

La GDH puede emplear NADP ó NAD como cofactor, aunque en trucha arcoiris (WALTON y COWEY, 1977), anguila

americana (McBEAN,1966) y en otras especies estudiadas se ha comprobado que es mucho más activa usando NAD como cofactor. Actúan como moduladores negativos el ATP, GTP y NADH y es activada por el GDP y el ADP hasta 20-40 veces su actividad (CASEY et al. 1983; WALTON, 1986).

#### 2.1.4.2. REGULACION DEL METABOLISMO AMINOACIDICO

La regulación del metabolismo aminoacídico no es diferente a la que afecta a otras reacciones, es decir, nivel de enzima, ausencia o presencia de cofactores, hormonas, concentración de sustrato, acceso del sustrato al enzima etc.

Los aminoácidos son utilizados, fundamentalmente, para la síntesis de proteínas corporales y otros compuestos como hormonas, purinas, neurotransmisores etc., cuantitativamente menos importantes como se refleja en la FIG 2.1..

Los aminoácidos en exceso son rápidamente catabolizados, pues no son almacenados en el cuerpo, de ahí que un control de las rutas catabólicas sea importante en estos animales

KREBS (1972) establece que el metabolismo aminoacídico depende de dos tipos de controles, uno "grosero" producido por reajuste, de tipo adaptativo, de los niveles enzimáticos, al variar los niveles de síntesis y degradación enzimática. El otro tipo de control es más preciso y depende de la concentración de sustrato. El principal mecanismo de control por este medio es el control por  $K_m$ , de modo que, por ejemplo, en el caso de los aminoácidos cuando aumenta la concentración de estos en sangre o en tejidos inmediatamente aumenta la degradación de aminoácidos, debido a que los valores de la  $K_m$  de los enzimas catabolizantes de aminoácidos son altos, más altos que la concentración aminoacídica normal en un tejido (MALLETT et al., 1969 ; KAPLAN y PITOT, 1970). En el caso de los aminoácidos esenciales la  $K_m$  de sus enzimas catabólicas es especialmente alta, lo que supondría que, en caso de bajo suministro, estos no serían degradados

(KREBS,1972).Esto explicaría que los aminoácidos no esenciales sean degradados preferentemente a los aminoácidos esenciales.

En contraste, los enzimas que comienzan la síntesis de proteínas (amino-acil-t RNA sintetasa) tienen unos valores de Km bajos (hasta 10 veces menor que los enzimas catabólicos; KREBS,1972 ;ROGERS et al. 1977), así, si tenemos en cuenta que la concentración aminoacídica tiende a ser mayor que la Km de la amino-acil-t RNA sintetasa, ésta estará saturada, siguiendo una cinética de orden 0 y por tanto no se afectará con incrementos en la concentración aminoacídica. Sin embargo, para los enzimas catabolizantes, y debido a la elevada Km que presentan, siguen una cinética de primer orden, aumentando su actividad cuando aumenta la concentración de sustrato.

En peces, los mecanismos de control de la desaminación son básicamente los mismos que en mamíferos. Sin embargo, una dieta con diferentes niveles de lisina, triptófano y arginina no provocará, en truchas, ningún efecto significativo en la actividad  $\alpha$ -cetoglutarato reductasa, triptofano pirrolasa y arginasa (WALTON et al.1984 a,b y c), mientras que en ratas estos enzimas se inducen al aumentar los niveles de sustrato. Los datos obtenidos por WALTON et al.(1984 b) coinciden con los hallados para otros peces en los que se muestra poca adaptación del metabolismo aminoacídico a los cambios en el contenido protéico de la dieta (RUMSEY,1981), faltando el mecanismo de control "grosero". Así, el control por Km probablemente juega un papel importante. Los valores de Km para la acil-t RNA sintetasa son del orden de 0.01-0.1 mM, bastante menor que la concentración tisular de aminoácidos. Sin embargo, la Km para los enzimas catabolizantes de aminoácidos es alta, alrededor de 1-10 mM. En la tabla 2.1. se muestran los valores de la Km para algunos de estos enzimas.

TABLA 2.1-Valores de la Km para algunos de los enzimas mas representativos del metabolismo aminoácido.

Enzima	Pez	Tejido	Sustrato	Km	Ref.	
AAT	trucha	hígado	Ala	2.2	1	
Arginasa	trucha	hígado	Arg	4.9	2	
		riñon	Arg	4.7	2	
GDH	trucha	hígado	Glu	3.7	1	
		anguila	hígado	Glu	15.5	3
		hígado	Glu	3.7	4	
Histidasa	trucha	hígado	His	0.28	5	
		riñon	His	0.2	6	
Lys reductasa	trucha	hígado	Lys	7.3	2	
Ser desaminasa	trucha	hígado	Ser	44.0	1	
Ser Pir AT	trucha	hígado	Ser	8.1	1	
Thr desaminasa	trucha	hígado	Thr	26.0	1	
Thr DH	trucha	hígado	Thr	7.8	1	
Tyr AT	trucha	hígado	Tyr	3.2	7	
Trp pirrolasa	trucha	hígado	Trp	0.2	2	

Ref.1- WALTON y COWEY (1982) 2- WALTON (1985) 3- McBEAN et. al. (1966) 4- HAYASHI et. al. (1982) 5- FOWLER et. al. (1979) 6-ALLEN et. al. (1983) 7-WHITING y WIGGS (1978)

Una vez finalizada la desaminación del aminoácido y formado el  $\alpha$ -cetoácido estos son oxidados via TCA a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O para producir energia.No obstante,NAGAI e IKEDA (1971 a y b,1972,1973) demostraron en la carpa que algunos aminoácidos eran buenos precursores para la síntesis de lípidos e hidratos de carbono,siendo la alanina el que parece que contribuye más a la formación de glucosa (FELIP, 1975). Son probablemente los aminoácidos los principales precursores gluconeogénicos, en periodos de ayuno o cuando las dietas administradas tienen pocos hidratos de carbono.Este proceso se realiza en el hígado, fundamentalmente, ya que es el único tejido en el que se encuentran niveles apropiados de enzimas gluconeogénicos (KNOX et al.1980).

## 2.2.-LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LA NUTRICION DE LOS PECES

### 2.2.1.-PAPEL DE LOS HIDRATOS DE CARBONO EN LA ALIMENTACION DE LOS PECES

Los peces no tienen necesidades esenciales de hidratos de carbono y pueden alimentarse con una dieta libre de glúcidos sin que aparezca ningún efecto negativo sobre el pez, pero también es cierto que en su dieta natural incluyen una pequeña parte de glúcidos como glucógeno, en los carnívoros, y almidón, celulosa o azúcares sencillos en los omnívoros y herbívoros, que pueden utilizar de forma limitada.

Dado que la glucemia basal es constante incluso en peces que ingieren pequeñísimas cantidades de hidratos de carbono y que la glucosa es utilizada, como en mamíferos, como sustrato energético de numerosos tejidos tales como gónadas, sistema nervioso etc. la gluconeogénesis parece una vía imprescindible y cuantitativamente importante para los peces lo que supone una desviación de los aminoácidos hacia la producción de glucosa y no con fines plásticos, por lo que el aprovechamiento metabólico de la proteína para fines de crecimiento y mantenimiento está reducido. Este planteamiento hizo que desde mediados de siglo se investigara la consecuencia de la inclusión de hidratos de carbono en la dieta. Los resultados obtenidos por McLAREN et al. (1946) y PHILLIPS et al. (1948) no fueron favorables ya que a niveles superiores del 12% aparecían alteraciones metabólicas que provocaban un alto índice de mortalidad, hiperglucemias y hepatomegalias, además de una disminución de la digestibilidad, aunque según PHILLIPS esta podría estar provocada bien, por el elevado porcentaje de glúcidos, o bien por un desequilibrio de los regímenes alimenticios a que estaban sometidos los animales.

SINGH y NOSE (1967) encuentran que la digestibilidad varía con el peso molecular de los hidratos de

carbono, siendo mayor cuanto menor es éste, aunque los datos publicados por otros autores varían considerablemente entre sí, lo que hace pensar que sobre la digestibilidad influyen otros factores, aparte del peso molecular, tales como por ejemplo la cantidad en la dieta. En este sentido al aumentar el contenido de almidón disminuye su digestibilidad (INABA et al., 1963; BERGOT, 1979 c), lo que no se cumple para glúcidos sencillos (BERGOT, 1979 c).

El tratamiento del almidón por cocción o gelatinización (INABA et al. 1963; SMITH, 1981; LUQUET, 1976) mejora la digestibilidad. BERGOT y BREQUE (1983) obtienen los mejores resultados en truchas alimentadas con almidón solubilizado, independiente del tratamiento, y cuando se reduce su inclusión en la dieta.

Las dietas ricas en almidón producen una hiperglucemia y un aumento de la actividad, amilásica del jugo intestinal, con un aumento del volumen de este y una disminución de su pH además la liberación de amilasa es mayor cuando el almidón está tratado (SPANNHOF y PLANTIKOW, 1983). El efecto que ejerce el almidón crudo sobre la actividad amilásica se debe a disponibilidad y no a cantidad de enzima ya que el almidón crudo adsorbe el enzima disminuyendo su actividad. Así, el almidón crudo puede llegar a disminuir la digestibilidad del cocido (INABA et al. 1963).

Por otra parte la presencia de glúcidos disminuye el tiempo de absorción de glúcidos y de proteínas, (KITAMIKADO et al. 1964) al aumentar la velocidad de tránsito por un aumento del peristáltismo aunque en especies como la carpa la digestibilidad de la proteína se mantiene alta independientemente del nivel glucídico de la dieta (SHIMENO et al. 1979 ; SHIMENO, 1982).

Los glúcidos más utilizados en la alimentación de peces son el almidón, que presenta como efectos secundarios el acúmulo de lípidos en digestivo y carcasa (BERGOT, 1979 b). No obstante, CARDENETE et al. (1986), con una incorporación del 10% de almidón en la dieta no encuentra que se afecte la composición corporal; incluso mejoró el

coeficiente de eficacia en crecimiento La celulosa, al contrario, disminuye el crecimiento tanto en peso como en longitud, a cualquier nivel que se incorpore a la dieta (POSTON, 1975) y también disminuye el coeficiente de digestibilidad de todos los nutrientes cuando supera el 10% en el pienso (HILTON et al. 1983), probablemente por aumento de la velocidad de paso. La adición de glucosa también disminuye el crecimiento y aumenta el glucógeno hepático, y aunque no afecta al contenido de lípidos de este órgano, lo aumenta en digestivo y músculo (BERGOT, 1979 b; REFSTIE y AUSHENG, 1981), no obstante algunos autores obtienen mejoras del CEC y VPP (BERGOT, 1979 c). SMITH (1971) establece los niveles máximos de inclusión de glucosa en el 20% de la dieta para la truchas.

Los niveles de sustitución de la proteína por hidratos de carbono que se aconsejan varían según la fuente de glúcidos. Para la sacarosa se puede sustituir hasta un 10% y un 10-20% si es almidón la fuente empleada. Incluso algunos autores llegan a niveles de sustitución del 30-40% con unos valores máximos de CEC y PPV (PIEPER y PFEFFER, 1980 ; GARCIA et al. 1984), aunque el contenido protéico del pienso era superior al 40% en todos los casos. Los peces omnívoros admiten unos mayores niveles de inclusión de carbohidratos en la dieta. En carpas alimentadas con una dieta con un 45% de dextrina aumenta el CEC, aunque hay una disminución del peso (SHIMENO et al. 1981). En pez gato se obtienen buenos índices de crecimiento y de utilización de la proteína con dietas de hasta un 20% de dextrina (GARLING y WILSON, 1977). La composición de lípidos y proteínas hepáticas varía poco en la carpa (FURUICHI y YONE, 1980) mientras que en el hígado del pez gato se aprecia una disminución del contenido lipídico y protéico (GARLING y WILSON, 1977). El glucógeno hepático aumentó, en estos casos tanto en la carpa como en el pez gato.

En tilapia, herbívora, se obtiene un mejor crecimiento con la inclusión de carbohidratos en la dieta hasta niveles próximos al 40%. Todos los hidratos de carbono dieron buenos resultados, aunque la fibra no se recomienda incluirla a niveles mayores del 10% .

Desde el punto de vista metabólico no se aprecian diferencias entre los distintos glúcidos ensayados. En este sentido, SMITH (1971) encuentra que almidón, dextrina, glucosa, etc. eran sustratos energéticos semejantes una vez absorbidos y que las diferencias se encuentran a nivel de digestibilidad.

## 2.2.2.-METABOLISMO DE LOS GLUCIDOS

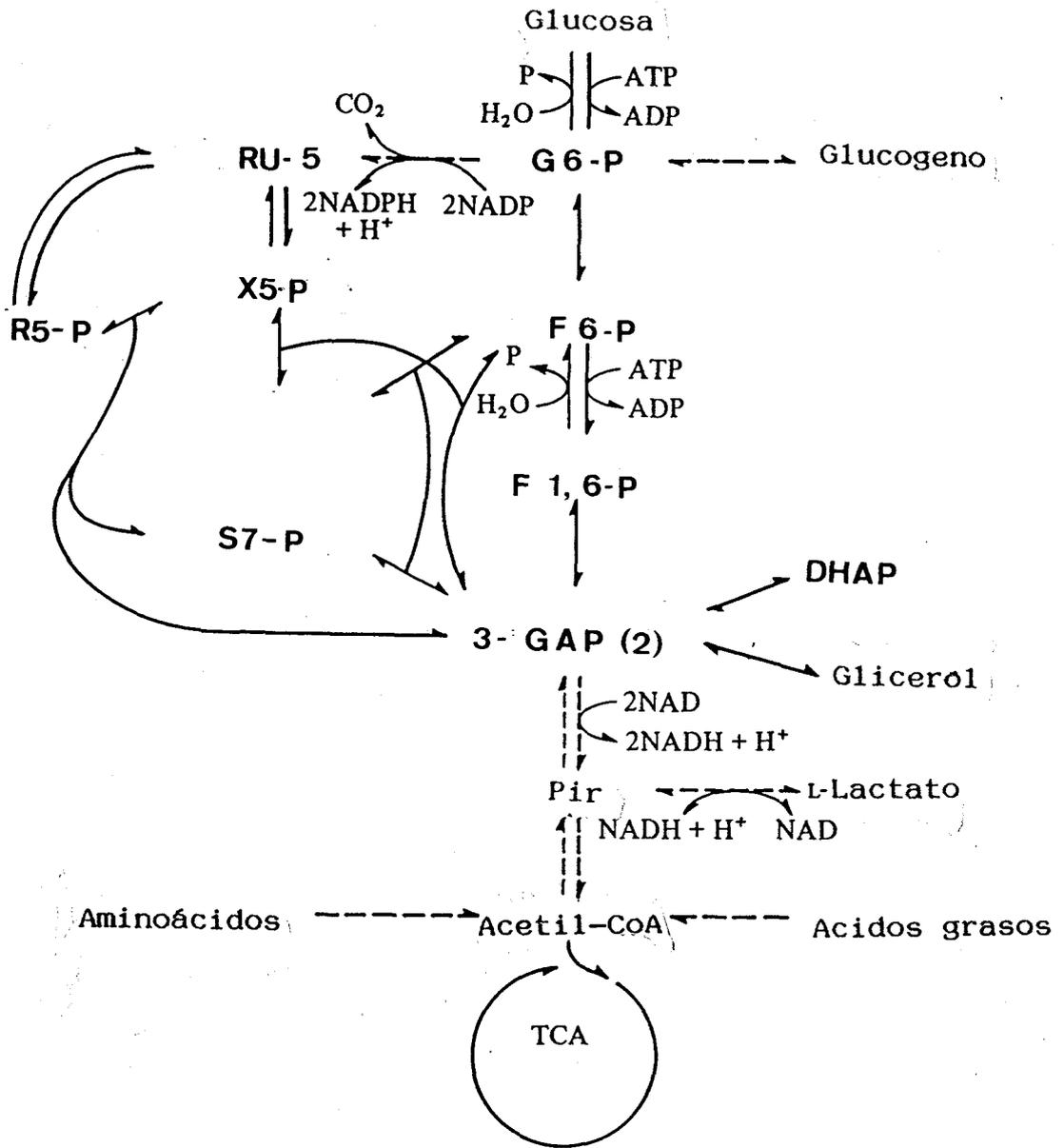
### 2.2.2.1.-RUTAS CATABOLICAS

La utilización de la glucosa como fuente de energía se hace en dos etapas: en la primera la glucosa es transformada a piruvico siguiendo dos rutas anaerobias diferentes: glucolisis, que provee de ATP, y la via de las pentosas fosfato surte de equivalentes reductores, como NADH y ribosa 5-fosfato (FIG.-2.3.)

La segunda etapa ocurre gracias a una secuencia de reacciones que conforman el ciclo de Krebs o TCA en las que el piruvato es convertido en acetil-CoA y posteriormente oxidado hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O con la producción de NADH + H y FAD. El TCA es de localización intramitocondrial y requiere oxígeno. El FADH, a través de la fosforilación oxidativa transforma el ADP en ATP.

Varios investigadores han tratado de establecer el aporte que realizan una y otra via. en la degradación de la glucosa, usando diferentes métodos basados en la medida de la actividad de los enzimas implicados en estas rutas metabólicas o en el uso de inhibidores específicos de la glucolisis, como el iodoacetato, que inhibe la gliceraldehido 3P-dehidrogenasa (EKBERG, 1958). También se ha trabajado con sustratos marcados (KATZ y WOOD, 1960) o administrando a los animales metabolitos intermediarios, como el acetato-1-C<sup>14</sup>, y midiendo el carbono marcado que aparece en el CO<sub>2</sub> y en el glucógeno (HOCHACHKA, 1962; NAGAI e IKEDA, 1972, 1973). Los resultados muestran que, bajo condiciones normales, es la glucolisis la principal via de degradación de la glucosa,

FIG. 2.3.-Principales rutas del metabolismo de los glúcidos. (HOAR, 1975)



aunque la vía de las pentosas fosfato tiene cierta importancia (SHIMENO y TAKEDA, 1972, 1973). LIU et al. (1970) en *Cichlosoma bimaculatum* observaron que el 66% de la degradación se hace vía glucólisis, el 19% vía pentosas fosfato y el 22% por la vía del ácido glucurónico, no obstante en eritrocitos de perca aparece tan efectiva como la vía general (BACHAND y LEARY, 1975). SHIMENO y TAKEDA (1973) obtienen en el hígado, o hepatopancreas, mayor actividad para la vía de las pentosas fosfato que en el músculo, y se presenta relativamente pequeña, siendo la glucólisis la vía principal, según muestran las elevadas actividades de PGM, PGI y PFK lo que hace suponer que la vía de las pentosas fosfato en hígado está asociada a la formación de NADPH y ribosa-5-fosfato, que serán transportadas al tejido que las necesite, mientras que en músculo predomina la glucólisis y provee de la energía necesaria para el movimiento.

El nivel de actividad de la vía de las pentosas fosfato varía también con la especie (SHIMENO y TAKEDA, 1973), siendo mayor en hígado de anguila (en agua dulce) que en carpa y trucha arcoiris. Por otra parte, YAMAUCHI et al. (1975) encuentran que la actividad G6PDH en hígado de *Salvelinus fontinalis* 10 es veces mayor que en *Salmo gairdneri*.

La regulación de la glucólisis y de la vía de las pentosas fosfato es compleja y responde, como en mamíferos, a estímulos de origen hormonal y enzimático. Además en los peces al ser animales poikiloterms la temperatura puede llegar a ser un factor importante.

Los mecanismos de regulación enzimática atienden básicamente a dos tipos de control: "grosero", lento y con variación de la cantidad de enzima, y "fino", que es mucho más rápido, variando la actividad por cambios de la  $K_m$  como ya se ha descrito en el apartado de catabolismo aminoacídico.

En la glucólisis y en la vía de las pentoasa fosfato, como ocurre en otros sistemas multienzimáticos, sólo unos cuantos enzimas serán los que marquen el flujo

de utilización de la glucosa. Estos se pueden definir como "enzimas reguladores". Estos enzimas son de regulación alostérica, lo que supone que su actividad se verá afectada por varios factores, además del sustrato, tales como pH, efecto iónico, y concentración de nucleótidos y metabolitos, que ejerce un control "feed back" al igual que en vertebrados superiores (HALL et. al., 1978).

los enzimas que se han descrito como reguladores en la glucólisis son : Hexoquinasa, Fosfofructoquinasa y piruvato quinasa.

Glucocinasa/Hexocinasa: (ADP-hexosa 6 fosfotransferasa E.C.27.1.1.10. y E.C.27.1.1.12. ADP-glucosa 6 fosfotransferasa).

Cataliza la reacción de fosforilación de la glucosa, necesaria para entrar en los ciclos metabólicos celulares. En trucha arcoiris tiene poca actividad, comparada al resto de los enzimas glucolíticos (DRIEDZIC y HOCHACHKA, 1978), 25 veces menor que la actividad presentada por la PFK y 45 veces menor que la actividad PK (FIDEU et al., 1983). COWEY et al. (1977 b), variando la proporción de dextrina en la dieta del 5 al 55% no llegaron a inducir la actividad gluco-hexoquinasa, sin embargo, FIDEU et al. (1983) sí encontraron una variación significativa de la actividad enzimática al cambiar la dieta aumentando sus niveles con dietas altas en carbohidratos y disminuyendo en ayuno y con dietas ricas en proteína.

Fosfofructocinasa (PFK E.C.2.7.1.1.11 ATP.D.fructosa 6- fosfato 1-transferasa):

Cataliza la siguiente reacción:



Se considera como el primer enzima clave en la regulación de esta ruta tanto en mamíferos como en peces y

otros animales (CRABTREE y NEWSHOLME, 1972 b; ATKINSON, 1966; WILLIANSON et al., 1967; FREED, 1971; KNOX et al., 1980) y ha sido detectada en casi todos los tejidos (KNOX et al., 1980). Presenta una actividad menor comparada con el resto de los enzimas de la glucólisis, lo que puede confirmar su papel regulador del flujo glucolítico (SHIBATA, 1977). En la mayoría de las especies acuáticas presenta una cinética sigmoide, típica de los enzimas reguladores, frente a su sustrato (SAND, 1981a; NICHOLLS et al., 1976; LEAVER y BURT, 1980), si bien algunas especies exhiben una cinética bifásica (KELLY y TURNER, 1971; LEE et al., 1973).

La PFK es el prototipo de enzima multimodulada alostéricamente. Ejerce un efecto inhibitorio de la enzima el  $Mg^{2+}$  libre y el ATP a elevadas concentraciones. Sin embargo, el complejo  $ATP-Mg^{2+}$  actúa como sustrato del enzima, obteniéndose máxima actividad cuando el coeficiente  $Mg^{2+}/ATP$  es cercano a 1. La afinidad de la enzima por el ATP varía con la concentración de fructosa-6 fosfato (HANDSON et al., 1973). En hígado de carpa NAGASHIMA et al. (1989 a) sugieren que el ATP actúe como modulador alostérico de la enzima. También afectan negativamente la actividad PFK, el citrato y la fosfocreatinina en músculo rojo de platija, mientras que en el hígado de esta especie ni la fosfocreatinina ni la fructosa 1.6-fosfato presentan efecto modulador sobre esta enzima (JORGENSEN y MUSTAFA, 1980).

Entre los efectores positivos destacan el AMP, que activa la enzima en presencia de concentraciones, inhibitorias de ATP, el fosfato y la fructosa 6-fosfato siendo este último el principal regulador, al menos en miocardio de trucha (JENSEN, 1981). Otro potente activador de esta enzima es la fructosa 2,6-bifosfato que actúa a su vez como inhibidor de la actividad FBP-asa (PILKIS et al. 1988). Este metabolito regula el flujo a través del ciclo entre la fructosa 6-fosfato y la fructosa 1,6-bifosfato. Si los niveles de fructosa 2,6-bifosfato son elevados el flujo neto es glucolítico, mientras que al disminuir los niveles del metabolito se favorece la ruta gluconeogénica (GARCIA DE FRUTOS et al., 1988). Los niveles, de este

metabolito están regulados fundamentalmente por estimulación hormonal, aunque también se pueden modificar en función del contenido de carbohidratos de la dieta y sus niveles, junto con otros mecanismos, regulan la adaptación a la dieta y la modificación del metabolismo durante el ayuno.

Como enzima alostérico la actividad PFK también se ve influida por factores como el pH con un óptimo alrededor de 8 (SHIMENO, 1982; NAGASHIMA et al., 1989 a), y la temperatura (FIDEU et al., 1984) que afectan su comportamiento cinético respecto a sus sustratos y efectores, el pH en concreto, actúa sobre las reacciones de disociación/asociación del enzima como forma de control de la actividad PFK "in vivo" (LEAVER y BURT, 1980).

SHIMENO (1982) observa que la PFK en peces omnívoros como la carpa presenta mayor actividad que en los carnívoros. La actividad específica del enzima, en carpa, es dos veces mayor que en trucha y que en otros peces (SHIMENO, 1974; SAND, 1981 b) y similar a la actividad que presenta el hígado de pollo (KONO y UYEDA, 1973).

Piruvato quinasa (PK E.C.2.7.1.40 ATP  
piruvato 2-fosfotransferasa):

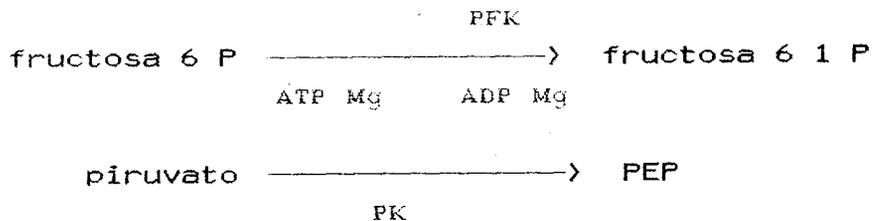
Cataliza la conversión del PEP en piruvato según la reacción:

PK



Este enzima es clave en la encrucijada metabólica del PEP. Por una parte es vía única entre el PEP y el piruvato y, además, puede jugar un papel importante en la formación del ácido pirúvico procedente de las triosas fosfato y de las pentosas fosfato. También es importante su papel como productora de energía durante el catabolismo de la glucosa.

Las actividades PK y PFK están coordinadas mediante el acoplamiento de nucleótidos: el ADP producto de la reacción catalizada por la PFK es sustrato de la PK.



La distribución de este enzima ha sido estudiada en bacalao, platija y trucha por KNOX et al. (1980), presentando valores relativamente más altos en músculo esquelético que en hígado, riñón y branquias.

El enzima presenta en vertebrados tres tipos diferentes de isoenzimas que han sido definidos por CARBONELL et al. (1973) y que, en peces, muestran diferencias importantes en cuanto a cinética y distribución.

Los isoenzimas de músculo de peces presentan un fuerte control por la F 1,6-P y cinética sigmoide respecto al PEP (ROBERTS y ANDERSON, 1985 ; JOHNSTON, 1975; MOON y HULBERT, 1980; RANDALL y ANDERSON, 1975; GUDERLEY y CARDENAS, 1980). La PK de hígado de carpa muestra una inhibición competitiva respecto al PEP por la fenilalanina, alanina y valina. En hígado de lenguado se han descrito dos isoenzimas para la PK (PKI y PKII) con diferente peso molecular y diferente  $K_{0.5}$  (6 mM para PKII y 3 mM para PKI) (SAND, 1984). Este enzima requiere iones mono y bivalentes como moduladores positivos. SAND (1986) encuentra una respuesta hiperbólica para el  $K^+$  pero no para el  $Mg^{2+}$  y muestra curvas de actividad hiperbólicas en función de la concentración de PEP. En general estos dos isoenzimas hepáticos están sometidos a una menor regulación. En algunas especies no es activada por la FBP como en la trucha (SOMERO y HOCHACHKA, 1968) y en la anguila (MOON y HULBERT, 1980). En esta especie, además, no se ha encontrado ningún efector al que sea sensible, por lo que se cuestiona el papel regulador de este enzima, que

puede ejercerlo en otro tejido como el músculo rojo (HULBERT y MOON, 1978). El pH óptimo está situado en 7 y 8 (RANDALL y ANDERSON, 1975; JOHNSTON, 1975). La temperatura también tiene un efecto modulador de la actividad PK disminuyendo la Km con la temperatura (RANDALL y ANDERSON, 1975; GUPPY y HOCHACHKA, 1979) estando asociado este efecto al valor del pH (ROBERTS y ANDERSON, 1985) aunque la modulación térmica del resto de los efectores no es muy patente, siendo estos igualmente activos dentro del rango de temperaturas normales en el habitat del pez (SOMERO y HOCHACHKA, 1968).

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH D-glucosa 6-fosfato :NADP 1-oxidoreductasa E.C.1.1.1.49.)

Cataliza la reacción de deshidrogenación de la glucosa que es el primer paso de la via de las pentosas fosfato :



Este enzima actúa en el punto donde la via de las pentosas fosfato se separa de la glucólisis y es uno de los principales en la regulación del metabolismo de los carbohidratos. Además participa en la formación de NADPH, necesario en la biosíntesis de lípidos, por lo que se encuentran estrechamente relacionadas la síntesis de ácidos grasos con la via de las pentosas fosfato.

El pH óptimo está entre 7.5-8.5 en hígado de barracuda (SHIMENO, 1982), rata (GLOCK y McLEAN, 1953) y en otros muchos organismos tanto animales como vegetales; sin embargo, en hígado de trucha arcoiris el pH óptimo se sitúa entre 10.5-11.5 (SHATTON et al., 1971).

Los valores obtenidos en hígado de barracuda para la Km son de  $4.5 \times 10^{-5}$  M para la G6P y  $2 \times 10^{-5}$  para el NADP, similares a los obtenidos en hígado de rata (GLOCK y McLEAN, 1953). Por otra parte, el enzima muestra gran especificidad en carpa, barracuda y seriola, por el NADP como coenzima y apenas ninguna por el NAD. La actividad

G6P-DH aumenta con el  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , y  $Mn^{2+}$ , mientras es completamente inhibida por el  $Hg^{2+}$ , y algo por el  $PO_4$ .

Este enzima ha sido detectado en células de varios tejidos de diferentes especies de peces mostrándose siempre mayor actividad en hígado (SHIMENO, 1982; NAGAYAMA et al., 1972; NICHOLLS et al. 1976). En riñón de seriola la actividad también se mostró alta, aunque menos que en hígado (SHIMENO, 1982).

En el hepatocito se encuentra distribuido mayoritariamente en la fracción soluble aunque presente una pequeña fracción mitocondrial.

#### 2.2.2.2. -GLUCONEOGENESIS

En ausencia de hidratos de carbono en la dieta, la glucosa ha de ser sintetizada a partir de un precursor, principalmente piruvato, vía gluconeogénesis. Esta ruta biosintética es paralela a la glucólisis y varios pasos son iguales, reversibles y catalizados por el mismo enzima. Sin embargo hay tres pasos que son irreversibles, responsables del control de esta ruta. Estos pasos son: la conversión del piruvato a fosfoenolpiruvato vía oxalacetato, desfosforilación de la fructosa 1,6-bifosfato por la fructosa bifosfatasa, y la desfosforilación de la glucosa por la glucosa 6-fosfatasa (FIG 2.3.).

La gluconeogénesis es un proceso que requiere energía. Sus niveles, medidos como incorporación de lactato, parecen menores (3 a 5 veces) en hepatocitos aislados de trucha (WALTON y COWEY, 1979 a) que los hallados en hígado de rata perfundidos (ROSS et al., 1967). Sin embargo, HAYASHI y OOSHIRO (1975) obtienen valores similares de gluconeogénesis a partir de lactato, en hígado perfundido de rata y anguila. Estos resultados probablemente se deben a diferencias intraespecíficas muy relacionadas, seguramente, con los hábitos alimenticios de cada especie (MOSSE, 1980). MIGLIORINI et al. (1973), encuentran que la incorporación de alanina en glucosa, vía gluconeogénesis, es el doble en el carnívoro buitre negro que en el pollo. COWEY et al. (1977 a y b) y de la HIGUERA

y CARDENAS (1986) encuentran que la actividad gluconeogénica "in totum" de la trucha, medida por incorporación de  $C^{14}$ -alanina o  $C^{14}$ -glutámico en glucosa, se adapta a variaciones en el contenido protéico y de hidratos de carbono, disminuyendo la incorporación en glucosa al aumentar el contenido en hidratos de carbono de la dieta.

Los precursores más frecuentes son el piruvato y el lactato (procedentes del metabolismo de carbohidratos), el glicerol (del metabolismo de ácidos grasos) y los aminoácidos gluconeogénicos, alanina principalmente, serina, glicocola, glutamina y glutámico. Todos estos sustratos necesitan de una transformación previa hasta un sustrato que pueda seguir la ruta de formación de glucosa, y sea diferente según el compuesto de partida.

La glicocola y la serina se incorporan activamente a la glucosa y glucógeno (DEMAEL-SUARD et al., 1974; INUI et al., 1978; ROWSELL et al., 1979) y lo hacen de forma semejante a mamíferos carnívoros y anfibios; vía piruvato aminotransferasa, la glicocola ha de ser transformada previamente en serina y ésta sufre una transaminación hasta hidroxipiruvato que, en presencia de NADPH y glicerato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.29), es transformado en D-glicerato que es fosforilado en presencia de ATP y de la gliceratoquinasa a 2-fosfoglicerato que puede seguir la vía gluconeogénica (WALTON y COWEY, 1979 b). Existe otra vía minoritaria iniciada por la serina deshidratasa (E.C.4.2.1.13.) y que es la habitual en ratas y vertebrados superiores.

El glicerol se incorpora a la gluconeogénesis a nivel de la dihidroxiacetona pasando previamente por  $\alpha$ -glicerolfosfato.

La biosíntesis de glucosa, a partir de alanina y piruvato, es más complicada, pues estos entran a esta ruta como piruvato, que ha de ser transformado en fosfoenol piruvato, con la intervención de la piruvato carboxilasa (de localización exclusivamente mitocondrial) y la fosfoenol-piruvato carboxiquinasa, que tiene una fracción

citoplasmática y otra mitocondrial. El piruvato entra en la mitocondria, la piruvato carboxilasa actúa sobre él transformándolo en oxalacetato, que no puede atravesar la membrana mitocondrial; en este punto puede ocurrir que sea transformado en aspartato que sale al citosol y aquí es transformado de nuevo en oxalacetato. La fosfoenol-piruvato carboxiquinasa citoplasmática lo transformará en fosfoenol-piruvato, o bien que sobre el oxalacetato mitocondrial actúe la PEPCK mitocondrial pasándolo a PEP, que puede salir al citosol.

La gluconeogénesis se realiza fundamentalmente en dos órganos, hígado y riñón, que trabajarían coordinadamente manteniendo la homeostasis de la glucemia. La capacidad gluconeogénica de ambos órganos es similar, aunque el aporte parece mayor en hígado debido principalmente, a su mayor tamaño.

Uno de los puntos de control en la gluconeogénesis es el paso de fructosa 1,6 bifosfato a fructosa 6P. Esta reacción está catalizada por la fructosa bifosfatasa, fundamental en la regulación gluconeogénica.

Fructosa 1,6 - bifosfatasa (FBP-asa E.C.3.1.3.11. D-fructosa 1,6-fosfato 1-fosfohidrolasa)

Este enzima ha sido detectado en hígado y riñón de peces. También se ha encontrado en músculo donde no hay evidencia de que existan importantes niveles de gluconeogénesis (KNOX et al. 1980). Dentro de la célula es de localización citoplasmática.

La FBP asa es un enzima alostérico y, por tanto, modulado por varios factores. En mamíferos se han descrito como efectores positivos la histidina (HERS y HUE, 1983) y el citrato (TEJWANI, 1983) no existiendo noticias bibliográficas de que lo sean en peces. También requiere iones bivalentes como el  $Mg^{2+}$  y en carpa es necesaria la presencia de  $Mn^{2+}$ . El  $Co^{2+}$  en peces, al contrario que en mamíferos, no actúa sobre la actividad de la enzima. Los iones  $K^+$  y  $NH_4^+$  aumentan la actividad de la enzima de peces aunque en carpa la presencia de estos iones junto con  $Mg^{2+}$

inhibe la actividad FBP-asa (NAGASHIMA et al., 1989 b).

Entre los inhibidores de la enzima destaca el AMP que en presencia de  $Mg^{2+}$  llega a inhibir la actividad al 100% en anguilas, 65% en carpa y 57% en trucha (NAGASHIMA et al. 1989 b). Su propio sustrato puede actuar como inhibidor (TAKETA y POGELL, 1965; BEHRISCH, 1969) aunque a concentraciones tan elevadas que no tiene significado biológico (BOITEAUX et al., 1980). Otro inhibidor recientemente detectado en mamíferos es la fructosa 2,6-bifosfato (RICHARDS y UYEDA, 1980; EL-MAGHRABI et al., 1981) que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido detectado en peces, así como, su carácter inhibidor para la FBP-asa (GARCIA DE FRUTOS et al., 1988).

El pH óptimo es de 7.4, a pH menor de 6 no se detecta actividad (NAGASHIMA et al., 1989 b), a pH 8 se mantiene del 60 al 80% de la actividad (SHIMENO, 1982).

FBP-asa es un enzima dependiente de la temperatura y su  $K_m$  disminuye con ésta. También presenta diferencias según la especie y así 25 °C la  $K_m$  para trucha es de 5.6  $\mu M$ ; 8.2  $\mu M$  para la anguila y 12.5  $\mu M$  para la carpa.

En general la FBP-asa presenta más actividad en peces carnívoros que en omnívoros (SHIMENO, 1974).

## 2.3.- LOS LÍPIDOS EN LA NUTRICIÓN DE LOS PECES

### 2.3.1.- PAPEL ENERGÉTICO DE LOS LÍPIDOS

Los lípidos tienen un importante papel en la alimentación de los peces, tanto como transportadores de sustancias no grasas (como vitaminas liposolubles), como por ser fuente de ácidos grasos esenciales y energía, sobre todo en carnívoros, que tan ineficazmente utilizan los hidratos de carbono con fines energéticos. Así la adición de lípidos contribuye a una mejor utilización de la proteína reflejada en unas mejoras en el crecimiento de los animales y en los índices de utilización protéica: PPV y CEC (de la HIGUERA et al., 1977a; TAKEUCHI et al., 1978 a; CARDENETE, 1985; CARDENETE et al., 1986; BEAMISH y MEDLAM, 1986). También hay una disminución en la tasa de excreción de amoníaco (ATHERTON y AITKEN, 1970; GARCIA et al., 1981 b; CARDENETE, 1985) y del consumo de  $O_2$  (CHO et al., 1982).

El efecto principal del ahorro de proteína, por adición de lípidos a la dieta, va en función de la sustitución de una fracción de la proteína, que se utilizará como fuente de energía o para la síntesis de lípidos.

La proporción óptima proteína/lípidos en dietas para salmónidos está alrededor de 35% de proteína-15-20% de lípidos, lo que supone una reducción de los niveles de proteína para esta proporción de lípidos del 48% al 35%, sin pérdida en la ganancia de peso (TAKEUCHI et al., 1978 a). Manteniendo fijo el nivel de proteína al 35% y variando el de lípidos de un 5 a un 25% TAKEUCHI et al. (1978 c) establece el nivel óptimo para la trucha en el 12% de lípidos, con mayores ganancias de peso y retención de la proteína y con valores óptimos de utilización nutritiva de la proteína sin que se altere la digestibilidad de las proteínas ni la de los lípidos. El valor óptimo de la relación energía digestible /proteína, para máximo crecimiento, en la trucha, fué de 130, en base a la medición de ED, relación bastante más alta que las obtenidas para trucha de arroyo (PHILLIP et al. 1966 ; RINGROSE, 1971), trucha arcoiris (LEE y PUTMAN, 1973; ZEITOUN et al., 1973), pez gato (GARLING y WILSON, 1976) y seriola (TAKEDA et al., 1975).

En rodaballo, BROMLEY (1980) obtiene un mayor ahorro de proteínas en los animales que tomaban la dieta alta en lípidos (6%) alimentados a 3/4 partes del nivel de saciedad incorporando un 42% de la proteína dietaria a las proteínas corporales, frente al 32% que incorporan los alimentados con la dieta control (0.5% lípidos).

Por el contrario, la inclusión de un alto porcentaje de lípidos en la dieta puede presentar acumulos lipídicos en distintas fracciones corporales del animal (de la HIGUERA et al., 1976, 1977 b, 1979; REINITZ y HITZEL, 1980; GARCIA et al., 1981 a; LEGER, 1981), si bien los depósitos no solo dependen de la adición de lípidos a la dieta, sino del propio nivel energético de ésta y de la ingesta calórica total (de la HIGUERA et al., 1977 b; BUCKLEY y GROVES, 1979; CARDENETE et al., 1987). De todas formas, estos acumulos parecen no alterar las propiedades organolépticas de estos animales (de la HIGUERA et al., 1977 b).

## 2.3.2.-NECESIDADES DE ACIDOS GRASOS ESENCIALES

Los numerosos trabajos existentes demuestran que los requerimientos de AGE varían considerablemente con la especie.

En un principio NICOLAIDES y WONDAL (1962) observaron en salmón chinook una pérdida de pigmentación si se alimentaban con dietas deficientes en 18:3 $\omega$ 3 y 18:2 $\omega$ 6.

En los trabajos realizados en pez gato, de aguas templadas, se observa que tienen unas bajas necesidades de AGE, pues en dietas libres de grasa no aparecen síntomas de deficiencia, aunque sí se aprecia una reducción del crecimiento. STICKNEY y ANDREWS (1972) obtienen mejores tasas de crecimiento en estos peces cuando son alimentados con dietas suplementadas con grasa de vacuno, aceite de oliva y triglicéridos de aceite de pescado que en los peces alimentados con dietas que contenían aceite de girasol (alto en 18:2 $\omega$ 6), aceite de linaza (rico en 18:3 $\omega$ 3). La carpa, también de agua templada, resultó tener unas necesidades de ácidos grasos muy similares a las del pez gato (WATANABE et al., 1975 a) cuando se usaron peces de 2.5 gr de peso, sin embargo cuando se usaron carpas de 0.65 gr para los ensayos alimentándolas durante 4 meses con dietas libres de grasa, se demostró claramente el carácter esencial del 18:3 $\omega$ 3 y 18:2 $\omega$ 6 para estos peces (WATANABE et al., 1975 b; TAKEUCHI y WATANABE, 1977 a) obteniendo los mejores resultados cuando se incorporaban a la dieta en un 1% para el 18:3 $\omega$ 3 y para 18:2 $\omega$ 6. Otro pez de agua caliente como es la anguila japonesa presenta unas necesidades de AGE similares a las de la carpa, pero a nivel más bajo: 0.5% para cada uno de ellos (TAKEUCHI et al., 1980).

En peces de agua fría, como la trucha, CASTELL et al. (1972 a) obtienen las mejores tasas de crecimiento e índices de conversión en las truchas alimentadas con 1% de 18:3 $\omega$ 3. La adición de 18:2 $\omega$ 6 a dietas deficientes mejoraba el crecimiento pero aparecían síntomas de deficiencia. Estudios de estos mismos autores sobre el metabolismo

lipídico determinaron definitivamente, el carácter esencial del 18:3 $\omega$ 3 para la trucha (CASTELL et al., 1972 b). Los niveles óptimos de este ácido graso están comprendidos entre 0.8-1.6% de la dieta. Niveles inferiores al 0.5% provocan la aparición de síntomas de deficiencia. TAKEUCHI y WATANABE (1977 b) observaron que las necesidades de ácidos grasos esenciales (18:3 $\omega$ 3) varían con la proporción total de lípidos en la dieta, sugiriendo que las necesidades de AGE se expresen como porcentaje de los lípidos de la dieta.

La adaptación a la salinidad parece no afectar los requerimientos de AGE en el salmón chum (WATANABE y TAKEUCHI, 1982 b) cuyas necesidades de AGE resultaron ser similares a las de la carpa : 1% de 18:2 $\omega$ 6 y 18:3 $\omega$ 3.

Sin embargo, en los peces de aguas marinas cálidas como el besugo, la seriola y el sargo, la necesidad de 18:3 $\omega$ 3 "per se" no es tan importante como para los peces de agua dulce (YONE y FUJII, 1975; FUJII y YONE, 1976; YONE, 1978). Los mejores resultados para los parámetros sanguíneos y nutricionales medidos en seriola y besugo se obtuvieron en los animales alimentados con dietas que contenían ácidos grasos polisaturados de la serie  $\omega$ 3 frente a los alimentados con dietas ricas en ácidos grasos de la serie  $\omega$ 6 (FURUKAWA et al., 1966; TSUKAHARA et al., 1967). YONE (1978) propone que los ácidos grasos polisaturados de cadena larga (HUFA) son esenciales en la nutrición de peces marinos, siendo las necesidades del besugo del 0.5% de la dieta para los  $\omega$ 3 HUFA. En peces de agua dulce como la trucha, carpa y anguila la fracción corporal de  $\omega$ 3 HUFA aumentaba cuando eran alimentados con 18:3 $\omega$ 3 mientras que en los peces marinos como la platija (OWEN et al., 1972) y el besugo (FUJII et al., 1976) no ocurría esto, concluyendo que los peces marinos presentaban una menor capacidad de elongación y desaturación del 18:3 $\omega$ 3 que los de agua dulce, (FUJII et al., 1976), aunque el rodaballo mostró cierta capacidad de elongación y desaturación (OWEN et al., 1975). Más tarde YAMADA et al. (1980) encontraron que tras la administración de 18:3 $\omega$ 3 marcado los peces marinos incorporaban al 22:6 $\omega$ 3 un 4.8-0.9% de la radiactividad

total, mientras que en la trucha el nivel de incorporación de radiactividad era del 3.6 al 14.5% .

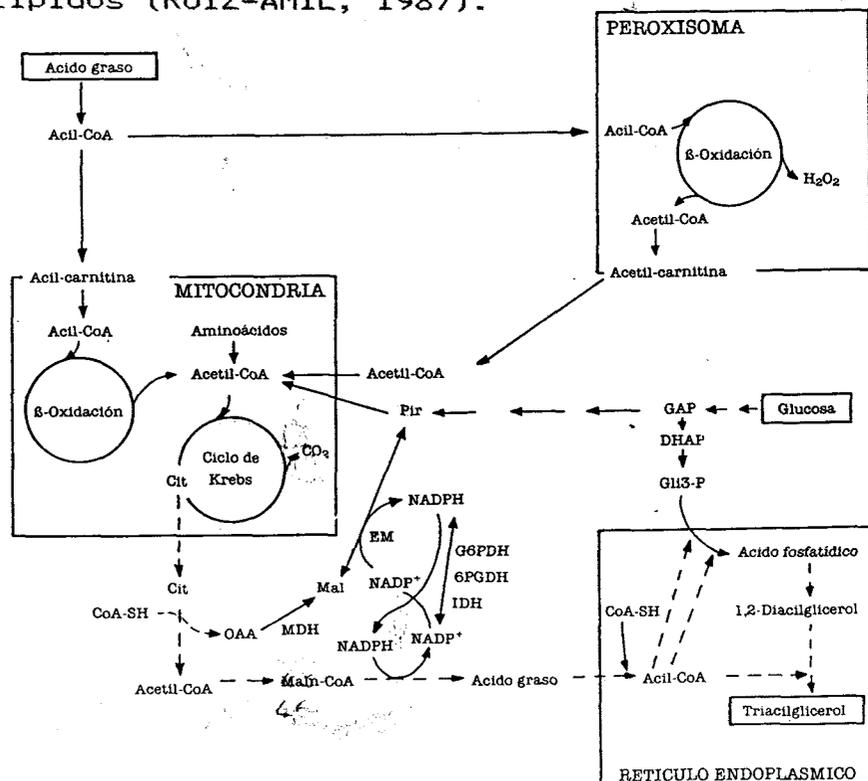
## 2.3.3.- METABOLISMO LIPIDICO

### 2.3.3.1.- síntesis de lipidos

La biosíntesis de ácidos grasos tiene dos vías diferentes y complementarias, la síntesis *de novo* a partir de acetyl-CoA y la elongación y desaturación de una cadena ya existente.

La síntesis de ácidos grasos en peces es similar a la descrita para aves y mamíferos (HANSEN y KNUDSEN, 1981). El acetyl-CoA es carboxilado, por la acetyl-CoA carboxilasa, y transformado en malonil-CoA. La biosíntesis comienza con un aceptor común, el acetyl-CoA, el proceso de síntesis se lleva a cabo gracias al complejo ácido graso-sintetasa formado por siete enzimas unidos a la proteína portadora de acilos (ACP). Los grupos acilos, necesarios para la síntesis, son aportados por el acetyl-CoA y el malonil-CoA y los hidrógenos por el NADPH. Esta primera fase es citoplasmática, se activa con el citrato y requiere la presencia de NADPH (FIG 2.4.).

FIG. 2.4 : Principales rutas del metabolismo de los lípidos (RUIZ-AMIL, 1987).



La elongación y saturación de los ácidos grasos es de localización intramitocondrial. La elongación de una cadena de ácidos grasos ya existentes se lleva a cabo por sucesivas adiciones de acetil-CoA, con gasto de NADPH y NADH, a esta cadena. El sistema enzimático que interviene es el mismo que para la  $\beta$ -oxidación, pero funcionando en sentido inverso, y, como en vertebrados, carece de las desaturasas ( $\Delta 12$  y  $\Delta 15$ ) necesarias para la síntesis de 18:2 $\omega$ 6 y 18:3 $\omega$ 3.

La elongación de la cadena de ácidos grasos, por adición de unidades de dos carbonos, ha sido demostrada en carpa (FARKAS y CSENGERI, 1976; FARKAS et al., 1978, 1980) anguila (HANSEN y ABRAHAM, 1983) y trucha (HAZEL y PROSSER, 1979) tras la administración de C<sup>14</sup>-acetato.

Los lípidos corporales de peces, sobretodo los que consumen dietas naturales, son generalmente ricos en ácidos grasos polinsaturados de los cuales la mayor parte es de la serie  $\omega$ 3 la administración de C<sup>14</sup> 18:3 $\omega$ 3 a peces pone en evidencia la facilidad de los peces de agua dulce, en general, y de la trucha, en particular, y la incapacidad de las especies marinas de elongar y desaturar el 18:3 $\omega$ 3 hasta C20 o C22 HUFA (KANAZAWA et al., 1979; OWEN et al., 1975; YAMADA et al., 1980). Incluso en salmón y trucha numerosos autores han demostrado la posibilidad de conversión de los 18:2 $\omega$ 6 ó 18:3 $\omega$ 3 a C20 ó C22 HUFA de las series  $\omega$ 3 y  $\omega$ 6 (TAKEUCHI y WATANABE, 1982 a; TAKEUCHI et al, 1979; WATANABE et al., 1974 a y b) y KAYAMA et al. (1963) en gupí y rodaballo han demostrado que el 20:5 $\omega$ 3 puede ser transformado en 22:6 $\omega$ 3, aunque los enzimas necesarios son escasos (BELL et al., 1985 a y b). El grado de insaturación de los ácidos grasos componentes de las membranas celulares en poiquilotermos, como los peces, están inversamente relacionado con la aclimatación a la temperatura (HAZEL y PROSSER, 1974). NINNO et al. (1974) demostraron la presencia, en los microsomas del hígado de *Pimelodus maculatus*, de  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas, que les permite alargar y desaturar las cadenas 18:3 $\omega$ 3 y 18:2 $\omega$ 6 y propone que al bajar la temperatura del agua aumente su actividad, lo que, posteriormente fue demostrado por De TORRENGO y BRENNER (1976) en *Pimelodus maculatus* mantenido

a 14-15°C y a 29-30°C. En truchas aclimatadas a 5°C aparece el 18:3ω3 como sustrato preferente para la elongación y desaturación, seguido del 18:2ω6 y del 18:1ω9 (SELLNER y HAZEL, 1982).

Tanto los procesos de elongación-desaturación y formación *de novo* de ácidos grasos, necesitan gran aporte de equivalentes reductores, NADPH ó NADH, cuyo suministro está cubierto por la vía de las pentosas fosfato (HOCHAKCHKA, 1967; FRIED y SCHREIBMAN, 1972; NAGAYAMA et al., 1972). En este sentido, LIN et al. (1977 a, b y c) determinaron la actividad de la ácido graso sintetasa, enzima citrato-liasa, enzima málico, glucosa 6 fosfato-deshidrogenasa, 6 fosfogluconato deshidrogenasa y NADP-isocitrato deshidrogenasa, en hígado de salmón coho, comprobando que en las dietas de alto contenido glucídico se incrementaba la actividad de estas enzimas, mientras que el ayuno y las dietas de alto contenido graso provocaban un descenso de la actividad de los enzimas lipogénicos. Estos resultados coinciden con los obtenidos para hígado de otras especies como yellow tail (SHIMENO et al., 1981), trucha (JÜRSS et al., 1985) que además no detectaron variaciones en la actividad con cambios en la salinidad. La temperatura parece no ejercer algún efecto sobre la lipogénesis y los enzimas sobre la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa y NADP-malato deshidrogenasa, ni sobre la síntesis total de lípidos o el contenido de NADP o NADPH en hígado de trucha (BALWIN y REED 1976 a).

La capacidad de síntesis de ácidos grasos de diferentes tejidos, se ha determinado por los niveles de enzimas y la incorporación de radiactividad a ácidos grasos procedentes de precursores de bajo peso molecular.

En salmón coho la actividad ATP-citrato liasa, enzima málico, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y ácido graso sintetasa fueron mayores en hígado que en tejido adiposo (LIN et al., 1977 a y b). Lo mismo ocurrió en pez gato (LIKIMANI y WILSON, 1982) y en anguila cuando se comparó

con tejido adiposo y músculo por lo que se considera el hígado como el órgano principalmente responsable de la síntesis de ácidos grasos (ASTER y MOON, 1981). Sin embargo, cuando los niveles de incorporación de sustratos marcados se expresa en términos de ADN, solo para la  $C^{14}$ -alanina fué 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 hepatocitos y adipocitos, si bién el hígado tiene aproximadamente 25 veces más ADN que el tejido adiposo por unidad de peso, por lo que se considera el hígado como el tejido de mayor producción de ácidos grasos y el tejido adiposo el de mayor capacidad de esterificación de  $C^{14}$ -palmitico en triglicéridos y de mayor capacidad de incorporación de  $C^{14}$ -glucosa al glicerol (HENDERSON y SARGENT, 1981) lo que indicaría que está adaptado para el acúmulo de lípidos. La distribución del tejido adiposo varía con las especies, en la trucha aparece rodeando las vísceras, 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.

El hecho de que la dieta, de numerosas especies de peces, sea rica en proteínas, junto con la baja velocidad de oxidación de la glucosa, comparada a la de los aminoácidos, en trucha (LIN et al., 1978) y carpa (NAGAI e IKEDA, 1972) y que los enzimas implicados en la conversión de los aminoácidos en intermediarios del ciclo TCA, sean activos en peces (WALTON y COWEY, 1982), hace pensar que los carbonos, derivados de los aminoácidos, sean incorporados al citrato que, por acción de la ATP-citrato liasa, generará acetyl-CoA, sustrato de la acetyl-CoA carboxilasa. Sin embargo, en algunas especies de peces, como la trucha arcoiris (BALDWIN y REED, 1976 b) y pez gato (LIKIMANI y WILSON, 1982) no ha sido detectado este enzima y la no incorporación de radiactividad del  $C^{14}$ -aspartato, en los ácidos grasos hepáticos de anguila americana (RENARD y MOON, 1980), hace que ASTER y MOON (1981) piensen que la fuente de carbono que usan estas especies para la síntesis de ácidos grasos, no requiera al citrato como precursor e indican que sería el acetato,

originado a nivel intestinal, el que actuaría como precursor en la síntesis de ácidos grasos en estas especies.

#### 2.3.3.2. -CATABOLISMO LIPIDICO

En mamíferos, los lípidos movilizados son transportados al hígado donde son oxidados en lugar de los carbohidratos para obtener energía. Puede ocurrir que los niveles de suministro y  $\beta$ -oxidación saturen la capacidad oxidativa del ciclo TCA y no se pueda degradar todo el acetil-CoA y este se transforma en cuerpos cetónicos (acetoacetato y 3-hidroxiacetato). Los cuerpos cetónicos formados en el hígado son captados por otros tejidos donde se reconvierten en acetil-CoA, que puede ser oxidado, vía TCA, o usado como sustrato lipogénico (WILLIANSON, 1981).

Al contrario que en mamíferos, en peces, tanto marinos como de agua dulce, no se ha detectado actividad 3-hidroxiacetato deshidrogenasa; sin embargo, se aprecian niveles altos de actividad para la 3-oxoacid-CoA transferasa (McGARRY y FOSTER, 1980; ZAMMIT et al., 1979). Para explicarlo ZAMMIT et al., (1979) proponen que la alta actividad de la 3-oxoacid-CoA transferasa reduce los niveles de formación de cuerpos cetónicos, transformando el acetoacetil en acetoacetil-CoA que inhibe a la HMG-CoA sintetasa y a la acetoacetil-CoA tiolasa. De este modo, todo el acetoacetil-CoA formado es transformado en acetil-CoA, que puede ser oxidado, manteniéndose los cuerpos cetónicos muy bajos.

La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos en peces es esencialmente la misma que en mamíferos, los ácidos grasos entran en la mitocondria como acilcarnitina y, posteriormente, son oxidados vía  $\beta$ -oxidación y TCA para obtener ATP. (FIG 2.4.)

La dieta natural de las especies pelágicas incluidos el arenque y la caballa, son ricas en ceras esterificadas con gran cantidad de alcoholes grasos del tipo 22:1 $\omega$ 11 y 20:1 $\omega$ 9. Estos son transformados en ácidos grasos por una deshidrogenasa microsomal, con formación de NADH, e

incorporados a los triacil-gliceroles en la mucosa intestinal (BAUERMEISTER y SARGENT, 1979). En truchas alimentadas con una dieta con gran cantidad de 22:1 $\omega$ 11 solo aparecen estos en un 8% del total de lípidos del pez (HENDERSON et al., 1982). YU et al. (1977) obtienen resultados similares sin encontrar gran cantidad de estos formando parte de los fosfolípidos de membrana, por lo que suponen deben ser usados específicamente como fuente de energía. Estos mismos autores al comparar la velocidad de oxidación mitocondrial, en hígado de trucha *in vitro*, de diferentes ácidos grasos, comprobaron que la velocidad de oxidación para el 12:0 es solo dos veces mayor que para el 22:6 $\omega$ 3. En truchas alimentadas con una dieta que contenía 7.6% de los lípidos totales como 22:1 $\omega$ 11, los niveles de oxidación para 16:0-carnitina y 22:1 $\omega$ 11-carnitina son iguales, mientras que en mamíferos existe una clara preferencia por los derivados de la carnitina de cadena corta (C10 a C14) (ALEXON y CANNON, 1984), lo que deja entrever que la trucha y, probablemente los peces en general, son capaces de utilizar una mayor gama de ácidos grasos para su oxidación que los mamíferos (HENDERSON y TOCHER, 1987)

La aparente retención durante la movilización de lípidos, de los HUFA podría asegurar su papel como constituyentes fundamentales de los fosfolípidos de membrana, mientras que los monosaturados, que son fácilmente movilizados, además de ser buen sustrato de la  $\beta$ -oxidación, son utilizados como fuente de energía.

La existencia de peroxisomas fué demostrada en carpa (GOLDENBERG et al., 1978) en dorada (BERGOT y FLECHON, 1970) y su capacidad de oxidar ácidos grasos fué puesta en evidencia al obtener actividad para la palmitoil-CoA oxidasa perixisomal, aunque en niveles muy bajos y no aumentando en truchas alimentadas con una dieta rica en 22:1 $\omega$ 11 (activador de la  $\beta$ -oxidación perisomal en mamíferos) (HENDERSON et al., 1982). Sin embargo, un desbalance entre los ácidos grasos de cadena larga monosaturados y los HUFA parece inducir su activación (HENDERSON y SARGENT, 1984; HENDERSON et al. 1982), siendo los ácidos grasos saturados el sustrato preferencial de la

$\beta$  oxidación perioxomal en hígado de trucha (HENDERSON y SARGENT, 1985).

De todas formas los niveles de oxidación peroxisomal del palmitoil-CoA son mucho menores que la actividad mitocondrial de la carnitina palmitoil transferasa (HENDERSON y SARGENT, 1985). Así la  $\beta$ -oxidación peroxisomal supondría solamente una pequeña contribución a la degradación de los ácidos grasos en peces y, como en el caso de los mamíferos, en condiciones fisiológicas normales la mayor parte de la oxidación se haría en la mitocondria.

## 2.4.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO PROTEICO A VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE LA DIETA

### 2.4.1.-EFECTOS DE LA INGESTION DE DIETAS DE ALTO CONTENIDO PROTEICO

El suministro a peces de una dieta con un elevado porcentaje de proteínas conlleva una serie de efectos, ya estudiados por numerosos autores, siendo los más aparentes un aumento del peso del animal, paralelo al aumento del porcentaje de proteína en la carcasa (AUSTRENG y REFSTIET, 1979) y en el hígado (COWEY et al., 1974; WALTON, 1986), además de un aumento del total de fosfolípidos hepáticos.

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 aminoácidos en sangre, frente a una baja proporción de glucosa, además de un bajo índice hepatosomático y bajos niveles de glucógeno hepático; sin embargo, este mismo autor en otros trabajos (WALTON et al., 1982, 1984 b) encuentra que, en dietas con un alto porcentaje de

aminoácidos cristalinizados, aumenta la relación hepatosomática así como el contenido de glucógeno en hígado, por lo que, en este sentido, parece ser que el metabolismo de un aminoácido puede estar afectado por la forma en que está 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 fué estudiada por NOSE (1972) y ZEBIAN (1977), quienes, efectivamente, encontraron que existe una correlación positiva entre los aminoácidos dietarios y la proporción de aminoácidos libres en los tejidos, si bién la proporción de estos en tejidos va a depender de la proporción de aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales que contenga la dieta, de manera que cuando se comen niveles de aminoácidos esenciales por encima de las necesidades aumenta la oxidación de estos, ya que el exceso será desviado hacia otras vías diferentes a la síntesis de proteína, mientras que si la concentración es baja se utiliza para síntesis de proteína, como ya se ha tratado en el apartado 2.1.4.2., esto se ha comprobado en pez gato (WILSON et. al., 1977; HARDIN et.al., 1977) y en trucha (KAUSHIK, 1979) aunque en los trabajos hechos sobre el efecto de diferentes niveles de aminoácidos en la actividad de los enzimas hepáticos iniciadores del catabolismo aminoacídico parece no afectarla, así, en trucha arcoiris la variación de los niveles dietarios de triptófano, lisina y arginina no tuvo efectos significativos sobre la actividad en hígado de triptófano pirrolasa, lisina- $\alpha$ -cetoglutarato reductasa y arginasa respectivamente (WALTON et al., 1984 a y b) mientras que en ratas un aumento del nivel protéico de la dieta provoca un aumento de la actividad de estos enzimas (MURAMATSU et al., 1984). Sin embargo, WALTON (1985), WALTON et al. (1984 a y b ; 1986) encuentran que a pesar de no aumentar la actividad enzimática la producción de  $C^{14}O_2$  a partir de una dosis inyectada de  $C^{14}$ -aminoácido tiende a mantenerse baja en peces alimentados con niveles de aminoácidos esenciales inferiores a las necesidades y aumenta cuando el nivel se sobrepasa.

COWEY et al., (1981), trabajando con dietas en las que varía la cantidad y calidad de la proteína observó que cuando la proteína es de alto valor biológico es fundamentalmente destinada a la síntesis de nuevas estructuras, mientras que una proteína con un nivel elevado de aminoácidos gluconeogénicos aumentará la síntesis de glucosa y, por tanto, los depósitos de glucógeno hepático.

Por último, otro efecto importante en peces sometidos a esta condición nutritiva es el aumento de la excreción de amoniaco, ya que los aminoácidos que no han sido utilizados para la síntesis de proteínas y que se emplean como fuente de energía o sustratos gluconeogénicos, han de ser desaminados por los mecanismos ya expuestos en el apartado 2.1.4.1. con el consiguiente aumento en la excreción de amoniaco.

La degradación de los aminoácidos, provenientes de la dieta o de la ruptura de las proteínas endógenas, comienza con una desaminación en la que, según el esquema propuesto por BRAUNSTEIN (1957), la primera reacción estaría catalizada por una transaminasa y la segunda por la GDH; estas enzimas se encuentran presentes en casi todos los tejidos, pero tienen actividad máxima en hígado, riñón y músculo (STIEBER y CVANCARA, 1977; SALVATORE et al., 1965; BELL, 1968; VAN WAARDE, 1981), si bien parece el hígado el órgano con mayor producción de amoniaco y, por esto, es el de mayor capacidad de desaminación en los peces (PEQUIN y SERFATY, 1963; GOLDSTEIN et al., 1964; McBEAN et al., 1966). Sin embargo, los resultados obtenidos para la actividad transaminasa en hígado de varios peces, en relación al contenido en proteína de la dieta, son contradictorios (TABLA 2.2.). RUMSEY (1981) y NAGAI e IKEDA (1972) encontraron, en general, poca adaptación en la actividad de los enzimas catalíticos del metabolismo protéico a cambios del nivel de proteína en la dieta. COWEY et al. (1974), en platijas alimentadas con una dieta al 50% de proteína, frente a otra al 20%, tampoco encuentran un aumento significativo en la actividad AAT, GOT y GDH (expresados en unidades de enzima hepático total / 100 g de pez) por lo que sugiere que factores de tipo cinético o alostérico pueden ser más

importantes, en el control del catabolismo aminoacídico, que el nivel total de enzimas. WALTON (1986) determinó la actividad arginasa, histidasa, leucina aminotransferasa, GPT, GOT, treonina-DH, y GDH y aunque, en general, mostraron poca tendencia a adaptar su actividad a cambios en la proteína dietaria, sí se detectó un aumento significativo en la actividad GPT, GOT, GDH y treonina-DH en las truchas alimentadas con una dieta alta en proteína/baja en carbohidratos frente a las alimentadas con una dieta baja en proteína/ alta en hidratos de carbono, resultados que concuerdan con los obtenidos por ALEXIS y PAPAPARASKEVA -PAPOUTSOGLOV (1986) para GOT y GPT medidas en pez gato alimentado con dietas en las que se varía la proporción de hidratos de carbono y proteínas. En la TABLA 2.2. se reflejan los datos obtenidos por diferentes autores en peces alimentados con una dieta alta en proteína y baja en carbohidratos frente a otra baja en proteína alta en carbohidratos.

En cuanto a la influencia en la actividad GOT, GPT y GDH, de la calidad y cantidad de la proteína, DEAN et al.(1985) para pez gato aportaron los siguientes resultados: en cuanto a la cantidad, la actividad GOT, GPT y GDH aumenta con el nivel de proteína en la dieta; sin embargo, al aumentar la calidad protéica parece que la única enzima que aumenta su actividad es la GOT, debido, probablemente, a que cataliza reacciones que intervienen en la síntesis de proteínas purinas y purimidinas y por su relación con el metabolismo energético aportando NADH. Por el contrario, GPT disminuye su actividad con el aumento de la calidad de la proteína pues esta enzima está asociada a la gluconeogénesis (MASTERS y HORGAN, 1962; MURAMATSER y ASHIDA, 1962; ROSEN et al., 1959), además de estar implicado en el transporte de grupos amino por la alanina desde el músculo esquelético al hígado (CORNISH et al., 1978).

La disparidad de los datos obtenidos por los diferentes autores, así como el diferente comportamiento de los enzimas estudiados, puede ser debido a distintas causas. Para algunos autores el comportamiento adaptativo

TABLA 2.2.-Efectos de la administración de una dieta alta en proteínas /baja en hidratos de carbono comparados con los de una baja en proteínas /alta en hidratos de carbono sobre la actividad de varios enzimas hepáticos, de diferentes especies de peces.

Enzima	Modificación-Ref.	Especie
AAT	0_1	platija
	0_2;+_2,3	trucha
Arginasas	+_4	carpa
	0_5	salmon
	0_6	trucha
GOT	0_1	platija
	0_2,6;+_2	trucha
GDH	0_1	platija
	0_5	salmon
	0_3;+-3	trucha
Histidasa	0_3,6	trucha
	+_7	caballa
LeuAT	0_5	salmón
	0_8	carpa
SerAT	0_3;+_6	trucha
Hexokinasa	0_2,11	trucha
PFK	-_3,12	trucha
PK	-_12;-_2,3,6,11.13	trucha
FbPasa	+_10	seriola
	+_3,6,11,13	trucha
PEPCK	+_2,3,11,13	trucha
G6PDH	-_4	carpa
	-_2,13	trucha

Ref.- 1. COWEY et al., (1974); 2. ABEL et al., (1978); 3. WALTON, (1986); 4. SHIMENO et al., (1981); 5. RUMSEY, (1981); 6. COWEY et al., (1981); 7. SAKAGUCHI y KAWAI, (1970); 8. ZEBIAN y CREACH, (1979); 10. SHIMENO, (1974); 11. COWEY et al., (1977 a); 12. FIDEU et al., (1983); 13. HILTON y ATKINSON, (1982).

de los enzimas catabolizantes del metabolismo aminoacídico es comparable a lo que ocurre en mamíferos, pues en éstos parece estar relacionado, en gran medida, con los hábitos alimenticios de cada especie; omnívoros y herbívoros parece que pueden adaptar la actividad de estos enzimas según los niveles de proteína de la dieta, mientras que los carnívoros, como el gato, que sería el caso de numerosas especies de peces, parece no sufrir grandes adaptaciones en la actividad transaminasa al variar la cantidad de proteína, debido, probablemente, a la gran afinidad que presentan estos enzimas por su sustrato, que les permite mantener una elevada tasa de desaminación sin aumentar la cantidad de enzimas hepáticos (WALTON y COWEY, 1979 b).

La utilización la proteína como fuente de energía podría estar determinada genéticamente, por lo que parte de la proteína ingerida en la dieta es desaminada y su metabolismo se dirige hacia la obtención de energía, independientemente de la proporción de proteína en la dieta. Aunque , otro factor a tener en cuenta es la energía disponible para el pez; en truchas alimentadas con dietas que mantienen constante el nivel de proteína y aumentan el de lípidos se observa una disminución de la actividad AAT (De la HIGUERA et al. 1977 a), al existir menor utilización catabólica de la proteína por el aporte energético extra que suponen los lípidos en la dieta.

#### 2.4.2.-INFLUENCIA DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN HIDRATOS DE CARBONO

Los aminoácidos pueden ser degradados para la obtención de energía. Parte de ellos, los aminoácidos gluconeogénicos, producen piruvato u otro metabolito intermediario del ciclo TCA, que pueden ser transformados en glucosa o seguir la ruta degradativa hasta la obtención de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y energía. Basándose en esto y en la necesidad de algunos tejidos de utilizar glucosa, como sustrato energético, numerosos autores han estudiado la posibilidad de la sustitución de la proteína por hidratos de carbono en la dieta; sin embargo, la lenta velocidad de oxidación

de la glucosa (LIN et al., 1978; COWEY y SARGENT, 1979), el poco control que ejercen estos animales sobre la regulación de la glucemia (PALMER y RYMAN, 1972; BERGOT, 1979 a) y, en general, la baja digestibilidad de los hidratos de carbono (SINGH y NOSE, 1967; PHILLIPS y BROCKAWAY, 1959), hacen que niveles superiores al 14-20% de la dieta (BUHLER y HALVER, 1961; HILTON y ATKINSON, 1982) no sean eficazmente aprovechados por la mayoría de las especies estudiadas.

Los datos obtenidos sobre la actividad transaminasa en hígado, de diferentes especies de peces alimentados con una dieta rica en hidratos de carbono, son contradictorios. En platija, COWEY et al., (1974), no detectaron cambios en la actividad transaminasa. En la trucha, cuando la proteína es sustituida por almidón de maíz gelatinizado (PIEPER y PFEFFER, 1979; ABEL et al., 1978), aparece un descenso en la actividad GOT y GPT. WALTON (1986), también obtiene una disminución de la actividad GPT, GDH y treonina-DH, en truchas alimentadas con una dieta de alto contenido glucídico y bajo en proteínas, (LP/HC), frente a las alimentadas con la dieta contraria, (HP/LC) y ALEXIS y PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLIOV (1986) obtuvieron resultados similares en *Mugil capito*.

Por otra parte, la gluconeogénesis "in totum", a partir de aminoácidos marcados, en truchas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos se inhibe significativamente (COWEY et al., 1977 a; de la HIGUERA y CARDENAS, 1985). Esto, junto con los datos enzimáticos antes citados parece indicar que existe cierta desviación de la proteína con fines de crecimiento y reposición de estructuras, cuando se sustituye parte de la proteína dietaria por hidratos de carbono, aunque HILTON y ATKINSON, (1982), encuentran que se mantiene la incorporación de C<sup>14</sup> de alanina en C<sub>4</sub>-glucosa plasmática, al aumentar los niveles de hidratos de carbono en la dieta. Estas diferencias entre los resultados obtenidos por, HILTON y ATKINSON, (1982) y De la HIGUERA y CARDENAS, (1985), las explican estos últimos en base a los diferentes niveles de proteína en la dieta, ya que HILTON

y ATKINSON trabajan con dietas de igual contenido en nitrógeno mientras que De la HIGUERA y CARDENAS lo hicieron sustituyendo isoenergéticamente la proteína por hidratos de carbono; si aceptamos que sea el nivel de aminoácidos disponibles en vez del de hidratos de carbono, el factor más importante de control gluconeogénico (De la HIGUERA y CARDENAS, 1985).

#### 2.4.3.- INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA.

El efecto favorable que ejerce la suplementación lipídica en la dieta ha sido constatado y cuantificado por numerosos autores y hoy día, no existe duda sobre los beneficios que reporta su adición a la dieta sobre la mejor utilización de la proteína dietaria. Los valores obtenidos para los índices CEC y PPV (De la HIGUERA et al., 1977 a; TAKEUCHI et al., 1978 a; CARDENETE et al., 1986; BEAMISH y MEDLAND, 1986), la disminución en la tasa de excreción de amoniaco (ATHERTON y AITKEN, 1970; GARCIA et al. 1981 b; CARDENETE, 1985) y la disminución en el consumo de O<sub>2</sub> (CHO et al., 1982) confirman esta mejor utilización de la proteína con fines de crecimiento. Sin embargo, a nivel metabólico, estos efectos sobre la utilización nutritiva de la proteína no se reflejan claramente, al contrario de lo que ocurre en mamíferos (KREBS, 1972; FREEDLAND y SZEPESEI, 1971). De la HIGUERA et al., (1977 a) encontraron una disminución significativa en la actividad AAT hepática, mientras que la GOT no parece afectarse, con el aumento de lípidos en la dieta, manteniendo aproximadamente constante el nivel de proteínas. JURRS, (1981 a) obtuvo también una clara disminución en la actividad AAT hepática cuando disminuye el nivel de proteínas y aumenta el de lípidos; sin embargo, en riñón parece que no se afecta la actividad para GOT, AAT ni GDH (JURRS et al., 1984). La disminución de actividad AAT, al aumentar el contenido graso de la dieta, puede ser debida a la relación de este enzima con la vía gluconeogénica (MASTERS y HORGAN, 1962; MURAMATSER y ASHIDA, 1962; ROSEN et al., 1959), al proveer esqueletos carbonados para gluconeogénesis y, probablemente esté

inhibida por el aporte energético extra que supone la administración de una dieta rica en lípidos.

## 2.5.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO GLUCIDICO A VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE LA DIETA

### 2.5.1.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN HIDRATOS DE CARBONO

Hemos visto en el apartado anterior que los hidratos de carbono necesarios para los peces, pero que su inclusión en la dieta, en proporciones adecuadas, mejora la utilización de la proteína para crecimiento. Sin embargo, el exceso de glúcidos provoca una serie de alteraciones en la trucha, como la elevación de la glucosa en sangre, el aumento en peso del hígado y la acumulación de glucógeno (PHILLIPS et al., 1948, 1966; BUHLER y HALVER, 1961; PIEPER, 1977; ABEL et al., 1979; REFSTIE y AUSTRENG, 1981; HILTON, 1982). En casos extremos puede llegar a presentar lesiones patológicas como es el hígado graso (HILLE et al., 1980).

PALMER y RYMAN, (1972) introdujeron una solución de glucosa en el estómago de la trucha arco-iris que produjo una elevada hiperglucémia y un aumento del glucógeno hepático. Trás la administración de insulina, los niveles de glucosa en sangre disminuyeron, incluso provocando una hipoglucémia, lo que indica un comportamiento de animal diabético (FALGE, 1973; LUQUET et al., 1975, 1976; LEGER et al., 1975, 1976). En trabajos posteriores, se puso de manifiesto que la trucha puede llegar a regular la glucemia, aunque en períodos largos (aprox. 24 h.) y después de adaptarse durante varias semanas a dietas con un elevado contenido en glucosa (BERGOT, 1979 a).

De todas formas, los hidratos de carbono pueden ser incluidos en las dietas para peces hasta ciertos niveles,

según la especie, sin provocar efectos negativos; por el contrario, mejoran la retención de nitrógeno, al intervenir en el establecimiento de una relación proteína/energía óptima, y reducen el destino gluconeogénico de los aminoácidos.

La poca tolerancia y mala regulación de la utilización de la glucosa que presentan numerosas especies de peces se debería, según COWEY et al., (1974), De la HIGUERA et al., (1977 a) y WALTON y COWEY, (1982), a la poca capacidad de fosforilación de la glucosa por la falta de inducción de la hexoquinasa. No obstante, el nivel de este enzima parece aumentar en algunas especies de peces, como la carpa, cuando son alimentados con una dieta rica en hidratos de carbono (FIDEU et al., 1983). La glucosa fosforilada puede ser utilizada para la síntesis de glucógeno hepático, ya que tras la administración de una dieta rica en hidratos de carbono digestibles los depósitos de glucógeno aumentan (HILTON y ATKINSON, 1982), o bien puede ser degradada vía pentosas fosfato, la G6PDH aumenta su actividad, o también puede metabolizarse a través de la vía glucolítica, ya que la actividad PK, PFK y LDH se vé incrementada en truchas alimentadas con una dieta alta en carbohidratos y baja en proteínas (WALTON, 1986). Por el contrario, HILTON y ATKINSON no llegan a detectar una activación de la PK en respuesta a dietas ricas en carbohidratos.

Respecto a la gluconeogénesis, los datos que encontramos no están claros. Por una parte, se obtiene una disminución de la gluconeogénesis "in totum" a partir de C<sup>14</sup>-glutamato (De la HIGUERA y CARDENAS, 1985) y de C<sup>14</sup>-alanina (COWEY et al., 1977 a) que, paralelamente, se correlaciona con la consiguiente inhibición de la actividad FBPasa y PEPCK (COWEY et al., 1977b; WALTON, 1986), cuando las truchas son alimentadas con dietas ricas en hidratos de carbono y pobres en proteínas. Por el contrario, HILTON y ATKINSON (1982), no encuentran ningún efecto sobre la gluconeogénesis en los animales alimentados con una dieta hiperglucídica, y que explican por un efecto de compensación entre la PEPCK que se inhibe

con el aumento de los hidratos de carbono, y la FBPasa que se activa bajo las mismas condiciones. Las diferencias obtenidas, por estos últimos, para la gluconeogénesis y la glucolisis, se pueden deber a la diferente composición de la dieta, ya que COWEY varía el nivel de glucidos y el de proteínas y HILTON y ATKINSON van reemplazando el aporte lipídico por el de carbohidratos. Ambas situaciones nutritivas provocarían dos mecanismos de control diferentes, uno, el propuesto por HILTON y ATKINSON en el que los niveles de fosforilación de la glucosa se mantendrían bajos pero mayores que los de gluconeogénesis, siendo la glucosa degradada preferentemente por la vía de las pentosas fosfato, generando poder reductor para la síntesis de lípidos. Otra posibilidad alternativa, según los resultados de NAGAI e IKEDA (1971 a y b), en carpa, y los de NEWGARD et al., (1984), en rata, es el aumento de la actividad fructosa bisfosfatasa reflejada en el incremento de la síntesis de glucógeno a partir de carbohidratos de la dieta, por una ruta alternativa. Otro mecanismo de regulación posible, frente a dietas de alto contenido en hidratos de carbono sería el que se desprende de los datos aportados por COWEY et al., (1977a) según los cuales la trucha podría relativamente adaptar su capacidad gluconeogénica a las variaciones de carbohidratos en la dieta, al mismo tiempo que se induciría el efecto contrario en la glucolisis, según los datos de actividad enzimática aportados por este autor posteriormente (COWEY et al., 1977 b).

## 2.5.2.-INFLUENCIA DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA.

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 enzimas productores de NADPH tales como G6PDH, 6PGDH y NADP isocitrato-DH, demostrado en mamíferos superiores como la rata (NACE et al., 1979), y en peces como el salmón coho (LIN et al., 1977 b), seriola (SHIMENO et al., 1981) y trucha arco-iris (JURRS et al., 1984; De la HIGUERA et al., 1977 a).

La utilización de la glucosa está estrechamente influenciada por los niveles de oxidación de los ácidos grasos y cuerpos cetónicos. En mamíferos, el aumento del nivel de ácidos grasos en sangre no solo provee de un combustible adicional sino que además reduce la tasa de oxidación de la glucosa (RANDLE et al., 1964; RENNIE y HOLLOSZY, 1977), ya que aumentan los niveles de acetil-CoA que inhiben a la piruvato deshidrogenasa, por un lado, y, además, también se inhibe la PFK, al aumentar los niveles de citrato, modulador negativo de este enzima; esto hace que aumente la concentración de metabolitos intermediarios y entre ellos la G6P produciéndose una inhibición de la hexoquinasa. Paralelamente, hay una activación de la gluconeogénesis por formación de ATP que favorece el proceso junto a la activación por, acetil-CoA, de la piruvato carboxilasa (FERRE et al., 1979). Sin embargo, en peces no parece existir ninguna activación de la gluconeogénesis. En truchas alimentadas con una dieta rica en grasas la G6Pasa parece activarse, aunque la gluconeogénesis, "in totum", a partir de C<sup>14</sup>-glutamato, no aumentan (De la HIGUERA y CARDENAS, 1985). SAVINA y WOJTCZAR, (1976), encuentran que el glicerol es un buen sustrato gluconeogénico durante el periodo de ayuno que supone la emigración de la lamprea proceso que se realiza fundamentalmente en músculo. Parece pues, que la oxidación de los ácidos grasos inhibe la gluconeogénesis pero en condiciones de ayuno, mientras que la administración de una dieta rica en grasa no tiene un efecto tan claro a nivel de gluconeogénesis pudiéndose producir la regulación de esta vía principalmente por las necesidades de energía y no por el nivel de lípidos dietarios .

### 2.5.3.-INFLUENCIA DE UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS

Un aumento del porcentaje de proteínas en la dieta aumenta los niveles de aminoácidos y, consecuentemente, la utilización de estos como fuente de energía o para la síntesis de glucosa. En este sentido, COWEY et. al., (1981) obtienen un aumento de la actividad de los enzimas gluconeogénicos con el aumento de la ingesta protéica, pudiendo ser reflejo de un aumento de la síntesis de

proteínas (que afectaría a la síntesis enzimática), y/o a un cambio en el balance metabólico, como respuesta adaptativa del animal a cambios en el régimen alimenticio. WALTON ,(1986), compara el efecto de la administración de una dieta alta en hidratos de carbono/baja en proteínas frente a otra alta en proteínas/baja en hidratos de carbono en la trucha arcoiris obteniendo un claro aumento de la actividad de los enzimas gluconeogénicos medidos (fructosa bisfosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y una fuerte inhibición de los enzimas glucolíticos (fosfofructoquinasa, piruvato quinasa y láctico deshidrogenasa). En los animales alimentados con la segunda dieta estos resultados coinciden con los obtenidos por COWEY et. al., (1981), en truchas alimentadas con 12 dietas diferentes en cuanto a calidad y cantidad protéica. La calidad de la proteína afecta la actividad de los enzimas gluconeogénicos dependiendo de la composición de los aminoácidos; una proteína con un alto valor biológico es utilizada principalmente para síntesis de estructuras, quedando pocos aminoácidos disponibles para ser transformados en glucosa; si la proteína tiene un gran porcentaje de aminoácidos gluconeogénicos esta vía metabólica se verá incrementada. Para los enzimas glucolíticos (PK y PFK), no se observó que existiera relación entre la actividad enzimática y la calidad de la proteína. COWEY et al., (1977 a) demostraron que en trucha arco-iris los niveles de gluconeogénesis están significativamente afectados por la composición de la dieta. En truchas alimentadas con una dieta rica en proteínas (60%) y sin hidratos de carbono los niveles de gluconeogénesis a partir de alanina son mucho mayores que en las alimentadas con una dieta que contenía un 10% de proteína y 55% de hidratos de carbono digestibles; en las truchas sometidas a ayuno durante tres semanas los niveles de gluconeogénesis son similares a los de las alimentadas con una dieta rica en proteínas. Las actividades enzimáticas, para enzimas gluconeogénicos y glucolíticos, concuerdan con estos resultados, tanto FBPasa como PEPCK se encuentran significativamente aumentados en los animales alimentados con la dieta rica en proteínas, con respecto a los obtenidos en animales alimentados con dieta

rica en carbohidratos, mientras que para la PK se obtienen resultados contrarios (COWEY et al., 1977 b).

## 2.6.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO LIPIDICO A VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE LA DIETA

### 2.6.1.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA

La utilización de dietas de elevado nivel graso presenta una serie de ventajas ya comentadas en apartados anteriores; sin embargo, también tiene una serie de efectos negativos sobre el pez tales como acúmulo de grasa en distintas fracciones corporales (De la HIGUERA et al., 1976, 1977 b; REINITZ y HITZEL, 1980; GARCIA et al., 1981 a; LEGER, 1981), aunque el contenido graso total no solo 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., 1977 b; BUCKLEY y GROVES, 1979; CARDENETE et al., 1987). Los lípidos suelen depositarse en el tejido mesentérico (LIN et al., 1977 a y b) y, a la larga, pueden ser perjudiciales para el pez (PHILLIPS et al., 1964; McCARTNEY, 1965). Por otra parte, ni el peso del hígado ni su contenido lipídico parece afectarse al aumentar los lípidos dietarios (OGINO et al., 1976). También la calidad de los lípidos de la dieta puede afectar al crecimiento, metabolismo intermediario y/o los depósitos grasos corporales.

La adición a la dieta de 18:3 $\omega$ 3 o una mezcla de 3 $\omega$  HUFA, 20:5 $\omega$ 3 y 22:6 $\omega$ 3 (1:1), en cantidades de cuatro veces la requerida, provoca, en la trucha arco-iris, un mal crecimiento e índices de conversión bajos (TAKEUCHI y WATANABE, 1979). Síntomas similares se han detectado para trucha y salmón alimentados con dietas ricas en ácidos grasos de la serie  $\omega$  6 (YU y SINNHUBER, 1979).

En varios estudios se ha tratado de establecer el efecto de una dieta con un nivel elevado de grasa sobre el metabolismo lipídico. Para ello, LIN et al., (1977 a) determinaron la respuesta al aumento del nivel graso en la dieta, de las actividades de los enzimas lipogénicos citrato liasa (Cl) y complejo sintetasa de ácidos grasos en hígado y tejido adiposo de salmón (*Oncorhynchus kisutch*); así mismo, determinaron la de los enzimas que generan equivalentes reductores, esenciales para la síntesis de ácidos grasos: enzima málica; G6PDH; GPGDH y NADP isocitrato-DH, y excepto esta última que pareció no afectarse, en las demás se produjo un efecto inhibitorio, especialmente para la ATP- citrato liasa. JURRS et al., (1984) también observó una reducción la actividad de G6PDH y 6PGDH, en hígado de trucha pero al contrario que LIN también obtuvo una reducción de la IDH con el aumento del contenido graso de la dieta. SHIMENO et al., (1981) obtuvieron resultados similares para la seriola, aunque contrastando los resultados obtenidos por LIN et al., (1978) para los enzimas lipogénicos. WARMAN y BOTTINO (1978) no observaron reducción de la actividad ácido graso sintetasa, ni de la acetil-CoA-carboxilasa, en pez gato, al variar los niveles lipídicos de la dieta, pero el porcentaje de lípidos en las dietas empleadas era tan bajo que explicaría la falta de influencia sobre la actividad enzimática. De hecho la síntesis "de novo" de ácidos grasos en peces solo se hace patente para niveles grasos superiores al 10%, inhibiéndose por debajo de este porcentaje, lo que contrasta con la situación en mamíferos donde los enzimas lipogénicos se inhiben cuando los niveles lipídicos dietarios están por debajo del 2.5%

Resumiendo, se puede decir que durante situaciones claramente antilipogénicas (administración de una dieta alta en grasa o un ayuno prolongado) tiene lugar una disminución de la actividad de los enzimas hepáticos, tanto lipogénicos como productores de NADPH, igual que ocurre en mamíferos (NACE et al., 1979; HERZBERG, 1983). Esta disminución en la actividad puede deberse a un aumento de la forma inactiva del enzima, como le ocurre a

la acetil-CoA carboxilasa, o a la disminución de la concentración celular de proteína como reflejo del proceso de represión enzimática que tiene lugar bajo estas condiciones (MIKSICEK y FOWLE, 1982). En el tejido adiposo, la actividad de los enzimas parece no afectarse al variar el nivel lipídico de la dieta, aunque se mantiene el almacenamiento de triacil-glicerol 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  $\beta$ -oxidación, al exceso de grasa en la dieta. De hecho, la carnitina parmitoil-transferasa, considerada como limitante en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial (McGARRY y FOSTER, 1980), no se afecta al aumentar la grasa en la dieta (HENDERSON y SARGENT, 1981), lo que sugiere que la  $\beta$ -oxidación mitocondrial permanece constante y solo la  $\beta$ -oxidación perixosomal aumenta, aunque parece provocada por el desbalance entre ácidos grasos saturados e insaturados más que por el exceso de grasa dietaria.

## 2.6.2.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDOS EN PROTEINAS

En mamíferos omnívoros, el acetil-CoA, empleado en la síntesis de lípidos, se origina en la mitocondria a partir de carbohidratos. En peces carnívoros se piensa que el esqueleto carbonado del acetil-CoA se forma por la degradación de aminoácidos ya que por una parte su dieta está fundamentalmente constituida por proteínas y, además, la capacidad de oxidación de la glucosa es muy limitada. Por otra parte, se ha detectado actividad para los enzimas implicados en la conversión de aminoácidos en piruvato o algún intermediario del ciclo de Krebs (WALTON y COWEY, 1982). El carbono procedente de los aminoácidos puede ser incorporado al citrato que abandona la mitocondria y en el citosol puede actuar como sustrato de la ATP citrato-liasa, transformándose en acetil-CoA, sustrato de la acetil-CoA carboxilasa (HENDERSON y TOCHER, 1987). Aunque la presencia, en peces, de la ATP citrato liasa no está claramente demostrada, la mayor velocidad de incorporación de  $C^{14}$ -alanina a los ácidos grasos,

comparada con la de la C<sup>14</sup>-glucosa (HENDERSON y SARGENT, 1981), nos lleva a considerar de nuevo a los aminoácidos como fuente de carbono para la síntesis de lípidos.

En mamíferos, una dieta hiperprotéica conlleva un aumento de la G6PDH (ONO et al., 1963); sin embargo en peces parece que no ocurre esto. Por una parte JURRS et al., (1985) obtuvieron un aumento en la actividad de este enzima al alimentar al pez con una dieta de elevado nivel en proteína, pero con niveles lipídicos muy bajos, lo que seguramente sea la causa de este aumento. En carpa (SHIMENO et al., 1981) y trucha (HILTON y ATKINSON, 1982), sin embargo, se aprecia una disminución del enzima cuando se compara la actividad obtenida en truchas alimentadas con una dieta alta en proteínas y baja en carbohidratos frente a una dieta baja en proteínas y alta en hidratos de carbono.

### 2.6.3.-EFECTOS DE LA INGESTION DE UNA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN HIDRATOS DE CARBONO

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 y baja en grasa mantienen la actividad acetil-CoA carboxilasa y la lipogénesis en general. Las deshidrogenasas del ciclo de las pentosas fosfato, tan ligadas a la síntesis de lípidos, muestran una gran capacidad de regulación en función del estado nutricional del animal y, cuando la dieta es rica en carbohidratos estos enzimas mantienen sus niveles de actividad (TEPPERMAN y TEPPERMAN, 1958, 1965; ZAKIN et al., 1967).

En peces la transformación de glucosa en lípidos, a través del acetil-CoA parece muy reducida. GARIN y DEMAEL (1981) no obtuvieron apenas incorporación de radioactividad al glicerol, tras la administración de una inyección de glucosa marcada a la trucha. En pez gato, alimentado con una dieta rica en hidratos de carbono o en

grasas, no se aprecia ninguna respuesta significativa ni para la ácido graso sintetasa ni para acetil-CoA carboxilasa (WARMAN y BOTTINO, 1978). Por el contrario, LIN et al. (1977 b) sí encontraron un aumento en la actividad de los enzimas lipogénicos y productores de NADPH cuando las truchas han sido alimentadas, durante varias, semanas 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 2 días y realimentación con una dieta con un 52% de grasa, y estos mismos autores en otro trabajo (LIN et al., 1977 c) encuentran una inhibición de la actividad de los enzimas lipogénicos y productores de NADPH al aumentar el contenido graso de la dieta y manteniendo el de la proteína.

Estos últimos resultados hacen suponer que la lipogénesis es principalmente regulada por el nivel lipídico de la dieta y no por el de carbohidratos, haciéndose patente este efecto solo cuando los niveles de lípidos son superiores al 10%, lo que explicaría que WARMAN y BOTTINO no obtuvieran diferencias en sus ensayos, ya que los niveles lipídicos usados 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%.

## 2.7.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO AL AYUNO

En mamíferos, el ayuno aumenta los niveles de glucagón y disminuyen los de insulina en plasma (CAHILL et al., 1966; MARLISS et al., 1970), provocando una liberación de aminoácidos desde el músculo esquelético, se activan la lipólisis en el tejido adiposo y además se estimula la glucogenólisis y gluconeogénesis hepática y se inhibe la glucólisis.

En peces la respuesta al ayuno varía a la descrita para mamíferos, por ejemplo, el glucógeno hepático que se degrada en las primeras horas de ayuno, en peces no se altera hasta los 40 días (en el bacalao, COWEY y SARGENT, 1979). La anguila tras 164 días de ayuno mantiene los niveles de glucógeno hepático (DAVE et al., 1975). Esto se puede deber a la baja actividad que presenta la G6Pasa en los peces. En mamíferos, sin embargo, este enzima incrementa su actividad debido a un aumento de su síntesis (HERS y HUE, 1983). Los peces, durante los primeros días de ayuno, utilizan las reservas lipídicas como fuente de energía (INUI y OSHIMA, 1966; LARSSON y LEWANDER, 1973; DAVE et al., 1975; ROBINSON y MEAD, 1973; JOBLING, 1980 b; MOON y JOHNSTON, 1980). Un ayuno prolongado provoca un aumento de la actividad proteolítica y una movilización de los aminoácidos desde el músculo esquelético aumentando su concentración en otros tejidos (CHESTERJONES et al., 1969), donde serán utilizados como fuente de energía, vía gluconeogénesis (De la HIGUERA y CARDENAS, 1985). Los enzimas gluconeogénicos en general sufren un incremento de sus niveles durante esta situación nutritiva. En la lubina, aumenta la PEPCK (ZAMMIT y NEWSHOLME, 1979), en platija también aumenta la PEPCK y la glucosa 6-fosfatasa; sin embargo, la fructosa bisfosfatasa parece no alterarse (MOON y JOHNSTON, 1979). En trucha, al contrario, sí se obtiene un aumento de los enzimas gluconeogénicos: PEPCK, G6Pasa y FBPasa (MORATA et al., 1982 a).

La lipogénesis "de novo" está deprimida por la falta de sustratos disponibles para su conversión en ácidos grasos. Los ensayos "in vitro" de enzimas

lipogénicos revelan que estos presentan actividad durante los primeros días de ayuno, y, después de 23, días, su actividad decrece significativamente (LIN et al., 1977 b) junto con la actividad G6PDH que también experimentó una importante reducción en truchas sometidas a ayuno (BUHLER y BENVILLE, 1969).

En cuanto a la actividad de los enzimas productores de NADPH, ASTER y MOON, (1981), calcularon que el hígado de anguila americana puede producir 17.6  $\mu\text{mol}$  NADPH/min., para uso en la síntesis de ácidos grasos y que reduce a 9.63  $\mu\text{mol}$  NADPH/min. tras 4 a 6 meses de ayuno, con una notable disminución de la actividad G6PDH, mientras que la isocitrato DH no se afectó. Sin embargo, en hígado de anguila americana, tras 3 semanas de ayuno, no se aprecia disminución de la actividad de los enzimas generadores de NADPH ni en la ATP-citrato liasa, pero sí aparece un descenso en la actividad acetyl-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa (ABRAHAM et al., 1984). En esta misma especie, ABRAHAM et al., (1984) encuentran una disminución en la incorporación de acetato marcado, hasta de 20 veces, después de un ayuno de 39 semanas, aunque parece que en anguila no se pierde del todo la capacidad de síntesis de ácidos grasos, pues aparecen pequeñas cantidades de acetato- $C^{14}$ , en ácidos grasos, después de 95 semanas de ayuno.

En mamíferos sometidos a un ayuno prolongado, hay un aumento considerable de compuestos cetónicos en sangre, que son utilizados como sustrato energético por varios tejidos, disminuyendo la utilización de la glucosa con este fin. En teleósteos, sin embargo, no son los cuerpos cetónicos sino los ácidos grasos los que actúan como principal fuente de energía durante el ayuno (BLACK y LOVE, 1986).

El ayuno prolongado aumenta la liberación de cortisol (DAVE, 1975), que incrementa la utilización de las proteínas corporales como fuente de energía via gluconeogénesis (STORER, 1967) y, a nivel metabólico, produce un incremento de la actividad GOT en trucha tras

nueve semanas de ayuno (JURRS y NICOLAI, 1976) y de la GOT y GPT en hígado de anguila japonesa (INUI y YOKOTE, 1974). Estos aumentos también han sido observados en dorada japonesa (WOO y FUNG, 1981), carpa (CREACH y SERFATY, 1974), anguila (LARSSON y LEWANDER, 1973) y platija (MOON y JOHNSTON, 1981). MORATA et al., (1982 b), en truchas ayunadas durante 2 meses, encontraron resultados similares en la actividad transaminasa, tanto en hígado como en riñón, por lo que sugieren un importante papel de estos dos órganos en el aporte de energía, vía gluconeogénesis, durante el ayuno, aunque en los 30 primeros días de este detectan una disminución en la actividad transaminasa que atribuyen al uso del glucógeno hepático como fuente de glucosa, y por tanto, una mínima necesidad de gluconeogénesis.

Numerosos autores, en diferentes especies como anguila (INUI y OSHIMA, 1966; LARSSON y LEWANDER, 1973; DAVE et al., 1975), trucha arco-iris (ROBINSON y MEAD, 1973) y platija (JOBILING, 1980; MOON y JOHNSTON, 1980), encuentran que en el período inicial del ayuno serían los lípidos, primero hepáticos y luego musculares, y no el glucógeno, la principal fuente de combustible y, por tanto, habría una disminución del flujo gluconeogénico y una menor necesidad de un aporte de sustratos para esta vía, lo que reduciría la actividad de los enzimas implicados en la desaminación de los aminoácidos gluconeogénicos (GPT, GDH). Sin embargo, como hemos visto antes, si el ayuno persiste y se agotan las reservas lipídicas serán los aminoácidos procedentes de la proteólisis los que cubrirían las necesidades energéticas, incorporándose a la ruta biosintética de glucosa, como demuestran los trabajos realizados en carpa y bacalao (CREACH y GAS, 1971; LOVE et al., 1968). En salmón coho, durante el período de emigración para el deshove, el catabolismo protéico muscular aumenta, con el consiguiente aumento de los enzimas proteolíticos (catepepsina D y carboxipeptidasa A), siendo la alanina el aminoácido liberado en mayor cantidad desde el músculo blanco a otros tejidos (MOMMSEN et al., 1980), probablemente con fines gluconeogénicos.

## 2.8.- INFLUENCIAS HORMONALES SOBRE EL METABOLISMO INTERMEDIARIO

La regulación hormonal puede ser ejercida por dos mecanismos diferentes, uno mediante la acción directa de las hormonas sobre los enzimas claves implicados en cada vía metabólica, modificando su actividad catalítica y, por tanto, su velocidad. El otro mecanismo es de tipo indirecto regulando, en cada momento, el suministro de los diferentes sustratos, a partir de los tejidos, sin alterar las características cinéticas de los enzimas correspondientes.

La respuesta a la actuación hormonal puede ser rápida, por modificaciones alostéricas y covalentes del enzima, o lenta, por cambios inducidos en los procesos de síntesis y degradación de enzimas.

### 2.8.1.-INSULINA

Hoy por hoy no existe certeza de si la función principal de la insulina, en peces, es la regulación del metabolismo protéico, lipídico o glucídico, ni tampoco se tiene seguridad sobre si el órgano diana es el músculo o el hígado (PLISETKAYA et al., 1984). La insulina disminuye los niveles de glucosa y aminoácidos en plasma (THORPE y INCE, 1974; INCE y THORPE, 1974, 1978; INUI et al., 1975; COWEY et al., 1977 b) y en músculo (SESHADRI, 1959), inhibe el catabolismo protéico, por un efecto de ahorro de aminoácidos, (COWEY et al., 1977 b) y el catabolismo lipídico (MINICH y CHAVIN, 1972; INCE y THORPE, 1974, 1975; LEWANDER et al., 1976).

Varios autores han sugerido que el mecanismo de acción sea a través de la activación de una fosforilasa endógena, que hidroliza los glucolípidos de membrana, liberándose una sustancia compleja, carbohidratos fosfato, que contiene inositol y glucosamina, los cuales regularían la actividad AMPC-fosfodiesterasa y, quizás, la de otros enzimas (SALTIEL y CUATRECASAS, 1986; SALTIEL et al., 1986). La insulina, por ejemplo, produce una disminución del AMPC hepático y previene el aumento de este por el

glucagón (JEFFERSON et al., 1968).

En general la insulina tiene un efecto anabólico, en cuanto a la creación de macromoléculas; sin embargo, en peces, el papel de la insulina, a nivel de metabolismo del glucógeno, no está claro. Se ha comprobado que una inyección de insulina tiene un efecto variable sobre el glucógeno: en músculo, por ejemplo, o aumenta (OHOLENGI et al. 1982; YANNI, 1964; LEWANDER et al., 1976; TASHIMA y CAHILL, 1968), o no se altera (INCE y THORPE, 1976; ; ABLETT et al., 1981 a y b). En hígado, los resultados son más contradictorios aún que en el músculo, al compararlos con mamíferos, ya que la administración de insulina o no modifica el glucógeno hepático (INUI et al., 1978; ABLETT et al., 1981 a y b), o disminuye su cantidad (YANNI, 1964; LEIBSON y PLISETKAYA, 1986; INCE y THORPE, 1976; LEWANDER et al., 1976; OHOLENGI et al. 1982), sugiriéndose que esto pueda ser debido a la liberación de otras hormonas reguladoras (OHOLENGI et al. 1982).

En carpa, seriola y dorada japonesa, tras una inyección de insulina se observa un aumento de la actividad de los enzimas glucolíticos PK y HK, mientras que la G6Pasa se reduce. La actividad FBPasa se afecta según la especie, aumenta en seriola y dorada japonesa y disminuye en carpa (FURUICHI y YONE, 1982).

COWEY et al., (1977 a), estudiaron el efecto que sobre la gluconeogénesis tiene el ayuno o la ingestión de una dieta alta en hidratos de carbono o en proteínas junto con la administración de insulina y obtuvieron una drástica reducción de esta, en las truchas ayunadas y alimentadas con una dieta hiperprotéica. Cuanto mayor es el nivel de carbohidratos en la dieta, es mayor la capacidad de respuesta enzimática, (PFK, FBPasa), aunque la respuesta a la insulina disminuye.

La insulina ejerce un efecto anabólico en el metabolismo lipídico, estimulando en teleósteos la lipogénesis; también disminuye los ácidos grasos en plasma (MINICK y CHAVIN, 1972; PALMER y RAYMAN, 1972; INCE y THORPE, 1975; LEWANDER et al., 1976) y aumenta la incorporación de carbono, derivado de la glucosa, y de los

aminoácidos, a lípidos hepáticos o musculares (músculo esquelético) (TASHIMA y CAHILL, 1968; DE VLAMING y PARDO, 1975; INCE y THORPE, 1976; ABLETT et al., 1981 a y b). En peces ayunados la insulina tiende a contrarrestar la deplección protéica que se produce en esta situación; por un lado, disminuye la gluconeogénesis a partir de aminoácidos tales como la alanina (COWEY et al., 1977 b) y el glutamato (De la HIGUERA y CARDENAS, 1986) y por otra parte se produce un efecto lipogénico a partir de glucosa en el músculo esquelético.

En el metabolismo protéico también tiene un efecto estimulante de la síntesis de proteínas "in vivo" (TASHIMA y CAHILL, 1968; JACKIM y LAROCHE, 1973; INCE y THORPE, 1976; ABLETT et al., 1981 a y b), e "in vitro" (INUI e ISHIOKA, 1983 a y b), pues aumenta el transporte de aminoácidos al músculo esquelético, donde se utilizan para sintetizar proteínas y además se observa una disminución de la actividad alanina aminotransferasa en riñón (CARDENAS 1980).

## 2.8.2.- GLUCAGON

La administración exógena de glucagón produce una hiperglucemia en teleósteros (EPPLE, 1969; LARSSON y LEWANDER, 1972; THORPE y INCE, 1974; BHATT y KHANNA, 1976; INCE y THORPE, 1977 ; CHAN y WOO, 1978 a), como consecuencia de una glucogenolisis hepática (UMMINGER et al., 1975; BIRNBAUM et al., 1976; JANSSEN y WATERMAN, 1988; JANSSEN y LOWREY, 1987), pues aumenta los niveles intracelulares de AMPc activando la glucogeno fosforilasa, en carpa (JANSSEN y LOWREY, 1987). Además también aumenta la gluconeogénesis hepática en carpa (MURATA y SERFATY, 1975) y trucha arco-iris (MORATA et al., 1982 b y c), contribuyendo a la hiperglucemia (JANSSEN y WATERMAN, 1988).

El metabolismo protéico también se ve afectado por el glucagón, pues, por una parte, aumenta la gluconeogénesis a partir de aminoácidos como la alanina y la serina en hígado de trucha (WALTON y COWEY, 1979 a y b). Además contrarresta la acción proteogénica de la insulina (INUI y YOKOTE, 1977; CASTILLA y MURAT, 1957;

WALTON y COWEY, 1979 a), aumentando el catabolismo protéico a través de la actividad transaminasa (GOT, GPT) e inhibiendo la síntesis de proteínas (BROW et al., 1975). El papel de esta hormona en el metabolismo lipídico no ha sido muy investigado, no estando claro aún. CHAN y WOO, (1978 a), no encuentran que incremente la  $\beta$ -oxidación en anguila, y en algunas especies el glucagón no aumenta los niveles de ácidos grasos en plasma (PLISETKAYA, 1980), excepto a dosis muy elevadas (INCE y THORPE, 1975), por lo que se piensa que esta hormona no se opone al efecto antilipolítico de la insulina (INCE, 1983; De la HIGUERA y CARDENAS, 1986).

### 2.8.3.- CATECOLAMINAS

El mecanismo de acción de la adrenalina, al igual que el del glucagón, consiste en aumentar el contenido intracelular de AMPc que, a través de proteinquinas, activa la glucógeno fosforilasa y estimulándose la glucólisis en los hepatocitos; este mecanismo ha sido demostrado en *Carassius auratus* (BIRNBAUM et al., 1976) y en carpa (JANSSEN y LOWREY, 1987). Así, el efecto más patente, al incrementarse los niveles de adrenalina en teleósteros, es una marcada hiperglucemia, por aumento de la glucogenólisis. Sin embargo, la deplección de glucógeno hepático no es evidente, y por tanto, el origen de la hiperglucemia, gluconeogénesis o glucogenólisis no está claro. MURATA y SERFATY, (1975) en carpa y MORATA et al., (1982 b), en trucha, encontraron un aumento de la gluconeogénesis tras la administración de adrenalina y, sin embargo, JANSSEN y WATERMAN, (1988), no observaron tan patente este efecto, concluyendo que el aporte de glucosa via gluconeogénesis o glucogenólisis depende de los niveles de glucógeno; si estos son elevados la hiperglucemia sería provocada casi exclusivamente por degradación de glucógeno.

La adrenalina aumenta el nivel plasmático de ácidos grasos en el cíprino dorado (FARKAS, 1969), lamprea (LIEBSON et al., 1968) y en pez escorpión (PLISETKAYA y MARINA, 1969). Sin embargo, en cíprino dorado, dorada y carpa (MAZEAUD y MAZEAUD, 1981), la insulina disminuye el nivel de ácidos grasos en plasma. SHERIDAN y BERN, (1986),

en salmón coho, observó que la acción lipolítica de las catecolaminas depende del agente: con la adrenalina no observó ningún efecto lipolítico significativo, mientras que con la noradrenalina indujo una rápida lipólisis por acción directa sobre la triacilglicerol lipasa.

#### 2.8.4. CORTICOIDES

En vertebrados superiores los corticoides aumentan la gluconeogénesis y la glucogenosíntesis. En peces la presencia de corticoides ha sido confirmada y analizada por FONTAINE (1975), siendo el cortisol el corticoesteroide que se encuentra en mayor proporción en plasma de peces (CHAVIN y SINGLEY, 1972; FRYER, 1975; PETER et al., 1978; TRUSCOTT, 1979).

En peces, la respuesta a la administración de cortisol ni es tan clara ni tan uniforme como en mamíferos aunque, en general, sí parece aumentar la glucosa en sangre (PATENT, 1970). Esta hiperglucemia se debe probablemente a una activación de la gluconeogénesis, usándose como sustrato preferente los aminoácidos, tanto de origen exógeno como endógeno (STORER, 1967; de la HIGUERA y CARDENAS, 1986). Sin embargo, FOSTER y MOON, (1986) detectaron una disminución en la producción de glucosa, a partir de aminoácidos tales como alanina y aspartato. El lactato tampoco aumenta la síntesis de glucosa. Esto hace pensar a algunos autores que el aumento en los niveles de gluconeogénesis se deba más a un aumento de las disponibilidades de sustrato por movilización de las proteínas, que a una activación de esta vía. PERET y CHANEZ, (1976), obtuvieron un aumento de la PEPCK en ratas tratadas con cortisol y alimentadas con una dieta de un 10% de proteínas, mientras que si se alimentan con una dieta al 50% de proteínas y se tratan con cortisol la PEPCK aparece inalterada, debido a un efecto de saturación por sustrato. En anguilas tratadas con cortisol también se obtuvo un aumento de la actividad PEPCK, mientras que la actividad PK y PC no se altera (FOSTER y MOON, 1986).

El ayuno parece aumentar en anguilas los niveles de cortisol en sangre hasta seis veces más el nivel normal como ocurre en *Oncorhynchus sp.* (IDLER et al., 1959), a la

vez que aumenta la gluconeogénesis a partir de aminoácidos (DAVE, 1975).

La respuesta que provoca el cortisol sobre el metabolismo protéico, tiene un importante sentido biológico, pues provee de energía (via gluconeogénesis), aumentando el glucógeno hepático (CHANG y IDLER, 1960) y de materia para la síntesis de nuevas estructuras (gónadas), ambas funciones necesarias durante los largos períodos de inanición que supone la migración para la puesta.

En animales alimentados normalmente la administración de cortisol provoca una disminución de peso corporal, inhibe el crecimiento y aumenta el catabolismo protéico, que se refleja en un aumento de la actividad transaminasa en la trucha (FREEMAN e IDLER, 1973) y en la anguila (CHAN y WOO, 1978 b). Sin embargo, FREEMAN e IDLER no obtuvieron aumento en la actividad GOT, aunque en ratas tratadas con cortisol se observó un aumento de la actividad GOT en corazón y riñón pero no en hígado (EISCHEID y KOCHAKAIN, 1954). FOSTER y MOON, (1986) también encontraron un aumento de la actividad GPT en anguilas tratadas con cortisol; sin embargo, también observaron un aumento de la actividad GOT que explican por la relación GOT/PEPCK citoplasmática que existe en gluconeogénesis.

3-MATERIAL Y METODOS



### 3.1.-DISEÑO EXPERIMENTAL

Al objeto de estudiar la influencia de la composición de la dieta sobre algunos parámetros bioquímicos y nutricionales, se llevaron a cabo cuatro grupos de ensayos en los que a los animales se les suministró dietas diferentes por su contenido mayoritario en proteína, grasa o hidratos de carbono (tabla 3.1.). También se estudió el ayuno como situación nutritiva especial, todos ellos frente a una dieta control de composición normal y similar a una dieta comercial.

Los parámetros determinados para cada ensayo fueron los siguientes:

- Ingesta.
- Evolución ponderal como índice de crecimiento y conversión de alimento
- Peso de determinadas fracciones corporales (hígado y riñón).
- Utilización nutritiva de la proteína.
- Aminoácidos totales y glucosa en sangre.
- Glucógeno hepático.
- Actividad específica de los enzimas: Fructosa 1,6-fosfato; Piruvato quinasa; Fosfofructoquinasa, Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, Glutamato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa.

A continuación se relacionan las condiciones experimentales para cada grupo.

#### 1.-Respuesta metabólica a la ingestión de una dieta de alto contenido en hidratos de carbono.

Animales: truchas de 110-120 g de peso inicial en grupos de 20 animales, tres réplicas por dieta que les fué suministrada durante 30 días tras un periodo de adaptación de 7 días.

Dietas: alta en hidratos de carbono, de composición general :19% Proteína, 8% Grasa y 60% Hidratos de Carbono; y Control, de composición general :45% Proteína, 8% Grasa y 22% Hidratos de Carbono. (tabla 3.1).

2.-Respuesta metabólica a la ingestión de una dieta rica en proteínas.

Animales:truchas de 110-120 g de peso inicial en grupos de 20 animales,tres réplicas por dieta que les fué suministrada durante 30 días,tras un periodo de adaptación de 7 días.

Dietas:alta en proteínas, de composición general :60% Proteína,8% Grasa y 0% Hidratos de Carbono; y Control, de composición general :45% Proteína,8% Grasa y 22% Hidratos de Carbono.(tabla 3.1).

0

3.-Respuesta metabólica a la ingestión de una dieta rica en grasas.

Animales:truchas de 110-120 g de peso inicial en grupos de 20 animales,tres réplicas por dieta que les fué suministrada durante 30 días,tras un periodo de adaptación de 7 días.

Dietas:alta en grasa, de composición general :45% Proteínas,16% Grasas y 0% Hidratos de Carbono y Control, de composición general :45% Proteínas,8% Grasas y 22% Hidratos de Carbono (tabla 3.1).

4.-Respuesta metabólica de un ayuno prolongado frente a un control.

Animales:truchas de 110-120 g al inicio de la experiencia divididos en grupos de 20 animales,tres réplicas por condición nutritiva que se mantuvieron durante 30 días tras un periodo de adaptación de 7 días.

Dietas:Ayuno (---) y dieta control de composición general :45% Proteínas,8% Grasas y 22% Hidratos de Carbono.(tabla 3.1).

TABLA 3.1.-Composici3n general de las dietas experimentales (g/100 de materia seca)

ALIMENTO	Control	A.P.	A.H.deC.	A.G.
Harina pescado	44.6	59.6	18.9	45.9
Caseina	13.5	17.9	5.9	14.3
Aceite pescado	4.4	1.2	6.3	4.4
Aceite maiz	0	0	0	7.0
Almid3n	22	0	60	0
C. vitamínico*	2	2	2	2
C. mineral **	5	5	5	5
Alginato	2	2	0	2
Celulosa	6.5	12.3	1.9	19.4
Proteína %	46.0	61.1	19.1	45.7
Grsasa %	8.0	7.9	8.5	17.1
Ceniza %	11.5	12.2	10.4	10.3
MELN %	34.5	18.4	61.3	26.3

\*CORRECTOR VITAMINICO (mg/100g dieta): Tiamina (B1), 5; Rivoflavina (B2), 20; Piridoxina (B6), 5; Ac. Nicotínico, 75; Pantotenato cálcico, 30; Inositol, 200; Biotina, 25; Ac. Fólico, 1.5; Ac. ascórbico (C), 100; PABA, 40; Colina (clorohidrato), 800; Menadiona (K), 8; Cianocobalamina (B12), 0.1; Vit.A (retinol), 1; Vit. D3 (colecalciferol), 0.5; Vit. E ( $\alpha$ -tocoferol), 80. Esta mezcla se completa hasta 2 g con celulosa como excipiente.

\*\*CORRECTOR MINERAL (mg/100g dieta): SO4Zn . 7H2O, 20; SO4Cu. 5H2O, 5; SO4Mn . 1H2O, 20; IK, 2; SO4Co . 7H2O, 5; SO4Al . 16H2O, 1; ClNa, 400; ClNa, 250; Cl3Mg, 460; SO4Fe . 7H2O, 150; (PO4H2)2Ca . 1H2O, 3000; CO3Ca, 650; SeO3Na2, 0.218. Esta mezcla se completa hasta 5 g con celulosa como excipiente.

DIETAS:

- A. P.-Dieta alta en proteínas
- A. H.de C.-Dieta alta en hidratos de carbono
- A. G.-Dieta alta en grasa

## 3.2.-ANIMALES Y MANTENIMIENTO

La especie. que se ha utilizado para este trabajo ha sido la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*, recientemente cambiado por *Oncorhynchus mykiss*) de aproximadamente 110 g de peso al inicio de los ensayos, suministradas por la piscifactoria Sierra Nevada (Riofrio, Granada).

Los grupos experimentales fueron distribuidos en tanques de fibra de vidrio (0.9 x 0.7 x 0.7 m) con un volumen útil de 360 l. El agua procedente de la red potable de la ciudad, era previamente clorada y desodorizada mediante un filtro de carbón activo y arena silíceo. La aireación se realizó con difusores conectados a un soplante de aire (SIEMENS) con flujo de salida regulable que mantiene una concentración de O<sub>2</sub> próxima a la saturación (8-9% O<sub>2</sub>). La temperatura se mantuvo a 15± 0.5°C mediante un termostato introducido en los tanques y conectado a una válvula de 3 vías que mezcla automáticamente el H<sub>2</sub>O procedente de un sistema de refrigeración o de calefacción con el H<sub>2</sub>O de la red.

El fotoperiodo se fijó en 12 h. luz/12 h. oscuridad gracias a un temporizador conectado al sistema de iluminación.

Para evitar la acumulación de excretas que puedan actuar directamente como sustancias tóxicas o favorecer el desarrollo de microorganismos se mantuvo un flujo continuo de 1.2 l/min. que supone una renovación de un 20% del volumen total de la capacidad del tanque, en circuito abierto, durante los periodos de adaptación y experimentación.

### 3.2.1.-CONTROL DE PESO

Para cada ensayo y tras un periodo de adaptación de 7 días a las condiciones de laboratorio, se hicieron controles de peso en los días 0 y 30. Para llevar a cabo la pesada los animales fueron anestesiados sumergiéndolos

durante 1 minuto en un baño que contenía MS-222 (tricaina metano sulfonato) a una concentración de 1:20.000. A continuación se pesaron en una balanza monoplato de un error máximo de  $\pm 5$  g utilizando para la pesada un tipo de cesta que permitiera escurrir todo el agua.

### 3.2.2.-DIETAS EXPERIMENTALES

Se han ensayado 5 situaciones nutritivas diferentes, cuatro de ellas con distintos niveles de proteína, grasa e hidratos de carbono y una de ayuno prolongado. La composición general de las dietas experimentales se relacionan en la tabla 0. La composición de los correctores vitamínico y mineral se especifican en las tabla 3.1.

Dos cosas se tuvieron en cuenta a la hora de formular las dietas, una que la calidad de la proteína se mantuviera constante respetando la relación proteína de harina de pescado/caseína, y la otra que todas las dietas fuesen aproximadamente isocalóricas (Energía Metabolizable teórica: 13.863 KJ/kg) a pesar de las grandes diferencias en el contenido de proteína, grasa e hidratos de carbono.

La energía metabolizable fué calculada a partir de valores estandar de 19.6 KJ/g de proteína, 39.5 KJ/g de grasa y 17.2 KJ/g de hidratos de carbono (Brafeld, 1985).

Una vez pesados todos los componentes de la dieta, se homogenizaron en una mezcladora industrial marca Sammic (BM-20) de 20 l de capacidad. Durante este proceso se fué añadiendo agua hasta conseguir una mezcla homogénea de consistencia adecuada que se hizo pasar por una granuladora marca Sammic (PC-12) de 2 CV de potencia, con una matriz de 5 mm de diámetro. Una vez granuladas las dietas, se secaron a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente fueron distribuidas en bolsas que contenían raciones de aproximadamente una semana y congeladas en un arcón congelador a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización.

Las dietas experimentales fueron suministradas "ad libitum" 2 veces al día (10 h. AM y 5 h. PM) administrándose el granulado poco a poco hasta que los animales quedaban saciados, lo que permitió un control preciso de la ingestión del alimento.

Los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas fueron suministrados por "Musal" (caseína, almidón y celulosa), "Trophic" (harina de pescado y aceite de pescado). "Roche" y "Merck" facilitaron los productos necesarios para fabricar los correctores vitamínico y mineral respectivamente.

### 3.3.-METODOS ANALITICOS

#### 3.3.1.-DETERMINACION DE LA COMPOSICION DE INGREDIENTES Y 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 Mufla a  $500^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante.

Proteínas: Se determinaron por el método Kjeldahl. La mineralización de la muestra se hizo en sulfúrico utilizando un mineralizador-digestor Bûchi(mod.430) 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% recogiendo 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 de 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 ClH 0.05N hasta que viró el color

al tono inicial. Se empleó el factor 6.25 para la conversión del nitrógeno en proteína.

Grasa: Se determinó con extacción continua en éter etílico siguiendo el método Soxhlet, con un aparato Büchi(mod. B-810).

### 3.3.2.-DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

#### Preparación de la muestra

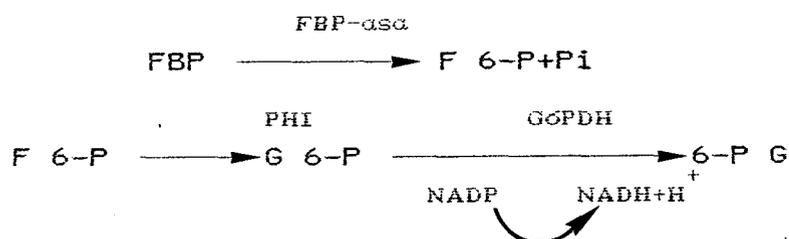
Para cada muestra se utilizó un pool de tres animales, que fueron sacrificados de un golpe seco en la base del cráneo. Rápidamente fueron extraídos y pesados hígado y riñón de cada animal, e inmediatamente después fueron colocados en solución salina al 0.9% a 4°C. A continuación se homogenizaron en tampón Tris-ClH 0.1M, Sacarosa 0.25 M (TS) a pH 7.6 en una proporción 100mg de tejido/ml de tampón TS, tanto para hígado como para riñón. La homogenización se realizó en un aparato tipo potter de 3 ml de capacidad con pistilo y tubo de vidrio esmerilado. Todo el proceso de homogenización del tejido se llevó a cabo en hielo picado. Una vez obtenidos los homogenados se separó una pequeña muestra de cada uno para ser sometida a sonicación en un sonicador "Sonifer" mod. B-12 (para la determinación de la GDH dada su localización intramitocondrial) durante 3 minutos, en intervalos de 30 segundos, manteniendo siempre la muestra en hielo. Una vez terminada la sonicación, tanto los homogenados primitivos como los sonicados fueron sometidos a una centrifugación de 30.000 x g durante 30 minutos, en una centrifuga "Kontron" mod. Centrikon H-401 refrigerada a +4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante donde se determinó el contenido en proteínas según el método de Lowry, que describimos mas adelante. A partir de los valores obtenidos en la determinación de proteínas, ajustamos su contenido con tampón T.S. (tris-0.1mM sacarosa 0.25) a unas proporciones P:V de 6 mg proteína/ml para hígado y de 5 mg/ml para riñón). Inmediatamente después se procedía a la determinación de las actividades enzimáticas, excepto para los enzimas en que la muestra

necesita una diálisis previa (GDH, G6P-DH), que se realizó en el mismo tampón de homogenización (TS), en cámara fría (a 4°C) y con agitación constante, durante 18 h.

Determinación de la actividad enzimática de la fructosa 1,6-bisfosfatasa (D-fructosa 1,6-bisfosfato1-fosfohidrolasa, E.C. 3.1.3.11).

a) Fundamento:

La determinación de la actividad fructosa 1,6 bisfosfatasa está basada en el metodo de LATZKO y GIBBS (1974) siguiendo espectrofotométricamente la aparición de NADPH acoplada al sistema de reacciones siguientes:



La aparición de NADPH provoca un cambio de densidad óptica que es seguida espectrofotométricamente a 340 nm y que nos dará cuantitativamente la actividad del enzima por minuto. La medida se realiza a 25°C y pH 7.2, mantenido con tampón tris-ClH.

b) Reactivos:

- Tampón Tris-ClH 66.6 mM pH 7.2
- Solución de Cl<sub>2</sub>Mg 100 mM
- Solución extemporánea de NADP 10 mM
- Solución de β-mercaptoetanol 200 mM
- Fosfohexosa isomerasa (E.C.5.3.1.9.), comercial
- Glucosa 6P-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.49), comercial
- H<sub>2</sub>O destilada
- Fructosa 1.6-bisfosfato

c) Técnica:

Se utilizaron cubetas de 1 ml preparadas según el

siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón Tris-ClH	0.60 ml	40 mM
Cl <sub>2</sub> Mg	0.05 ml	5 mM
NADP	0.05 ml	0.5 mM
β-mercaptoetanol	0.06 ml	12 mM
PHI	0.50 μl	2 U/ml
G6PDH	0.30 μl	0.2U/ml
Agua destilada	0.09 ml	-----
FBP	0.10 ml	-----

Se han utilizado dos concentraciones de sustrato subsaturantes (0.001 y 0.005mM), tres saturantes (0.01, 0.05 y 0.1mM) y una inhibitoria. ( 1 mM).

La reacción se inició añadiendo 0.1 ml de extracto celular a la cubeta con una concentración de 5mg prot/ml TS para el riñón y 3 mg prot /ml TS para el hígado.

d) Cálculos:

La actividad específica FBPasa se expresa en nmoles de F6P producidos por minuto y por miligramo de proteína:

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

ΔD.O./min = incremento de densidad óptica por minuto

V = Volumen total de la cubeta (ml)

ε = Coeficiente de extinción molar del NADPH, 6.22 x 10<sup>6</sup> cm<sup>2</sup>/mol.

d = Espesor de la cubeta

v = 0.05 ml de extracto

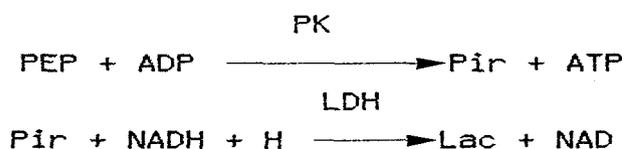
P = mg de proteína por ml.

10<sup>-9</sup> = para pasar a nmoles

Determinación enzimática de la piruvato quinasa (ATP: piruvato 2-O-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.40)

a) Fundamento:

La actividad piruvatoquinasa ha sido determinada por el método descrito por Carbonell et al. (1973), basado en la siguiente reacción:



Siguiendo la disminución de absorción a 340 nm, correspondiente a la oxidación del NADH en la reacción acoplada con LDH.

La medida se realiza a una temperatura de 25°C y pH 7.0, utilizando como precursor 2PG, que por medio de la enolasa proporciona sustrato, PEP, a la reacción, usando 6 concentraciones diferentes del sustrato (0.01; 0.05; 0.1; 0.25; 0.5 y 1.0 mM). Para el precursor se emplearon concentraciones que eran en cada caso el doble de las del sustrato.

b) Reactivos:

Tampón Imidazol-ClH 77 mM pH 7.0  
Solución de ClK 2 M  
Solución de Cl<sub>2</sub>Mg 100 mM  
Solución extemporánea de NADH 1.5 mM  
Solución extemporánea de ADP 10 mM  
L-láctico deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27) comercial  
Enolasa (E.C.4.2.1.11) comercial  
Fosfoenolpiruvato  
2-fosfoglicerato

c) Técnica:

Las cubetas se prepararon según el siguiente

protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón	0.45 ml	50 mM
ClK	0.05 ml	100 mM
Cl <sub>2</sub> Mg	0.05 ml	5 mM
NADH	0.10 ml	0.15 mM
ADP	0.10 ml	1 mM
PEP	0.10 ml	-----
2-PG	0.10 ml	-----
LDH	3 $\mu$ l	3 U/ml
Enolasa	5 $\mu$ l	2 U/ml

La reacción se inicia con la adición de 0.05 ml de extracto en la cubeta con una concentración de 6 mg prot/ml para hígado y 2.5 mg prot/ml para riñón.

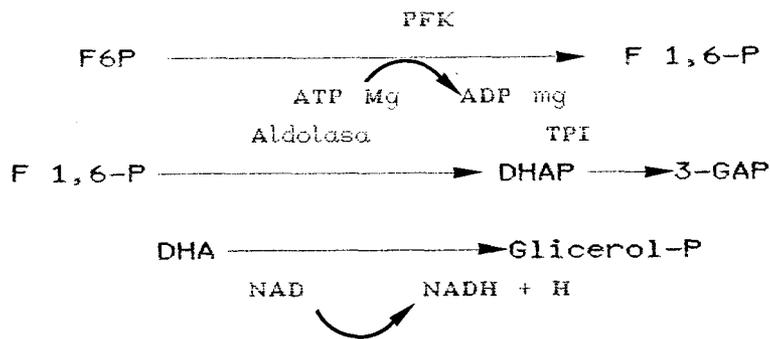
d) Cálculos:

La actividad PK se expresa en nmoles de Piruvato producidos en un minuto y por mg de proteína. Los cálculos son iguales a los anotados para la FBPasa.

Determinación enzimática de la fosfofructoquinasa (ATP-D-fructosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.11)

a) Fundamento:

La actividad PFK se determinó espectrofotométricamente siguiendo la desaparición de NADH según el método propuesto por CRABTREE y NEWSHOLME (1972), basado en la reacción:



Como precursor usamos G6P en proporción 3:1 con respecto a la F6P y a seis concentraciones diferentes.

b) Reactivos:

- Tampón Hepes 125 mM pH 7.0
- Solución extemporánea de NADH 1.5 mM
- Solución de ClK 2 M
- Solución de Cl<sub>2</sub>Mg 100 mM
- Solución de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 100 mM
- Solución de ClNH<sub>4</sub> 10 mM
- Solución extemporánea de MgATP 15 mM
- Solución extemporánea de AMP 1 mM
- Fosfohexosaisomerasa (E.C.3.1.9) comercial
- Aldolasa (E.C.4.1.2.13), comercial
- Triosafosfato isomerasa (E.C.5.3.1.1), comercial
- α-glicerolfosfato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.8), comercial
- Fructosa 6-fosfato
- Glucosa 6-fosfato

c) Técnica:

Se preparan cubetas de 1 ml según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
CL <sub>2</sub> Mg	0.05 ml	5 mM
ClK	0.05 ml	100 mM
MgATP	0.10 ml	1.5 mM

cont.

NADH	0.10 ml	0.15 mM
AMP	0.10 ml	0.1 mM
C1NH <sub>4</sub>	0.10 ml	1 mM
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0.05 ml	5 mM
Aldolasa	5.5 µl	0.5 U/ml
α-GPDH	1.5 µl	0.5 U/ml
TIM	0.5 µl	5 U/ml
PHI	1.5 µl	1 U/ml
F6P	0.10 ml	-----
G6P	0.10 ml	-----

El MgATP, NADH, AMP y C1NH<sub>4</sub> van disueltos en tampón Hepes pH 7.0, de forma que la concentración de este en cubeta es de 50 mM. Las disoluciones del sustrato fueron: 0.1; 0.5; 1; 2.5; 5 y 10 mM. Para el precursor se utilizaron concentraciones 3 veces mayores que las de F6P. La reacción se inicia con la adición de 0.250 ml de extracto a la cubeta, con una concentración de 3 y 2.5 mg Prot./ml para hígado y riñón respectivamente. Se determinan los incrementos de densidad óptica por minuto a 340 nm.

d) Cálculos:

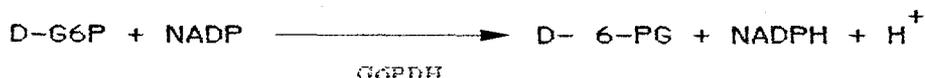
La actividad PFK se expresa en nmoles de FDP producidos por minuto y por mg de proteína, según los cálculos ya indicados para la determinación de la FBPasa.

Determinación de la actividad enzimática de la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (D-glucosa 6-fosfato: NADP 1-oxidoreductasa, E.C.1.1.1.49)

a) Fundamento:

Para determinar la actividad G6P-DH hemos usado el método descrito por LÖHR y WALLER (1965), basado en la

variación de la densidad óptica por formación de NADPH, que es seguida espectrofotométricamente a 340 nm, según la siguiente reacción:



b) Reactivos:

Tampón trietanolamina 50 mM pH 7.5  
 Solución extemporánea de NADP 40 mM  
 Glucosa 6P

c) Técnica:

Se preparan cubetas de 1 ml según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón	0.65 ml	32 mM
NADP	0.1 ml	4 mM
G6P	0.1 ml	-----

La G6P se utiliza como sustrato con las siguientes diluciones expresadas en mM : 0.001;0.005;0.01;0.05;0.1 y 1. La reacción se inició con la adición del extracto (0.150 ml) con unas concentraciones de 1.5 mg prot/ml para hígado y de 1.25 mg prot/ml en riñón, a un pH 7.5.

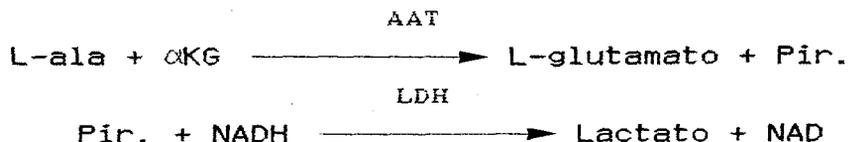
d) Cálculos:

La actividad G6PDH se expresa en nmoles de gluconato formados por minuto y por mg de proteína. Los cálculos se realizaron según la fórmula indicada para la FBPasa.

Determinación de la actividad enzimática de la Alanina aminotransferasa. (Glutamato piruvato transaminasa E.C.2.6.1.2.)

a) Fundamento:

Se basa en la desaparición de NADH acoplada a las siguientes reacciones:



El método seguido para la determinación de la actividad AAT fue el descrito por D'APOLLONIA y ANDERSON (1980) ,y se cuantificó siguiendo espectrofotométricamente a 340 nm la disminución de densidad óptica provocada por la desaparición de NADH.

b) Reactivos:

Tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4  
 Solución extemporánea neutra de  $\alpha$ KG 10 mM  
 Solución extemporánea neutra de NADH 5 mM  
 Lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27) comercial  
 L-Alanina

c) Técnica:

Las cubetas (de 1 ml) se prepararon según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón fosfato	0.74 ml	74 mM
NADH	0.03 ml	0.15 mM
LDH	0.003 ml	2 U/ml
L-Alanina	0.1 ml	-----
$\alpha$ -KG	0.08 ml	0.8 mM

La reacción se inició al añadirle 0.05 ml de extracto con una proporción de proteína soluble de 3 mg/ml en hígado y de 2.5 mg/ml en riñón. Dicha reacción se lleva a cabo a pH 7.6 y 25 °C de temperatura. Las concentraciones de sustrato empleadas fueron :0.01;0.1;1;10;25 y 50 mM.

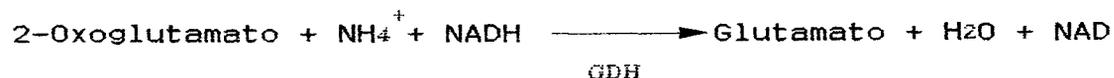
d) Cálculos:

La actividad se expresa en nmoles de lactato formados por minuto y mg de proteína. Los cálculos están descritos en la sección dedicada a la FBP-asa.

Determinación de la actividad enzimática de la Glutamato deshidrogenasa. (L-Glutamato: NAD oxidoreductasa desaminasa E.C. 1.4.1.2.)

a) Fundamento:

Para la determinación de la actividad GDH seguimos el método descrito por E. SCHMITDT (1979) , que se basa en la siguiente reacción:



y como en los métodos anteriormente descritos, se cuantificó la actividad GDH siguiendo espectrofotométricamente, a 340 nm, la variación de la densidad óptica provocada por la aparición de NAD.

b) Reactivos:

Tampón trietanolamina 70 mM ; 36 mM EDTA pH 8.0  
Solución extemporánea βNADH 10.25 mM ADP 50 mM  
Acetato amónico 3.3 M  
LDH (E.C.1.1.1.27) comercial  
α-Oxoglutarato

c) Técnica:

Se prepararon cubetas de 1 ml según el siguiente protocolo:

	<u>Volumen cubeta</u>	<u>Concentración cubeta</u>
Tampón	0.70 ml	50 mM TRA 25 mM EDTA
Acetato amónico	0.03 ml	100 mM
NADH/ADP	0.02 ml	0.2 mM NADH 1 mM ADP
LDH	0.40 $\mu$ l	2 UI
$\alpha$ -KG	0.03 ml	-----

La reacción se llevó a cabo a 25°C y pH 8.0, y se usaron las siguientes concentraciones de  $\alpha$ KG : 0.01;0.05;0.1;0.5;1 y 10, mM iniciándose con 0.150 ml de extracto a 0.3 mg proteína/ml para hígado y 0.25 mg proteína/ml para riñón.

#### d) Cálculos:

El cálculo de la actividad GDH fue igual al descrito en la sección FBP-asa, expresándose los resultados como nmoles de Glutamato formados por mg de proteína y minuto.

#### Aparatos y productos

En todas las determinaciones enzimáticas se ha usado un espectrofotómetro de la marca, Kontron mod. Uvikon-810 P, con lectura digital, compartimento de cubetas termostatzado y Plotter (Kontron Plotter-800) incorporado.

Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro marca Crinson 2001 con lectura digital y una precisión de  $\pm 0.01$ .

Las cubetas que se usaron eran desechables y de 1 cm de espesor.

Los productos utilizados para estas determinaciones fueron suministrados por varias casas :  
Sustratos, coenzimas y enzimas pertenecientes a la firma Sigma Chemical Co.(USA) y Böehringer (Mannheim, Alemania).

Los productos utilizados para la preparación de

tampones y demás reactivos generales fueron de las casas Merck (Damstad, Alemania), Carlos Erba (Italia) y Probus (España).

### 3.3.3.-DETERMINACION ENZIMATICA DE LA GLUCOSA EN SANGRE

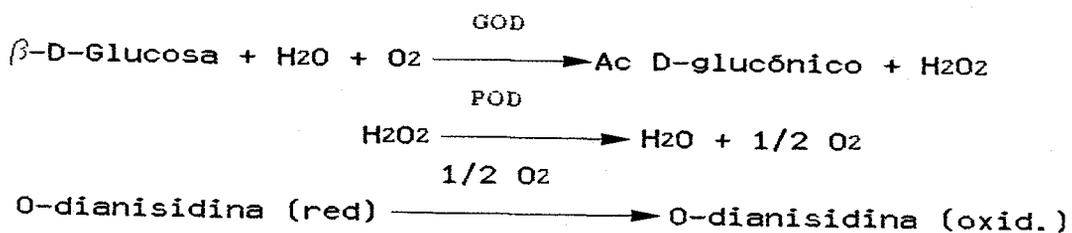
#### Obtención y preparación de la muestra

La sangre extraída de la vena dorsal de la trucha con una jeringa heparinizada se pone en un vial con un poco de anticoagulante en polvo (heparina u oxalato). De aquí se toma una muestra que se desproteíniza con  $\text{ClO}_4\text{H}$  al 2% en proporción 0.5 ml sangre:4 ml  $\text{ClO}_4\text{H}$ . La muestra se centrifuga durante 15 minutos a 5.000 r.p.m. El sobrenadante obtenido se recoge y neutraliza con  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  1 M usando una gota de rojo de metilo como indicador; se centrifuga otra vez durante 5 minutos a 5.000 r.p.m., se recoge el sobrenadante y, en este, se determina la glucosa.

#### Determinación enzimática de la glucosa

La glucosa contenida en la muestra ha sido determinada por el método enzimático de la glucosa oxidasa-peroxidasa usando como cromógeno la O-dianisidina.

La técnica ha sido descrita por BERGMEYER y col. (1974). La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado, por acción de la peroxidasa (POD), se descompone en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  (oxígeno atómico) que oxida al cromógeno.



La O-dianisidina oxidada presenta un color que absorbe a 440 nm. Aunque la glucosa oxidasa es un enzima específico de la  $\beta$ -D-glucosa, las pequeñas cantidades de  $\alpha$ -D-glucosa que puedan estar en las muestras también se determinan al estar la GOD comercial acompañada de mutarrotasa.

Reactivos:

- Tampón Fosfato-tris 0.2:0.1 M, pH 7.3
- Suspensión de O-dianisidina en etanol de 95° al 1% P/V
- Solución estándar de glucosa 0.2 mM
- Glucosa oxidasa (GOD) (E.C.1.1.3.4) comercial
- Peroxidasa (POD) (E.C.1.11.1.7) comercial

La mezcla enzimática se preparó mezclando 9.3 mg de GOD, 3 mg de POD, y 0.5 ml de la suspensión de O-dianisidina en un volumen final de 75 ml con el tampón fosfato-tris.

Técnica:

Se prepararon los tubos con las siguientes cantidades indicadas en ml:

	<u>Blanco</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>	<u>S3</u>	<u>Muestra</u>
Solución estándar de glucosa	---	0.50	0.75	1	---
Agua destilada	1	0.50	0.25	---	0.5
Muestra	---	---	---	---	0.5
Mezcla enzimática	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Se incubaron una hora a 37° C y se determinó la densidad óptica a 440 nm.

Cálculos:

Para hallar los nmoles de glucosa de la muestra es necesario representar una recta patrón con las densidades ópticas de los estándar y sus respectivas concentraciones de 0.1;0.15;0.200 nmoles de glucosa. Así se obtienen los

nmoles de glucosa existentes en 0.5 ml de muestra neutralizada, teniendo en cuenta el volumen del que proceden y la neutralización o dilución realizada en cada caso.

### 3.3.4.-DETERMINACION DE AMINOACIDOS TOTALES EN PLASMA

#### Preparación de la muestra

La sangre obtenida, como se explica en la sección anterior, fue centrifugada a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos obteniendo el suero por decantación; al que se le añade sulfo salicílico al 5%, en proporción 1 suero:3 sulfosalicílico. Se centrifuga otra vez a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos y del sobrenadante se toman 0.1 ml para la determinación.

#### Fundamento:

El método fotométrico de la ninhydrina, descrito por SPIES (1957), está basado en la formación de color azul por la reacción de la ninhydrina con los grupos amino libres.

#### Reactivos:

Tampón Citrato 0.2 M pH 5.0

Etilén glicol, éter monoetílico

Solución de Ninhydrina: Mezcla al 50% de las siguientes soluciones:

Solución A: 0.8 g. de  $Cl_2Sn$  en 500 ml. de tampón citrato

Solución B: 20 g. de Ninhydrina en 500 ml de Etilén glicol

Disolvente: Solución de n-Propanol en agua al 50%

Solución estándar de Leucina 2 mM

#### Técnica:

Se preparan los tubos según el siguiente protocolo:

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>Blanco</u>	<u>Muestra</u>
Solución Leucina	0.1	0.075	0.050	0.025	----	----
Agua	---	0.025	0.050	0.075	0.10	----
Muestra	---	---	---	---	----	0.1
Solución Ninhidrina	1	1	1	1	1	1
Disolvente	5	5	5	5	5	5

Los tubos con la curva patrón y con la muestra se mantienen en un baño con agitación, tapados con papel aluminio, durante 20 minutos a 100°C. Después se les añade el disolvente y se espera 15 minutos antes de medir la absorción a 570 nm. El color es estable durante una hora.

#### Cálculos:

Con los datos los tubos estándar se elaboró una curva patrón, y la concentración de cada muestra se obtiene por interpolación, teniendo en cuenta las diluciones sufridas en cada caso. Los resultados se expresan en mM.

### 3.3.5.-DETERMINACION DEL GLUCOGENO HEPATICO

#### Preparación de la muestra

Del hígado del animal se toma un trozo y se homogeniza en un potter con perclórico 0.6 N en proporción de 30 mg de tejido por 1 ml de ClO<sub>4</sub>H. Del homogenado se toman 0.2 ml y se reservan en hielo. El resto del homogenado se centrifuga durante 15 minutos a 5.000 r.p.m. y se recoge el sobrenadante y se neutraliza con CO<sub>2</sub>K 1 M, usando rojo de metilo como indicador. Seguidamente se procede a la determinación de la glucosa por el método ya descrito.

A las alicuotas de 0.2 ml de homogenado se añaden con CO<sub>2</sub>K 1 M, 2 ml de solución de amiloglucoxidasa en tampón acetato y se deja incubar en erlenmeyer de 25 ml

durante dos horas a 40°C tapados en un baño con agitación. Pasado el tiempo de incubación, la reacción se detiene adicionando 1 ml de  $\text{ClO}_4\text{H}$  0.6 N. Se centrifugan los tubos durante 15 minutos a 5.000 r.p.m. para eliminar el precipitado, y del sobrenadante se toman 0.5 ml en los que se determina la glucosa según el método enzimático de la glucosa-oxidasa peroxidasa (BERGMEYER y col. 1974).

#### Reactivos:

Solución de ácido perclórico 0.6 N  
Solución bicarbonato potásico 1 M  
Amiloglucoxidasa (E.C.3.2.1.3.) comercial  
Tampón acetato 0.2 M pH 4.8  
Solución  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  3.2 M

La amiloglucoxidasa se preparó disolviendo 333 mg de enzima en 1 ml de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  3.2 M. De esta solución se toman 0.4 ml y se añaden a 20 ml de tampón acetato.

#### Cálculos:

Al valor de glucosa obtenido de la muestra sometida a hidrólisis hay que restar la glucosa libre preexistente en el tejido, cuyo valor se determina con la muestra apartada del homogenado sometido a incubación. El valor resultante será la cantidad de glucógeno que habría en la muestra de hígado.

Los resultados se expresan como mg glucosa/g hígado.

### 3.3.6.-DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES

#### Fundamento:

Para esta determinación se siguió el método de LOWRY et al. (1951). Se trata de una reacción colorimétrica que tiene dos fases:

- 1- La del Biuret; los grupos  $\text{NH}_2$  reaccionan con el Cu alcalino y dan un color violeta.
- 2- La del Folin; los grupos  $\text{OH}^-$  reducen el fosfomolibdato.

presente en el reactivo que dá color azul.

Reactivos:

-Biuret:

A)  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% en sosa 0.1 N

B)  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5% en tartrato sódico al 1%

El Biuret se prepara con las soluciones A y B mezclando 50 ml de A con 1 ml de B. Se prepara extemporáneamente.

-Reactivo de Folin comercial diluido a la mitad con agua.

-Solución patrón de proteínas. Se prepara al 0.05% de albúmina bovina en agua destilada.

Técnica:

Se preparan los siguientes tubos y soluciones:

	<u>B</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>P1</u>	<u>P2</u>
Agua (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	---	---
Solución patrón ml	---	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	---	---
Dil. 1 problema	---	---	---	---	---	---	1	---
Dil. 2 problema	---	---	---	---	---	---	---	1

siendo B el blanco, y P1 y P2 los tubos problemas.

Una vez preparados todos los tubos, se añaden 5 ml. de Biuret, se esperan 15 minutos y aparece ligera coloración violeta correspondiente a la reacción del Biuret. Pasados los 15 minutos se añaden 0.5 ml de Folin y se dejan 20 minutos. Se desarrolla el color azul propio del reactivo de fenoles. Concluido este tiempo se hace la lectura a 640 nm.

Cálculos:

Se construye una curva patrón, representando la concentración de proteínas de cada uno de los patrones

(50, 100, 150, 200 y 250  $\mu$ /ml.) frente a su densidad óptica correspondiente. A partir de la curva patrón e interpolando, se obtiene la concentración de proteínas que hay en cada dilución del problema. Se multiplica la concentración de cada tubo por su dilución y se halla la media aritmética de los dos valores.

### 3.3.7.-INDICES BIOLÓGICOS DE UTILIZACIÓN DE LA DIETA

#### Eficacia del alimento

Un primer paso en el cálculo de los índices de crecimiento, una vez cuantificada la ingesta total de la dieta, es la valoración del crecimiento en peso de los animales para cada grupo experimental. Los incrementos de peso vivo deben ser expresados en términos absolutos para un período de tiempo. Con estos datos, relacionados con los de la ingesta, se puede calcular la conversión o eficiencia del alimento según el siguiente índice:

$$\text{Índice de conversión (IC)} = \frac{\text{A peso g}}{\text{Alimento ingerido g}}$$

#### Utilización protéica

Un término muy empleado en la práctica, para evaluar la proteína utilizada para crecimiento es el coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC). La expresión matemática que nos define este índice es:

$$\text{CEC} = \frac{\text{A peso g}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

#### Índice hepato-somatoico

Es otro índice de seguimiento del estado nutritivo-adaptativo de los animales. Este índice nos relaciona el peso del hígado con el peso corporal. Se expresa como:

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

### 3.38.-METODO ESTADISTICO

Para comparar las medias de dos poblaciones distintas se ha utilizado el test de la t de Student.

Al relacionar dos poblaciones distintas de datos, se han ajustado las rectas de regresión correspondientes, y se ha determinado su coeficiente de correlación.



4-RESULTADOS



#### 4.1.- ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE HIGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA A LA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN PROTEINAS

##### 4.1.1.- INGESTA E INDICES BIOLÓGICOS DE UTILIZACIÓN DE LA DIETA

Al comparar los resultados obtenidos, reflejados en la tabla 4.1. observamos que la ingesta es menor en las

TABLA 4.1.- Influencia de la dieta alta en proteínas (AP) sobre la ingesta, variación de peso e índices de conversión (IC) y utilización de la proteína para crecimiento (CEC).

	CONTROL (6)	DIETA A.P.(4)
Ingesta total (g)	1033.70	970.1
Ingesta (g/100 g pez/día)	1.12	1.23
Proteína (g)	481.91	600.38
Peso inicial (g)	2750.00	2267.00
Peso final (g)	3411.00	2983.00
Incremento de peso (g)	661.00	716.00
Incremento de peso (g/100 g pez/día)	0.72	0.90
I.C.	0.64	0.74
C.E.C.	1.37	1.19

Los valores son media de los grupos experimentales indicados en paréntesis. La ingesta se ha expresado como la cantidad de alimento ingerido por 100 g de animal y por día siendo el valor de ésta la media de la cantidad ingerida por los diferentes lotes experimentales sometidos al mismo tratamiento, habiendo sido tomado, tanto el peso como la ingesta el día quince del periodo experimental.

truchas controles que en las alimentadas con la dieta alta en proteínas, lógicamente los incrementos de peso, medidos también como incremento de peso por 100 g de pez al día, son mayores para los animales que ingirieron la dieta alta en proteínas. En la evolución ponderal se siguió en general, una línea similar a la ingesta.

Con respecto al índice de conversión, IC, se sigue manteniendo mejor en los animales alimentados con la dieta de alto contenido en proteínas ya que se obtiene un mayor aumento de peso por gramo de dieta ingerido, sin embargo, y como se esperaba, la utilización de la proteína es mejor para la dieta control como indican los valores de coeficiente de eficacia en crecimiento, CEC, expresados en la tabla 4.1. ya que el exceso de proteína provoca una desviación de la utilización de ésta hacia fines energéticos con el consiguiente despilfarro proteico.

#### 4.12.- ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO GLUCIDICO

##### A- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA Y FOSFOFRUCTOQUINASA

La dieta rica en proteínas provoca un incremento de la actividad PK hepática, aumentando significativamente la velocidad máxima alrededor de un 40% sobre el valor control. Asimismo a velocidad subsaturante se aprecian cambios significativos en la actividad de este enzima (FIG 4.1), siendo estos del orden del 49% de media. Como se puede observar estos cambios son proporcionales a lo largo de toda la curva de saturación, Sin embargo no se osbservan cambios significativos en los valores de la Km del enzima para el fosfoenolpiruvato.

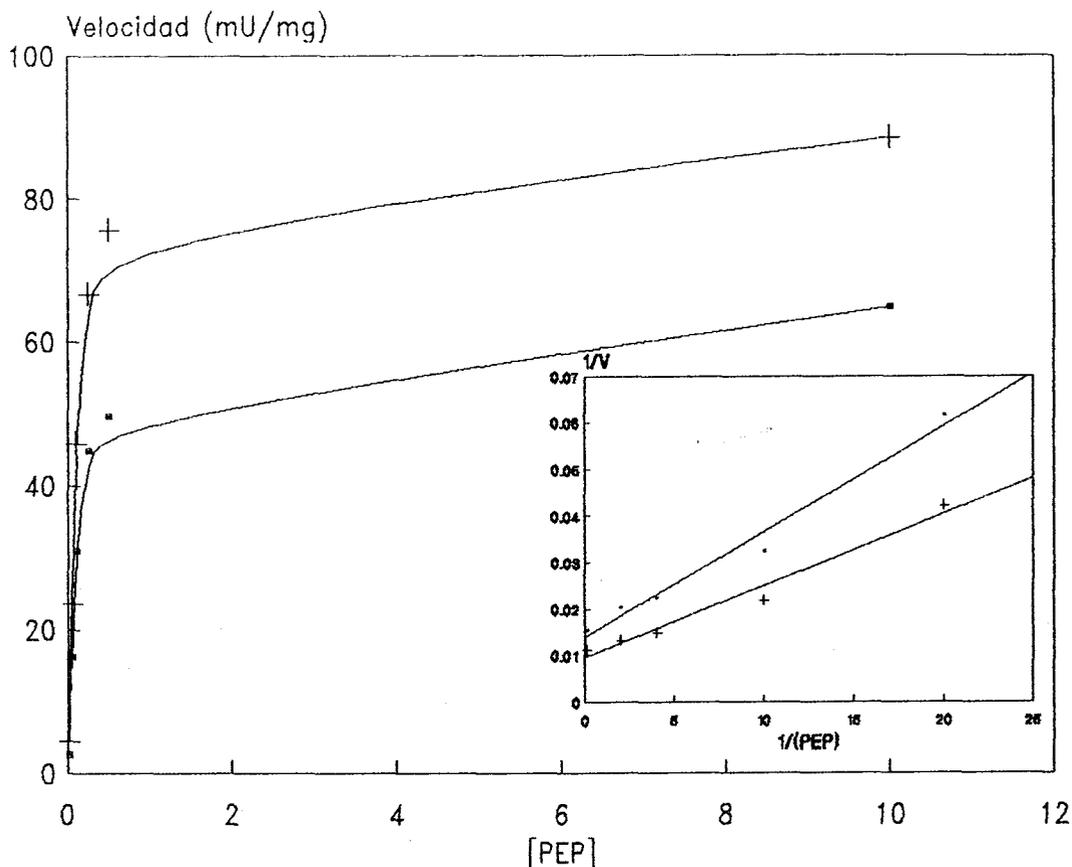
la figura incluida en la curva de saturación muestra la representación de Lineweaver-Burk para los valores correspondientes a la cinética enzimática con objeto de obtener los parámetros cinéticos del enzima y que de forma general se expresan en el pie de la figura. No obstante y

debido a que la representación de los dobles recíprocos tiende a enfatizar los puntos correspondientes a bajas concentraciones de sustrato donde se hace máximo el grado de error (FERSHT 1985), los datos experimentales presentados en este trabajo han sido analizados con fines comparativos mediante un ajuste simple de mínimos cuadrados (DOWD y RIGGS 1965; ATKINS y NIMMO 1975) descritos por la ecuación;  $V=V_{max} \times (S)/(K_m+(S))$ . Esta representación no lineal ha sido realizada con la ayuda de un programa de computador diseñado por nosotros en nuestro laboratorio. Los parámetros cinéticos obtenidos mediante este sistema se expresan al final de la tabla incluida al final de la figura correspondiente. Por regla general y aunque pueden existir diferencias entre ambos métodos, lo que si se repite es una constancia en el aspecto cualitativo del valor del parámetro cinético bajo las diferentes condiciones nutricionales.

Este análisis se ha realizado para todos y cada uno de los enzimas ensayados tanto en hígado, como riñón de trucha aunque de forma general, en esta sección de resultados, solo se comentan los resultados obtenidos mediante la representación no lineal, sin perjuicio de que en casos excepcionales se comenten y analicen los de ambos métodos.

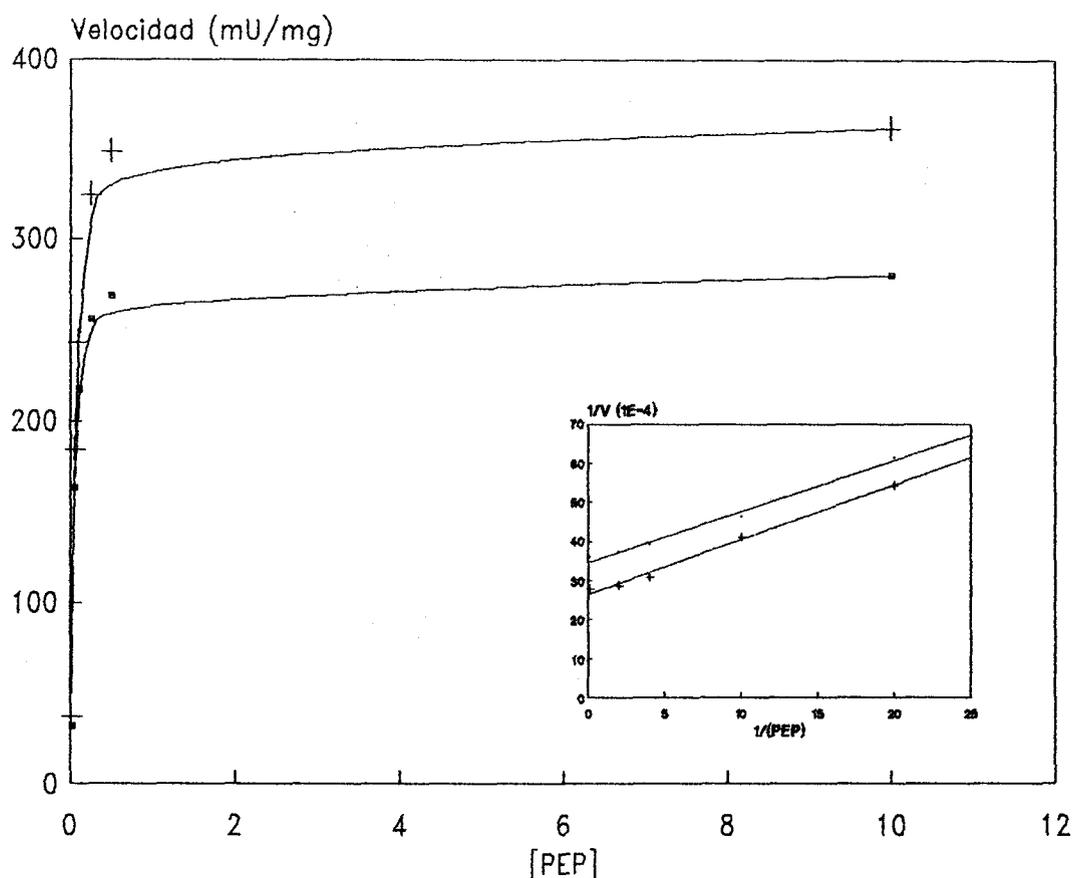
Por lo que respecta al riñón, el primer dato sobresaliente consiste en que la actividad PK en este tejido es del orden de cuatro veces mayor que en el hígado. El mecanismo de adaptación en el enzima renal es similar al de hígado, es decir, un claro aumento de la velocidad a niveles saturantes, sin que se aprecien cambios significativos en los valores de la  $K_m$ . (FIG. 4.2.)

La PFK hepática y renal parece no afectarse con la administración de una dieta alta en proteínas, ya que no se aprecia ningún cambio importante ni a nivel de la  $K_m$  ni de la velocidad máxima, manteniéndose la cinética similar a la obtenida para nuestros controles (FIG 4.3. y 4.4.).



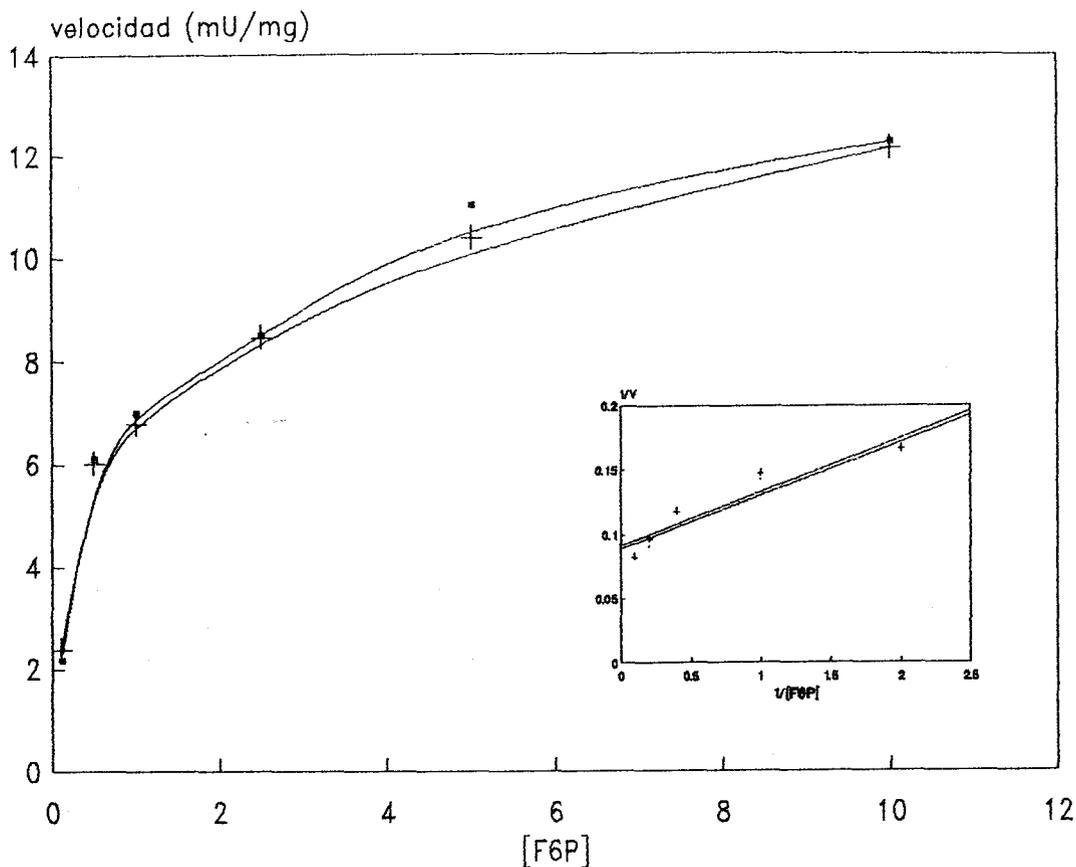
SUSTRATO	DIETAS	
PEP (mM)	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS
0.01	2.56 ± 0.58 (10)	4.50 ± 1.32 (6)
0.05	16.30 ± 1.92 (11)	23.72 ± 2.39 (6)
0.1	30.87 ± 3.70 (13)	45.94 ± 4.81 (6)
0.25	44.85 ± 3.88 (13)	66.74 ± 7.61 (6)
0.5	49.66 ± 3.35 (15)	75.54 ± 8.19 (6)
10	64.84 ± 3.47 (15)	88.35 ± 8.88 (6)
Km (mM)	0.130 ± 0.01 (10)	0.110 ± 0.02 (6)*
Vmax (mU/mg)	65.20 ± 7.30 (10)	91.33 ± 9.51 (6)

FIG 4.1.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y alimentados con una dieta alta en proteina (—+—). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.162 mM y 71.58 mU/mg para los controles y 0.163 mM y 105.03 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como:\* P<0.05.



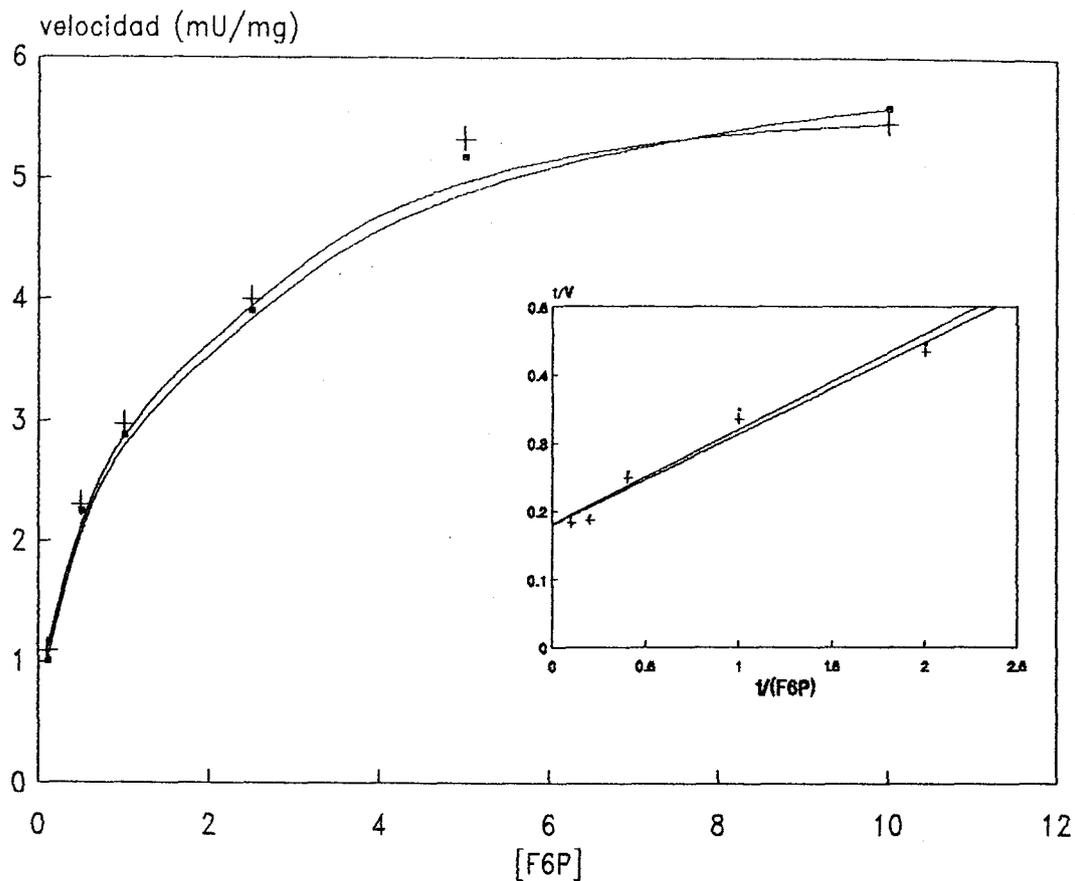
SUSTRATO PEP (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS
0.01	31.97 ± 5.39 (9)	37.06 ± 2.34 (5)
0.05	162.70 ± 12.65 (11)	184.30 ± 25.99 (5)
0.1	216.83 ± 11.43 (12)	243.34 ± 20.10 (5)
0.25	255.24 ± 14.69 (12)	324.24 ± 24.40 (5)
0.5	268.72 ± 12.71 (12)	348.17 ± 25.65 (5)
10	280.12 ± 10.92 (12)	360.95 ± 23.66 (5)
Km (mM)	0.049 ± 0.004 (12)	0.055 ± 0.005 (5)*
Vmax (mU/mg)	290.60 ± 22.45 (12)	381.70 ± 30.85 (5)

FIG 4.2.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN RIÑON DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y alimentados con una dieta alta en proteínas (—+—). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.038 mM y 290.69 mU/mg para los controles y 0.052 mM y 378.78 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como : \* P<0.05.



SUSTRATO	DIETAS	
	F6P (mM)	CONTROL
0.1	2.18 ± 0.43 (10)	2.37 ± 0.69 (6)
0.5	6.10 ± 0.91 (10)	6.01 ± 0.36 (6)
1	7.00 ± 0.56 (10)	6.78 ± 0.29 (6)
2.5	8.50 ± 0.53 (10)	8.47 ± 0.51 (6)
5	11.05 ± 0.43 (10)	10.39 ± 0.77 (6)
10	12.24 ± 0.71 (10)	12.12 ± 0.96 (6)
Km (mM)	0.65 ± 0.06 (10)	0.62 ± 0.06 (6)
Vmax (mU/mg)	12.20 ± 1.20 (10)	11.90 ± 1.20 (6)

FIG 4.3.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y alimentados con una dieta alta en proteina (—+—). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.468 mM y 11.28 mU/mg para los controles y 0.835 mM y 12.20 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO	DIETAS	
	F6P (mM)	CONTROL
0.1	1.00 ± 0.33 (10)	1.09 ± 0.37 (6)
0.5	2.25 ± 0.49 (10)	2.30 ± 0.39 (5)
1	2.87 ± 0.31 (10)	2.97 ± 0.42 (6)
2.5	3.90 ± 0.37 (10)	4.00 ± 0.59 (5)
5	5.18 ± 0.29 (10)	5.33 ± 0.83 (5)
10	5.58 ± 0.42 (10)	5.45 ± 0.91 (5)
Km (mM)	0.98 ± 0.15 (10)	0.62 ± 0.06 (5)
Vmax (mU/mg)	5.99 ± 0.86 (10)	5.91 ± 1.08 (5)

FIG 4.4. -EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE RIÑÓN TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteína (---+---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.769 mM y 5.52 mU/mg para los controles y 0.748 mM y 5.58 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

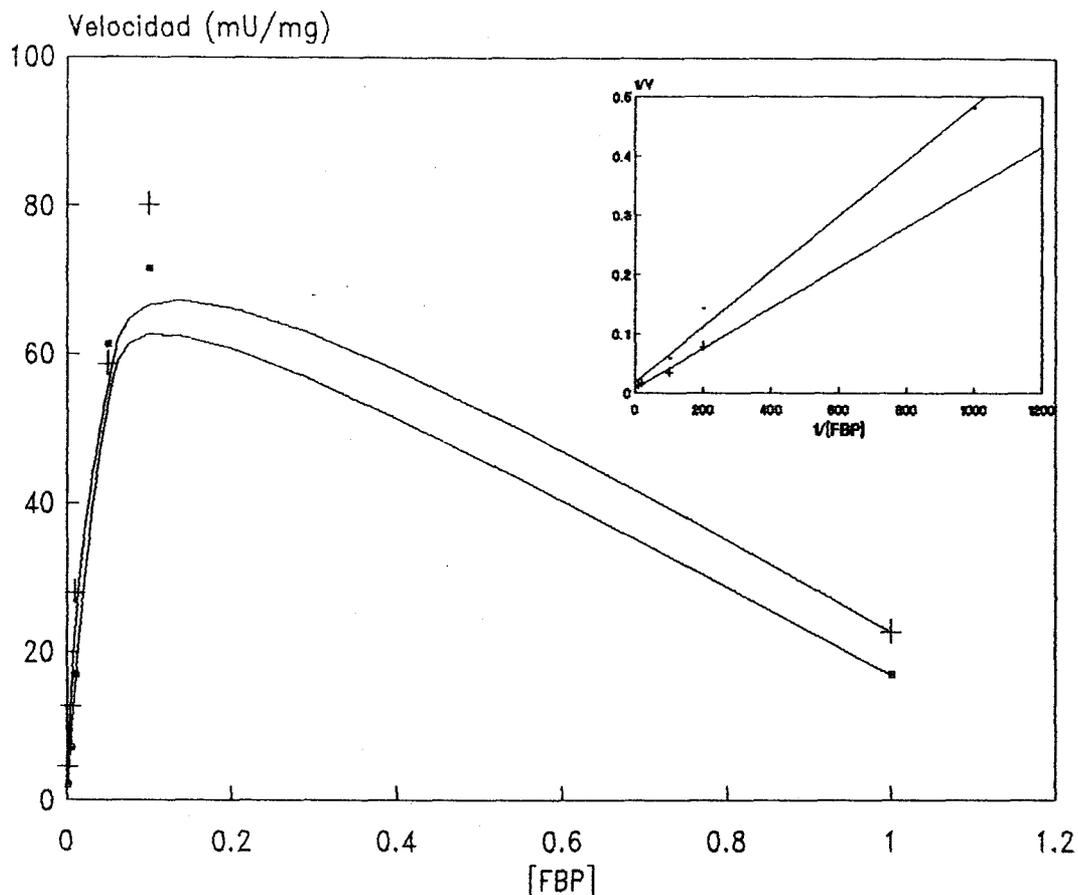
#### B- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA

El escaso contenido en hidratos carbono de la dieta alta en proteínas hace necesaria la formación de glucosa. La FBPasa, en hígado, aumenta su actividad hasta un 80%, a concentración subsaturante, sin que se observen cambios significativos en la velocidad máxima con respecto al control (FIG 4.5.)

La actividad FBPasa renal también aumenta aunque en menor proporción que la hepática, pero solo, como en hígado, a velocidad subsaturante, disminuyendo por tanto los valores de la Km de este enzima tanto en hígado como en riñón. (FIG. 4.6.). En este caso hay que mencionar que en otros sistemas biológicos estudiados este enzima presenta una clara inhibición por sustrato, que en nuestras condiciones experimentales, comienza a ser patente a una concentración de fructosa 1,6-bisfosfato de 0.1 mM para el caso del hígado y de 0.05 mM para el riñón. La actividad específica del enzima hepático es del orden de tres mayor que la del riñón.

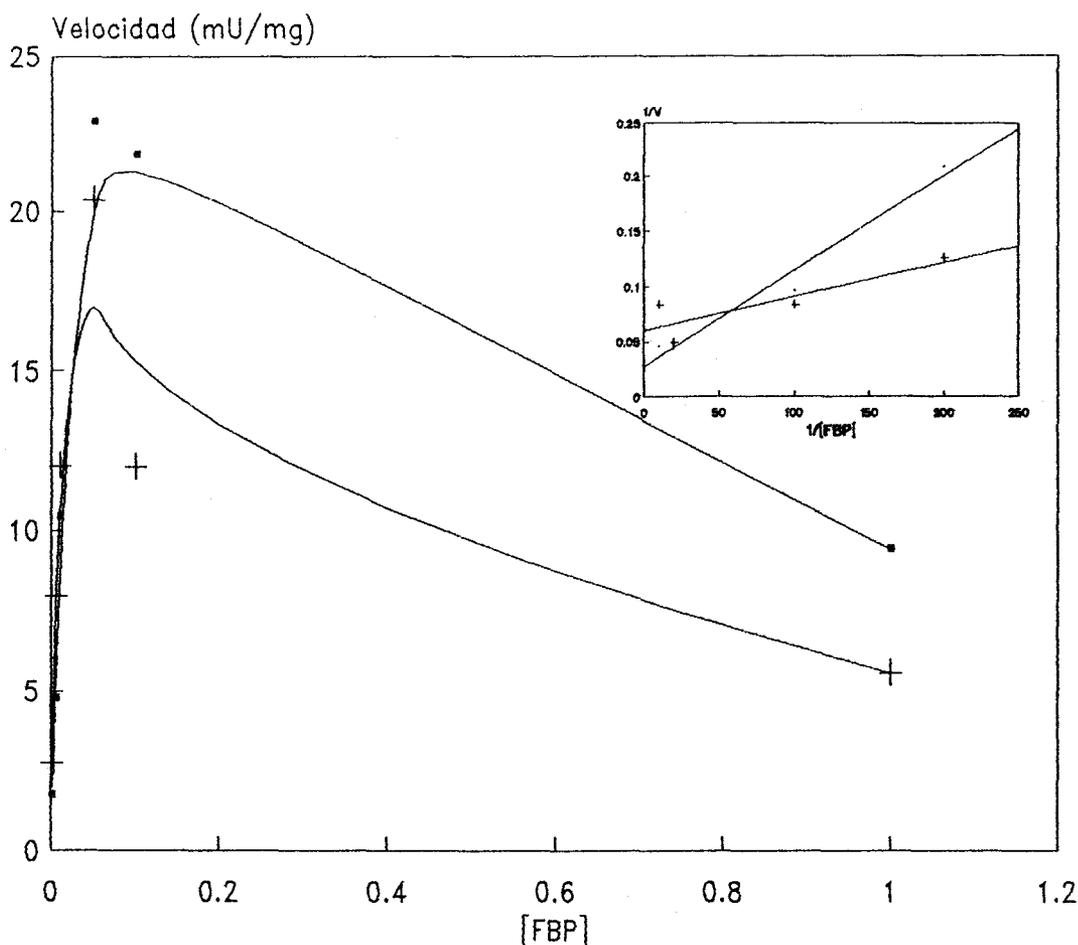
#### C- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA, 6-FOSFATO DESHIDROGENASA

El aumento de la proteína en la dieta parece no incidir sobre la vía de las pentosas fosfato ya que aparentemente no se necesita un aporte extra de poder reductor ni de pentosas fosfato. La actividad G6PDH no presenta ninguna variación significativa ni en hígado ni riñón, obteniéndose una curva de actividad similar al control, sin que aparezcan diferencias significativas para la Km y Vmax. obtenidas en las truchas alimentadas con la dieta control o la dieta alta en proteínas. No obstante hay que mencionar la tendencia de un ligero incremento (del orden del 15%) en la actividad específica de enzima bajo estas condiciones nutricionales (FIG 4.7. y 4.8.).



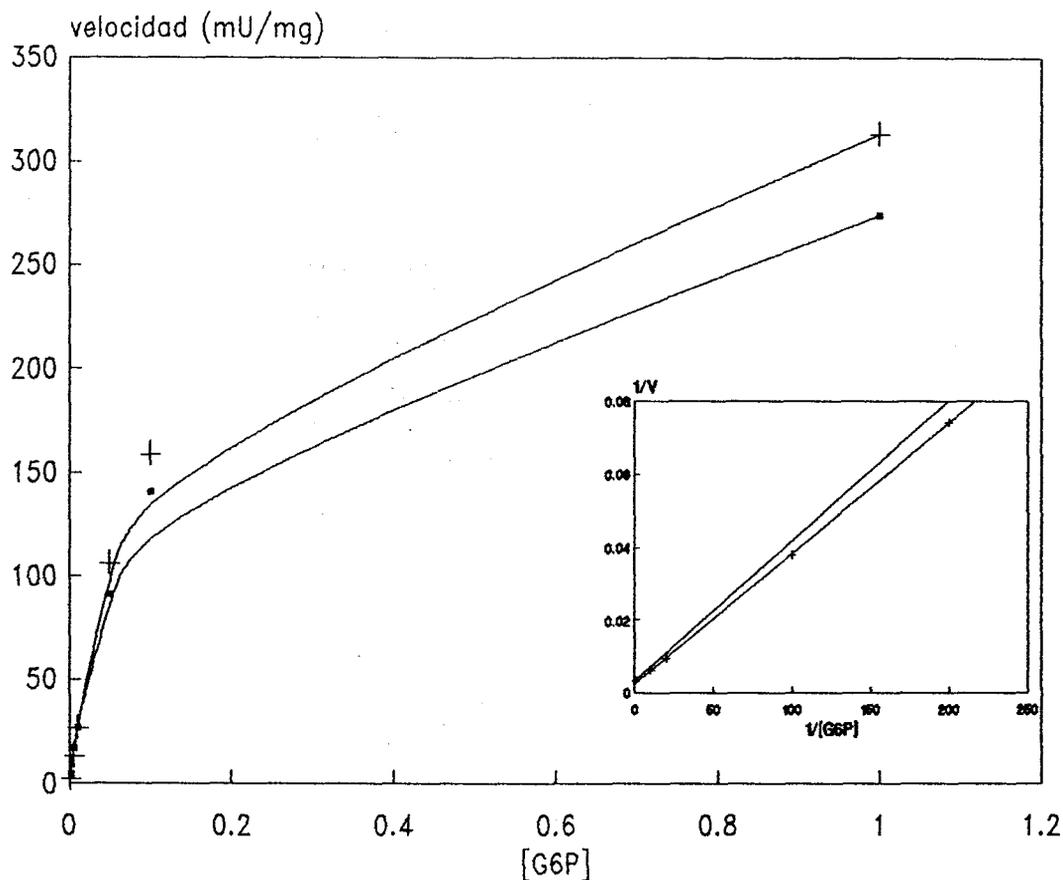
SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS
F 1,6-P (mM)		
0.001	2.09 ± 0.84 (13)	4.53 ± 1.69 (6)
0.005	7.07 ± 1.55 (12)	12.73 ± 3.33 (7)
0.01	16.90 ± 2.25 (13)	27.98 ± 4.97 (7)
0.05	61.33 ± 5.31 (14)	58.69 ± 3.77 (7)
0.1	71.43 ± 5.62 (12)	80.20 ± 5.75 (6)
1	16.83 ± 3.18 (17)	22.64 ± 4.50 (6)
Km (mM)	0.046 ± 0.005 (12)	0.029 ± 0.003 (6) *
Vmax (mU/mg)	108.10 ± 11.75 (12)	102.80 ± 9.95 (6)

FIG 4.5.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteinas (---+---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.034 mM y 72.46 mU/mg para los controles y 0.042 mM y 125.08.mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como : \* P<0.05.



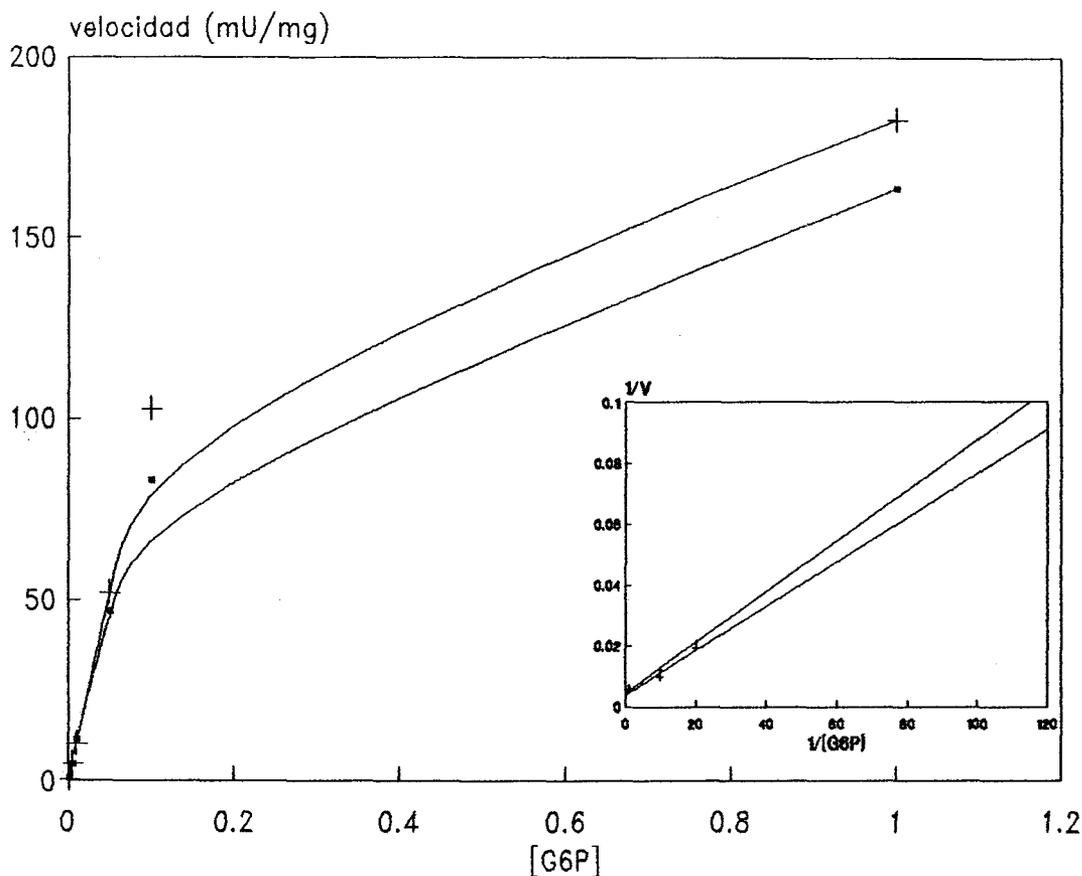
SUSTRATO		DIETAS	
F 1,6-P (mM)	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS	
0.001	1.76 ± 0.52 (13)	2.76 ± 1.18 (5)	
0.005	4.77 ± 1.07 (14)	7.96 ± 1.33 (5)	
0.01	10.45 ± 1.08 (15)	12.05 ± 0.76 (5)	
0.05	22.86 ± 1.79 (13)	20.35 ± 2.24 (5)	
0.1	21.78 ± 3.04 (15)	12.01 ± 2.80 (5)	
1	9.43 ± 0.86 (14)	5.56 ± 1.21 (5)	
Km (mM)	0.025 ± 0.004 (13)	0.010 ± 0.002 (5) *	
Vmax (mU/mg)	33.39 ± 5.98 (13)	24.39 ± 4.71 (5)	

FIG 4.6.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteínas(---+---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.054 mM y 58.48 mU/mg para los controles y 0.011 mM y 24.64 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.05.



SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS
G6P (mM)		
0.001	4.20 ± 0.06 (8)	2.15 ± 0.97 (7)
0.005	16.63 ± 1.94 (14)	13.48 ± 2.60 (7)
0.01	26.54 ± 3.08 (14)	26.52 ± 5.66 (7)
0.05	91.35 ± 12.90 (16)	105.97 ± 17.76 (7)
0.1	140.37 ± 12.32 (16)	158.46 ± 18.34 (7)
1	274.12 ± 19.88 (16)	313.43 ± 15.20 (7)
Km (mM)	0.115 ± 0.013 (14)	0.119 ± 0.022 (7)
Vmax (mU/mg)	305.6 ± 34.5 (14)	350.0 ± 65.9 (7)

FIG 4.7. -EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteínas (---+---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.118 mM y 305.81 mU/mg para los controles y 0.140 mM y 393.08 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO		DIETAS	
G6P (mM)	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS	
0.001	0.63 ± 0.36 (9)	0.37 ± 0.14 (5)	
0.005	4.68 ± 0.88 (10)	4.73 ± 1.19 (5)	
0.01	11.43 ± 1.24 (13)	10.04 ± 1.83 (5)	
0.05	46.63 ± 5.61 (11)	52.08 ± 7.22 (5)	
0.1	82.84 ± 7.96 (15)	102.65 ± 20.11 (5)	
1	162.99 ± 10.20 (14)	182.30 ± 13.71 (5)	
Km (mM)	0.135 ± 0.016 (11)	0.125 ± 0.021 (5)	
Vmax (mU/mg)	185.5 ± 21.36 (11)	205.1 ± 34.64 (5)	

FIG 4.8- EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteínas (---+---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.177 mM y 212.77 mU/mg para los controles y 0.183 mM y 251.89 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

#### 4.13- ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO PROTEICO

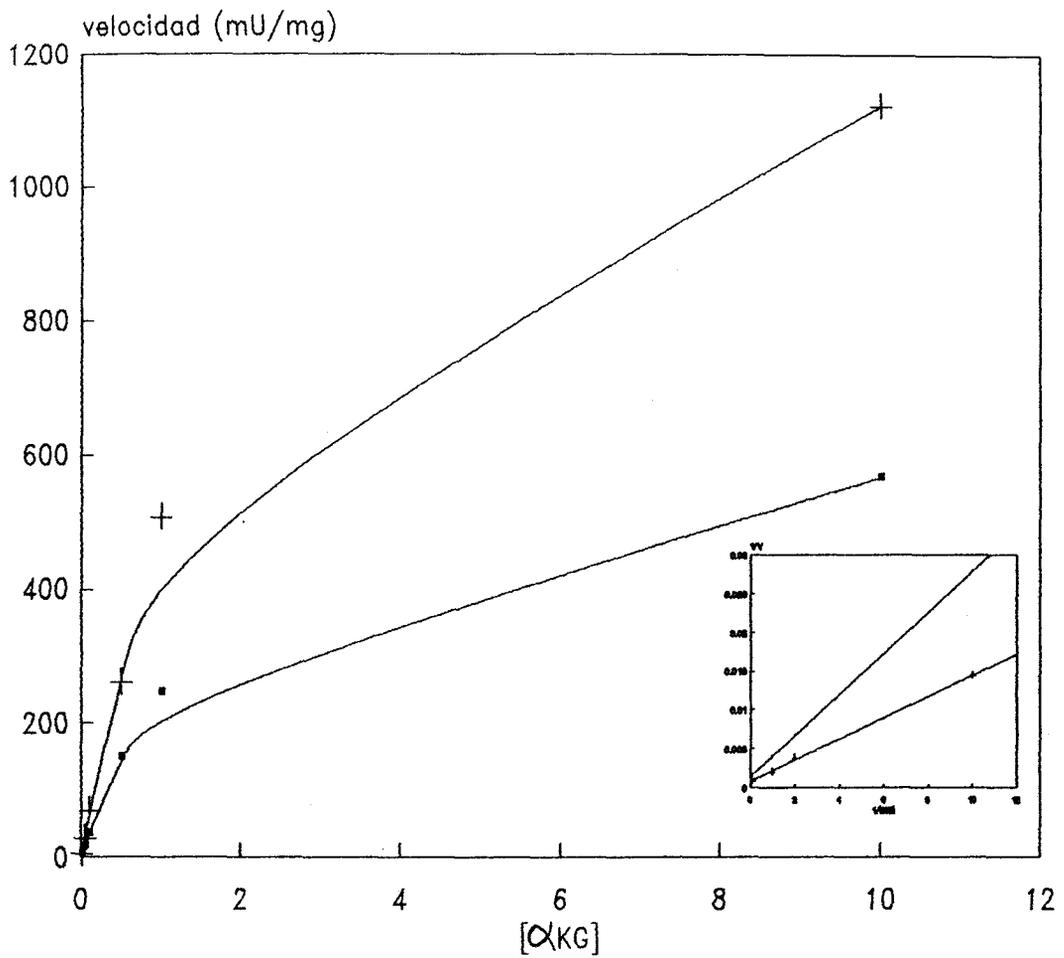
##### A- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA

Tras la administración de una dieta rica en proteínas la utilización de aminoácidos como fuente de energía se ve fuertemente incrementada. Los aminoácidos son degradados a través de diferentes rutas hasta piruvato o intermediarios del T.C.A.. La primera transformación que tienen que sufrir los aminoácidos para ser utilizados es la pérdida del grupo amino, según el modelo propuesto por BRAUNSTEIN (1957). Para la transdesaminación se necesita la intervención de una transaminasa, poco específica, que catalizaría la transferencia del grupo amino a un cetoácido, formándose glutamato. Finalmente el glutamato formado es desaminado oxidativamente por acción de la GDH. Nuestros resultados experimentales muestran un incremento en la velocidad máxima del enzima hepático que llega a ser del orden del 100% sobre los datos obtenidos en los animales controles (FIG 4.9). Este incremento tiene lugar también a lo largo de toda la curva de saturación siendo prácticamente del mismo orden para cada concentración de sustrato utilizada. Por esta razón no se aprecian cambios significativos en los valores  $K_m$  de este enzima para el glutamato.

En el riñón, los datos obtenidos para la actividad del enzima muestran un aumento significativo de la velocidad máxima, de características similares a los obtenidos en hígado, sin que se aprecien cambios en los valores de la  $K_m$  (FIG 4.10).

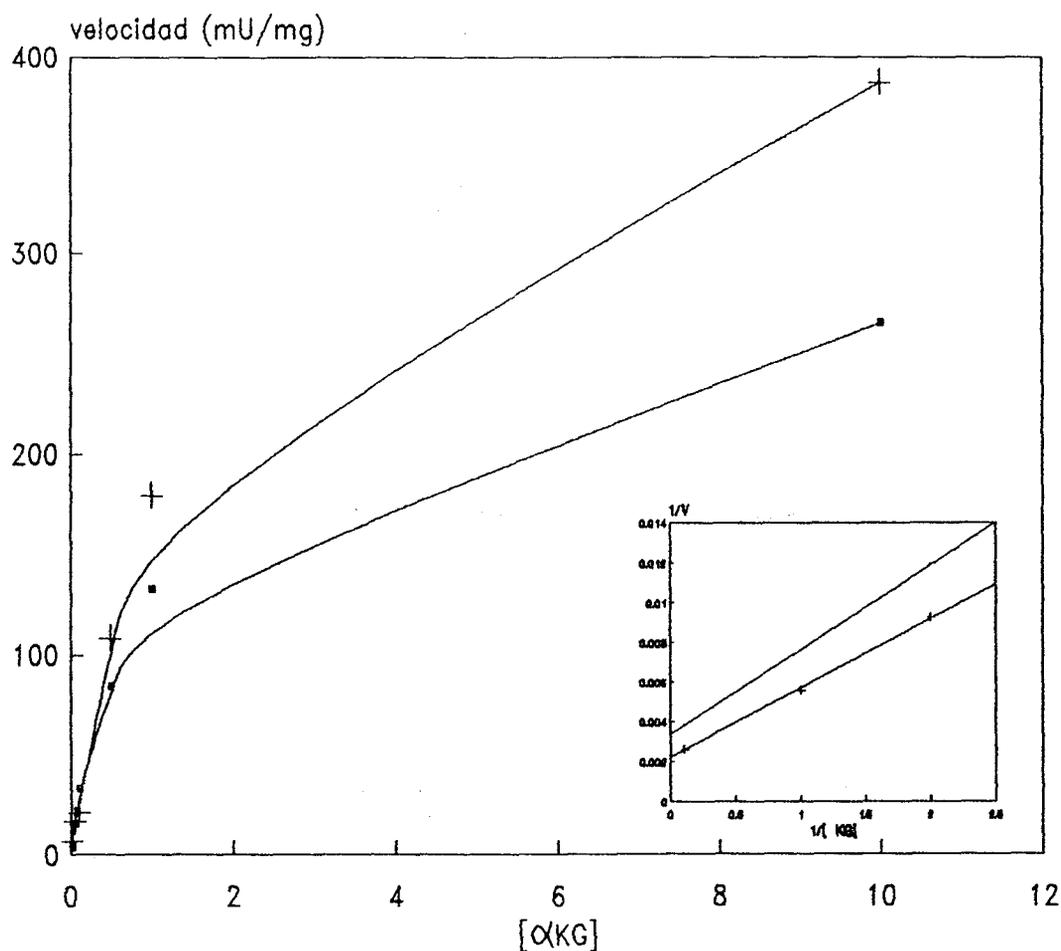
##### B-EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA.

La AAT cataliza la transaminación de la alanina y otros aminoácidos gluconeogénicos, interviniendo en el primer paso de la desaminación indirecta, así, la administración de una dieta rica en proteínas conlleva un aumento de la actividad de este enzima que en nuestras condiciones experimentales es de un 65% para el enzima



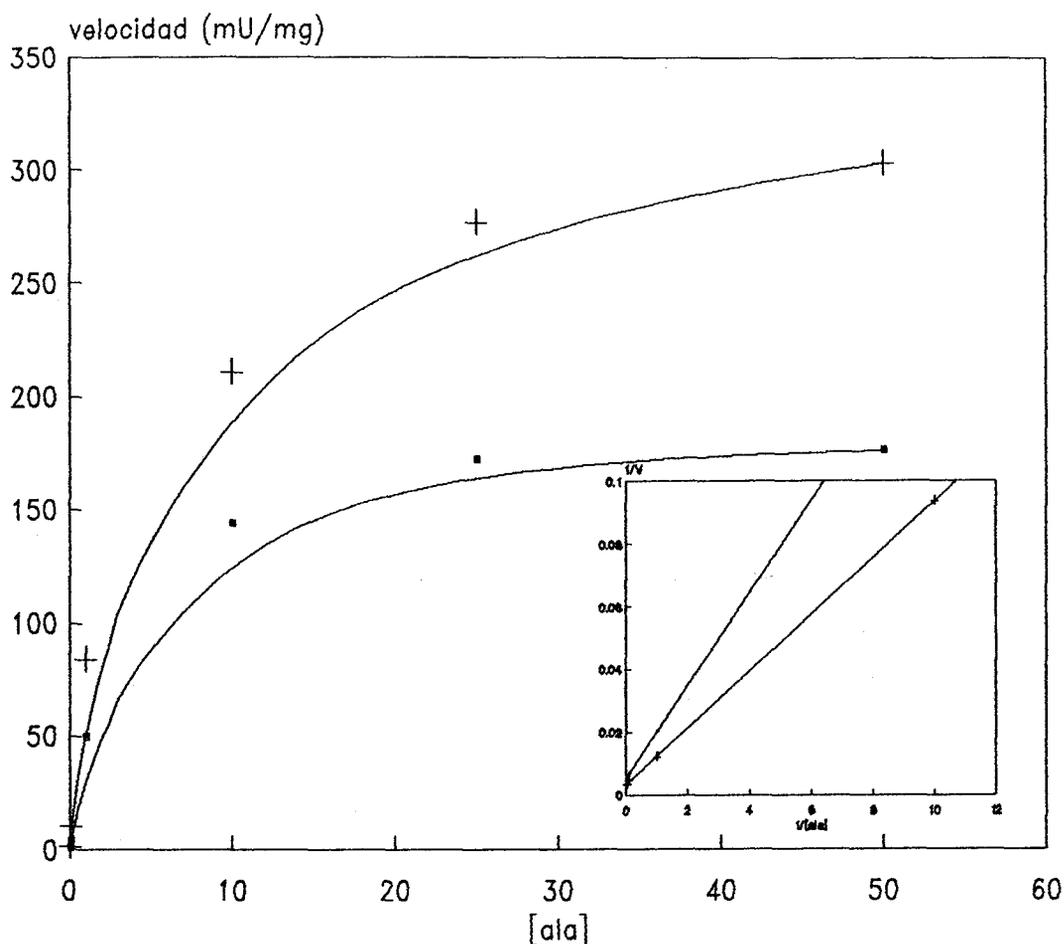
SUSTRATO $\alpha$ -KG (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN PROTEINA
0.01	5.17 $\pm$ 1.53 (20)	5.32 $\pm$ 2.63 (10)
0.05	16.00 $\pm$ 3.37 (20)	28.07 $\pm$ 4.95 (10)
0.1	35.94 $\pm$ 8.55 (20)	69.44 $\pm$ 6.99 (10)
0.5	148.78 $\pm$ 28.29 (20)	260.50 $\pm$ 30.24 (10)
1	245.28 $\pm$ 38.57 (20)	508.06 $\pm$ 51.50 (10)
10	566.03 $\pm$ 78.81 (20)	1121.22 $\pm$ 100.11 (10)
Km (mM)	1.72 $\pm$ 0.35 (20)	1.75 $\pm$ 0.20 (10)*
Vmax (mU/mg)	663.4 $\pm$ 116.1 (20)	13201.4 $\pm$ 144.2 (10)

FIG 4.9.-EFECTO DEL  $\alpha$ -CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DEHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta proteina (---+---). Los datos son media  $\pm$  SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 1.80 mM y 681.66 mU/mg para los controles y 1.68 mM y 1231.98 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como :\* P<0.005.



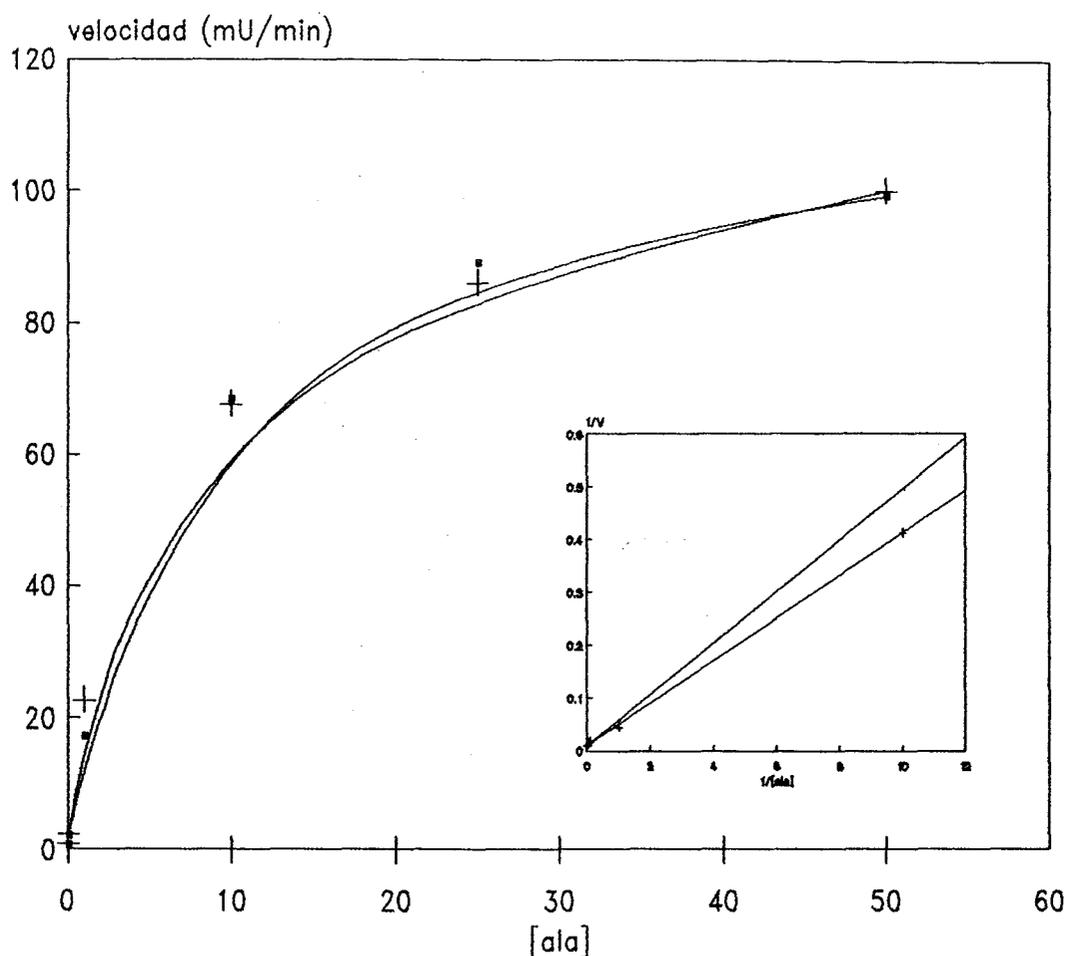
SUSTRATO $\alpha$ -KG (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN PROTEINA
0.01	3.63 $\pm$ 1.34 (12)	6.49 $\pm$ 1.53 (5)
0.05	15.17 $\pm$ 2.77 (12)	16.75 $\pm$ 2.96 (5)
0.1	32.35 $\pm$ 5.69 (12)	21.22 $\pm$ 2.53 (5)
0.5	84.25 $\pm$ 28.29 (12)	108.53 $\pm$ 14.81 (5)
1	132.81 $\pm$ 14.47 (12)	179.25 $\pm$ 9.03 (5)
10	265.02 $\pm$ 24.67 (12)	386.98 $\pm$ 25.13 (5)
Km (mM)	1.22 $\pm$ 0.16 (12)	1.34 $\pm$ 0.14 (5)*
Vmax (mU/mg)	296.4 $\pm$ 37.4 (12)	440.1 $\pm$ 46.2 (5)

FIG 4.10.-EFECTO DEL  $\alpha$ -CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DEHIDROGENASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteínas (---+---). Los datos son media  $\pm$  SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 1.28 mM y 299.85 mU/mg para los controles y 1.60 mM y 457.88 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.05.



SUSTRATO ALA (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS
0.01	0.58 ± 0.47 (9)	1.68 ± 0.96 (7)
0.1	3.85 ± 0.81 (9)	10.68 ± 1.84 (7)
1	49.77 ± 6.33 (9)	83.81 ± 9.61 (7)
10	143.81 ± 15.10 (9)	210.88 ± 15.60 (7)
25	171.91 ± 18.52 (9)	276.40 ± 17.52 (7)
50	176.03 ± 19.54 (9)	302.55 ± 11.19 (7)
Km (mM)	2.87 ± 0.38 (9)	3.15 ± 0.29 (7)*
Vmax (mU/mg)	187.9 ± 24.8 (9)	309.3 ± 28.7 (7)

FIG 4.11.-EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteina(---+---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 2.75 mM y 186.57 mU/mg para los controles y 2.75mM y 303.95 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.01.



SUSTRATO	DIETAS	
	ALA (mM)	
	CONTROL	ALTA EN PROTEINAS
0.01	0.55 ± 0.28 (10)	0.86 ± 0.32 (7)
0.1	2.02 ± 0.64 (10)	2.43 ± 0.59 (7)
1	17.17 ± 4.01 (10)	22.59 ± 5.16 (6)
10	68.35 ± 9.92 (10)	67.63 ± 13.21 (6)
25	89.13 ± 11.53 (10)	86.20 ± 14.85 (7)
50	99.27 ± 11.05 (10)	99.99 ± 10.09 (7)
Km (mM)	5.99 ± 1.12 (10)	5.21 ± 0.98 (7)
Vmax (mU/mg)	110.6 ± 20.7 (10)	106.8 ± 20.1 (7)

FIG 4.12.-EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN RIÑON DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en proteínas (---+---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 5.14 mM y 105.82 mU/mg para los controles y 4.68 mM y 116.23 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

hepático , y de características similares a las descritas en el apartado anterior para la GDH (FIG 4.11.).

Por el contrario ,en riñón, no se aprecian cambios significativos ni en la actividad del enzima ni en la Km entre los animales controles y los alimentados con la dieta rica en proteínas (FIG 4.12).

## 4.2.- ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE HIGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA A LA DIETA ALTA EN HIDRATOS DE CARBONO

### 4.2.1.- INGESTA E INDICES DE BIOLÓGICOS DE UTILIZACIÓN DE LA DIETA

La cantidad de alimento que voluntariamente han tomado estos animales ha sido mínima, tanto que ha

TABLA 4.2.- Influencia de la dieta alta en carbohidratos (AC) sobre la ingesta, variación de peso e índices de conversión (IC) y utilización de la proteína para crecimiento (CEC).

	CONTROL (6)	DIETA A.C.(4)
Ingesta total (g)	1033.70	154.83
Ingesta (g/100 g pez/día)	1.12	0.22
Proteína (g)	481.91	29.62
Peso inicial (g)	2750.00	2380.00
Peso final (g)	3411.00	2273.00
Incremento de peso (g)	661.00	-107.00
Incremento de peso g/100 g pez /día	0.72	-0.15
I.C.	0.64	----
C.E.C.	1.37	----

Los valores son media de los grupos experimentales indicados en paréntesis. La ingesta se ha expresado como cantidad de alimento ingerido por 100g de animal y por día siendo el valor de ésta la media de la cantidad ingerida por los diferentes lotes experimentales sometidos al mismo tratamiento, habiendo sido tomados tanto el peso como la ingesta el día quince del periodo experimental.

resultado ser insuficiente para satisfacer los gastos de mantenimiento. Todo ello ha provocado una disminución en el peso del animal (no tan acentuada como en el caso del ayuno). La escasa ingestión de alimento se debe probablemente al alto porcentaje de hidratos de carbono ya que estos por una parte no son bien utilizados por la trucha y por otra parece que presenta problemas de palatabilidad al animal puesto que en numerosas ocasiones el alimento era rechazado por el pez una vez probado.

Respecto al índice de conversión (IC) y al coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC) no se han calculado ya que los incrementos de peso resultaron negativos.

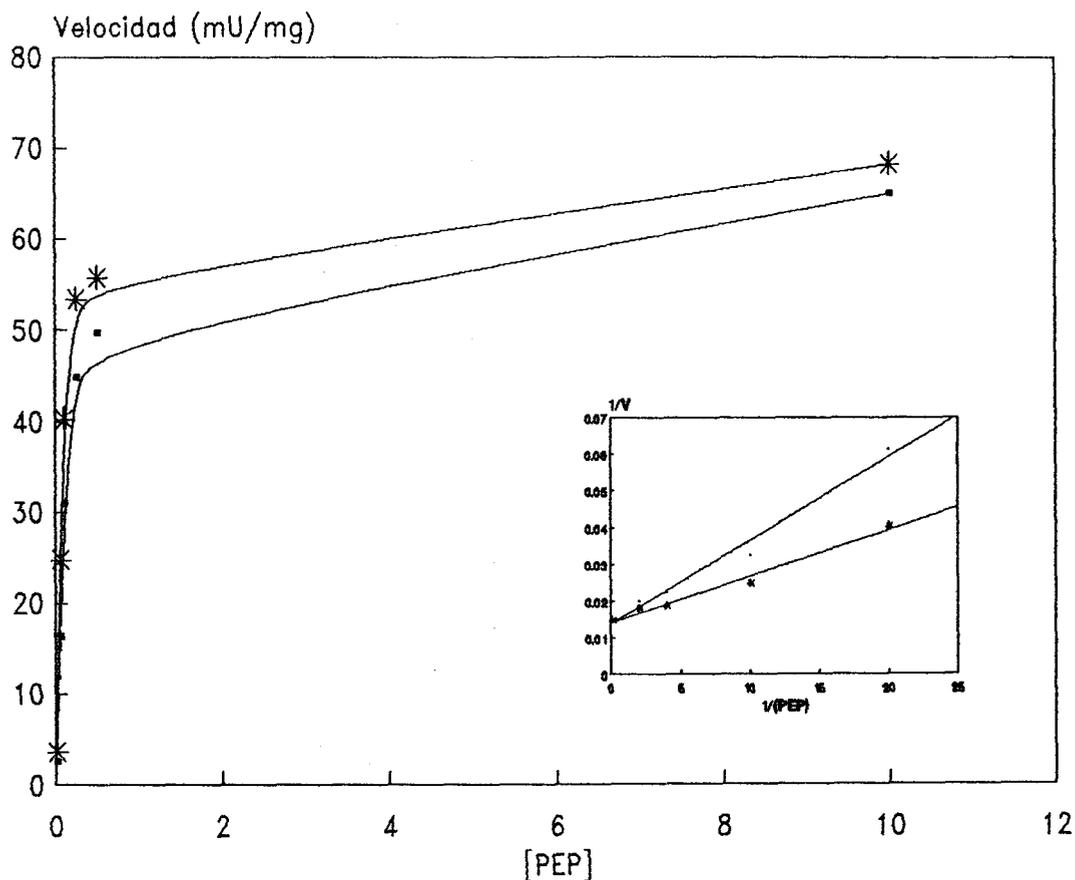
#### 4.2.2.- ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO GLUCIDICO.

##### A- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA Y PIRUVATO QUINASA

PK y PFK presentan un comportamiento similar frente a esta situación nutritiva. En el caso de la PK hepática se aprecia un aumento, del 50%, en la actividad a concentraciones subsaturantes de PEP (0.05 mM) (FIG 4.13.) lo que lleva a un cambio similar en la Km sin que se observen cambios significativos a velocidad máxima .

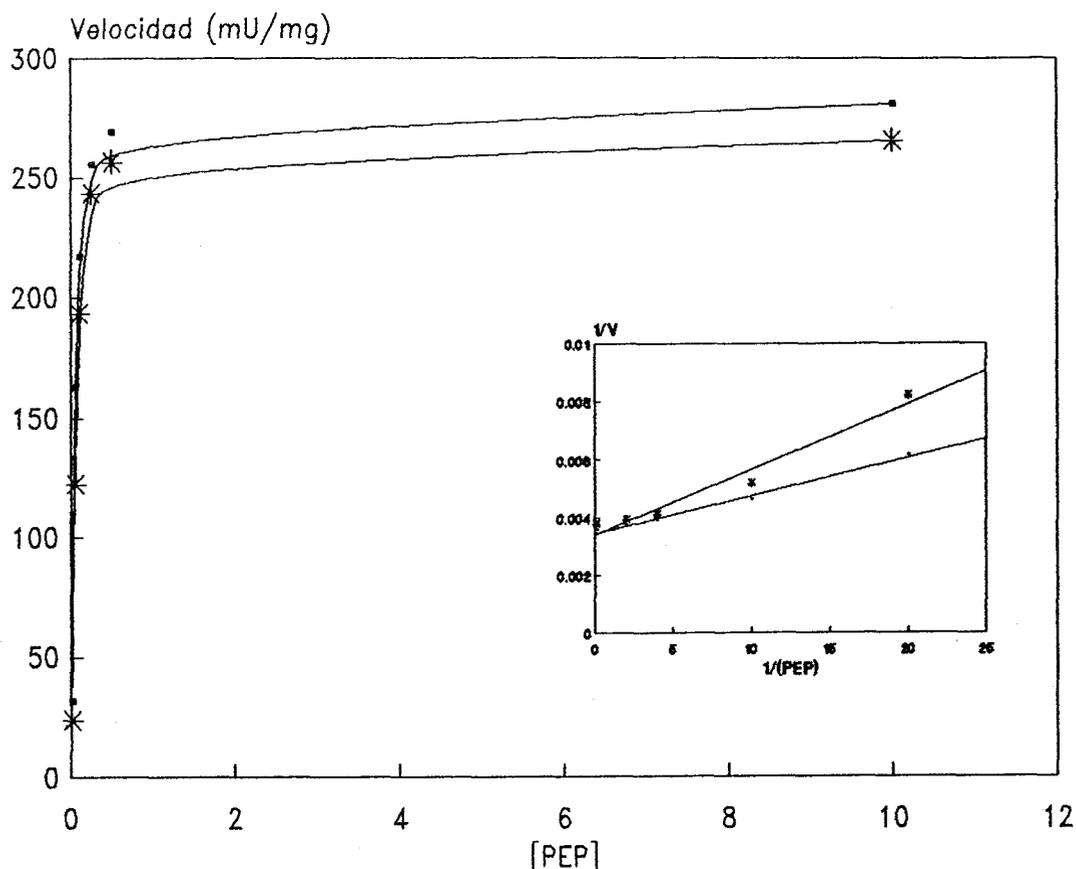
En el riñón no se apreciaron cambios en la cinética seguida por el enzima de los animales alimentados con respecto a la dieta rica en hidratos de carbono como se muestra en la FIG 4.14..

La PFK es un importante enzima regulador de la glucolisis en mamíferos como la rata (UYEDA 1979) ya que es bastante sensible al contenido glucídico de la dieta aumentando su actividad cuando este es elevado . Nuestros datos muestran un incremento del 50% en la velocidad pero solo a concentraciones subsaturantes de F6P (0.1 mM) en los animales alimentados con la dieta rica en carbohidratos (FIG 4.15) sin que aparezcan cambios



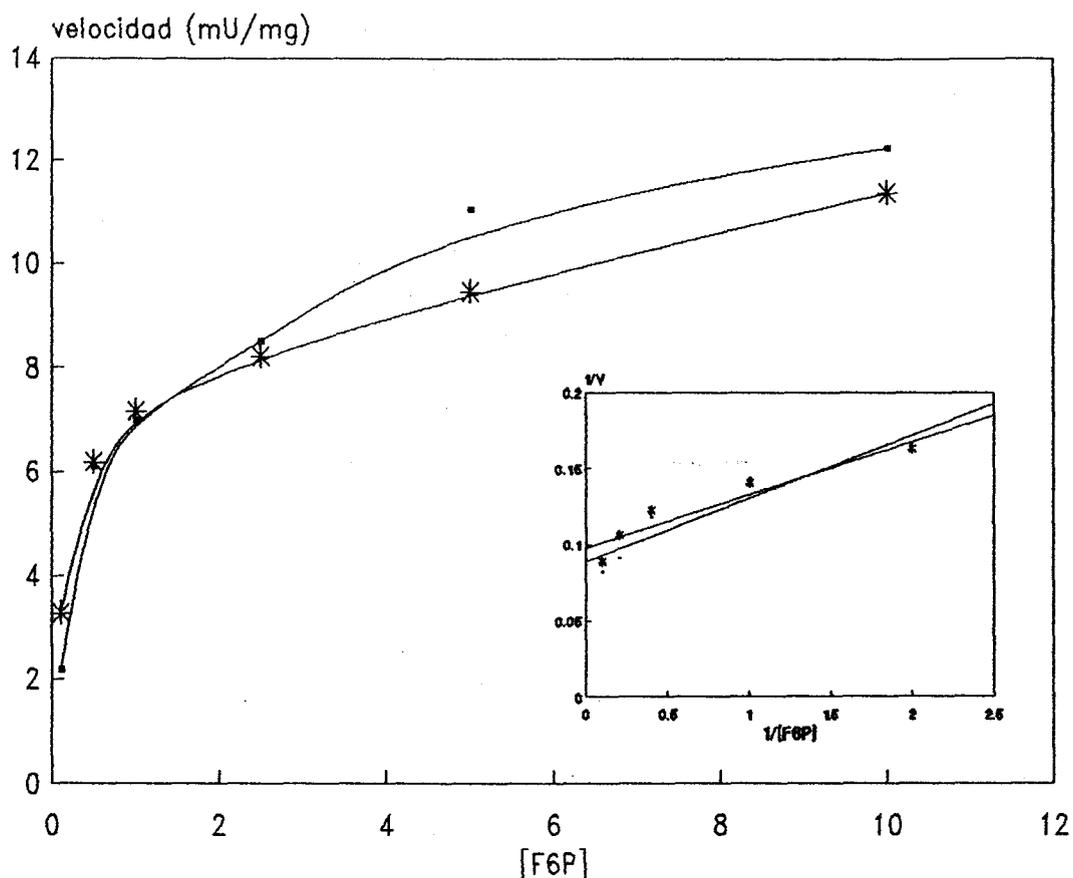
SUSTRATO PEP (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN H de C
0.01	2.56 ± 0.58 (10)	3.63 ± 1.16 (7)
0.05	16.30 ± 1.92 (11)	24.72 ± 5.84 (7)
0.1	30.87 ± 3.70 (13)	40.14 ± 8.19 (7)
0.25	44.85 ± 3.88 (13)	53.35 ± 8.61 (7)
0.5	49.66 ± 3.35 (15)	55.74 ± 8.51 (7)
10	64.84 ± 3.47 (15)	68.04 ± 7.33 (7)
Km (mM)	0.130 ± 0.01 (10)	0.080 ± 0.02 (7) <sup>*</sup>
Vmax (mU/mg)	65.20 ± 7.30 (10)	68.14 ± 13.41 (7)

FIG 4.13.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono (---\*---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.162 mM y 71.58 mU/mg para los controles y 0.088 mM y 70.27 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.02.



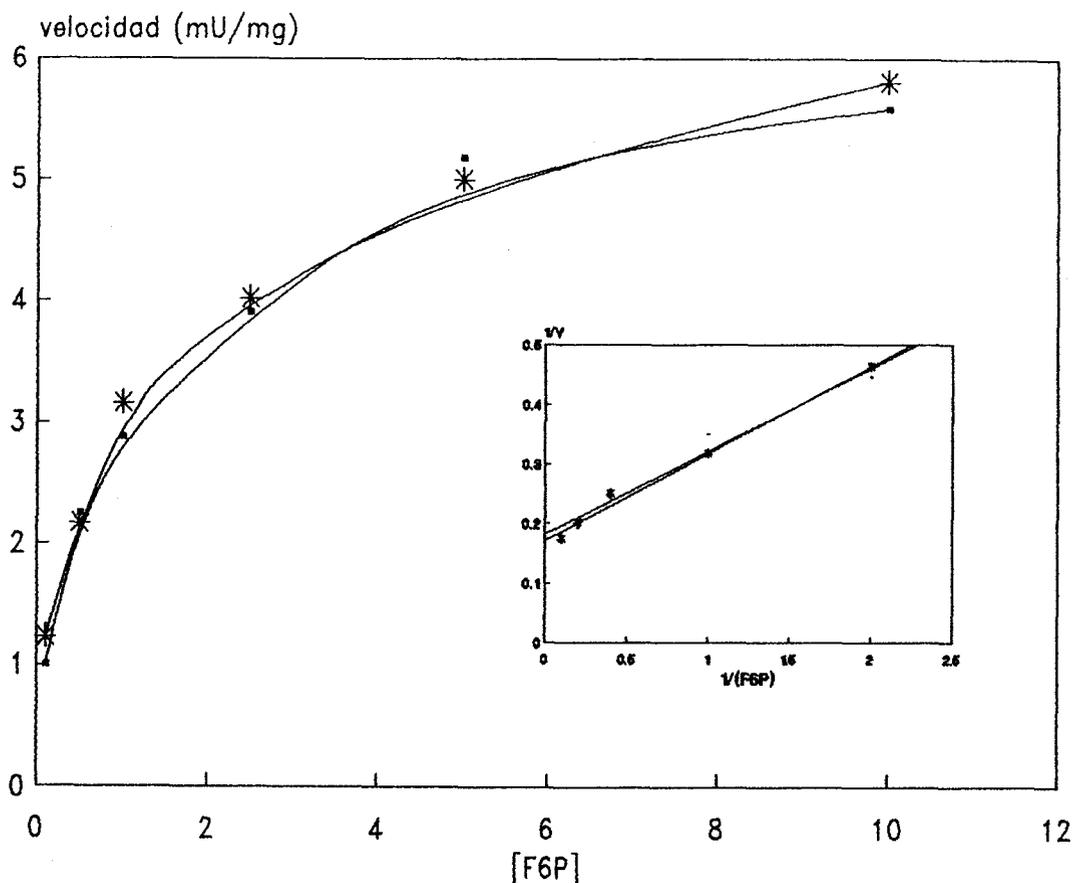
SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN H de C
PEP (mM)		
0.01	31.97 ± 5.39 (9)	23.96 ± 5.06 (8)
0.05	162.70 ± 12.65 (11)	122.35 ± 8.75 (8)
0.1	216.83 ± 11.43 (12)	193.31 ± 7.27 (9)
0.25	255.24 ± 14.69 (12)	243.28 ± 10.38 (9)
0.5	268.72 ± 12.71 (12)	256.02 ± 11.28 (9)
10	280.12 ± 10.92 (12)	264.50 ± 13.79 (9)
Km (mM)	0.049 ± 0.004 (12)	0.055 ± 0.005 (9)
Vmax (mU/mg)	290.60 ± 22.45 (12)	280.50 ± 26.76 (9)

FIG 4.14.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono (---\*---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.038 mM y 290.69 mU/mg para los controles y 0.066 mM y 293.60 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO	DIETAS	
	F6P(mM)	CONTROL
0.1	2.18 ± 0.43 (10)	3.28 ± 0.61 (7)
0.5	6.10 ± 0.91 (10)	6.17 ± 0.49 (7)
1	7.00 ± 0.56 (10)	7.15 ± 0.37 (7)
2.5	8.50 ± 0.53 (10)	8.22 ± 0.30 (7)
5	11.05 ± 0.43 (10)	9.46 ± 0.31 (7)
10	12.24 ± 0.71 (10)	11.38 ± 0.42 (7)
Km (mM)	0.65 ± 0.06 (10)	0.36 ± 0.03 (7)*
Vmax (mU/mg)	12.20 ± 1.20 (10)	10.50 ± 0.80 (7)

FIG 4.15.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en carbohidratos (---\*---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.468 mM y 11.28 mU/mg para los controles y 0.356 mM y 10.23 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.005.



SUSTRATO	DIETAS	
	F6P (mM)	CONTROL
0.1	1.00 ± 0.33 (10)	1.23 ± 0.44 (7)
0.5	2.25 ± 0.49 (10)	2.17 ± 0.51 (7)
1	2.87 ± 0.31 (10)	3.16 ± 0.66 (7)
2.5	3.90 ± 0.37 (10)	4.02 ± 0.69 (7)
5	5.18 ± 0.29 (10)	5.00 ± 0.57 (7)
10	5.58 ± 0.42 (10)	5.80 ± 0.64 (7)
Km (mM)	0.98 ± 0.15 (10)	0.89 ± 0.16 (7)
Vmax (mU/mg)	5.99 ± 0.86 (10)	5.99 ± 1.17 (7)

FIG 4.16.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE RIÑÓN TRUCHA .Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono (---\*---). Los datos son la media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax, obtenidas fueron 0.769 mM y 5.52 mU/mg para los controles y 0.847 mM y 5.82 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

significativos en la velocidad máxima. Este comportamiento cinético provoca una disminución significativa de la Km del enzima para la fructosa 6-fosfato del orden del 40%.

En riñón, sin embargo, no aparecen diferencias, ni a nivel de la Km ni de la velocidad máxima (FIG. 4.16), entre los animales controles y los alimentados con la dieta rica en glúcidos.

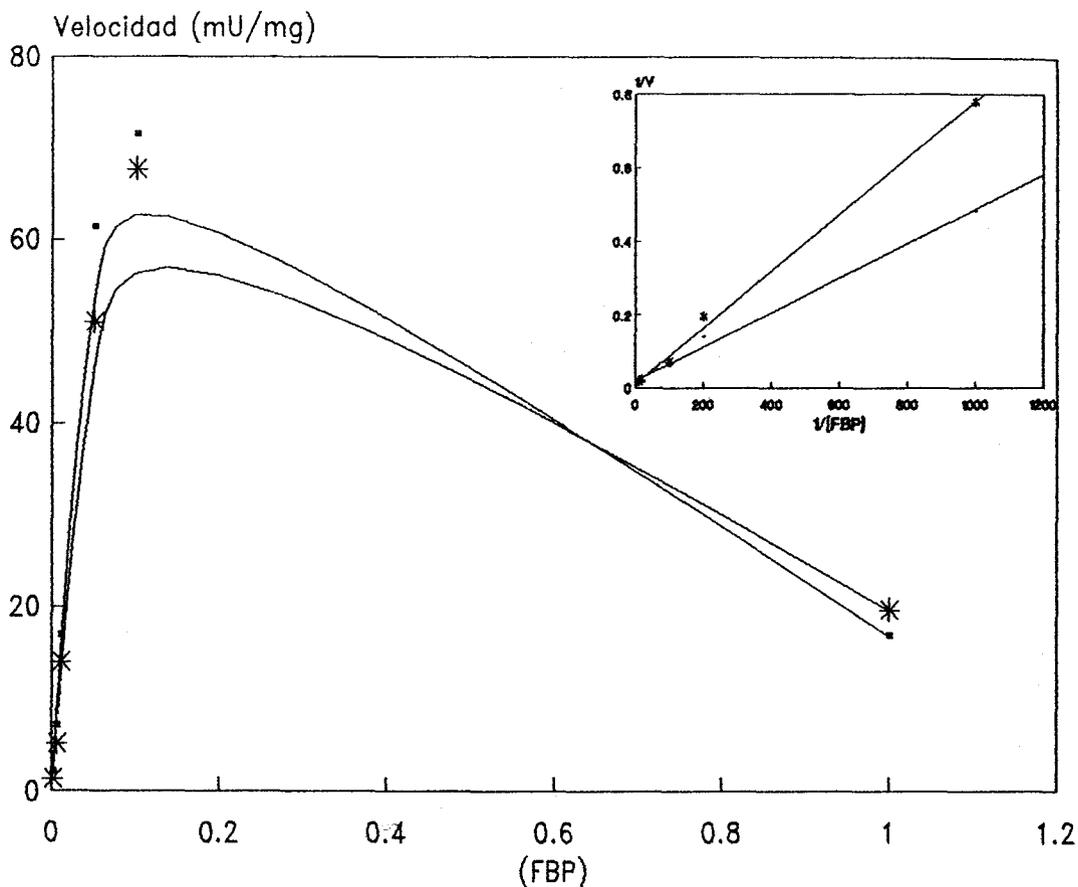
#### B- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA

La dieta rica en hidratos de carbono parece no provocar ningún cambio en este enzima ya que en ninguno de los parámetros cinéticos analizados aparecen diferencias significativas entre los animales controles y los alimentados con la dieta hiperglucídica (FIG 4.17), si bien, aparece cierta tendencia a la inhibición, aunque no significativa, en la actividad del enzima hepático a concentraciones subsaturantes de sustrato.

En riñón, no se aprecian cambios significativos ni a velocidad máxima ni en la Km de los animales alimentados con la dieta alta en carbohidratos(FIG.4.18.).

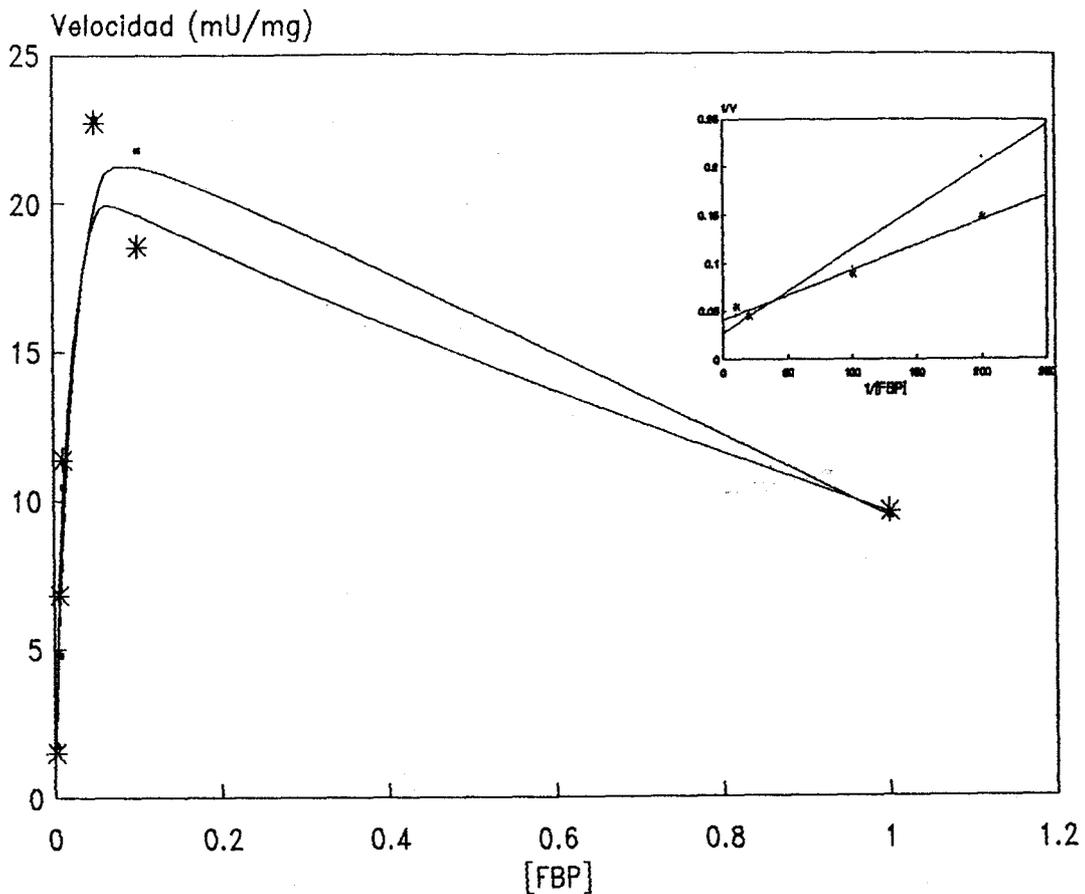
#### C- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Según los resultados que se muestran en la FIG 4.19. para hígado y la FIG 4.20. para riñón el comportamiento de la G6PDH parece no presentar ningún tipo de modificación al aumento de los hidratos de carbono en la dieta ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros cinéticos obtenidos entre esta dieta y los controles.



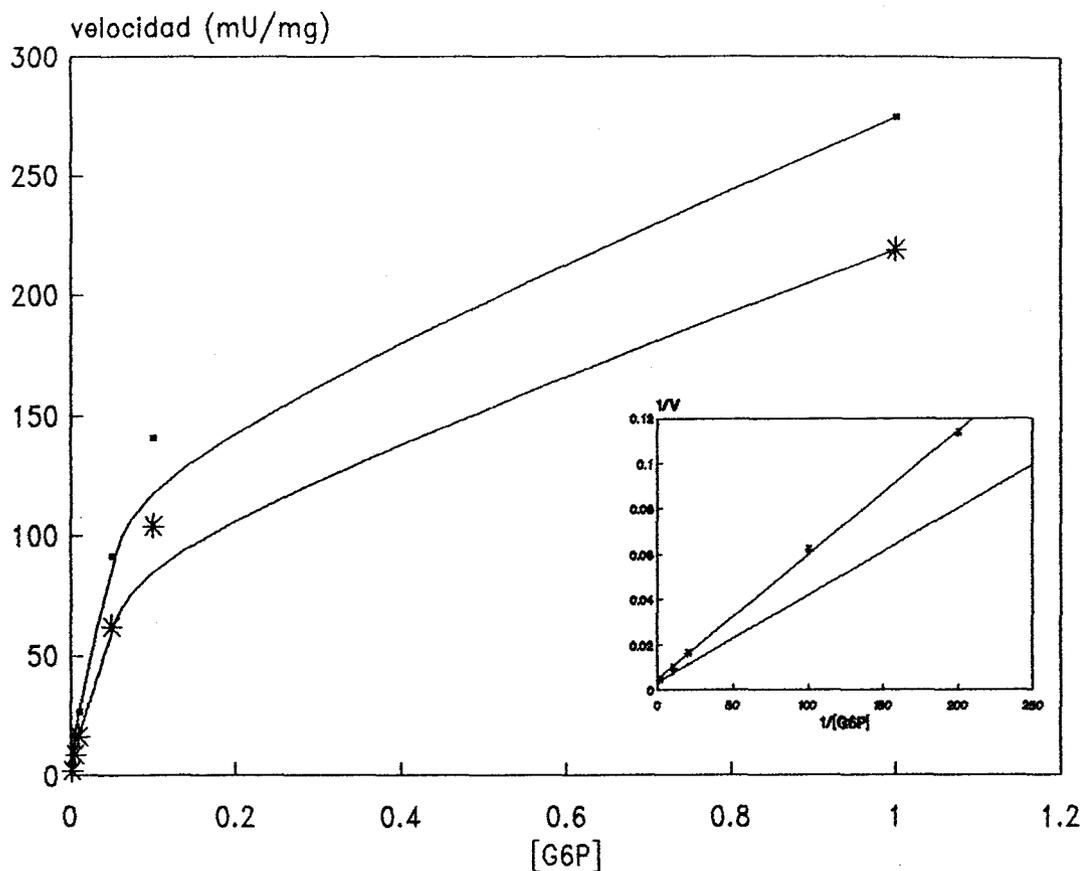
SUSTRATO	DIETAS	
F 1,6-P (mM)	CONTROL	ALTA EN H de C
0.001	2.09 ± 0.84 (13)	1.29 ± 0.99 (8)
0.005	7.07 ± 1.55 (12)	5.20 ± 0.97 (8)
0.01	16.90 ± 2.25 (13)	14.02 ± 1.46 (8)
0.05	61.33 ± 5.31 (14)	51.01 ± 4.92 (8)
0.1	71.43 ± 5.62 (12)	67.62 ± 4.07 (8)
1	16.83 ± 3.18 (12)	19.71 ± 2.62 (8)
Km (mM)	0.046 ± 0.005(12)	0.067 ± 0.016(8)
Vmax (mU/mg)	108.10 ± 11.75(12)	114.80 ± 27.89(8)

FIG 4.17.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN HIGADO DE TRUCHA Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono(---\*---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.034 mM y 72.46 mU/mg para los controles y 0.076 mM y 99.01 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



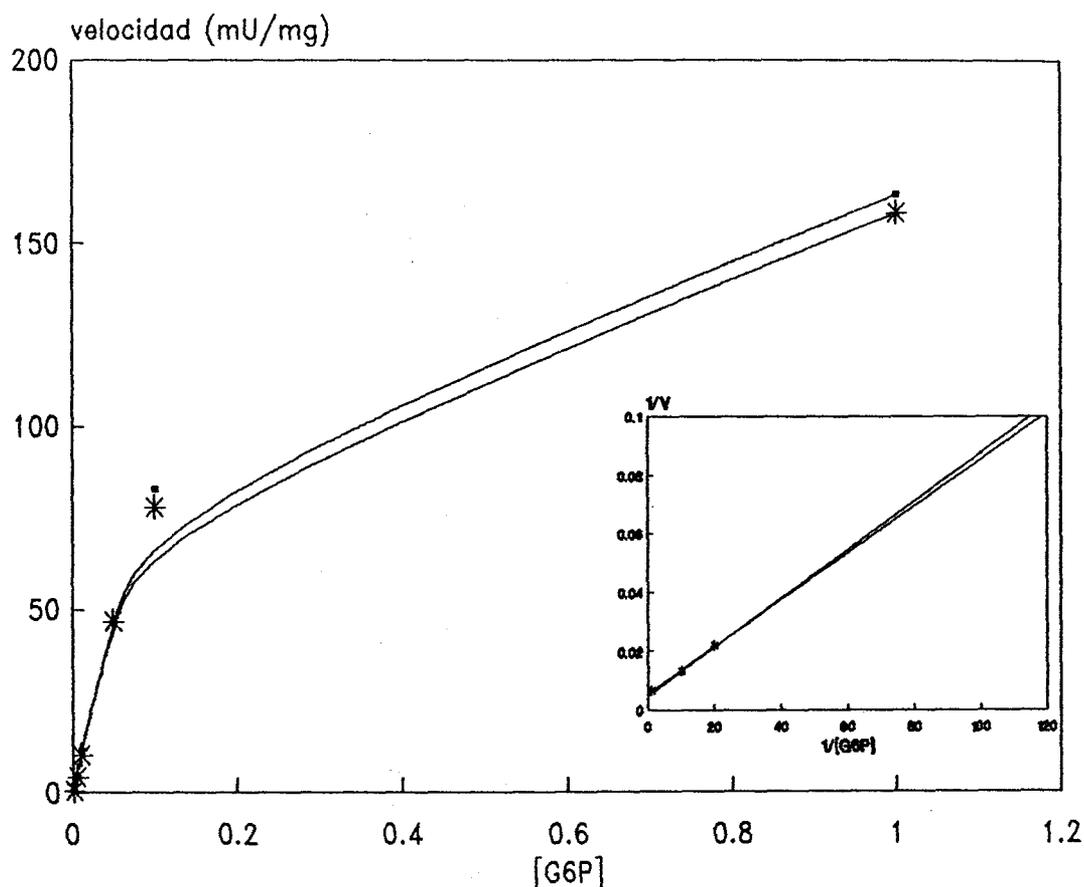
SUSTRATO	DIETAS	
	F 1,6-P (mM)	CONTROL
0.001	1.76 ± 0.52 (13)	1.49 ± 0.31 (7)
0.005	4.77 ± 1.07 (14)	6.80 ± 0.60 (7)
0.01	10.45 ± 1.08 (15)	11.37 ± 0.64 (8)
0.05	22.86 ± 1.79 (13)	22.72 ± 1.17 (9)
0.1	21.78 ± 3.04 (15)	18.53 ± 2.20 (9)
1	9.43 ± 0.86 (14)	9.54 ± 0.71 (9)
Km (mM)	0.025 ± 0.004 (13)	0.018 ± 0.002 (7)
Vmax (mU/mg)	33.39 ± 5.98 (13)	31.15 ± 3.35 (7)

FIG 4.18.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentadas con una dieta alta en hidratos de carbono(---\*---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.054 mM y 58.48 mU/mg para los controles y 0.018 mM y 31.25 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO G6P (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN H de C
0.001	4.20 ± 0.06 (8)	2.02 ± 0.90 (7)
0.005	16.63 ± 1.94 (14)	8.84 ± 1.86 (7)
0.01	26.54 ± 3.08 (14)	16.20 ± 2.71 (7)
0.05	91.35 ± 12.90 (16)	62.22 ± 6.42 (7)
0.1	140.37 ± 12.32 (16)	104.11 ± 8.41 (7)
1	274.12 ± 19.88 (16)	218.59 ± 10.32 (7)
Km (mM)	0.115 ± 0.013 (14)	0.140 ± 0.0233(7)
Vmax (mU/mg)	305.6 ± 34.5 (14)	249.7 ± 43.8 (7)

FIG 4.19.-EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono(---\*---). Los datos media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.118 mM y 305.81 mU/mg para los controles y 0.141 mM y 243.90 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO	DIETAS	
	G6P (mM)	CONTROL
0.001	0.63 ± 0.36 (9)	0.42 ± 0.41 (8)
0.005	4.68 ± 0.88 (10)	4.25 ± 1.69 (8)
0.01	11.43 ± 1.24 (13)	10.07 ± 2.43 (8)
0.05	46.63 ± 5.61 (11)	46.54 ± 5.89 (8)
0.1	82.84 ± 7.96 (15)	77.80 ± 6.31 (8)
1	162.99 ± 10.20 (14)	158.16 ± 8.28 (8)
Km (mM)	0.135 ± 0.016 (11)	0.138 ± 0.022 (8)
Vmax (mU/mg)	185.5 ± 21.36 (11)	181.4 ± 32.60 (8)

FIG 4.20.—EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono(—\*—). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.177 mM y 212.77 mU/mg para los controles y 0.151 mM y 188.86 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

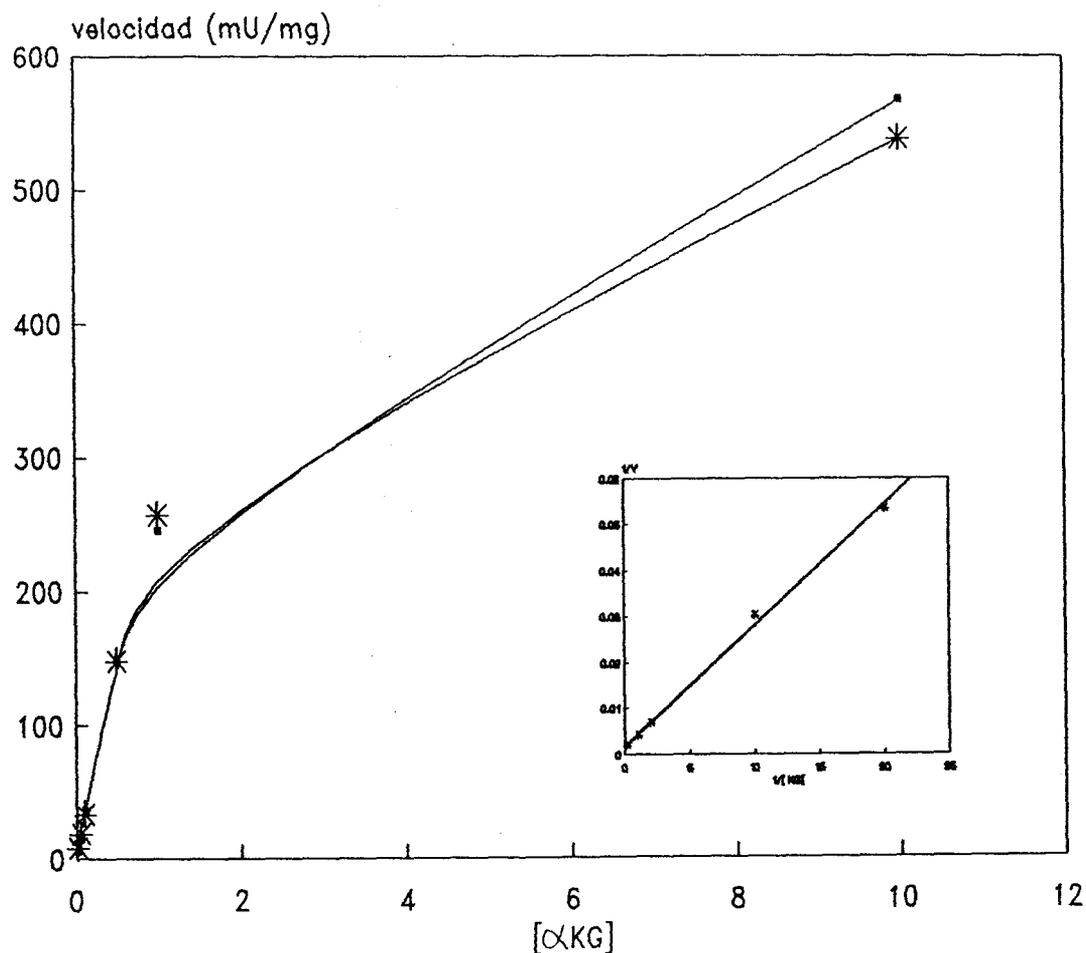
## 4.2.3- ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO PROTEICO

### A- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA

Debido al escaso aporte proteico que se les suministra a los animales alimentados con esta dieta era de esperar un drástico descenso en la actividad GDH , si bien, nuestros datos experimentales (FIG 4.21. para el hígado y FIG 4.22. para el riñón) no se aprecian diferencias , ni a velocidad máxima ni a velocidad subsaturante, entre la actividad obtenida en los animales controles y los alimentados con la dieta alta en carbohidratos.

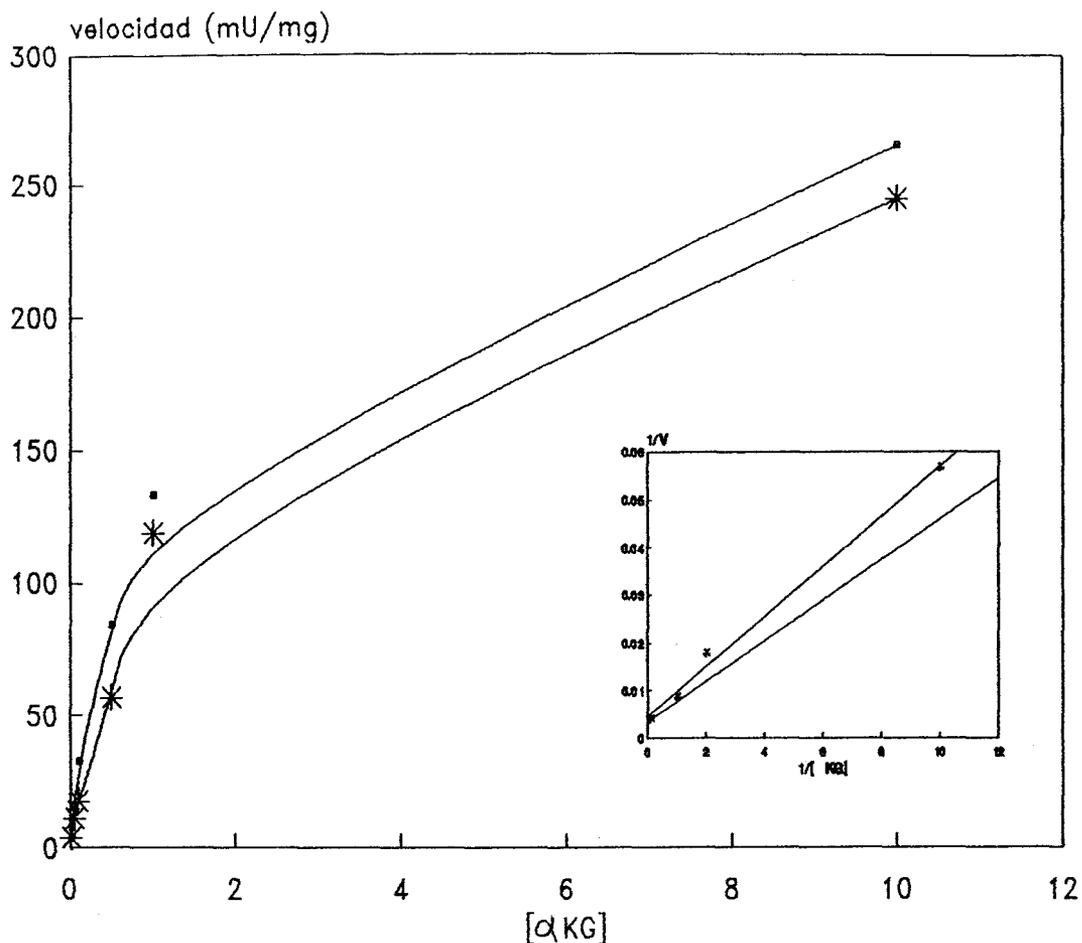
### B- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA.

El comportamiento que sigue la AAT frente a esta situación nutritiva es parecido al descrito para la GDH. En la FIG 4.23. aparecen los datos correspondientes a hígado y en la FIG 4.24 los obtenidos para riñón de los animales alimentados con la dieta rica en hidratos de carbono. Según los datos obtenidos no se observan diferencias entre el comportamiento cinético del enzima ensayado en los animales alimentados con una u otra dieta.



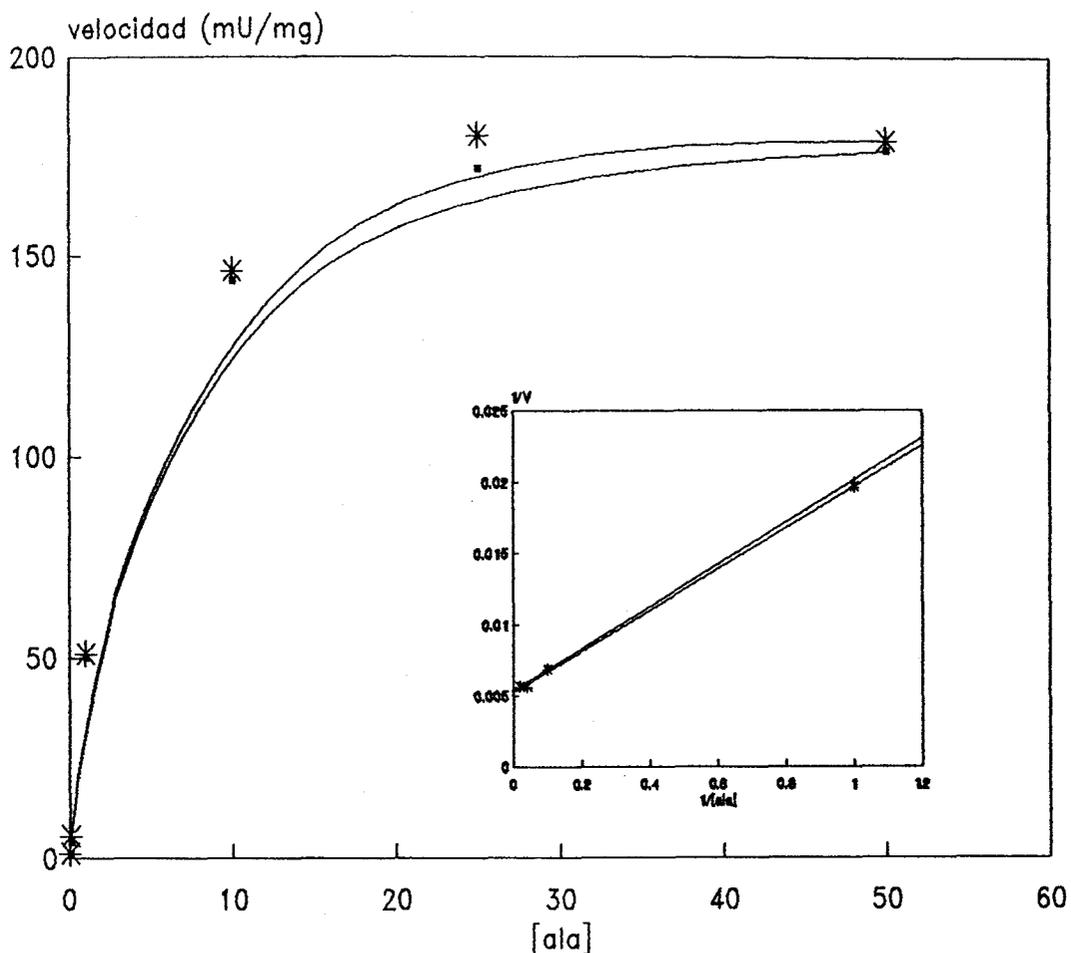
SUSTRATO $\alpha$ -KG (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN H de C
0.01	5.17 $\pm$ 1.53 (20)	8.54 $\pm$ 2.25 (9)
0.05	16.00 $\pm$ 3.37 (20)	18.69 $\pm$ 3.25 (9)
0.1	35.94 $\pm$ 8.55 (20)	33.34 $\pm$ 5.79 (9)
0.5	148.78 $\pm$ 28.29 (20)	148.39 $\pm$ 28.25 (9)
1	245.28 $\pm$ 38.57 (20)	256.98 $\pm$ 34.18 (9)
10	566.03 $\pm$ 78.81 (20)	536.94 $\pm$ 48.25 (9)
Km (mM)	1.72 $\pm$ 0.35 (20)	1.68 $\pm$ 0.28 (9)
Vmax (mU/mg)	663.4 $\pm$ 116.1 (20)	617.6 $\pm$ 100.7 (9)

FIG 4.21.-EFECTO DEL  $\alpha$ -CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DEHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta carbohidratos (---\*---). Los datos son media  $\pm$  SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas, La Km y Vmax obtenidas fueron 1.80 mM y 681.66 mU/mg para los controles y 1.48 mM y 561.80 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



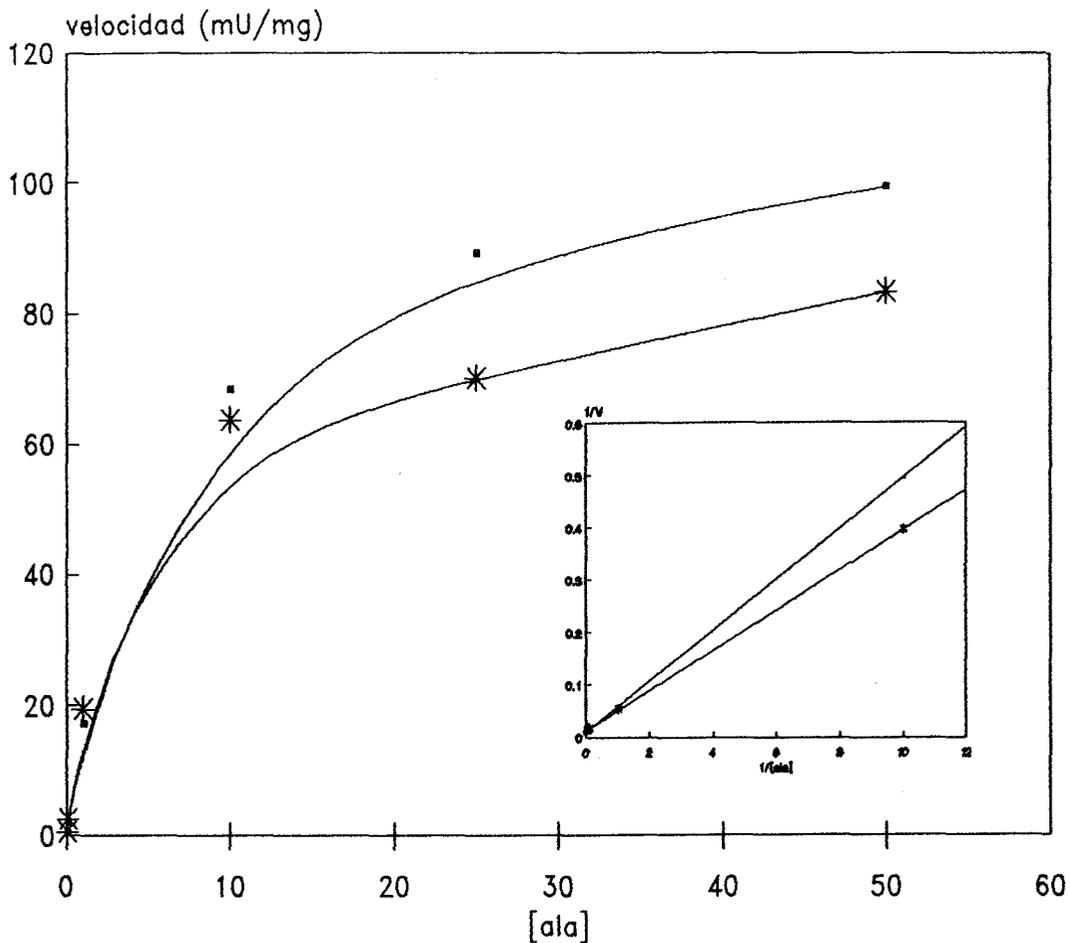
SUSTRATO	DIETAS	
$\alpha$ -KG (mM)	CONTROL	ALTA EN H de C.
0.01	3.63 $\pm$ 1.34 (12)	3.74 $\pm$ 2.01 (7)
0.05	15.17 $\pm$ 2.77 (12)	10.94 $\pm$ 4.16 (7)
0.1	32.35 $\pm$ 5.69 (12)	17.67 $\pm$ 2.41 (7)
0.5	84.25 $\pm$ 28.29 (12)	56.59 $\pm$ 6.57 (7)
1	132.81 $\pm$ 14.47 (12)	118.82 $\pm$ 17.11 (7)
10	265.02 $\pm$ 24.67 (12)	244.63 $\pm$ 21.83 (7)
Km (mM)	1.22 $\pm$ 0.16 (12)	1.58 $\pm$ 0.27 (7)
Vmax (mU/mg)	296.4 $\pm$ 37.4 (12)	284.5 $\pm$ 47.2 (7)

FIG 4.22.-EFECTO DEL  $\alpha$ -CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono (---\*---). Los datos son media  $\pm$  SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 1.28 mM y 299.85 mU/mg para los controles y 1.17 mM y 221.98 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO	DIETAS		
	ALA (mM)	CONTROL	ALTA EN H de C.
0.01		0.58 ± 0.47 (9)	1.20 ± 0.58 (9)
0.1		3.85 ± 0.81 (9)	5.51 ± 1.44 (9)
1		49.77 ± 6.33 (9)	50.94 ± 6.89 (9)
10		143.81 ± 15.10 (9)	146.49 ± 16.19 (9)
25		171.91 ± 18.52 (9)	180.14 ± 22.18 (9)
50		176.03 ± 19.54 (9)	178.75 ± 22.41 (9)
Km (mM)		2.87 ± 0.38 (9)	2.88 ± 0.43 (9)
Vmax (mU/mg)		187.9 ± 24.8 (9)	191.5 ± 28.7 (9)

FIG 4.23.—EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y alimentados con una dieta alta en hidratos de carbono(—\*—). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 2.75 mM y 186.57mU/mg para los controles y 2.80 mM y 191.94 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO ALA (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN H de C
0.01	0.55 ± 0.28 (10)	0.56 ± 0.32 (9)
0.1	2.02 ± 0.64 (10)	2.53 ± 0.72 (9)
1	17.17 ± 4.01 (10)	19.43 ± 3.98 (9)
10	68.35 ± 9.92 (10)	63.71 ± 12.15 (9)
25	89.13 ± 11.53 (10)	70.16 ± 13.97 (9)
50	99.27 ± 11.05 (10)	83.19 ± 14.47 (9)
Km (mM)	5.99 ± 1.12 (10)	5.56 ± 1.17 (9)
Vmax (mU/mg)	110.6 ± 20.7 (10)	95.4 ± 20.1 (9)

FIG 4.24.-EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en carbohidratos (---\*---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 5.14 mM y 105.82 mU/mg para los controles y 3.18 mM y 82.98 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

### 4.3.- ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE HIGADO Y RIÑÓN TRUCHA A LA DIETA DE ALTO CONTENIDO EN GRASA

#### 4.3.1.- INGESTA E INDICES BIOLÓGICOS DE UTILIZACIÓN DE LA DIETA

Por los datos expresados en la tabla 4.3., la dieta alta en grasa ha resultado ser la más positiva en cuanto a la mejora de los índices nutricionales. Tanto la ingesta

TABLA 4.3.- Influencia de la dieta alta en grasa (AG) sobre la ingesta, variación de peso e índices de conversión (IC) y utilización de la proteína para crecimiento (CEC).

	CONTROL (6)	DIETA A.G.(1)
Ingesta total (g)	1033.70	1442.55
Ingesta (g/100 g pez/día)	1.12	1.20
Proteína (g)	481.91	659.25
Peso inicial (g)	2750.00	3460.00
Peso final (g)	3411.00	4590.00
Incremento de peso (g)	661.00	1130.00
Incremento de peso (g/100 g pez/día)	0.72	0.94
I.C.	0.64	0.78
C.E.C.	1.37	1.71

Los valores son media de los grupos experimentales indicados en paréntesis. La ingesta se ha expresado como cantidad de alimento ingerido por 100g de animal y por día siendo el valor de ésta la media de la cantidad ingerida por los diferentes lotes experimentales sometidos al mismo tratamiento, habiendo sido tomados, tanto el peso como la ingesta el día quince del periodo experimental.

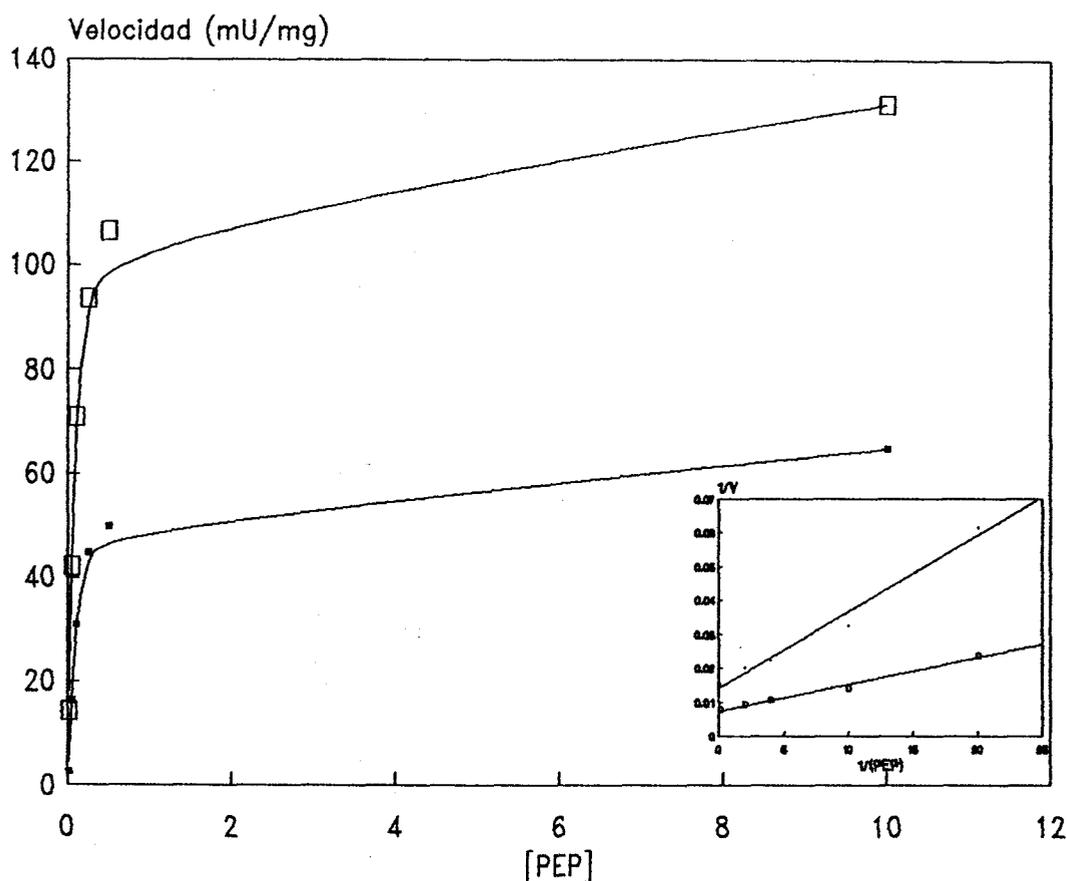
como los incrementos de peso son similares a los obtenidos para la dieta de alto contenido en proteína y mejores que los controles pero además muestran un índice de conversión, IC, mayor que los controles y ligeramente superior a la dieta alta en proteína, presentando un CEC sensiblemente mejor que los obtenidos para las otras dietas experimentales. En el caso de la dieta control, con el mismo nivel de proteína que la dieta alta en grasa, la diferencia que presentan el CEC puede deberse a que tanto el incremento de peso como la ingesta son mayores y por tanto la cantidad de proteína ingerida es mayor, al relacionarla con el aumento de peso parece que esta es utilizada preferentemente con fines estructurales y de producción de equivalentes de energía.

#### 4.3.2.-ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO GLUCIDICO

##### A- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA Y FOSFOFRUCTOQUINASA

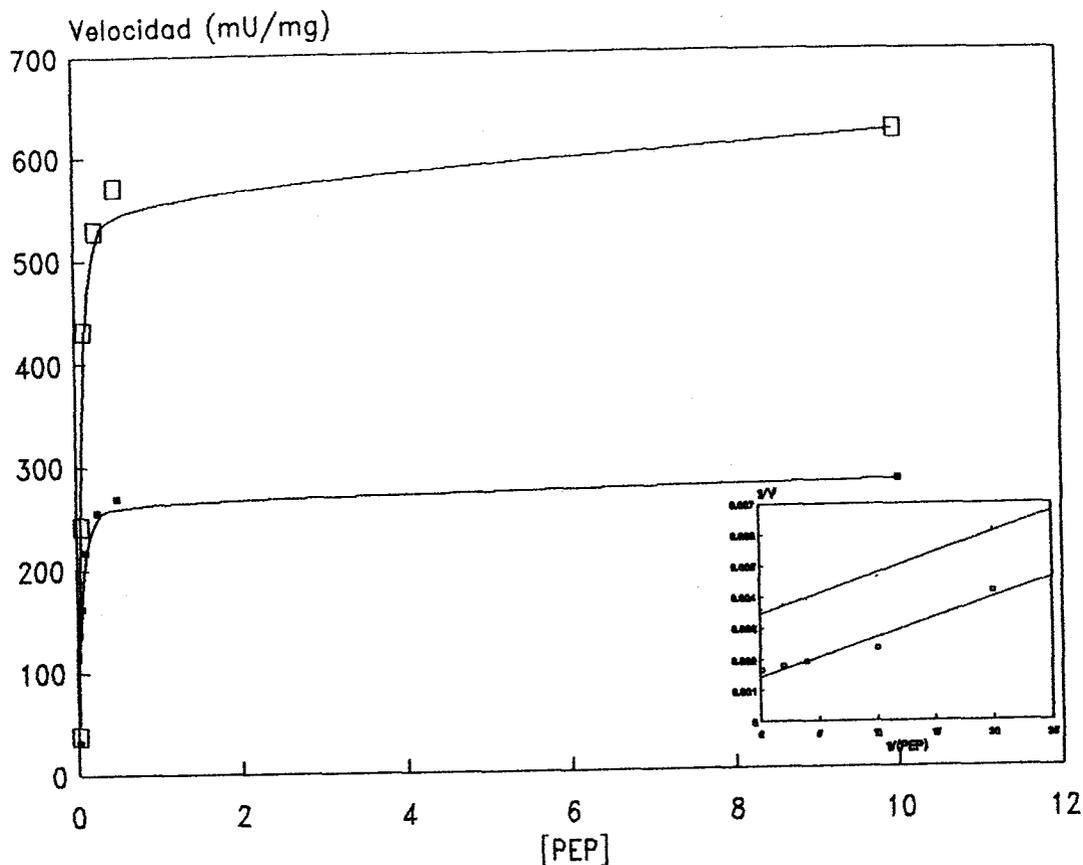
Sin embargo bajo nuestras condiciones experimentales aparece un claro pero significativo aumento, tanto en hígado (100%) como en riñón (120%), de la actividad PK a lo largo de toda la curva de saturación, no encontrándose diferencias significativas para la Km ni en hígado ni en riñón (FIG. 4.25. para el hígado y FIG. 4.26. para riñón)

Para la PFK, los datos de la literatura científica muestran que la administración de una dieta rica en grasa afecta negativamente su actividad ya que bajo estas condiciones produce un acúmulo de citrato que actúa como inhibidor del enzima. Sin embargo, nosotros no observamos diferencias significativas en los valores obtenidos para el enzima entre los animales alimentados con la dieta control o con la dieta alta en grasa (FIG 4.27.). Tampoco en riñón hemos encontrado variación en la actividad del enzima de los animales sometidos a estos tratamientos, si bien aparece cierta disminución en los valores de la Km



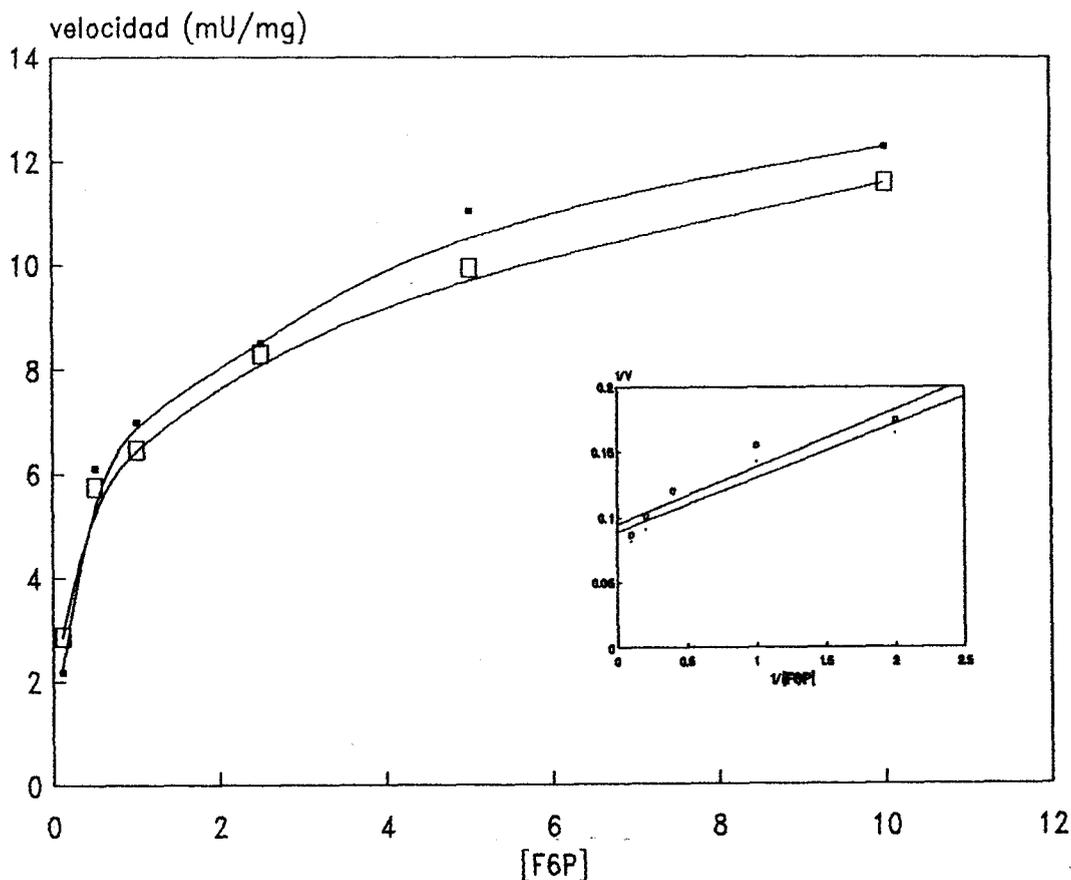
SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN GRASA
PEP (mM)		
0.01	2.56 ± 0.58 (10)	14.19 ± 3.88 (8)
0.05	16.30 ± 1.92 (11)	42.09 ± 2.14 (7)
0.1	30.87 ± 3.70 (13)	70.80 ± 5.29 (7)
0.25	44.85 ± 3.88 (13)	93.58 ± 10.19 (7)
0.5	49.66 ± 3.35 (15)	106.39 ± 9.72 (8)
10	64.84 ± 3.47 (15)	131.14 ± 14.36 (8)
Km (mM)	0.130 ± 0.01 (10)	0.100 ± 0.01 (7)*
Vmax (mU/mg)	65.20 ± 7.30 (10)	130.50 ± 15.41 (7)

FIG 4.25.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y alimentados con una dieta alta en grasa (—□—). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.162 mM y 71.58 mU/mg para los controles y 0.107 mM y 134.99 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.001.



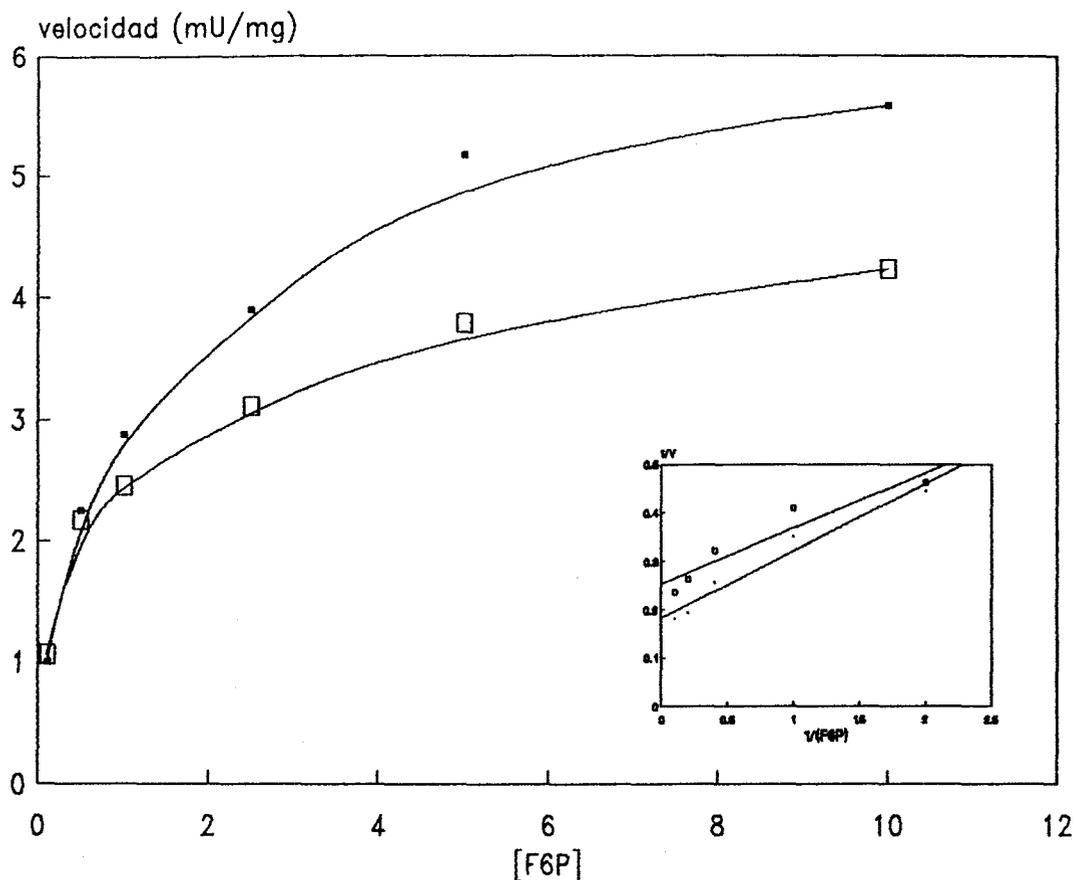
SUSTRATO PEP (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN GRASA
0.01	31.97 ± 5.39 (9)	38.06 ± 6.45 (7)
0.05	162.70 ± 12.65 (11)	241.38 ± 30.10 (7)
0.1	216.83 ± 11.43 (12)	431.35 ± 26.79 (7)
0.25	255.24 ± 14.69 (12)	529.07 ± 41.78 (7)
0.5	268.72 ± 12.71 (12)	570.68 ± 48.25 (7)
10	280.12 ± 10.92 (12)	619.28 ± 50.49 (7)
Km (mM)	0.049 ± 0.004(12)	0.066 ± 0.008(9)*
Vmax (mU/mg)	290.60 ± 22.45 (12)	645.60 ± 77.64 (7)

FIG 4.26.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos representados son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.038 mM y 290.69mU/mg para los controles y 0.088 mM y 696.86 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.0001.



SUSTRATO	DIETAS		
	F6P (mM)	CONTROL	ALTA EN GRASA
0.1		2.18 ± 0.43 (10)	2.85 ± 0.69 (6)
0.5		6.10 ± 0.91 (10)	5.75 ± 0.85 (6)
1		7.00 ± 0.56 (10)	6.46 ± 0.99 (6)
2.5		8.50 ± 0.53 (10)	8.29 ± 0.46 (5)
5		11.05 ± 0.43 (10)	9.95 ± 0.81 (6)
10		12.24 ± 0.71 (10)	11.55 ± 1.05 (5)
Km (Mm)		0.65 ± 0.06 (10)	0.56 ± 0.07 (6)
Vmax (mU/mg)		12.20 ± 1.20 (10)	11.20 ± 1.40 (6)

FIG 4.27.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE HIGADO DE TRUCHA. Las curvas de saturación muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.468 mM y 11.28 mU/mg para los controles y 0.464 mM y 10.55 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO	DIETAS	
	F6P (mM)	CONTROL
0.1	1.00 ± 0.33 (10)	1.06 ± 0.29 (7)
0.5	2.25 ± 0.49 (10)	2.17 ± 0.33 (7)
1	2.87 ± 0.31 (10)	2.45 ± 0.32 (7)
2.5	3.90 ± 0.37 (10)	3.11 ± 0.15 (5)
5	5.18 ± 0.29 (10)	3.80 ± 0.16 (5)
10	5.58 ± 0.42 (10)	4.23 ± 0.19 (5)
Km (mM)	0.98 ± 0.15 (10)	0.53 ± 0.06 (5)
Vmax (mU/min)	5.99 ± 0.86 (10)	4.20 ± 0.48 (5)

FIG 4.28.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE RIÑÓN TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son la media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax, obtenidas fueron 0.769 mM y 5.52 mU/mg para los controles y 0.454 mM y 3.95 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

en los animales que se alimentaron con la dieta alta en grasa aunque esta no es significativa (FIG 4.28.).

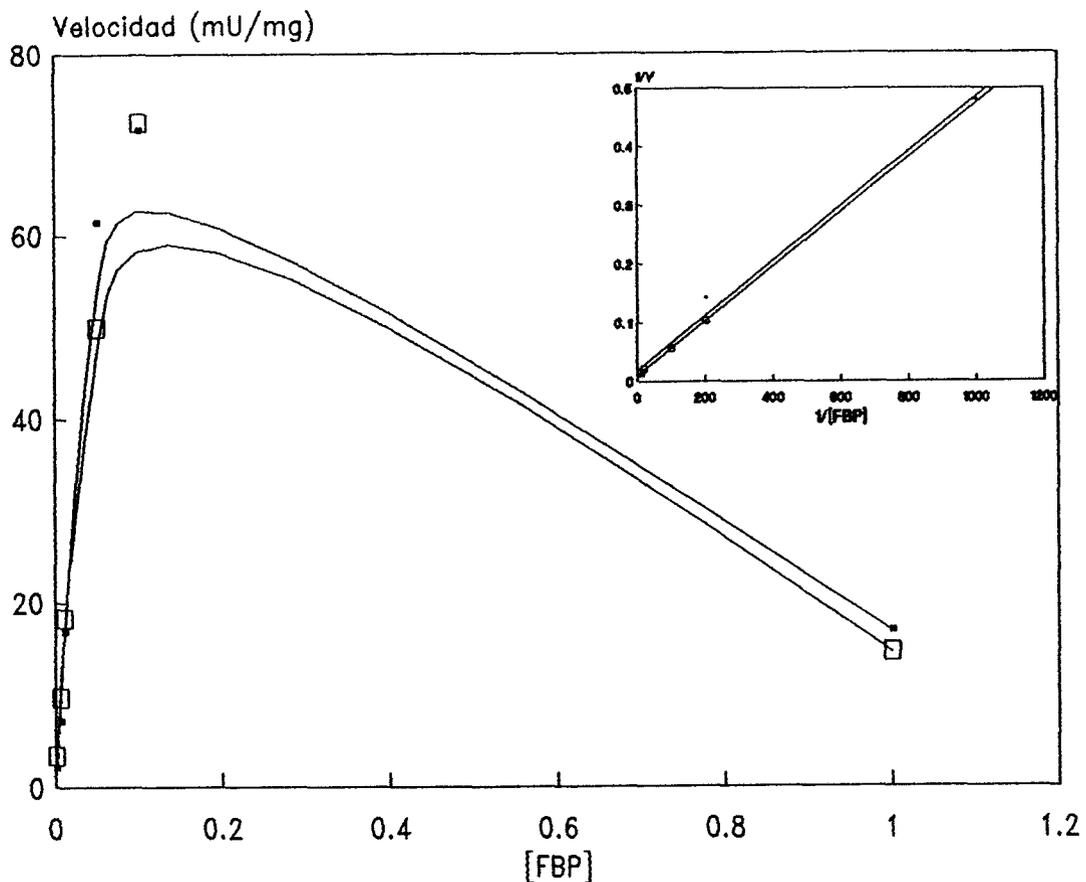
#### B- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA

En mamíferos la adición de grasa a la dieta estimula la gluconeogenesis mejorando la utilización de diferentes sustratos gluconeogenicos tales como la alanina, piruvato o lactato. Esta activación de la gluconeogénesis se debe a un aumento en los niveles de ATP, NADH y de acetyl-CoA que estimulan este proceso en diferentes puntos. Nosotros solo obtenemos un aumento significativo de la velocidad del enzima en riñon y a concentraciones de F, 1,6 P subsaturantes (FIG 4.29). En hígado, la actividad del enzima permanece constante sin que se aprecien cambios ni en la velocidad ni en la afinidad por su sustrato (FIG 4.30.).

#### C- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA, 6-FOSFATO DESHIDROGENASA

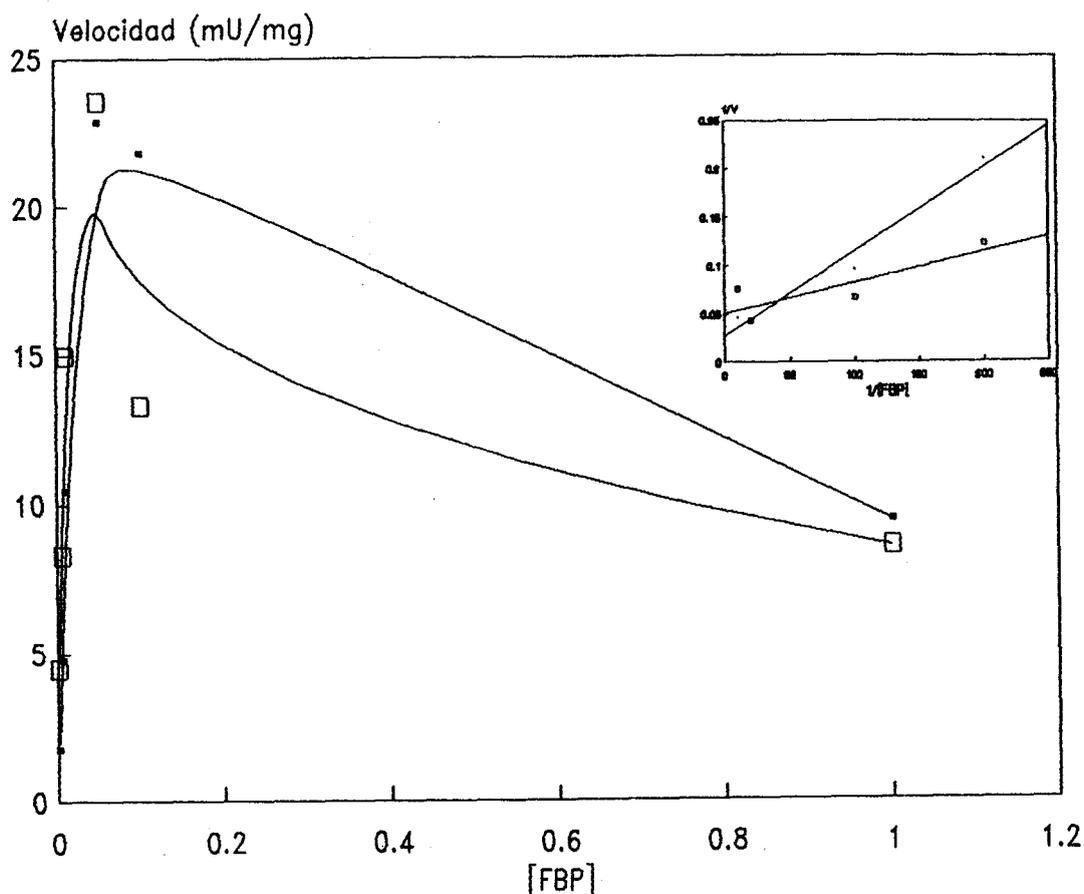
Como se ha descrito en el apartado 2.6.1., la administración de una dieta alta en grasa provoca una fuerte inhibición de los enzimas productores de NADPH: NADP-malato deshidrogenasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, NADP-isocitrato deshidrogenasa ( y con la consiguiente inhibición de la via de las pentosas fosfato). Los datos experimentales obtenidos en este trabajo muestran una disminución de la velocidad máxima del 55%, en el hígado de las truchas alimentadas con la dieta rica en lípidos (FIG 4.31.). En riñon por el contrario, no aparece ninguna variación de la velocidad máxima.

No hubo diferencias significativas entre los valores de la Km del enzima hepático y renal ,entre los controles y los animales mantenidos con la dieta rica en grasa.



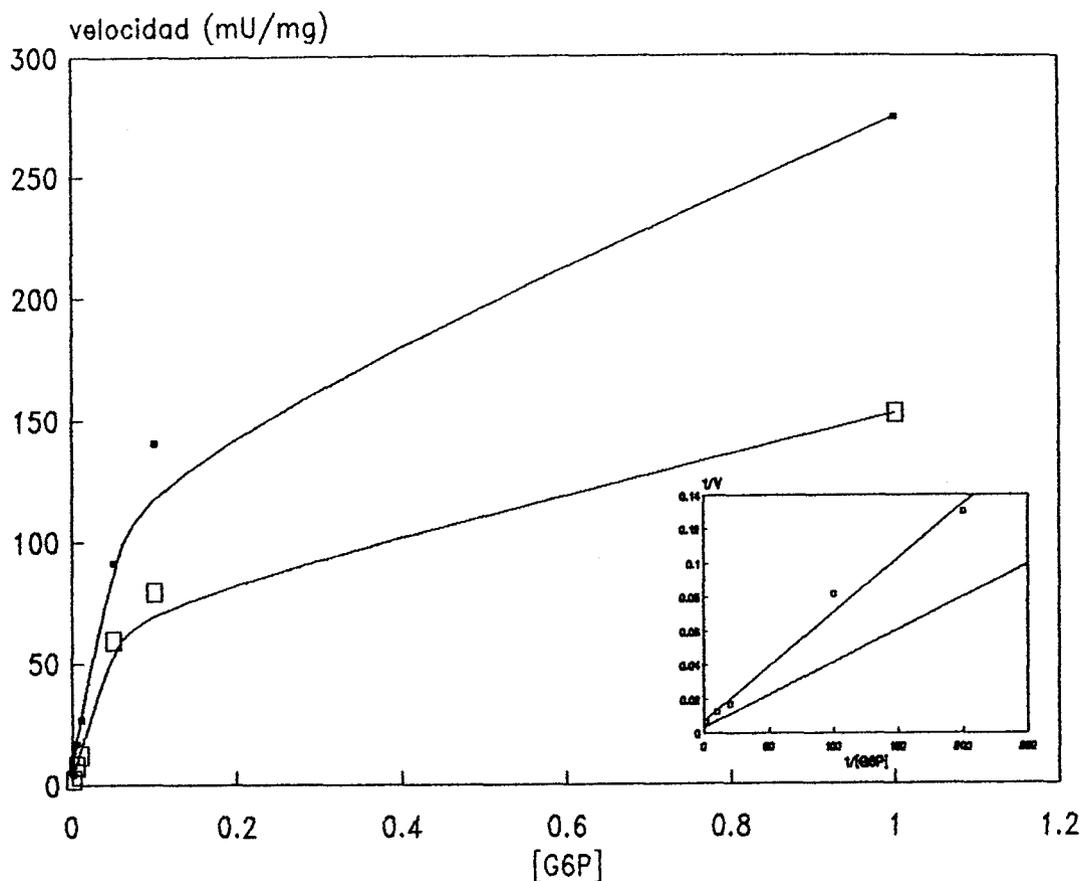
SUSTRATO	DIETAS	
F 1,6-P (mM)	CONTROL	ALTA EN GRASA
0.001	2.09 ± 0.84 (13)	3.36 ± 2.11 (4)
0.005	7.07 ± 1.55 (12)	9.72 ± 1.63 (4)
0.01	16.90 ± 2.25 (13)	18.26 ± 1.95 (7)
0.05	61.33 ± 5.31 (14)	49.85 ± 2.80 (7)
0.1	71.43 ± 5.62 (12)	72.34 ± 1.84 (7)
1	16.83 ± 3.18 (17)	14.57 ± 1.83 (7)
Km (mM)	0.046 ± 0.005(12)	0.058 ± 0.005(4)
Vmax (mU/mg)	108.10 ± 11.75(12)	112.80 ± 12.12(4)

FIG 4.29.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.034 mM y 72.46 mU/mg para los controles y 0.048 mM y 103.81 mU/mg para los animales sometidos la dieta.



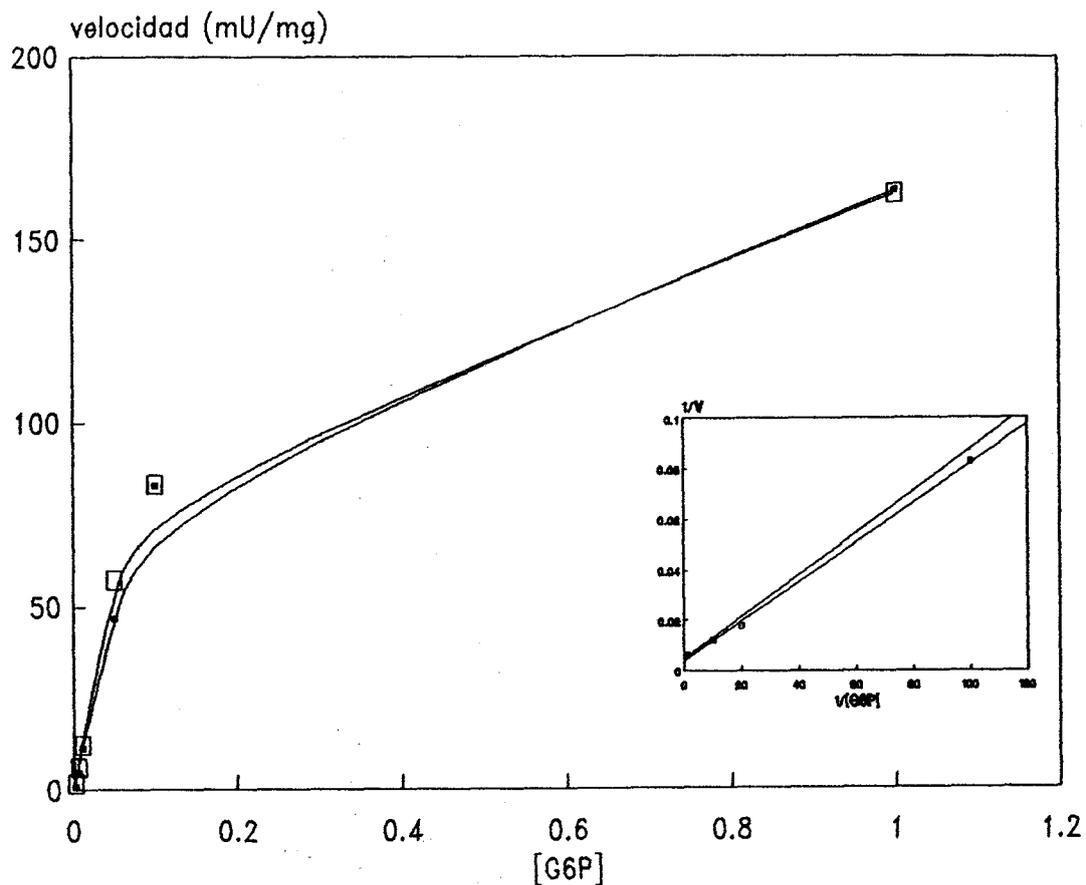
SUSTRATO	DIETAS	
F 1,6-P	CONTROL	ALTA EN GRASA .
0.001	1.76 ± 0.52 (13)	4.46 ± 0.95 (7)
0.005	4.77 ± 1.07 (14)	8.27 ± 1.09 (8)
0.01	10.45 ± 1.08 (15)	14.96 ± 1.94 (8)
0.05	22.86 ± 1.79 (13)	23.53 ± 0.79 (8)
0.1	21.78 ± 3.04 (15)	13.31 ± 0.98 (8)
1	9.43 ± 0.86 (14)	8.53 ± 0.79 (8)
Km(mM)	0.025 ± 0.004(13)	0.010 ± 0.001(8) *
Vmax (mU/mg)	33.39 ± 5.98 (13)	28.10 ± 3.36 (8)

FIG 4.30.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y animales alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.054 mM y 58.48 mU/mg para los controles y 0.015 mM y 34.48 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.01.



SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN GRASA
G6P (mM)		
0.001	4.20 ± 0.06 (8)	2.18 ± 0.96 (6)
0.005	16.63 ± 1.94 (14)	7.70 ± 2.80 (6)
0.01	26.54 ± 3.08 (14)	12.27 ± 2.95 (6)
0.05	91.35 ± 12.90 (16)	59.30 ± 6.78 (6)
0.1	140.37 ± 12.32 (16)	79.62 ± 5.93 (6)
1	274.12 ± 19.88 (16)	152.31 ± 8.78 (6)
Km (mM)	0.115 ± 0.013 (14)	0.102 ± 0.017 (6)*
Vmax (mU/mg)	305.6 ± 34.5 (14)	167.2 ± 28.2 (6)

FIG 4.31.--EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.118 mM y 305.81 mU/mg para los controles y 0.087 mM y 137.25 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.03.



SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN. GRASA
G6P (mM)		
0.001	0.63 ± 0.36 (9)	1.64 ± 0.49 (5)
0.005	4.68 ± 0.88 (10)	6.00 ± 1.50 (5)
0.01	11.43 ± 1.24 (13)	12.12 ± 2.52 (5)
0.05	46.63 ± 5.61 (11)	57.42 ± 4.41 (5)
0.1	82.84 ± 7.96 (15)	83.23 ± 5.85 (5)
1	162.99 ± 10.20 (14)	162.24 ± 8.35 (5)
Km (mM)	0.135 ± 0.016 (11)	0.118 ± 0.015 (5)
Vmax (mU/mg)	185.5 ± 21.36 (11)	180.1 ± 23.65 (5)

FIG 4.32.-EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN RIÑON DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.177 mM y 212.77 mU/mg para los controles y 0.103 mM y 173.76 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.

### 4.3.3- ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO PROTEICO

#### A- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA

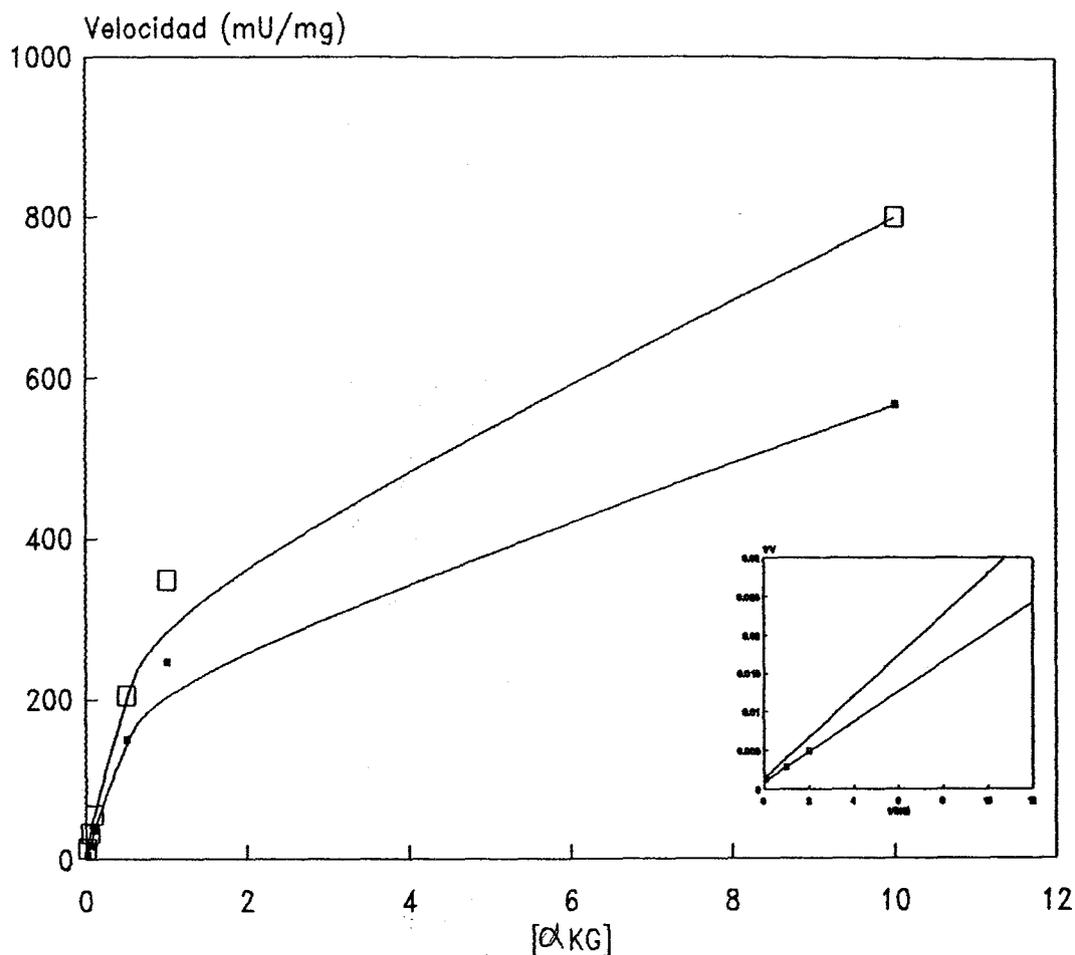
Los lípidos en la dieta reducen la tasa de utilización de la proteína con fines que no sean de síntesis y por tanto los niveles de desaminación se encontrarán disminuidos, pero este efecto metabólico no está claro. Nosotros no encontramos datos significativamente diferentes ni para la velocidad máxima ni para la  $K_m$  del enzima en riñón (FIG 4.34).

En hígado la  $V_{max}$  del enzima se incrementa con respecto al control aproximadamente un 40% aunque este aumento no fué estadísticamente significativo (FIG 4.33.)

#### B- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA.

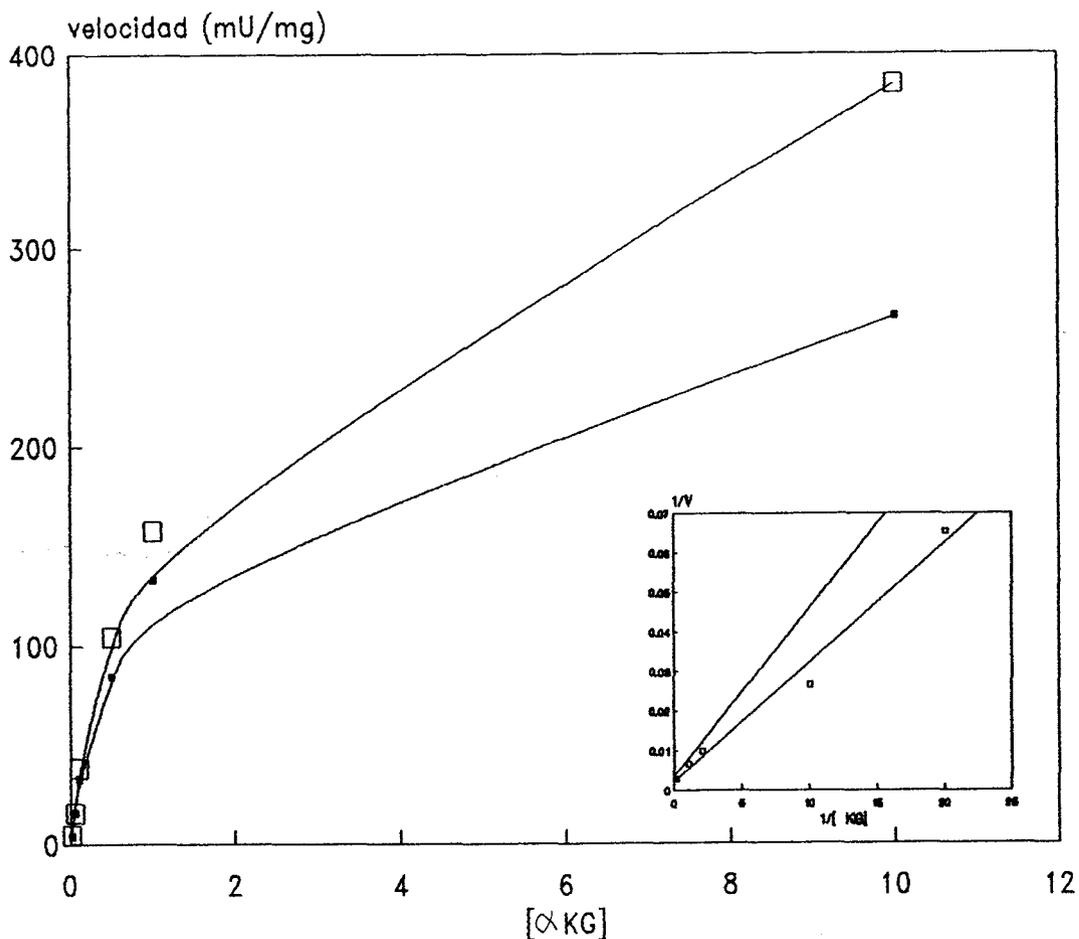
En la FIG 4.35. se representa la curva de actividad que sigue la AAT de hígado. Como se puede observar la actividad del enzima se incrementa a lo largo de toda la curva de saturación en un 100% sin que aparezcan variaciones significativas en la  $K_m$  del sistema para la alanina.

En riñón (FIG 4.36). no se observan cambios entre los parámetros cinéticos comparados ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) para los animales sometidos a estas dos condiciones nutritivas.



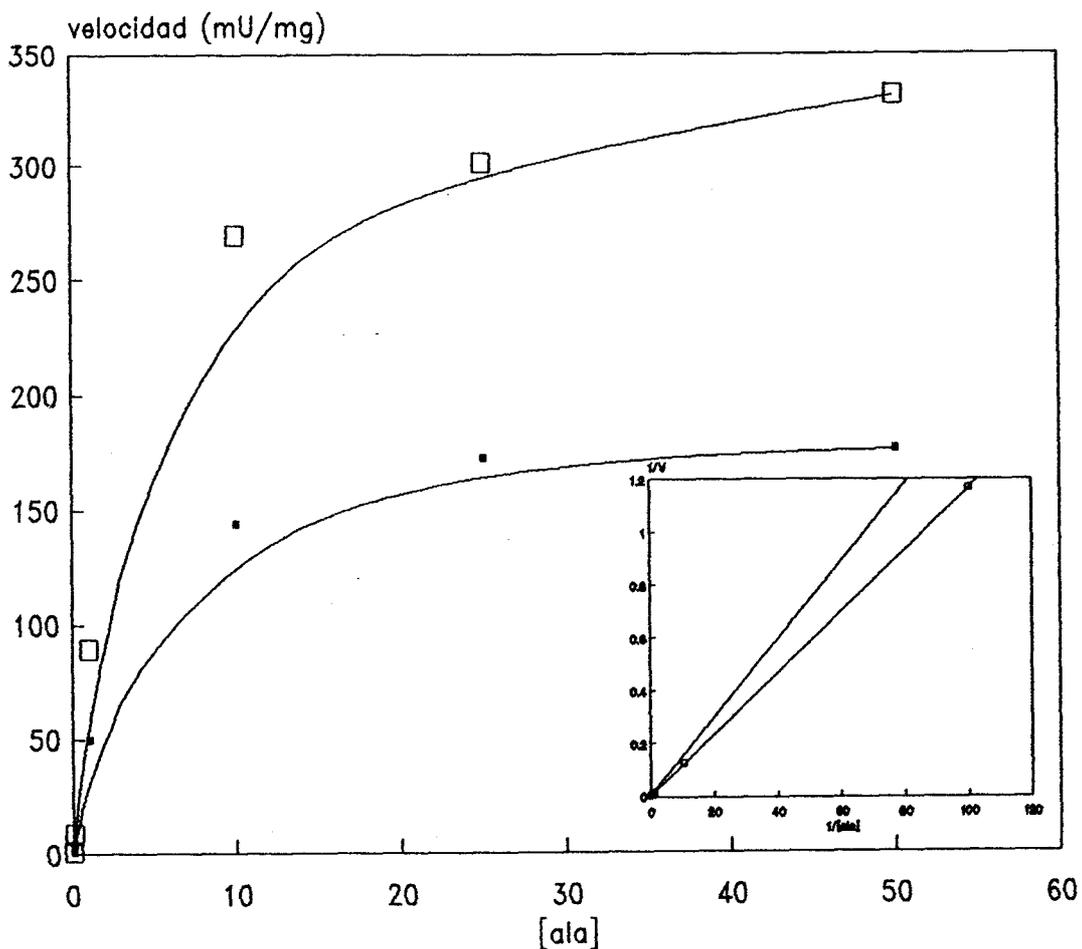
SUSTRATO α-KG (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN GRASA
0.01	5.17 ± 1.53 (20)	12.17 ± 3.63 (7)
0.05	16.00 ± 3.37 (20)	31.22 ± 9.92 (7)
0.1	35.94 ± 8.55 (20)	54.71 ± 7.61 (7)
0.5	148.78 ± 28.29 (20)	203.56 ± 23.69 (7)
1	245.28 ± 38.57 (20)	347.37 ± 36.94 (7)
10	566.03 ± 78.81 (20)	797.84 ± 77.76 (7)
Km (mM)	1.72 ± 0.35 (20)	1.72 ± 0.19 (7)
Vmax (mU/mg)	663.4 ± 116.1 (20)	935.6 ± 97.8 (7)

FIG 4.33.-EFECTO DEL  $\alpha$ -CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DEHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta grasa (---□---). Los datos son media  $\pm$  SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 1.80 mM y 681.66 mU/mg para los controles y 1.88 mM y 977.52 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



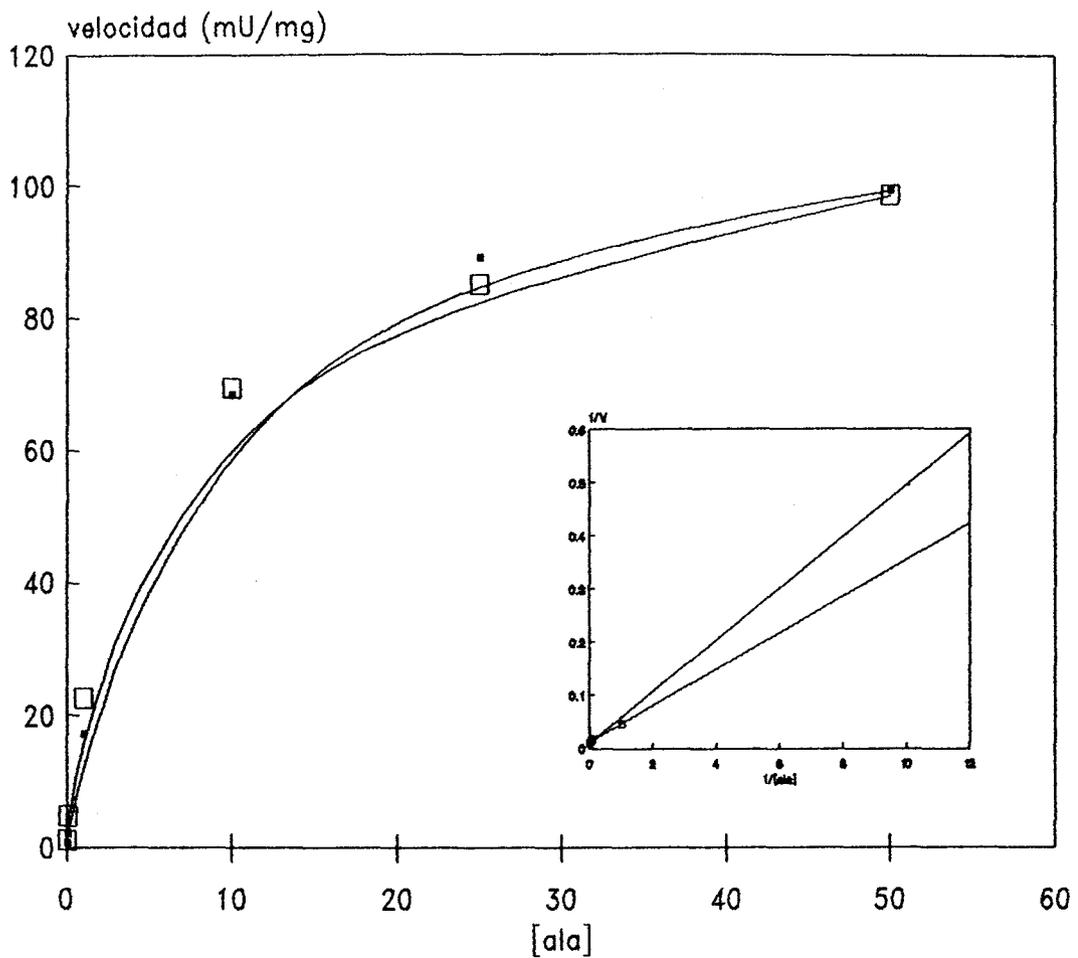
SUSTRATO $\alpha$ -KG (mM)	DIETAS	
	CONTROL	ALTA EN GRASA
0.01	3.63 $\pm$ 1.34 (12)	3.92 $\pm$ 3.92 (5)
0.05	15.17 $\pm$ 2.77 (12)	15.36 $\pm$ 2.33 (5)
0.1	32.35 $\pm$ 5.69 (12)	37.93 $\pm$ 5.32 (5)
0.5	84.25 $\pm$ 28.29 (12)	104.14 $\pm$ 10.19 (5)
1	132.81 $\pm$ 14.47 (12)	157.44 $\pm$ 9.14 (5)
10	265.02 $\pm$ 24.67 (12)	383.91 $\pm$ 37.09 (5)
Km (mM)	1.22 $\pm$ 0.16 (12)	1.43 $\pm$ 0.15 (5)
Vmax (mU/mg)	296.4 $\pm$ 37.4 (12)	424.6 $\pm$ 44.2 (5)

FIG 4.34.-EFECTO DEL  $\alpha$ -CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DEHIDROGENASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media  $\pm$  SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 1.28 mM y 299.85 mU/mg para los controles y 1.50 mM y 495.54 mU/mg para los animales sometidos a la dieta.



SUSTRATO	DIETAS	
	ALA (mM)	CONTROL
0.01	0.58 ± 0.47 (9)	0.86 ± 0.61 (9)
0.1	3.85 ± 0.81 (9)	8.04 ± 1.85 (9)
1	49.77 ± 6.33 (9)	88.96 ± 9.70 (9)
10	143.81 ± 15.10 (9)	268.99 ± 22.42 (9)
25	171.91 ± 18.52 (9)	300.58 ± 22.02 (9)
50	176.03 ± 19.54 (9)	331.33 ± 22.48 (9)
Km (mM)	2.87 ± 0.38 (9)	2.92 ± 0.33 (9)*
Vmax (mU/mg)	187.9 ± 24.8 (9)	344.6 ± 38.8 (9)

FIG 4.35.-EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 2.75 mM y 186.57mU/mg para los controles y 3.55 mM y 305.81 mU/mg para los animales sometidos a la dieta. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.005.



SUSTRATO	DIETAS	
	ALA (mM)	
	CONTROL	ALTA EN GRASA
0.01	0.55 ± 0.28 (10)	1.02 ± 0.50 (8)
0.1	2.02 ± 0.64 (10)	4.73 ± 1.19 (8)
1	17.17 ± 4.01 (10)	22.42 ± 2.70 (8)
10	68.35 ± 9.92 (10)	69.28 ± 6.88 (8)
25	89.13 ± 11.53 (10)	84.94 ± 8.16 (8)
50	99.27 ± 11.05 (10)	98.35 ± 9.37 (8)
Km (mM)	5.99 ± 1.12 (10)	4.44 ± 0.59 (8)
Vmax (mU/mg)	110.6 ± 20.7 (10)	103.3 ± 13.7 (8)

FIG 4.36.-EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y alimentados con una dieta alta en grasa (---□---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 5.14 mM y 105.82 mU/mg para los controles y 3.35 mM y 97.37 mU/mg para los animales sometidos la dieta.

## 4.4.- ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO DE HIGADO Y RIÑÓN DE TRUCHA AL AYUNO

### 4.4.1.- EFECTO DEL AYUNO SOBRE EL PESO

Logicamente las truchas mantenidas en ayuno durante 30 días mostraron una disminución en el peso, que supone, en valores medios, una pérdida del 0.64 % al día de su peso, como muestra la tabla 4.4.. Esta disminución se lleva a cabo fundamentalmente a costa de tejido muscular y adiposo ya que los ácidos grasos y aminoácidos son movilizados desde el tejido adiposo y músculo esquelético respectivamente para ser utilizados como sustrato gluconeogénico y satisfacer la demanda energética y de glucosa de algunos tejidos, necesaria para cubrir los gastos de mantenimiento del animal.

TABLA 4.4.-Influencia del ayuno (Ay) sobre la variación de peso.

	CONTROL (6)	AYUNO (3)
Peso inicial (g)	2750.00	3053.00
Peso final (g)	3411.00	2518.00
Incremento de peso (g)	661.00	-535.00
Incremento de peso g/100 g pez/día	0.72	-0.64

Los valores son media de los grupos experimentales indicados en parentesis. La ingesta se ha expresado como cantidad de alimento ingerido por 100g de animal y por día siendo el valor de ésta la media de la cantidad ingerida por los diferentes lotes experimentales sometidos al mismo tratamiento, habiendo sido tomado tanto el peso como la ingesta el día quince del periodo experimental.

## 4.4.2.-ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO GLUCIDICO

### A- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA Y FOSFOFRUCTOQUINASA

Durante una situación de ayuno los niveles de actividad piruvato quinasa no parece afectarse en ninguno de los parámetros estudiados. Efectivamente, no hemos encontrado cambios en la actividad enzimática, ni varía la velocidad máxima ni lo hace su afinidad por el sustrato (FIG 4.37.).

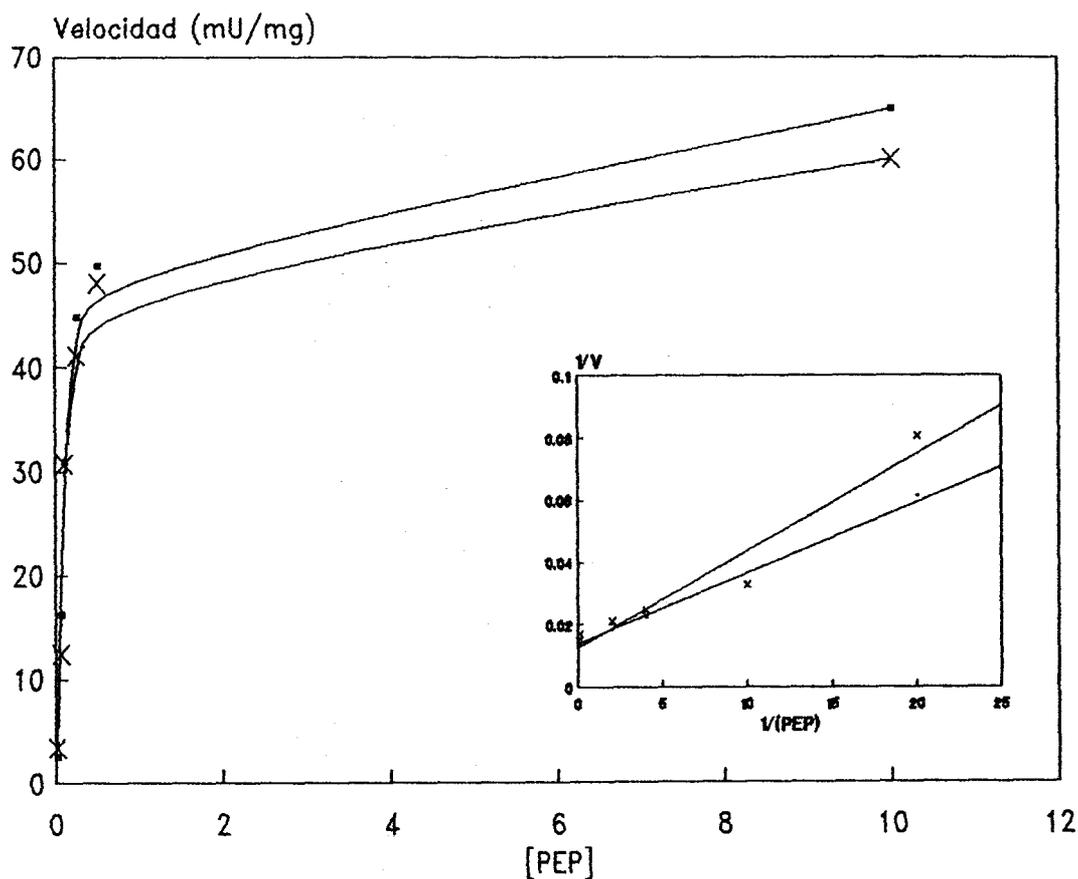
En riñón, se presenta una situación similar al hígado ya que tampoco se detectan cambios en la actividad del enzima ni a concentración saturante ni subsaturante de fosfoenolpiruvato, mostrándose, eso sí, mucho más activa en riñón que en hígado a niveles saturantes de fosfoenolpiruvato (FIG 4.38.).

Como muestra la FIG 4.39., tampoco se observan diferencias significativas para la actividad PFK entre los animales controles y los sometidos a ayuno. Tanto la  $K_m$  como la velocidad máxima se mantienen constantes a pesar de las diferentes situaciones nutritivas a las que han sido sometidos los animales.

En el riñón, se repite este comportamiento, tampoco aparecen diferencias significativas ni en la  $K_m$  ni en la velocidad máxima. Como se observa en la FIG 4.40. las curvas representadas muestran una cinética similar, los datos obtenidos para la  $K_m$  y velocidad máxima, que aparecen en dicha figura, mantienen valores muy similares.

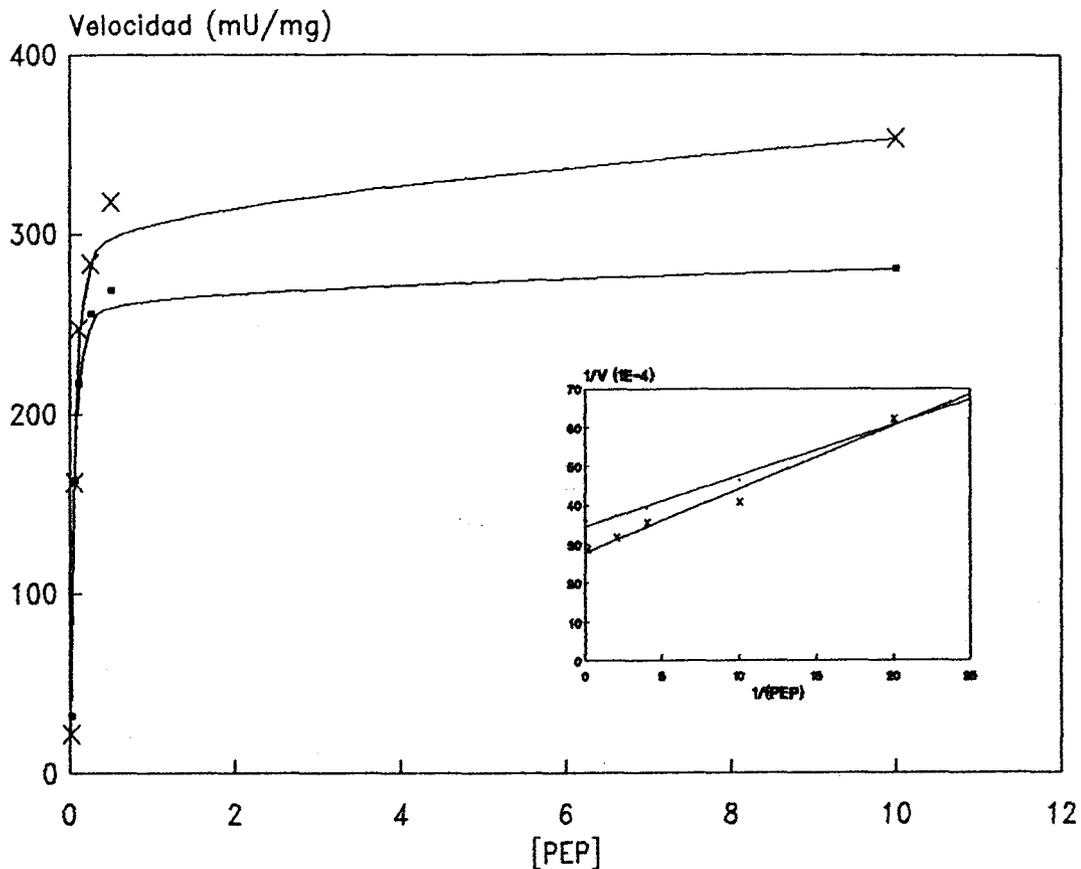
### B- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA

Al contrario de lo que ocurre con los dos enzimas glucolíticos anteriormente comentados, PK y PFK, la FBPasa sí parece afectarse bajo esta condición nutritiva. El ayuno provoca un aumento, ya descrito por otros autores, de la actividad del enzima que supone aproximadamente un 50% sobre el control como se refleja en la FIG 4.41.. Este



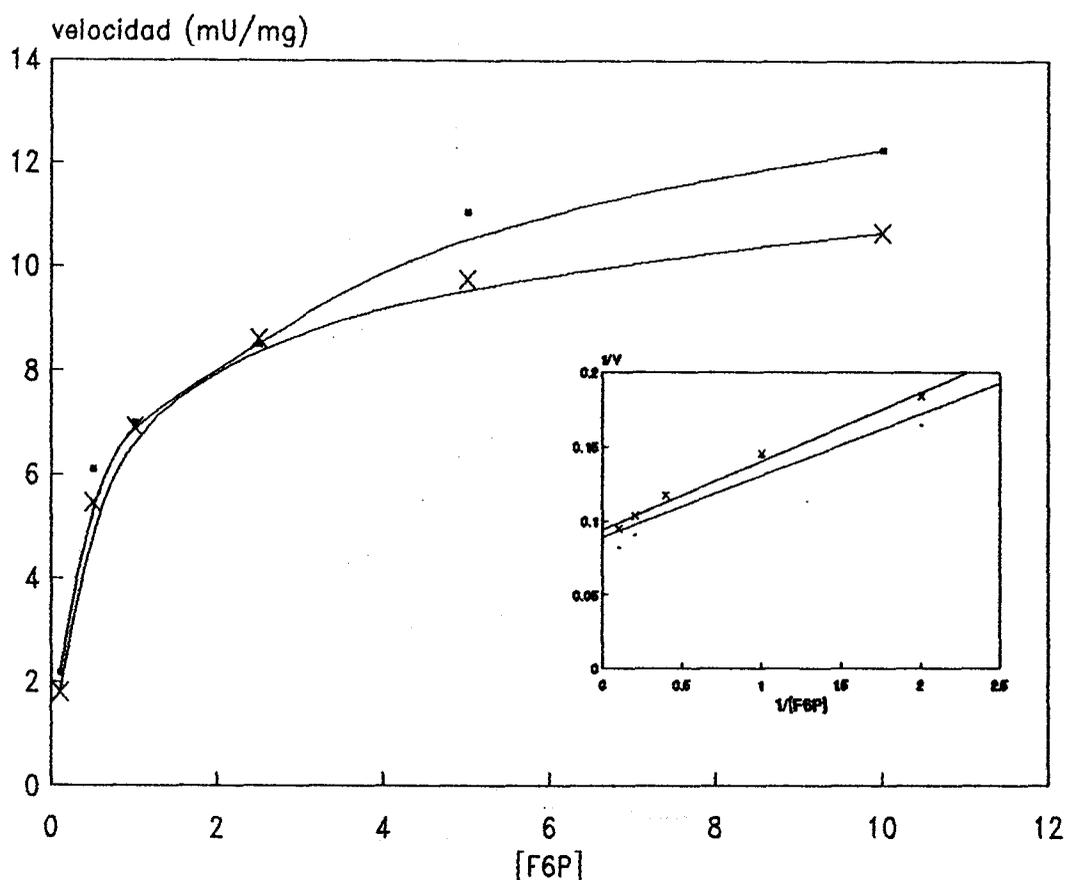
SUS T RATO PEP (mM)	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
0.01	2.56 ± 0.58 (10)	3.35 ± 0.93 (12)
0.05	16.30 ± 1.92 (11)	12.45 ± 1.89 (12)
0.1	30.87 ± 3.70 (13)	30.74 ± 4.23 (12)
0.25	44.85 ± 3.88 (13)	41.12 ± 3.86 (12)
0.5	49.66 ± 3.35 (15)	48.05 ± 3.95 (12)
10	64.84 ± 3.47 (15)	60.01 ± 4.56 (12)
Km (mM)	0.130 ± 0.01 (10)	0.130 ± 0.02 (12)
Vmax (mU/mg)	65.20 ± 7.30 (10)	61.10 ± 8.34 (12)

FIG 4.37.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---) Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.162 mM y 71.58 mU/mg para los controles y 0.200 mM y 61.10 mU/mg para los animales sometidos a ayuno.



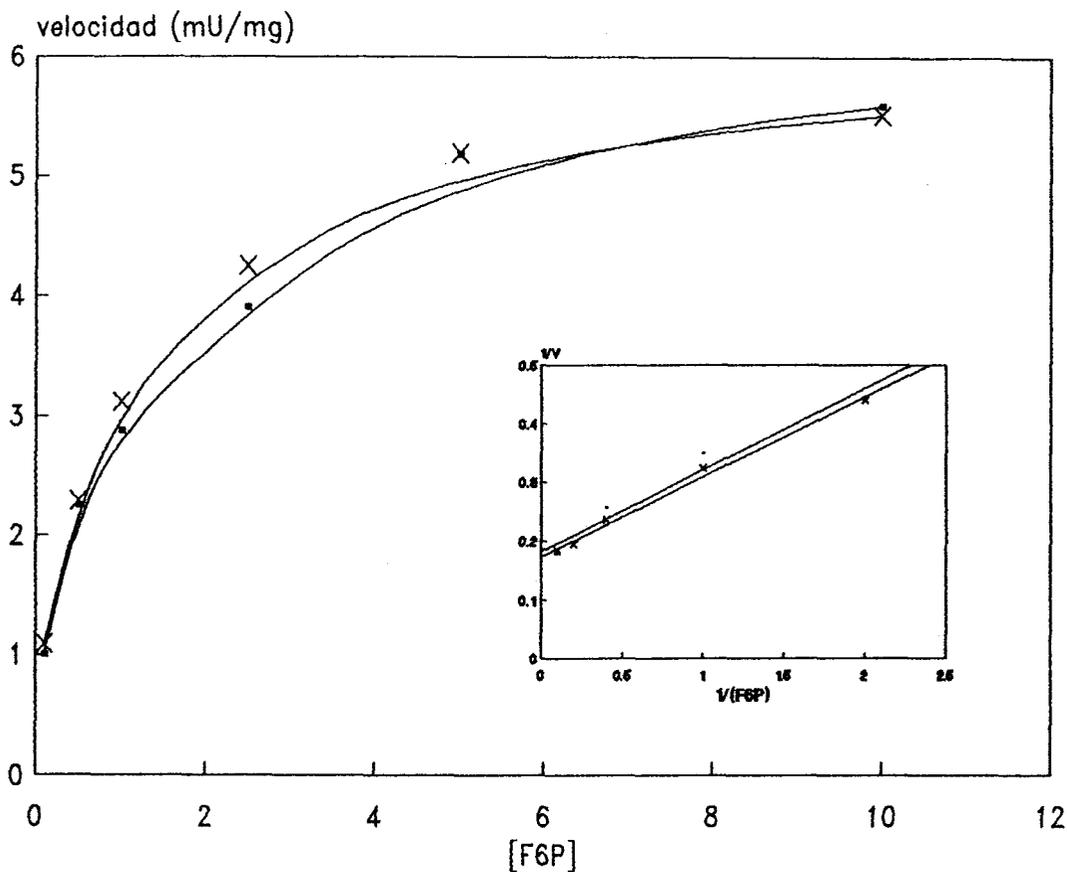
SUSTRATO PEP (Mm)	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
0.01	31.97 ± 5.39 (9)	21.62 ± 4.19 (12)
0.05	162.70 ± 12.65 (11)	161.70 ± 28.21 (12)
0.1	216.83 ± 11.43 (12)	246.93 ± 26.80 (9)
0.25	255.24 ± 14.69 (12)	283.56 ± 30.29 (9)
0.5	268.72 ± 12.71 (12)	353.17 ± 34.02 (9)
10	280.12 ± 10.92 (12)	317.54 ± 34.02 (9)
Km (mM)	0.049 ± 0.004 (12)	0.053 ± 0.008 (9)
Vmax (mU/mg)	290.60 ± 22.45 (12)	337.70 ± 52.66 (9)

FIG 4.38.-EFECTO DEL FOSFOENOLPIRUVATO SOBRE LA ACTIVIDAD PIRUVATO QUINASA EN RIÑON DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---) Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.038 mM y 290.69 mU/mg para los y 0.058 mM y 358.94 mU/mg para los animales sometidos a ayuno.



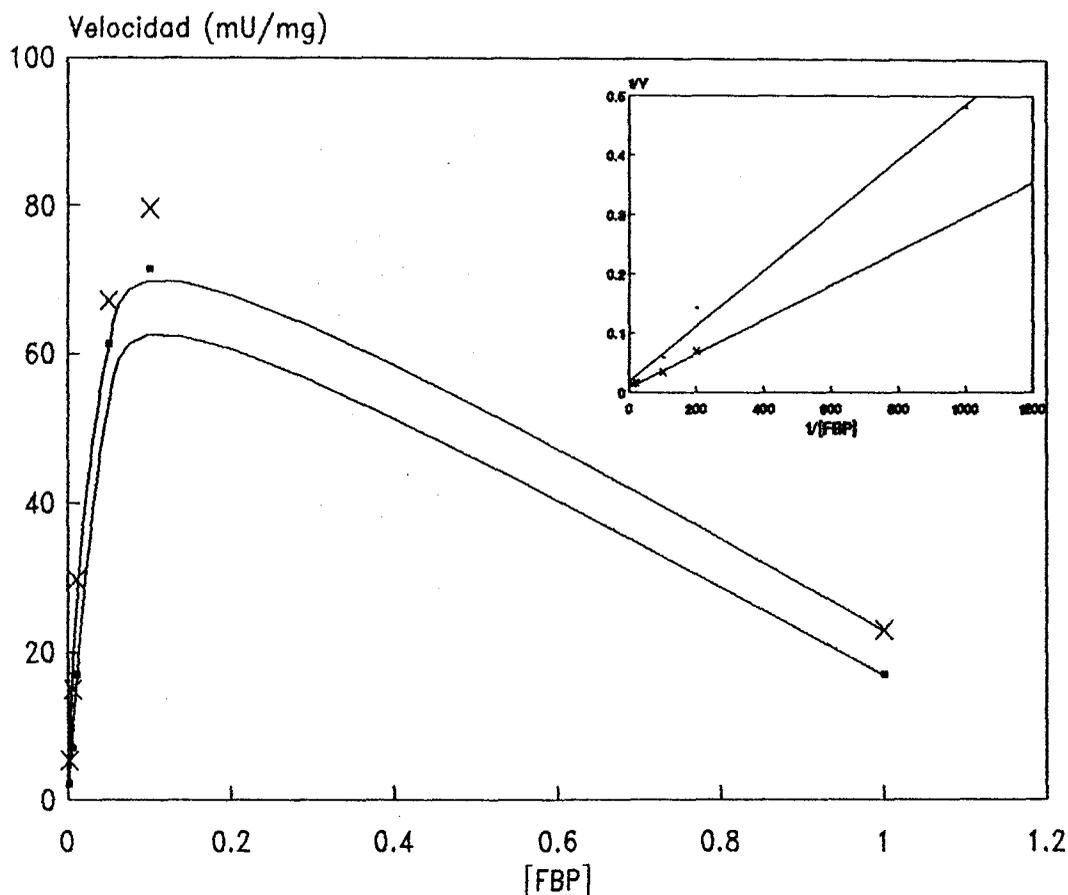
SUSTRATO	DIETAS	
	F6P (mM)	CONTROL
0.1	2.18 ± 0.43 (10)	1.80 ± 0.50 (9)
0.5	6.10 ± 0.91 (10)	5.45 ± 0.63 (9)
1	7.00 ± 0.56 (10)	6.90 ± 0.58 (9)
2.5	8.50 ± 0.53 (10)	8.62 ± 0.56 (9)
5	11.05 ± 0.43 (10)	9.75 ± 0.79 (9)
10	12.24 ± 0.71 (10)	10.65 ± 0.76 (9)
Km (Mm)	0.65 ± 0.06 (10)	0.55 ± 0.06 (9)
Vmax (mU/mg)	12.20 ± 1.20 (10)	10.90 ± 1.3 (9)

FIG 4.39.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (--■--) y ayunados (--X--). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.468 mM y 11.28 mU/mg para los controles y 0.490 mM y 10.63 mU/mg para los animales sometidos a ayuno.



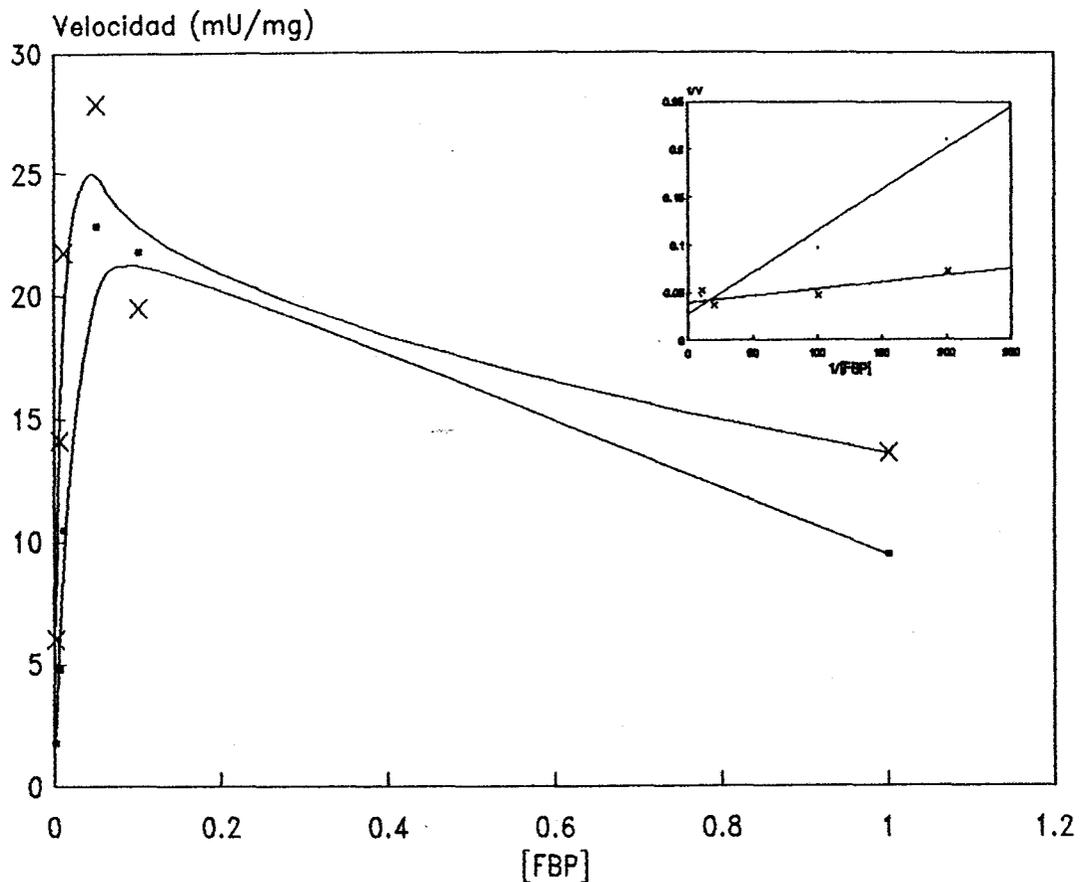
SUSTRATO F6P (mM)	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
0.1	1.00 ± 0.33 (10)	1.09 ± 0.21 (12)
0.5	2.25 ± 0.49 (10)	2.28 ± 0.28 (10)
1	2.87 ± 0.31 (10)	3.11 ± 0.37 (10)
2.5	3.90 ± 0.37 (10)	4.25 ± 0.55 (11)
5	5.18 ± 0.29 (10)	5.19 ± 0.55 (10)
10	5.58 ± 0.42 (10)	5.50 ± 0.39 (10)
Km (mM)	0.98 ± 0.15 (10)	0.81 ± 0.10 (10)
Vmax (mU/m)	5.99 ± 0.86 (10)	5.88 ± 0.72 (10)

FIG 4.40.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFOFRUCTOQUINASA DE RIÑON TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y sometidos a un ayuno (---X---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.769 mM y 5.52 mU/mg para los controles y 0.784 mM y 5.77 mU/mg para los animales sometidos a ayuno.



SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
F 1,6-P (mM)		
0.001	2.09 ± 0.84 (13)	5.22 ± 1.54 (8)
0.005	7.07 ± 1.55 (12)	14.85 ± 1.88 (8)
0.01	16.90 ± 2.25 (13)	29.70 ± 2.77 (9)
0.05	61.33 ± 5.31 (14)	67.06 ± 5.72 (9)
0.1	71.43 ± 5.62 (12)	79.60 ± 4.73 (9)
1	16.83 ± 3.18 (17)	22.85 ± 4.49 (9)
Km (mM)	0.046 ± 0.005 (12)	0.025 ± 0.002 (8) *
Vmax (mU/mg)	108.10 ± 11.75 (12)	100.94 ± 11.31 (8)

FIG 4.41.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.034 mM y 72.46 mU/mg para los controles y 0.035 mM y 117.40 mU/mg para los animales sometidos a ayuno. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.005.



SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
F 1,6-P		
0.001	1.76 ± 0.52 (13)	5.97 ± 1.92 (10)
0.005	4.77 ± 1.07 (14)	14.10 ± 2.09 (10)
0.01	10.45 ± 1.08 (15)	21.77 ± 2.59 (10)
0.05	22.86 ± 1.79 (13)	27.79 ± 3.33 (10)
0.1	21.78 ± 3.04 (15)	19.48 ± 1.90 (8)
1	9.43 ± 0.86 (14)	13.55 ± 2.00 (8)
Km (mM)	0.025 ± 0.004 (13)	0.005 ± 0.001 (10)*
Vmax (mU/mg)	33.39 ± 5.98 (13)	30.79 ± 4.96 (10)

FIG 4.42.-EFECTO DE LA FRUCTOSA 1,6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA 1,6-BISFOSFATASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.054 mM y 58.48 mU/mg para los controles y 0.007 mM y 33.33 mU/mg para los animales sometidos a ayuno. Las diferencias significativas se expresan como:\* P<0.0005.

aumento solo se observa a concentraciones celulares de F6P, mientras que la velocidad maxima se mantiene constante.

En riñón, el enzima presenta el mismo mecanismo de actuación, aumentando su actividad a concentraciones subsaturantes de F6P (0.005mM) sin modificar su velocidad máxima (FIG 4.42.).

Tanto en hígado como riñón este enzima muestra inhibición por exceso de sustrato, como ha sido descrito ya en otros sistemas biológicos y que en nuestro trabajo observamos en todas las situaciones ensayadas.

C- EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA-6-FOSFATO  
DESHIDROGENASA

En mamíferos, durante situaciones nutricionales claramente antilipogénicas como por ejemplo el ayuno se produce una drástica disminución en la actividad de este enzima (NACE et. al.1979; HERZBERG 1983). En peces tales como el salmón (LIN et. al. 1977) y la seriola (SHIMENO 1982) la G6PDH presenta el mismo comportamiento al descrito en mamíferos. Nuestros resultados reflejan un mecanismo de adaptación similar al descrito para la trucha arcoiris. Según podemos ver en la FIG 4.43. la G6PDH disminuye su actividad ante un ayuno prolongado, con una marcada reducción de su velocidad, de aproximadamente un 55% en todas las concentraciones de sustrato estudiadas, sin embargo, la Km no se afecta ante esta situación, así, parece que la adaptación al ayuno se hace por disminución del contenido intracelular de este enzima.

En riñón, al contrario, no encontramos variación de la actividad del enzima ya que no presenta diferencias significativas ni para la Km ni para la velocidad maxima entre los animales controles y los sometidos a ayuno (FIG 4.44.).

## 4.4.2.- ADAPTACIONES ENZIMATICAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO PROTEICO

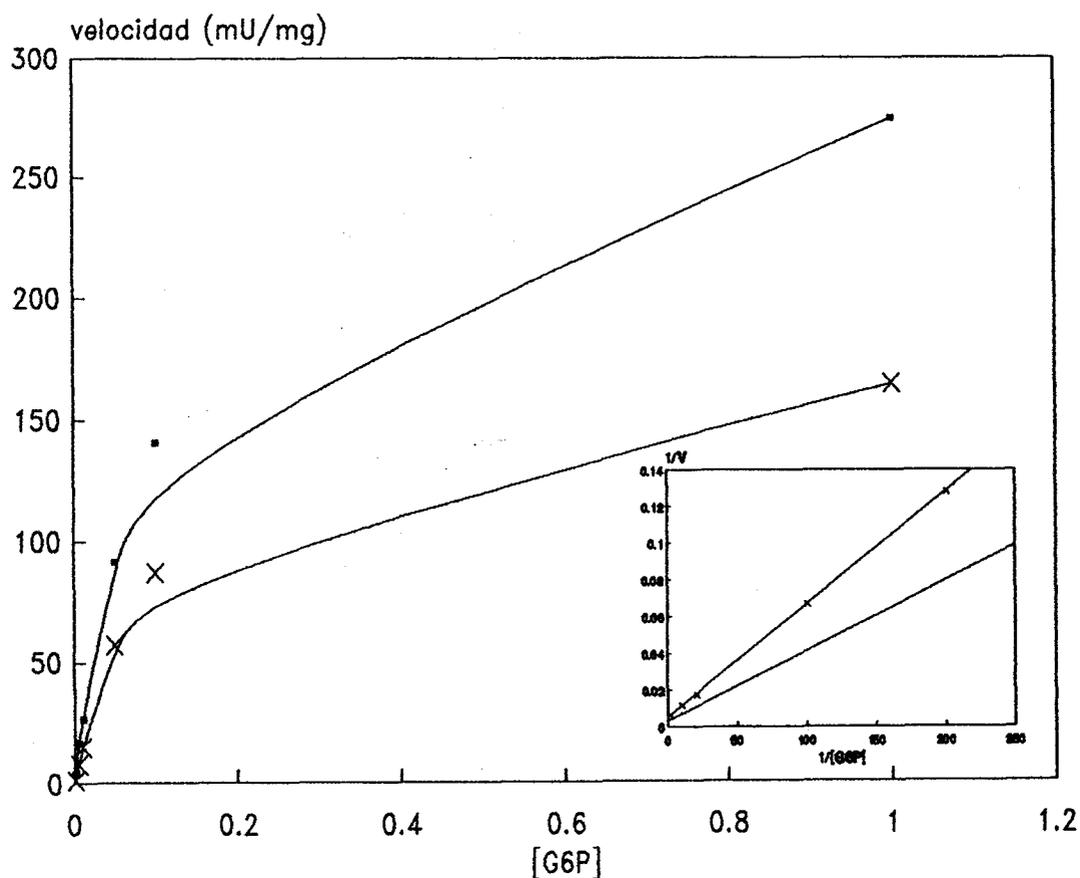
### A. - EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DESHIDROGENASA

El ayuno provoca un aumento en la síntesis de glucosa que hace necesario un incremento en la disponibilidad de esqueletos carbonados para ser utilizados como sustratos gluconeogénicos. Muchas de estas cadenas carbonadas provienen de la desaminación de aminoácidos en la que interviene , como hemos descrito anteriormente, de forma decisiva por lo que es lógico pensar que ante esta situación nutritiva estos enzimas presenten una elevada actividad. La actividad del enzima hepático representado en la FIG 4.45., muestra un aumento de a lo largo de toda la curva de saturación para  $\alpha$ -KG sin que aparezcan diferencias significativas en la  $K_m$  del enzima entre los animales que ingirieron la dietan control y los sometidos a ayuno.

En cuanto al enzima renal, se puede ver en la FIG 4.46., que no presenta variaciones entre los parámetros estudiados y que tanto los valores de la  $K_m$  como los obtenidos para la velocidad máxima no presentan diferencias estadísticamente significativas entre la situaciones nutritivas ensayadas. No obstante se puede observar cierto aumento en la velocidad maxima en los animales ayunados, aunque esta diferencia no sea significativa.

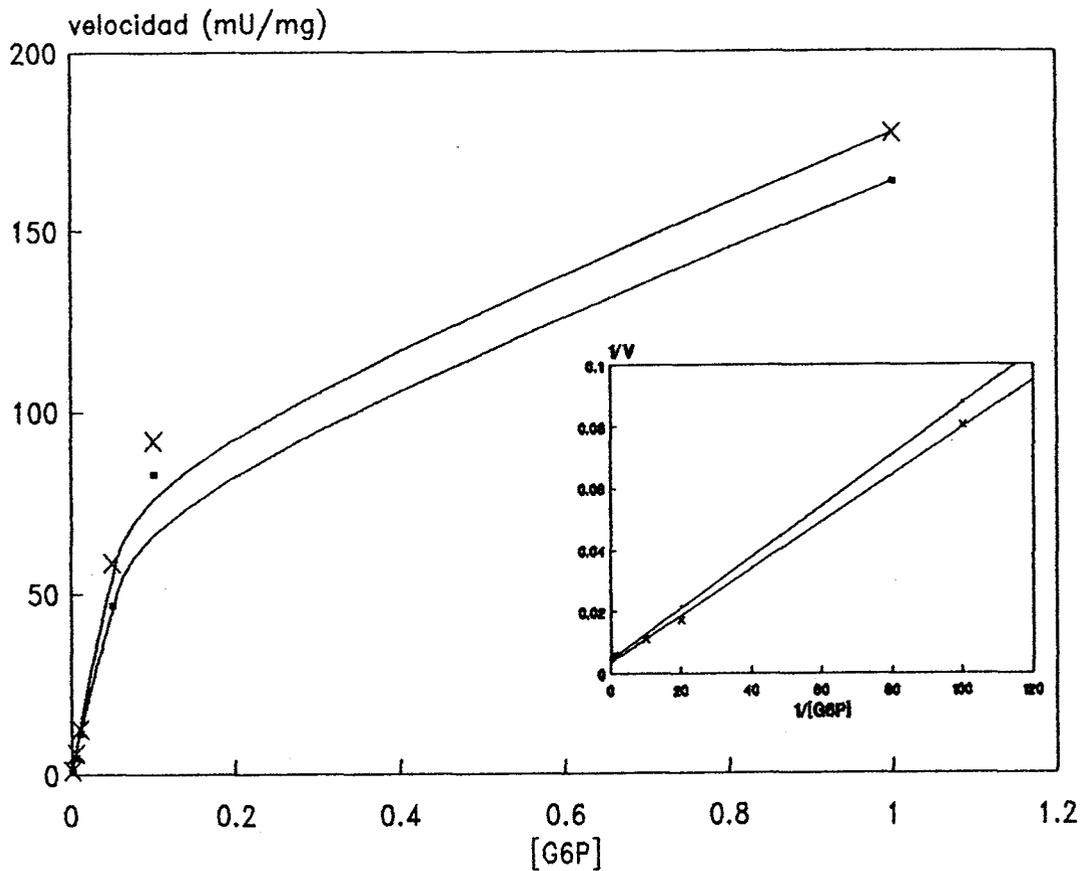
### B. - EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA

El comportamiento cinético de la AAT ante un ayuno prolongado es diferente en el hígado (FIG 4.47.) que en el riñón (FIG 4.48.) mientras que en el primero muestra un aumento en su velocidad, del orden de un 125%, en el riñón la velocidad aparece inalterada. Probablemente la razones del incremento de actividad hepática sean las mismas descritas para la GDH, es decir la necesidad de un aporte constante de cadenas carbonadas para la síntesis de glucosa .



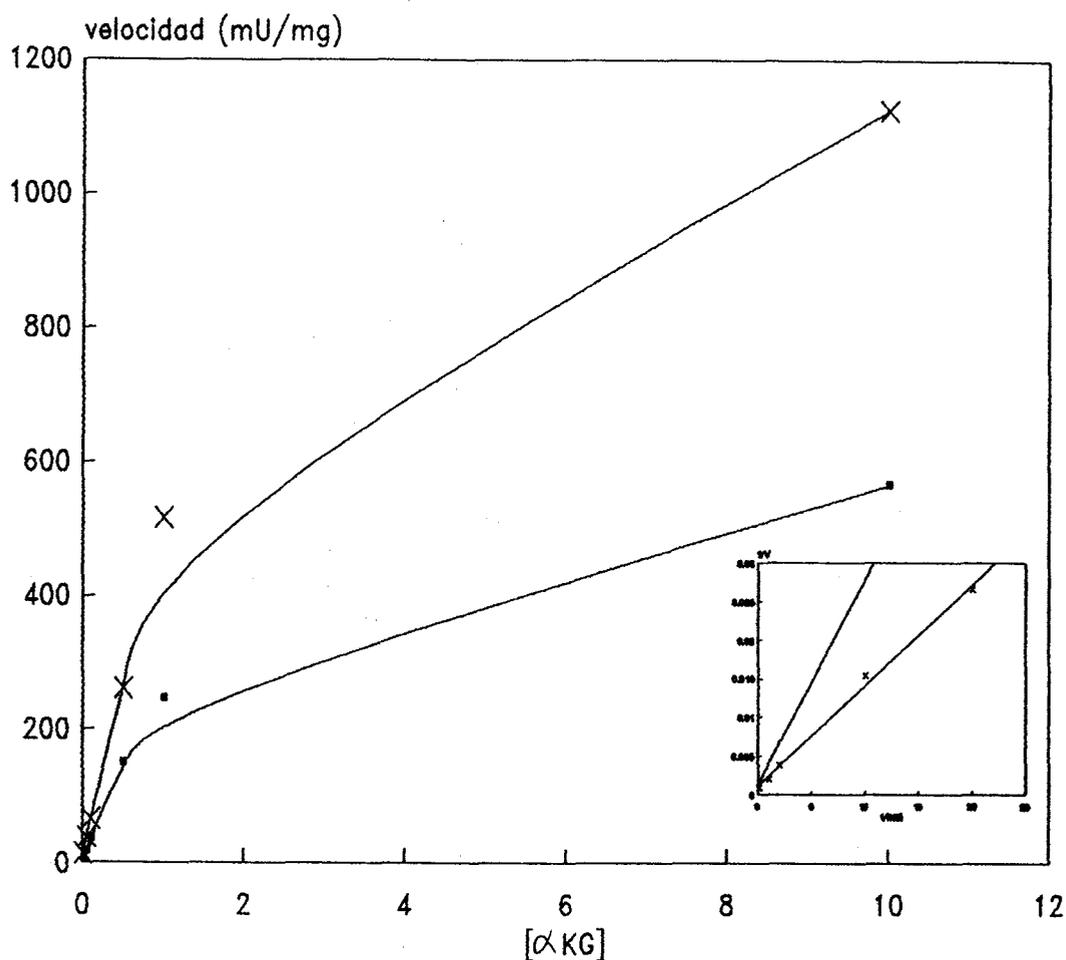
SUSTRATO G6P (mM)	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
0.001	4.20 ± 0.06 (8)	1.06 ± 0.29 (7)
0.005	16.63 ± 1.94 (14)	7.81 ± 0.94 (7)
0.01	26.54 ± 3.08 (14)	14.96 ± 1.58 (10)
0.05	91.35 ± 12.90 (16)	57.35 ± 4.37 (10)
0.1	140.37 ± 12.32 (16)	87.20 ± 6.45 (10)
1	274.12 ± 19.88 (16)	164.22 ± 4.45 (10)
Km (mM)	0.115 ± 0.013 (14)	0.109 ± 0.012 (7)*
Vmax (mU/mg)	305.6 ± 34.5 (14)	172.2 ± 19.4 (7)

FIG 4.43.-EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (—■—) y ayunados (—X—). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.118 mM y 305.81 mU/mg para los controles y 0.115 mM y 186.92 mU/mg para los animales sometidos a ayuno. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.02.



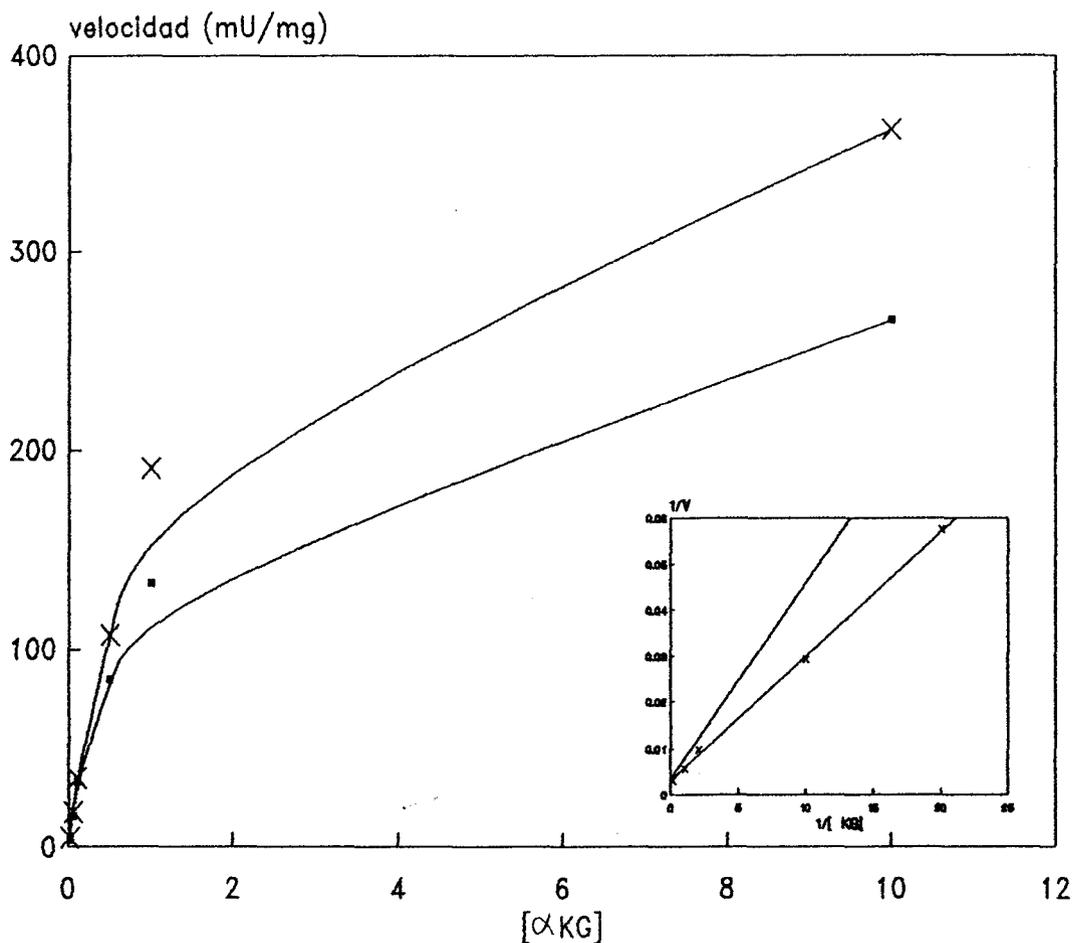
SUSTRATO G6P (mM)	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
0.001	0.63 ± 0.36 (9)	0.93 ± 0.38 (8)
0.005	4.68 ± 0.88 (10)	5.61 ± 1.44 (8)
0.01	11.43 ± 1.24 (13)	12.51 ± 2.23 (8)
0.05	46.63 ± 5.61 (11)	58.50 ± 4.57 (8)
0.1	82.84 ± 7.96 (15)	92.03 ± 5.53 (8)
1	162.99 ± 10.20 (14)	176.55 ± 9.49 (8)
Km (mM)	0.135 ± 0.016 (11)	0.119 ± 0.015 (8)
Vmax (mU/mg)	185.5 ± 21.36 (11)	197.9 ± 25.00 (8)

FIG 4.44.-EFECTO DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA EN RIÑON DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 0.177 mM y 212.77 mU/mg para los controles y 0.121 mM y 200.48 mU/mg para los animales sometidos a ayuno.



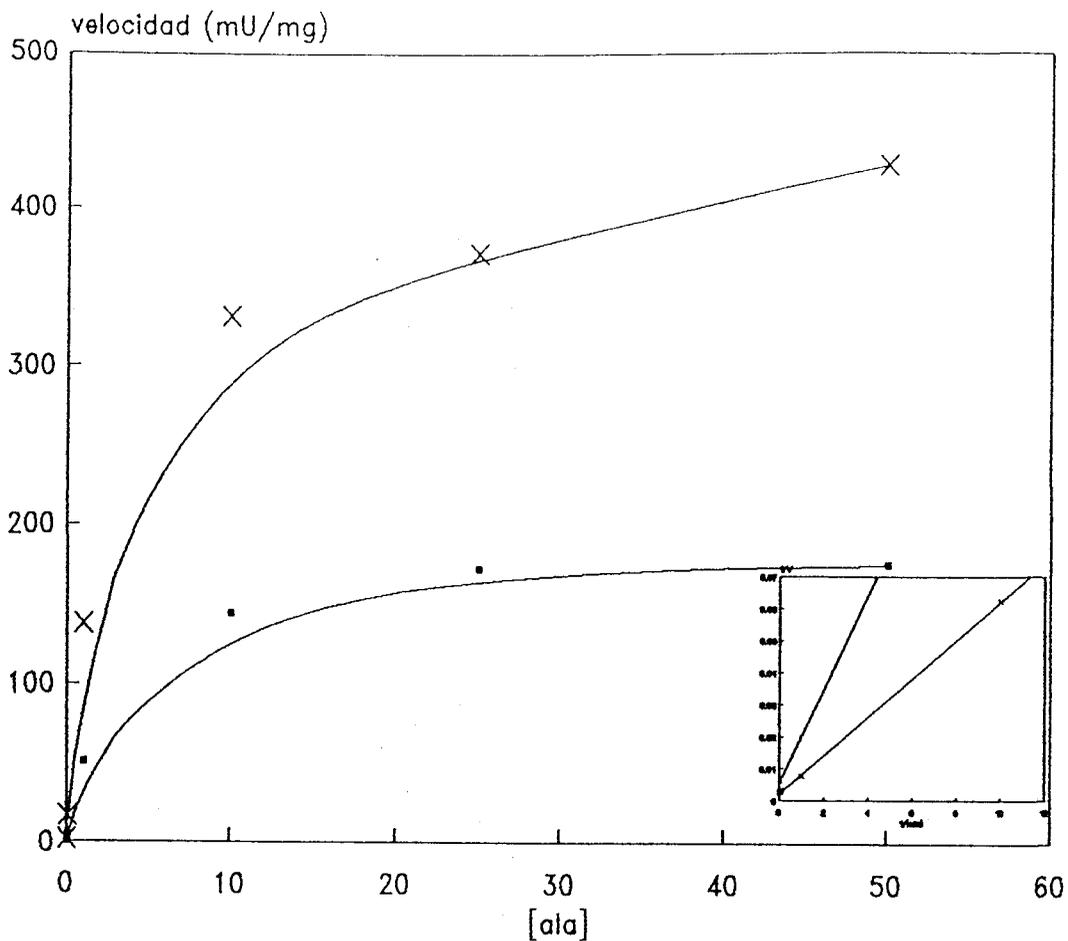
SUSTRATO α-KG (mM)	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
0.01	5.17 ± 1.53 (20)	12.79 ± 2.66 (11)
0.05	16.00 ± 3.37 (20)	37.77 ± 4.45 (11)
0.1	35.94 ± 8.55 (20)	64.95 ± 9.99 (11)
0.5	148.78 ± 28.29 (20)	260.25 ± 30.65 (11)
1	245.28 ± 38.57 (20)	515.80 ± 52.98 (11)
10	566.03 ± 78.81 (20)	1124.30 ± 100.14 (11)
Km (mM)	1.72 ± 0.35 (20)	1.73 ± 0.22 (11)*
Vmax (mU/mg)	663.4 ± 116.1 (20)	1322.0 ± 163.8 (11)

FIG 4.45.-EFECTO DEL α-CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DEHIDROGENASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 1.80 mM y 681.66 mU/mg para los controles y 1.18 mM y 910.75 mU/mg para los animales sometidos a ayuno. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.005.



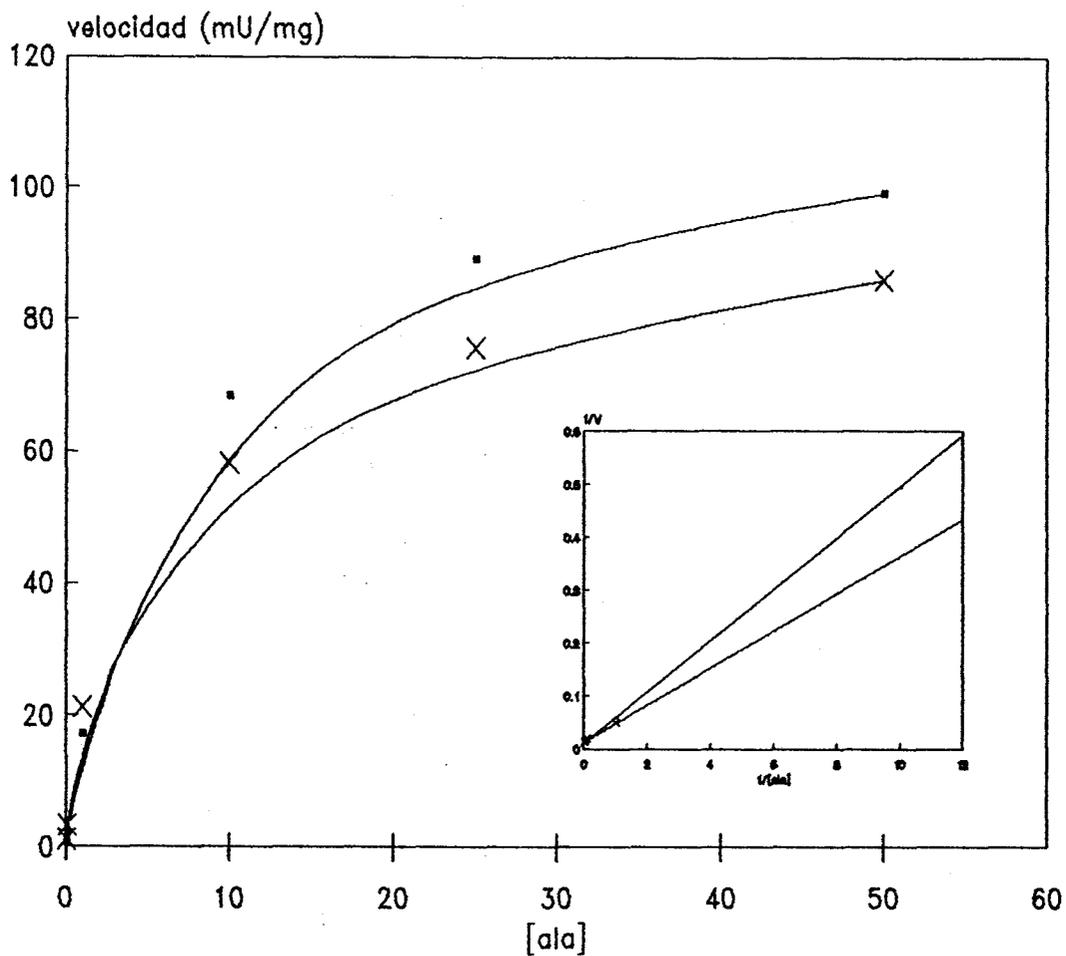
SUSTRATO	DIETAS	
$\alpha$ -KG (mM)	CONTROL	AYUNO
0.01	3.63 $\pm$ 1.34 (12)	4.51 $\pm$ 1.98 (7)
0.05	15.17 $\pm$ 2.77 (12)	17.51 $\pm$ 3.01 (7)
0.1	32.35 $\pm$ 5.69 (12)	34.45 $\pm$ 4.12 (7)
0.5	84.25 $\pm$ 28.29 (12)	106.86 $\pm$ 11.71 (7)
1	132.81 $\pm$ 14.47 (12)	190.68 $\pm$ 19.62 (7)
10	265.02 $\pm$ 24.67 (12)	361.80 $\pm$ 30.45 (7)
Km (mM)	1.22 $\pm$ 0.16 (12)	1.23 $\pm$ 0.14 (7)
Vmax (mU/mg)	296.4 $\pm$ 37.4 (12)	417.3 $\pm$ 45.9 (7)

FIG 4.46.-EFECTO DEL  $\alpha$ -CETOGLUTARATO SOBRE LA ACTIVIDAD GLUTAMATO DEHIDROGENASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---). Los datos son media  $\pm$  SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 1.28 mM y 299.85 mU/mg para los controles y 0.95 mM y 353.36 mU/mg para los animales sometidos a ayuno.



SUSTRATO ALA (mM)	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
0.01	0.58 ± 0.47 (9)	1.47 ± 0.47 (10)
0.1	3.85 ± 0.81 (9)	16.12 ± 2.65 (10)
1	49.77 ± 6.33 (9)	137.80 ± 6.83 (10)
10	143.81 ± 15.10 (9)	330.28 ± 16.72 (10)
25	171.91 ± 18.52 (9)	370.95 ± 21.61 (10)
50	176.03 ± 19.54 (9)	428.62 ± 25.64 (10)
Km (mM)	2.87 ± 0.38 (9)	2.36 ± 0.18 (10)*
Vmax (mU/mg)	187.9 ± 24.8 (9)	424.1 ± 32.4 (10)

FIG 4.47.-EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN HIGADO DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 2.75 mM y 186.57mU/mg para los controles y 2.83 mM y 473.93 mU/mg para los animales sometidos a ayuno. Las diferencias significativas se expresan como: \* P<0.0005.



SUSTRATO	DIETAS	
	CONTROL	AYUNO
ALA (mM)		
0.01	0.55 ± 0.28 (10)	1.06 ± 0.65 (11)
0.1	2.02 ± 0.64 (10)	3.24 ± 0.95 (11)
1	17.17 ± 4.01 (10)	21.24 ± 3.94 (11)
10	68.35 ± 9.92 (10)	58.19 ± 9.27 (11)
25	89.13 ± 11.53 (10)	75.65 ± 13.44 (11)
50	99.27 ± 11.05 (10)	85.95 ± 13.14 (11)
Km (mM)	5.99 ± 1.12 (10)	5.59 ± 1.08 (11)
Vmax (mU/mg)	110.6 ± 20.7 (10)	100.7 ± 19.5 (11)

FIG 4.48.-EFECTO DE LA ALANINA SOBRE LA ACTIVIDAD ALANINA AMINOTRANSFERASA EN RIÑÓN DE TRUCHA. Las curvas muestran las actividades del enzima en animales controles (---■---) y ayunados (---X---). Los datos son media ± SEM del número de observaciones indicadas. La gráfica incluida muestra la representación inversa de las respectivas curvas cinéticas. La Km y Vmax obtenidas fueron 5.14 mM y 105.82 mU/mg para los controles y 2.90 mM y 82.65 mU/mg para los animales sometidos a ayuno.

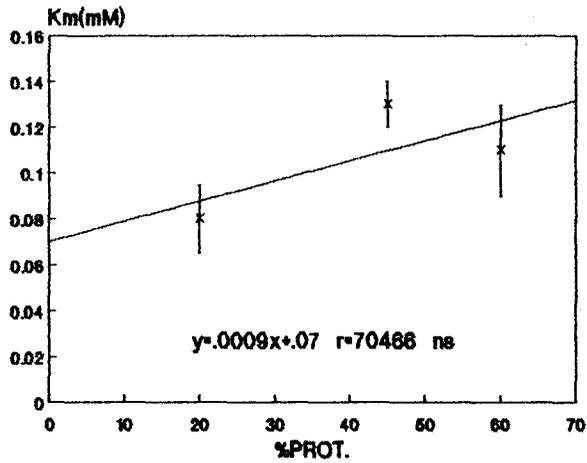
Respecto a la Km parece, segun los datos obtenidos , que no presenta modificaciones en su valor para la alanina ni en hígado ni en riñón.

#### 4.5.-INTERRELACION ENTRE EL COMPORTAMIENTO CINETICO DE LOS ENZIMAS ENSAYADOS Y EL NIVEL DE PROTEINA DE LA DIETA

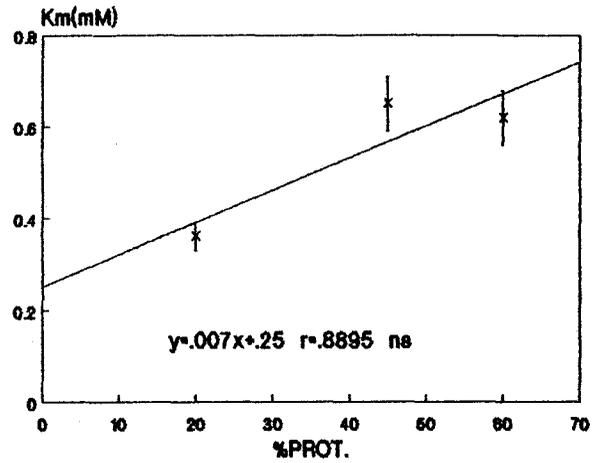
Con objeto de conocer la correlación existente entre la cantidad de proteína presente en las dietas y los valores de los principales parámetros cinéticos de los enzimas hepáticos y renales ensayados se ha representado la evolución de los mismos frente a los tres niveles de concentración de proteína utilizados (20 % en la dieta alta en carbohidratos; 45 % para los controles; 60 % en la dieta alta en proteína) FIG de la 4.49 a la 4.56 ( ambas incluidas). Los parámetros cinéticos representados son:  $V_{max}$ ;  $K_m$ ; Razón de actividad ( $V_{ss}/V_{max}$ ) y Eficiencia catalítica, tanto a niveles saturantes ( $V_{max}/K_m$ ) como subsaturantes ( $V_s/K_m$ ).

Por regla general los resultados obtenidos ponen de manifiesto un desarrollo lineal entre la concentración de proteína y el comportamiento cinético del enzima. No obstante , en algunos valores correspondientes a la dieta alta en carbohidratos aparecen desviaciones en este comportamiento general que se atribuyen a la poca aceptación de la dieta por las truchas.

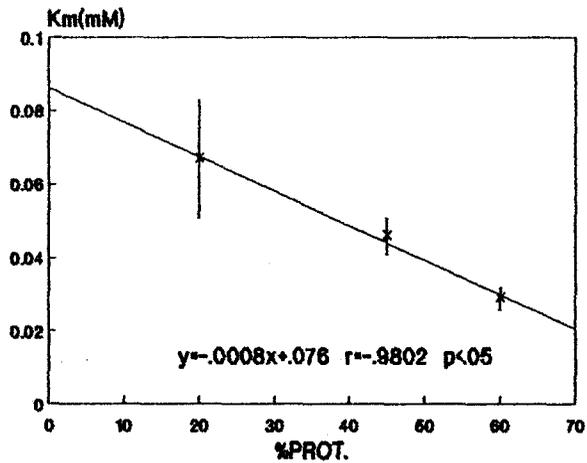
Km frente a concentración de proteínas  
PK Hígado



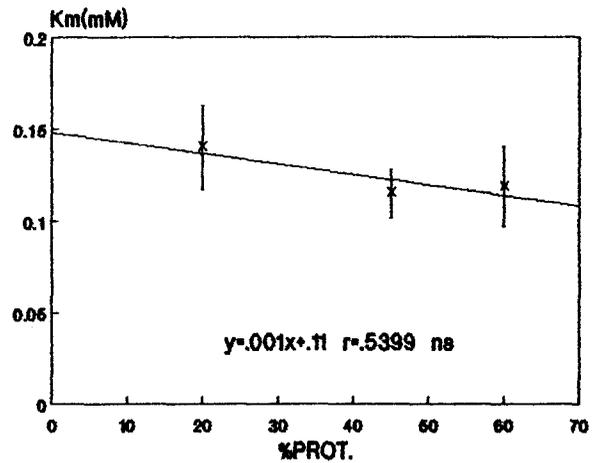
Km frente a concentración de proteínas  
PFK Hígado



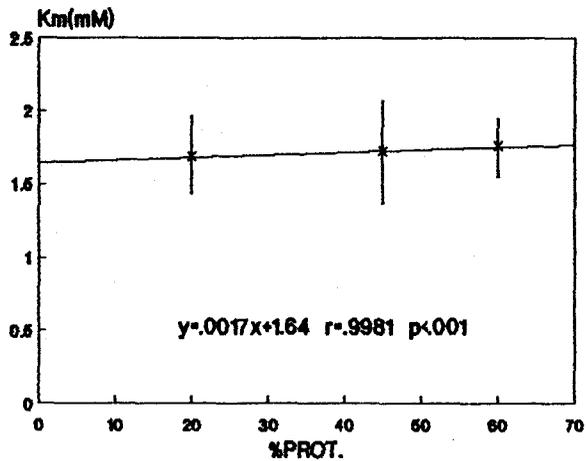
Km frente a concentración de proteínas  
FBPasa Hígado



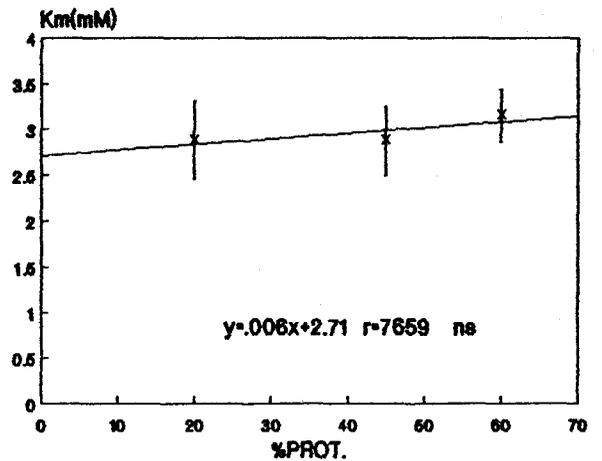
Km frente a concentración de proteínas  
G6PDH Hígado



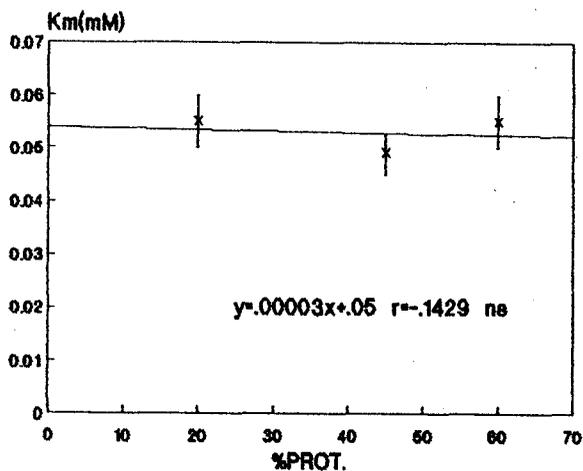
Km frente a concentración de proteínas  
GDH Hígado



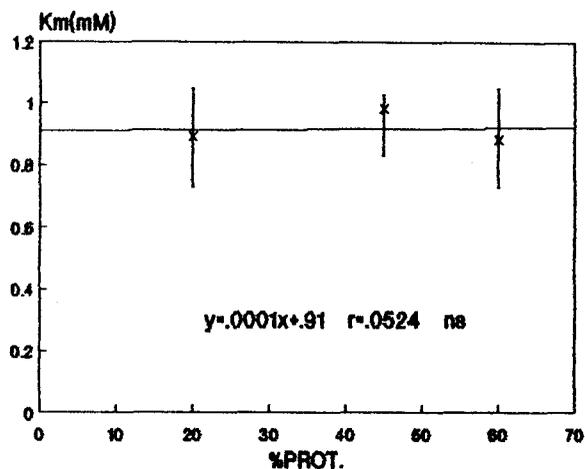
Km frente a concentración de proteínas  
AAT Hígado



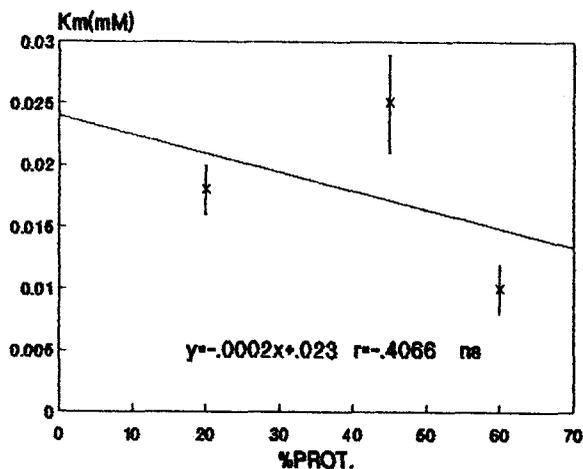
Km frente a concentración de proteínas  
PK riñón



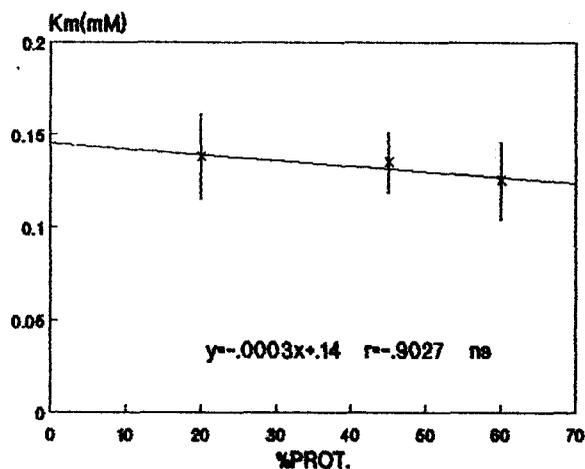
Km frente a concentración de proteínas  
PFK riñón



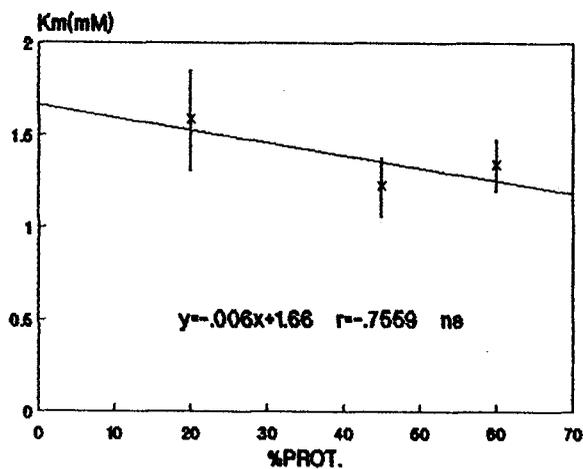
Km frente a concentración de proteínas  
FBPasa Riñón



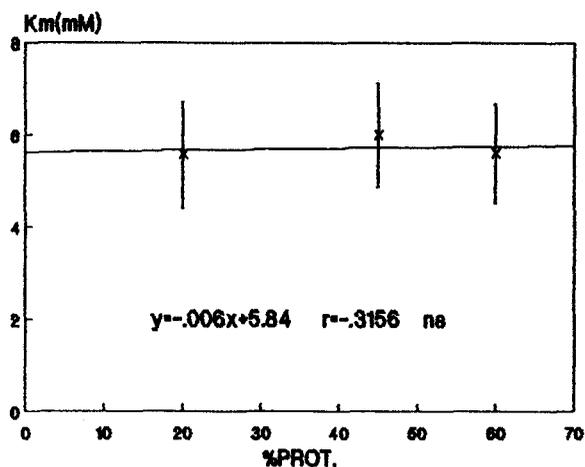
Km frente a concentración de proteínas  
G6PDH Riñón



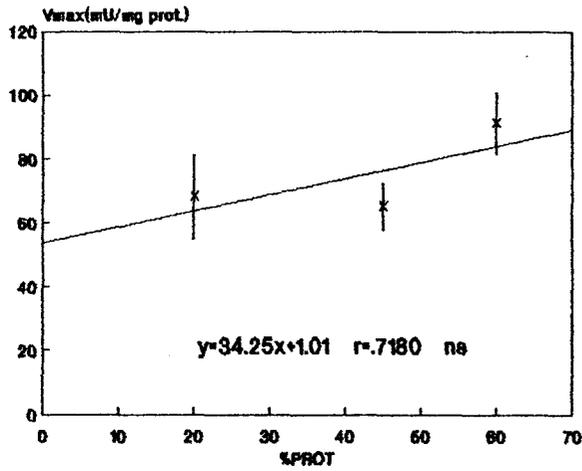
Km frente a concentración de proteínas  
GDH Riñón



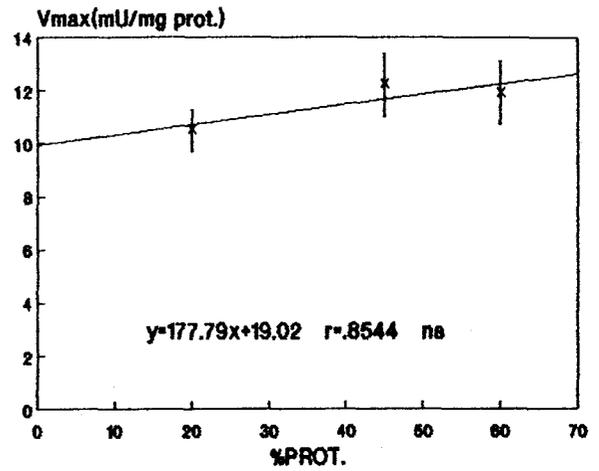
Km frente a concentración de proteínas  
AAT Riñón



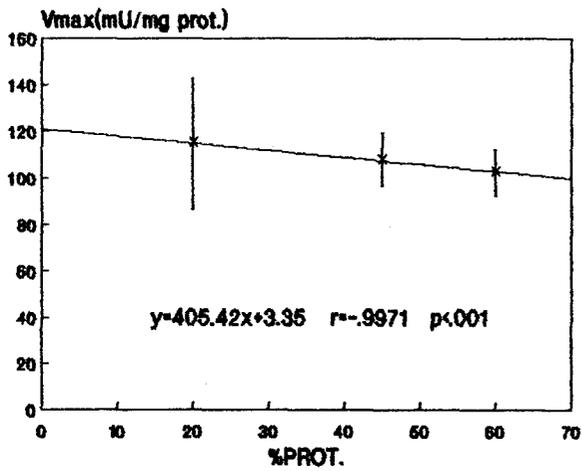
Vmax frente a concentración de proteínas  
PK Hígado



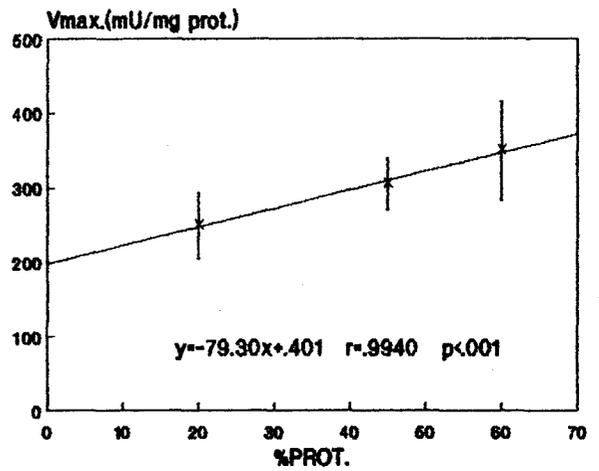
Vmax frente a concentración de proteínas  
PFK Hígado



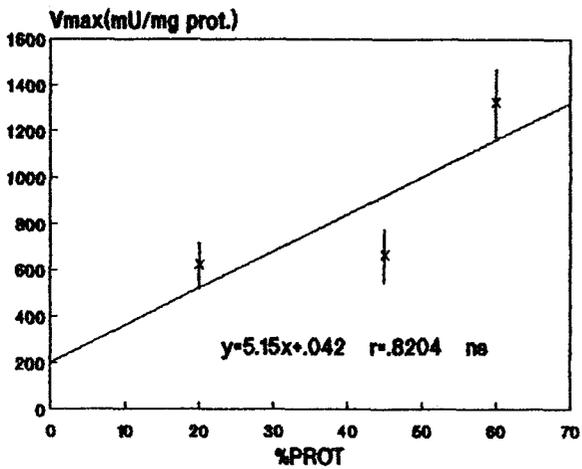
Vmax frente a concentración de proteínas  
FBPasa Hígado



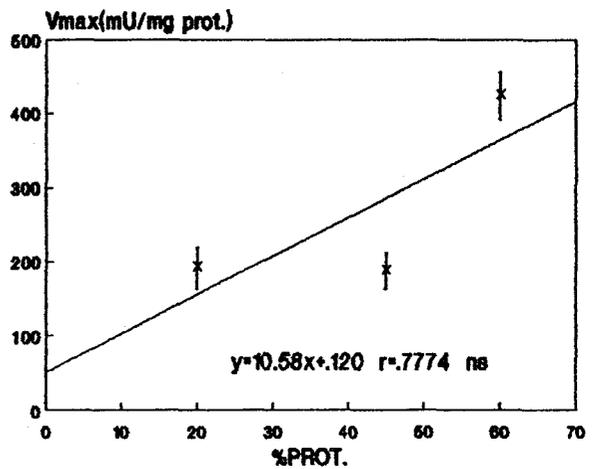
Vmax frente a concentración de proteínas  
G6PDH Hígado



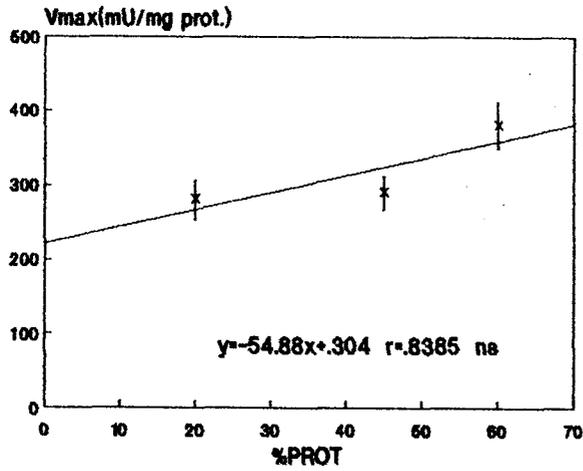
Vmax frente a concentración de proteínas  
GDH Hígado



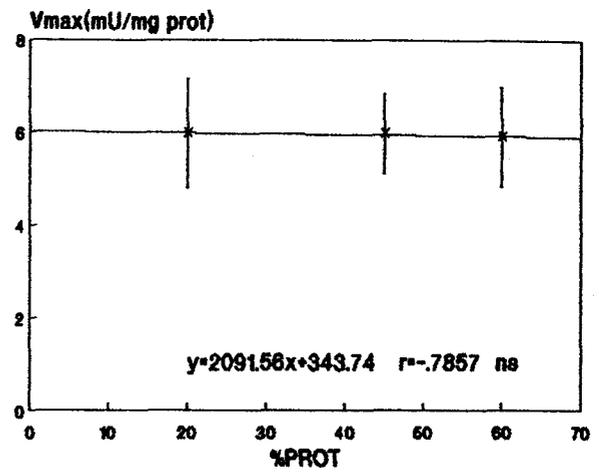
Vmax frente a concentración de proteínas  
AAT Hígado



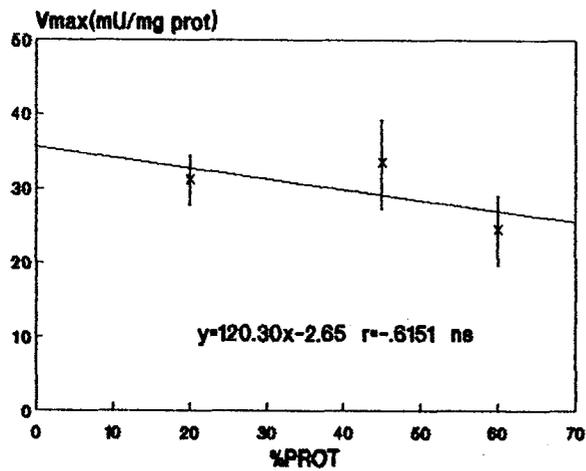
Vmax frente a concentración de proteínas  
PK Riñon



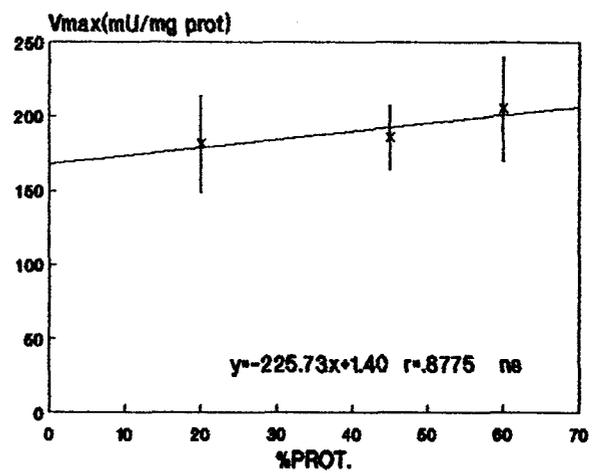
Vmax frente a concentración de proteínas  
PFK Riñon



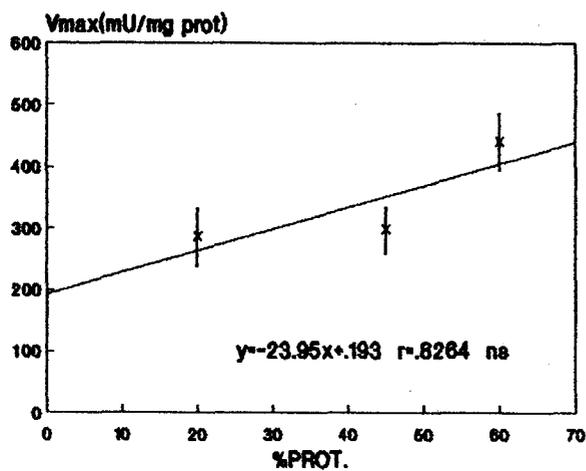
Vmax frente a concentración de proteínas  
FBPasa Riñon



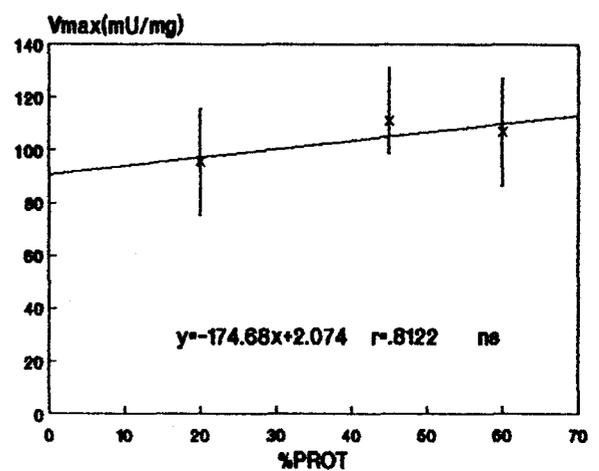
Vmax frente a concentración de proteínas  
G6PDH Riñon



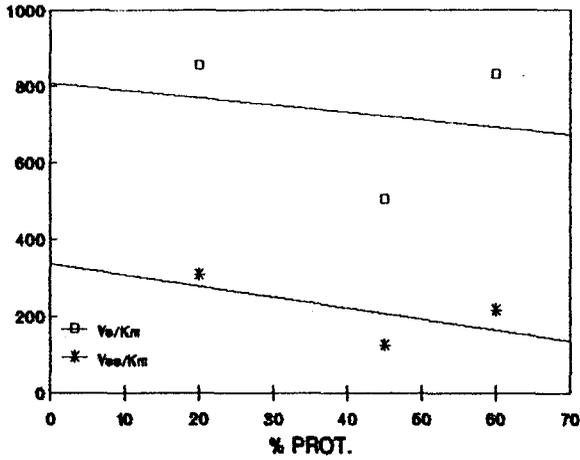
Vmax frente a concentración de proteínas  
GDH Riñon



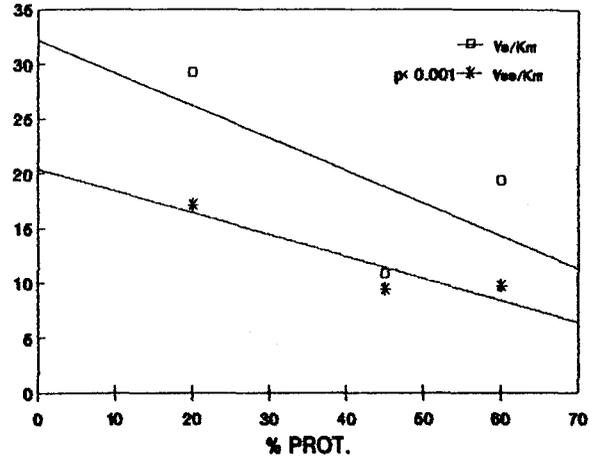
Vmax frente a concentración de proteínas  
AAT Riñon



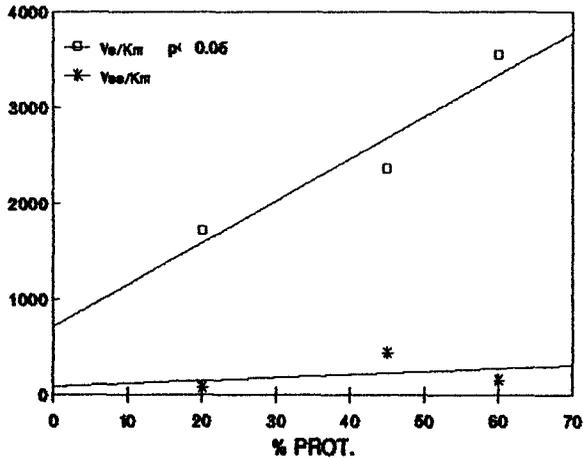
**Eficiencia catalítica de la PK hepática**



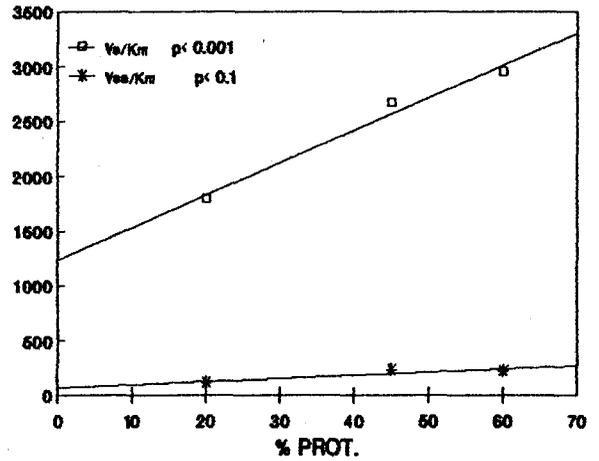
**Eficiencia catalítica de la PFK hepática**



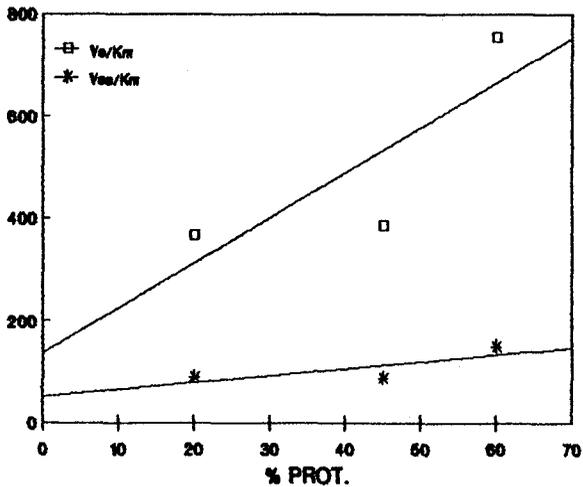
**Eficiencia catalítica de la FBPa hepática**



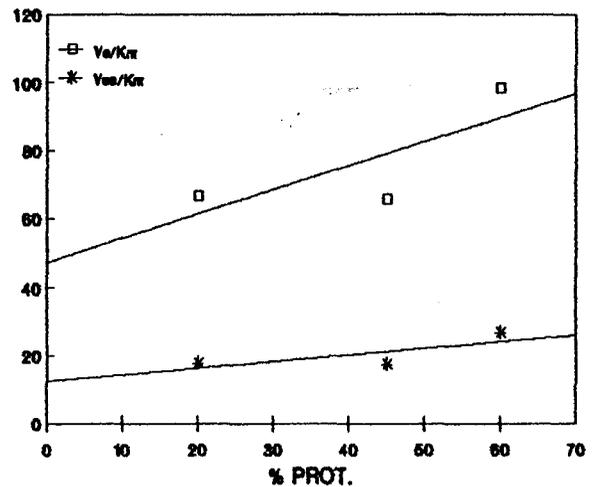
**Eficiencia catalítica de la G6PDH hepática**



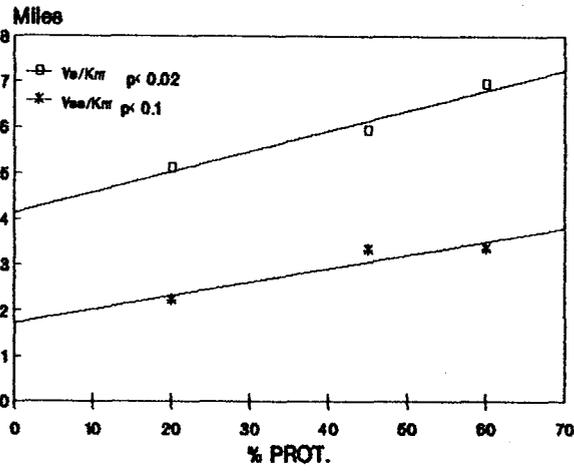
**Eficiencia catalítica de la GDH hepática**



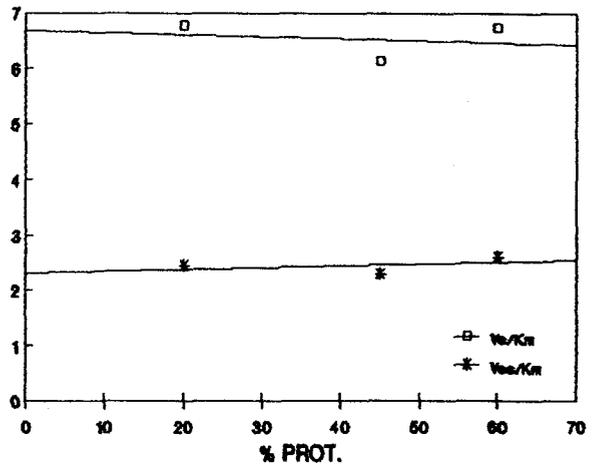
**Eficiencia catalítica de la AAT hepática**



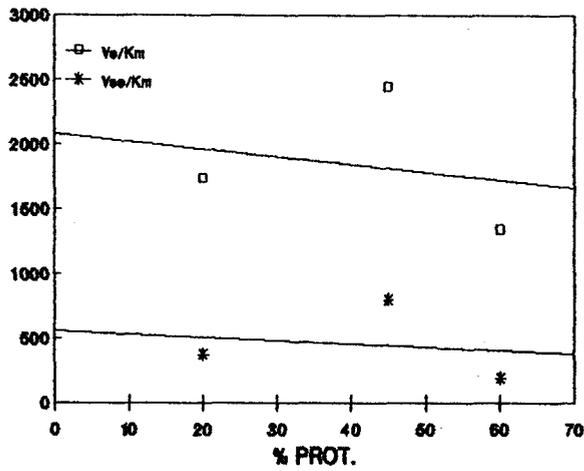
Eficiencia catalítica de la PK renal



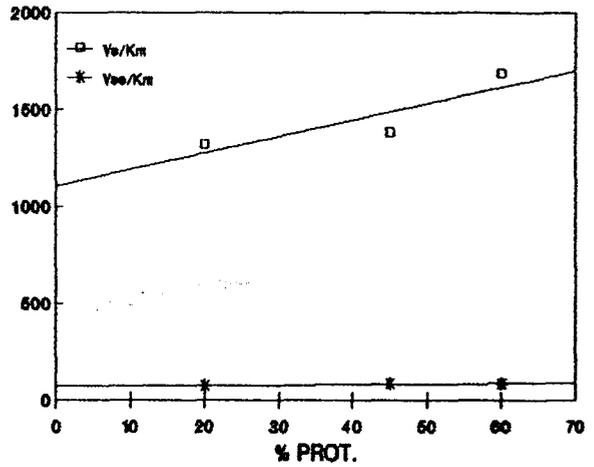
Eficiencia catalítica de la PFK renal



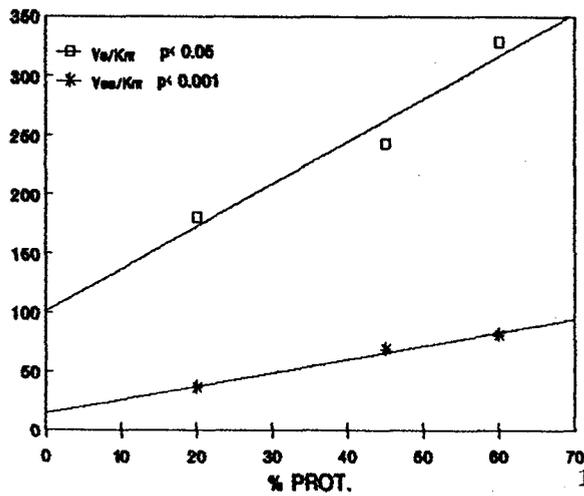
Eficiencia catalítica de la FBPass renal



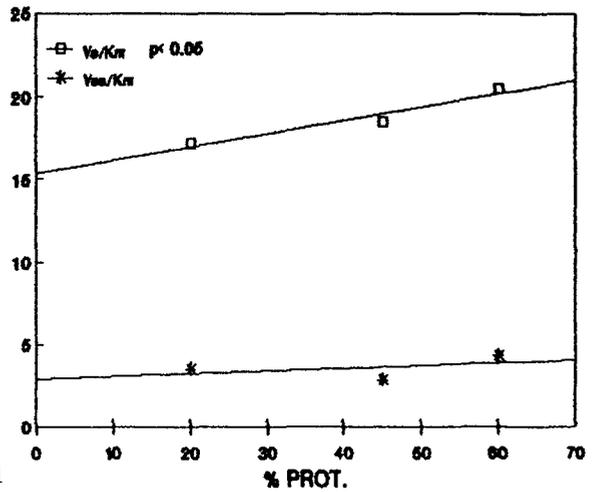
Eficiencia catalítica de la G6PDH renal



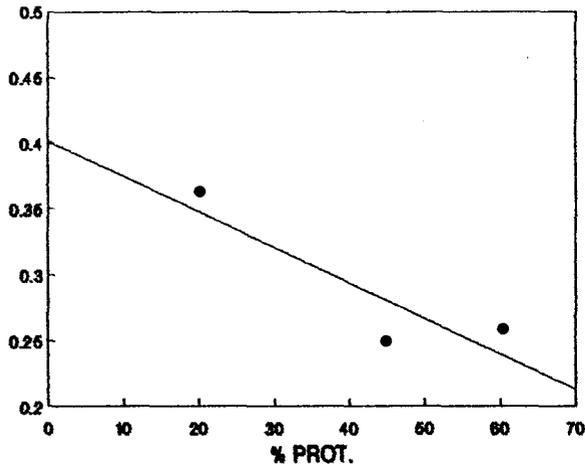
Eficiencia catalítica de la GDH renal



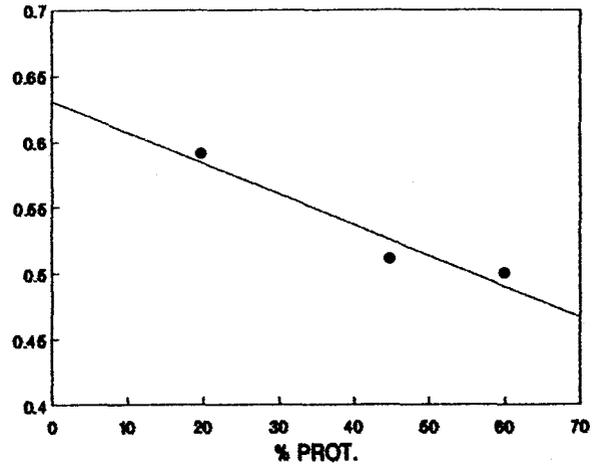
Eficiencia catalítica de la AAT renal



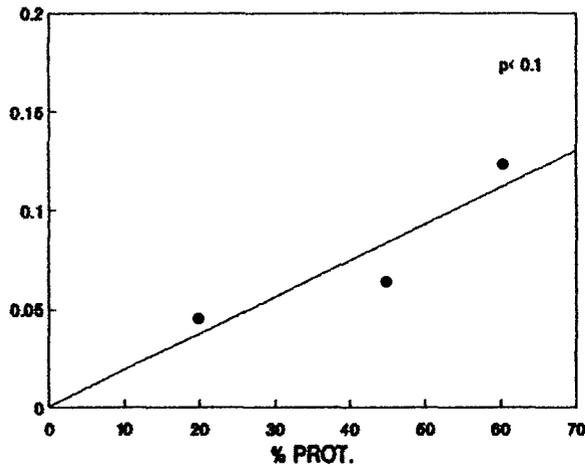
Razón de actividad de la PK hepática



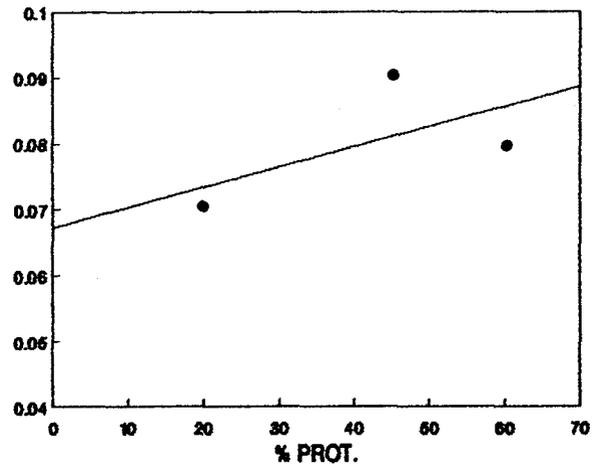
Razón de actividad de la PFK hepática



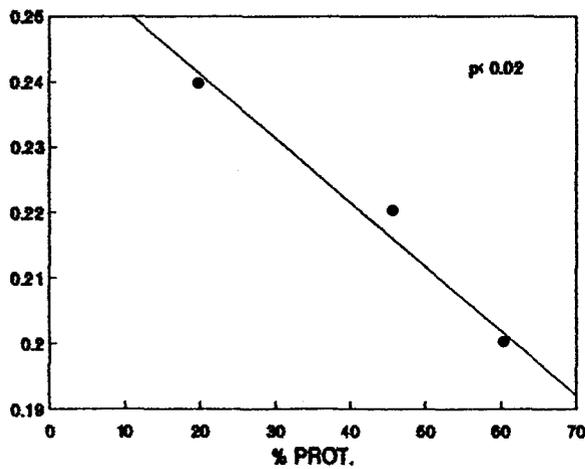
Razón de actividad de la FBPasa hepática



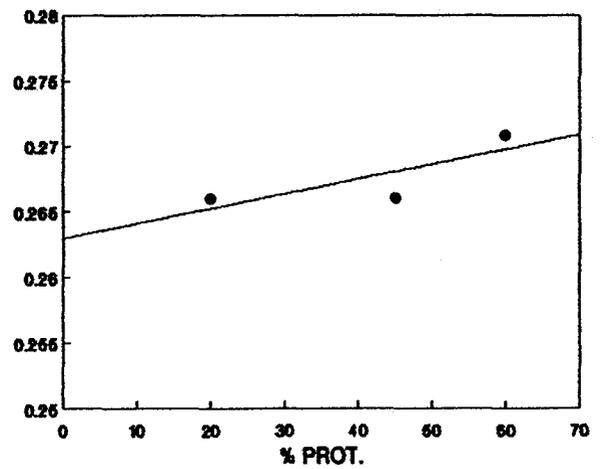
Razón de actividad de la G6PDH hepática



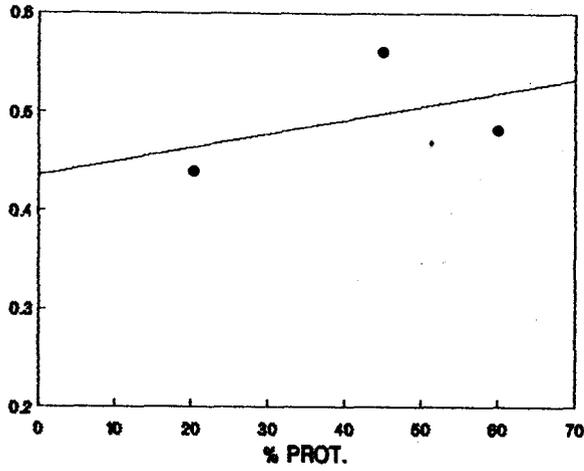
Razón de actividad de la GDH hepática



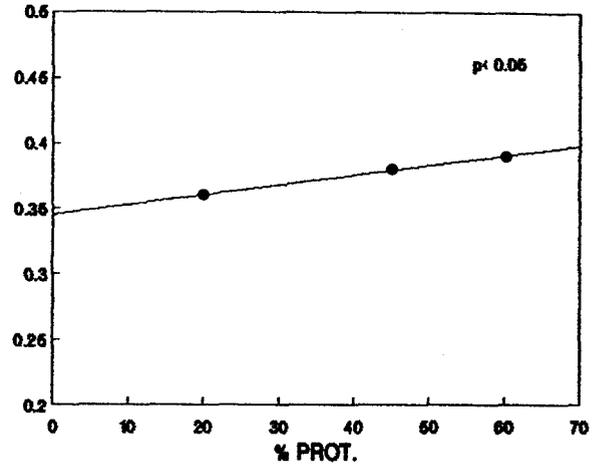
Razón de actividad de la AAT hepática



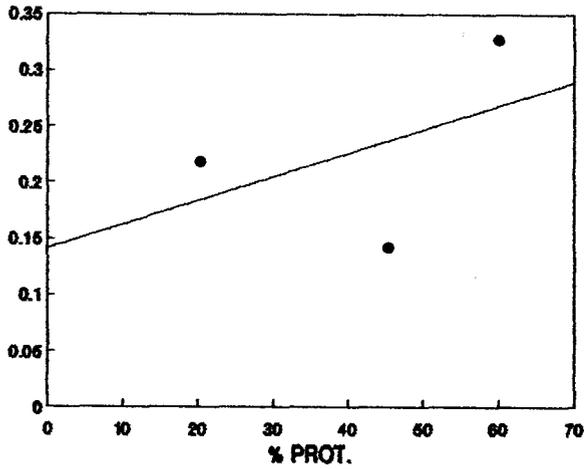
Razón de actividad de la PK renal



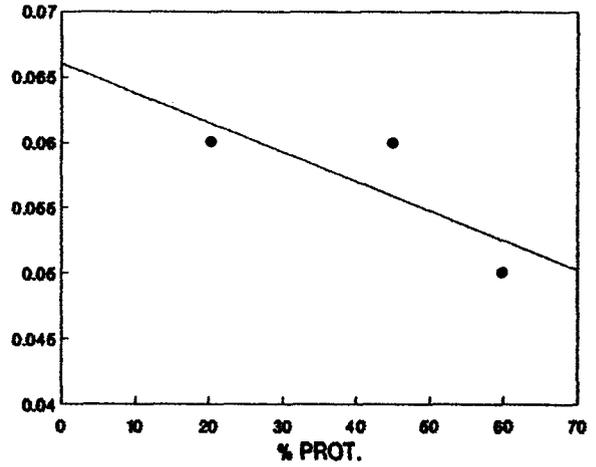
Razón de actividad de la PFK renal



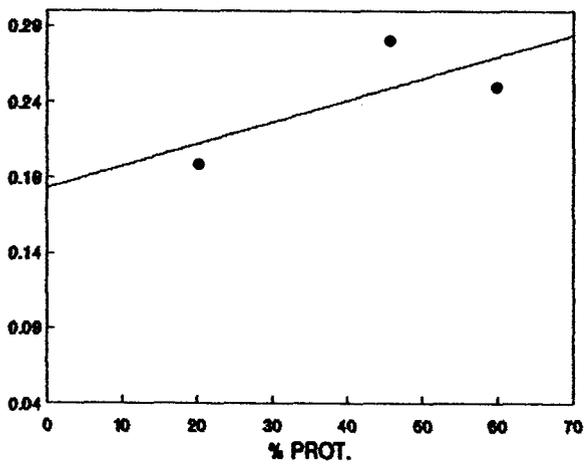
Razón de actividad de la FBPasa renal



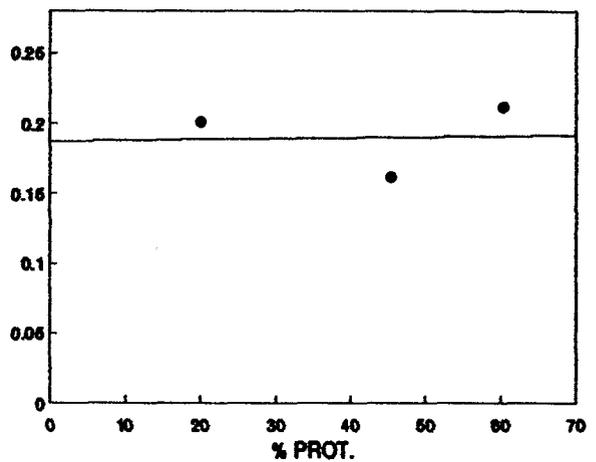
Razón de actividad de la G6PDH renal



Razón de actividad de la GDH renal



Razón de actividad de la AAT renal



## 4.6.- NIVELES DE GLUCOGENO HEPATICO , GLUCOSA Y AMINOACIDOS PLASMATICOS

La Tabla 4.4. muestra la influencia que las diferentes situaciones nutricionales usadas presentan sobre los niveles de glucógeno hepático, aminoácidos plasmáticos y glucosa. Como se puede observar el ayuno reduce significativamente la concentración de glucógeno hepático, así como la dieta alta en proteína/ baja en hidratos de carbono. La disminución observada de este metabolito con la dieta alta en hidratos de carbono se debe fundamentalmente a la poca aceptación de esta dieta por los animales. Los niveles de glucosa plasmática apenas se modifican con la excepción de la dieta alta en grasa . Mientras que los aminoácidos totales aumentan con la dieta alta en proteínas y disminuyen con el ayuno.

TABLA 4.1.-Efecto de las diferentes dietas sobre la concentración de algunos metabolitos plasmáticos e intracelulares. Las diferencias significativas se expresan como  $p < 0.05$ .

DIETAS	Glucosa en sangre $\mu\text{g/ml}$ sangre	Aa. plasmáticos mM	Gucogéno hepático $\mu\text{g Glu./mg Tej.}$
Control	645.6 $\pm$ 27.1(7)	1.65 $\pm$ 0.03(5)	14.46 $\pm$ 1.32(5)
Atl. Proteinas	665.6 $\pm$ 17.3(8)	1.86 $\pm$ 0.02(5)*	9.78 $\pm$ 0.05(6)*
Alt. H. de C.	739.5 $\pm$ 62.4(8)	1.15 $\pm$ 0.03(5)*	8.49 $\pm$ 2.12(6)*
Alt. Grasa	1053.7 $\pm$ 134.8(8)*	1.60 $\pm$ 0.05(5)	17.23 $\pm$ 1.49(5)
Ayuno	551.7 $\pm$ 78.8(6)	1.00 $\pm$ 0.04(5)*	2.97 $\pm$ 0.92(5)*

5-DISCUSSION



## 5.1-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO A UNA DIETA ALTA EN PROTEINAS.

La importancia y trascendencia de la proteína como nutriente, en piscicultura, no es solo cualitativa, en cuanto al aporte de aminoácidos esenciales, sino que, por el régimen carnívoro de la mayoría de las especies cultivadas, necesita ser incluida en la dieta en elevadas proporciones, (ver revisión de las necesidades realizada por De la HIGUERA, 1987) lo que encarece considerablemente el costo de la dieta en los cultivos intensivos. Distintos grupos de investigadores han hecho un esfuerzo por ajustar el contenido proteico en las dietas al mínimo, en función de establecer el óptimo equilibrio entre proteína y energía total a base, fundamentalmente, de sustituir la proteína, o mejor: el destino energético de los aminoácidos, por fuentes energéticas más baratas como la grasa (WATANABE 1987) y/o los hidratos de carbono (ZAMORA y ECHEVARRIA 1987).

Más adelante se comentan las consecuencias nutritivas, metabólicas y de conversión del alimento, que tiene la elevación de los niveles de lípidos o hidratos de carbono de la dieta, para minimizar el aporte proteico y rentabilizar su destino para crecimiento. Parece oportuno comentar brevemente el, o los posibles condicionantes de unas necesidades aparentemente tan elevadas de proteína, en relación a otros grupos de vertebrados, que hacen que los peces utilicen preferentemente los aminoácidos con fines energéticos (CHO y KAUSHIK, 1985; TACON Y COWEY, 1985) y gluconeogénicos (COWEY et.al., 1977a), mientras que tan sólo aproximadamente 1/3 de la proteína de la dieta se incorpora a las estructuras del animal, en condiciones óptimas. Ante estos hechos cabe preguntarse: ¿Dependen las necesidades de proteína de unas necesidades elevadas de alguno o algunos aminoácidos esenciales?, ¿Es una falta de capacidad adaptativa de los enzimas implicados en el catabolismo aminoacídico, el que, a variaciones sustanciales en el aporte proteico, mantenga en todo momento, elevadas tasas de utilización y que, a partir de ciertos niveles, una reducción en el aporte proteico suponga una drástica alteración del crecimiento?, ¿Existe

una protección de los aminoácidos esenciales ante bajas ingestas proteicas?.

Las necesidades de aminoácidos esenciales de los peces son, en términos de % de la proteína, comparables a las de otros con necesidades proteicas inferiores, luego esto no sería la causa de los altos niveles requeridos.

Por otra parte, los carnívoros, como los peces y el gato, no adaptan el catabolismo aminoacídico a la ingesta proteica y mantienen altas las tasas de utilización, con independencia de la concentración de proteína en la dieta. Sin embargo, presentan cierta capacidad adaptativa en relación al metabolismo glucídico, aumentando la actividad gluconeogénica al aumentar la ingesta proteica, y al contrario (COWEY et al., 1977a,b; De la HIGUERA y CARDENAS, 1985; HILTON y ATKINSON, 1982; WALTON, 1986).

Otro aspecto ilustrativo del condicionamiento evolutivo, a un régimen carnívoro, que lleva implícito esa capacidad adaptativa a variaciones en la ingesta proteica (RUMSEY, 1981) es que, con independencia del nivel proteico de la dieta, los peces oxidan cantidades importantes de aminoácidos esenciales, lo que pone de manifiesto la incapacidad de economizarlos a ingestas nitrogenadas bajas (COWEY y SARGENT, 1980), a diferencia de lo que ocurre con un omnívoro como la rata (ROGERS et al., 1977).

Sin embargo, en términos de producción animal, la conversión proteica es mayor en los peces que en los vertebrados homeotermos, de tal forma que las altas necesidades proteicas, en términos relativos (%) de composición de la dieta, no son más que aparentes y consecuencia de unas necesidades energéticas inferiores, al no tener que destinar parte de la energía al servicio de la homeotermia.

En cualquier caso, existe falta de información relativa a las posibilidades adaptativas del metabolismo nitrogenado que permitan reducciones sustanciales de la proteína, sin afectar al crecimiento, y en función de la capacidad de utilizar, como fuente de energía, otros macronutrientes en concentraciones adecuadas. En este

sentido, se aborda en este trabajo no solo la capacidad adaptativa del metabolismo intermediario, ante cambios sustanciales en el aporte proteico dietario, sino también ante la sustitución isocalórica de la proteína por grasa o hidratos de carbono al objeto, de interés aplicado, de reducir el destino energético y gluconeogénico de los aminoácidos.

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos afirmar que el destino metabólico que seguirá el exceso de aminoácidos, que no son utilizados en el proceso de síntesis proteica, puede ser múltiple. Parte del esqueleto carbonado de los aminoácidos, una vez perdido el grupo amino, podrá ser oxidado completamente a través del TCA hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , con la consiguiente producción de ATP. Otra proporción significativa podrá ser derivada hasta la formación de carbohidratos y lípidos, en un claro trabajo de biosíntesis necesario para cubrir las necesidades corporales de estos compuestos para el mantenimiento de un crecimiento adecuado (EISENSTEIN y STRAK, 1971; REMESY et al., 1978; 1983; PERET et al., 1981).

Nuestro interés se centró, fundamentalmente, en el análisis del comportamiento cinético de los enzimas más relevantes, desde el punto de vista regulador, del metabolismo intermediario frente a esta situación nutricional.

Algunos de los principales efectos que presenta una dieta alta en proteínas consiste, en un primer lugar, en el incremento de la excreción de nitrógeno y de la gluconeogénesis. Por lo que respecta a la influencia de los niveles de proteína sobre el metabolismo de carbohidratos, la utilización de los aminoácidos para la formación de glucosa es un camino esencial para peces carnívoros, para los cuales son regularmente bajos los niveles de carbohidratos presentes en sus dietas, siendo la glucosa un metabolito imprescindible para el mantenimiento del tejido nervioso, gónadas y metabolismo eritocitario.

En este sentido, nuestros resultados muestran un aumento significativo de la actividad de uno de los principales enzimas gluconeogénicos, fructosa

1.6-bisfosfatasa, el cual tiene lugar tanto en hígado como en riñón. Sin embargo, este incremento ocurre únicamente a concentraciones celulares de fructosa 1.6-bisfosfato, y este fué del orden del 80% para el hígado y del 67% para el riñón. En ninguno de estos tejidos pudimos apreciar cambios significativos en condiciones de velocidad máxima. Este comportamiento se debe, probablemente a la puesta en marcha de mecanismos de adaptación de la actividad enzimática relacionados más con cambios en la actividad del enzima que con cambios en su concentración. Esto se ve reforzado por el hecho de que la dieta alta en proteínas hace disminuir la  $K_m$  del enzima para el sustrato de forma significativa, lo que se traduce en un aumento de la afinidad del enzima por un sustrato (SEGAL, 1973). En este caso, parte del esqueleto carbonado que es utilizado en la síntesis de hexosa monofosfato a partir de los aminoácidos de la dieta, será posteriormente utilizado en la síntesis de glucógeno hepático o a través del camino oxidativo (REMESY et al., 1978; KAZT y McGARRY, 1984). La actividad enzimática exhibió una clara y típica inhibición por sustrato semejante al descrito para otros sistemas biológicos de una amplia distribución filogenética (MARCUS et al., 1973; ADROER et al., 1987). En un sentido global, nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros grupos (COWEY et al., 1977; 1981; HILTON y ATKINSON, 1982; WALTON, 1986) para el enzima hepático, aunque en estos casos el aumento en la actividad enzimática ocurre en condiciones de saturación de sustrato. Sin embargo, esta afirmación es arriesgada, cuando se trata de enzimas que presentan una clara inhibición por sustrato, por lo que se hace necesario realizar un estudio cinético completo para poder determinar de forma correcta la concentración a partir de la cual comienza a ser aparente la inhibición. En este sentido nuestros resultados muestran que para el hígado, a una concentración claramente saturante como 1 mM, la actividad enzimática, en animales sometidos a la dieta alta en proteínas, fué del orden 35% superior que la de animales controles, pero en ambos casos ya se encontraron en clara situación de inhibición (alrededor del 80% para ambos casos).

Los análisis de correlación entre los niveles de proteína en la dieta y el comportamiento cinético de este enzima corroboran lo anteriormente expuesto. No se

apreciaron cambios significativos en la velocidad máxima del enzima en hígado y riñón, mientras que la  $K_m$  disminuyó con el contenido de proteína. Este comportamiento permitió un incremento significativo de la razón de actividad ( $V_{ss}/V_{max}$ ), así como de la eficiencia catalítica, tanto a nivel subsaturante como saturante ( $V_{ss}/K_m$  y  $V_{max}/K_m$  respectivamente). Estos cambios fueron más patentes en el caso del hígado. La falta de respuesta renal parece ser debida a dos motivos, uno, que la capacidad de adaptación de este tejido es menor en términos cuantitativos y en segundo lugar a que exista una importante disminución en la ingesta de la dieta alta en glúcidos que se traduce en una reducción de los niveles de proteína ingerida, lo que afecta de forma especial a este órgano.

Parte de la glucosa sintetizada, bajo esta condición nutricional, va a ser utilizada con fines claramente energéticos utilizando una vía metabólica de oxidación conocida como glucólisis. En nuestro trabajo hemos analizado el comportamiento de dos enzimas clave, en la regulación y control de esta ruta, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa.

Ni en hígado ni en riñón encontramos diferencias significativas en la cinética ni en los parámetros estudiados,  $V_{max}$  y  $K_m$  de la fosfofructoquinasa. Sin embargo, la piruvato quinasa presentó un comportamiento claramente diferente, ya que se comprobó un aumento proporcional en la actividad del enzima a lo largo de toda la curva de saturación, es decir a todas las concentraciones de fosfoenolpiruvato analizadas. Por lo tanto era lógico esperar que no existiesen cambios significativos en los valores de la  $K_m$  del enzima. Todo esto está de acuerdo con un probable incremento en la síntesis proteica, que tiene lugar bajo esta condición nutricional. Esta capacidad de adaptación tiene lugar tanto en las células hepáticas como renales, aunque en estas últimas sea de menor orden. Este comportamiento contrasta claramente con el encontrado en la literatura científica (COWEY et al., 1977b; 1981; HILTON y AKTINSON, 1982; WALTON, 1986). Estos autores no encuentran diferencias importantes en la actividad del enzima hepático como consecuencia de una dieta alta en proteínas.

El aumento de la actividad de este enzima puede explicarse por varias razones. En primer lugar este enzima sería el máximo responsable del control de la ruta glucolítica asumiendo el papel que, en otros sistemas biológicos, realiza la fosfofructoquinasa. En segundo lugar, debido a que parte del exceso de  $\alpha$ -cetoácidos procedentes de los aminoácidos exógenos es utilizado preferentemente con fines oxidativos, a través de acetil-CoA vía fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y piruvato quinasa (SNELL, 1980). La menor capacidad de adaptación en renal se debe a que el significado y, por tanto, la velocidad de esta ruta en las células renales es menor, debido al diferente papel que este órgano juega en la oxidación de aminoácidos.

De forma general, el comportamiento cinético de los enzimas glucolíticos se ve reforzado por lo encontrado, en los estudios de correlación, entre este comportamiento y el nivel de proteína en la dieta. Algunas pequeñas desviaciones encontradas siempre en la dieta de mínimo nivel de proteína parecen deberse al comportamiento irregular de los animales en cuanto a la ingesta de esta dieta.

Otra vía oxidativa de la glucosa la constituye el ciclo de las pentosas fosfato. Se trata de una vía multifuncional en donde uno de los principales objetivos es producir equivalentes de reducción, en forma de NADPH, para la síntesis de ácidos grasos y otros derivados lipídicos. En el hígado de mamíferos esta ruta metabólica presenta grandes variaciones en su flujo, frente a diferentes situaciones nutricionales (KLETZIEN et al., 1985; CASSAZA y VEECH, 1986).

Una de estas situaciones corresponde a la dieta alta en proteína. Como comentamos anteriormente, parte del esqueleto carbonado de los aminoácidos, procedente de la dieta, puede, a partir del Acetil CoA, transformarse en ácidos grasos y otros derivados lipídicos, para lo cual es necesario un aporte suplementario de equivalentes de reducción. Por todo ello, estudiamos los efectos de una dieta alta en proteínas sobre la actividad de uno de los principales enzimas de este ciclo, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, tanto en hígado como en riñón, no

observándose cambios significativos en el comportamiento cinético de este enzima, a diferencia de lo que ocurre en hígado y riñón de rata (KLETZIEN, et al., 1985; CASSAZA y VEECH, 1986).

Parece claro que la respuesta de la trucha a esta situación nutricional es claramente diferente a la de otros vertebrados. Probablemente esto sea debido a que la necesidad de síntesis de ácidos grasos para los peces, en estas condiciones, sea menor que en mamíferos; y, si no es así, otras rutas alternativas tales como los enzimas NADP-isocitrato deshidrogenasa y/o enzima málico deberán proveer al animal de la cantidad de NADPH extra necesaria para llevar a cabo estos procesos de síntesis. No obstante, son necesarios posteriores estudios para poder corroborar esta hipótesis.

Por otra parte, teniendo en cuenta que bajo estas condiciones, los peces crecen más que en condiciones normales (alrededor de un 30% ) y que la velocidad óptima del enzima aumenta, aunque no es suficiente, en un 15%, podemos pensar que en términos de órgano completo la actividad enzimática total podría sufrir un incremento suficiente para cubrir las necesidades extras de NADPH, capaces de utilizar el exceso de Acetil-CoA generado bajo estas condiciones para la síntesis de ácidos grasos.

Por lo que respecta a los peces carnívoros, tales como la trucha arcoiris, se ha descrito que la dieta alta en proteínas proporciona un importante aumento en la eliminación de amonio (BEAMISH y THOMAS, 1984). Estos cambios podrían ser explicados tanto por el control de las actividades enzimáticas como por el incremento de los niveles de sustrato relacionados con este aporte proteico extra. No obstante, hasta este momento no existían evidencias que apoyasen un incremento en la actividad de enzimas que metabolizasen algunos aminoácidos en truchas alimentadas con este tipo de dieta (alta en proteínas), cuando se comparan con las alimentadas con una dieta baja en este macronutriente (ABEL et al., 1978; COWEY et al. 1981). En cualquier caso, parte de la información disponible es incompleta y difícil de comparar debido a que han sido utilizadas dietas y especies diferentes así como la propia experiencia de las actividades enzimáticas.

Además la mayoría de la información de estas actividades ha sido obtenida utilizando niveles saturantes de sustrato y no a concentraciones celulares del mismo. Bajo estas condiciones experimentales nosotros estudiamos el comportamiento cinético de los enzimas mas representativos de metabolismo nitrogenado, glutamato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa (conocida tambien como glutamato-piruvato transaminasa). Mientras que la alanina aminotransferasa es un enzima especifico del metabolismo de la alanina, la glutamato deshidrogenasa es un enzima obligado en el proceso de transdeaminación de, practicamente todos los aminoácidos lo que lo hace un enzima clave en el metabolismo (anabólico y catabólico) de estos aminoácidos.

Por lo que respecta a la alanina aminotransferasa pudimos encontrar una diferencia importante en los dos órganos estudiados, lo que está de acuerdo con los papeles diferentes que presenta este enzima en el metabolismo de este aminoácido en ambos tejidos. La actividad específica del enzima hepático fué de alrededor del 65% mayor que en animales controles, mientras que no existieron cambios significativos en el valor de Km para la alanina.

Un aumento en la actividad del enzima, en este caso como consecuencia de un incremento en la concentración del mismo, explica perfectamente la enorme capacidad de adaptación de este órgano, en condiciones en las que se requiere un aumento de la velocidad de metabolización del exceso de aminoácidos y, por tanto, de su incorporación al metabolismo primario del animal.

Sin embargo, no observamos cambios en el comportamiento del enzima renal, el cual permaneció practicamente inalterable. Está bien establecido que en riñón de rata la alanina no es utilizada como sustrato gluconeogénico (GARCIA-SALGUERO et al., 1989) debido, entre otras razones a la bajísima concentración de este aminoácido en estas celulas. Por otra parte, la alta Km encotrada para el enzima renal, del orden de 6 mM, hace que los posibles cambios en la concentración celular de alanina, que puede oscilar entre 0 y 0.5 mM, haga practicamente inútil cualquier cambio de velocidad (SEGAL, 1973).

Por el contrario, la actividad de la glutamato deshidrogenasa en hígado y riñón mostró un incremento significativo a todas las concentraciones de sustrato empleadas en el estudio de la curva de saturación. La velocidad del enzima hepático aumentó en un 100% y la de riñón en un 50% , sin cambios en la Km del enzima por el glutamato.

Estos resultados estan básicamente de acuerdo con los descritos por otros autores, WALTON (1986) puso de manifiesto un incremento en la actividad alanina aminotransferasa hepática de 1.2 veces y de 1.6 en la actividad glutamato deshidrogenasa de hígado de truchas alimentadas con una dieta alta en proteínas y baja en carbohidratos, comparada con una dieta baja en proteínas y alta en carbohidratos.

El exceso de  $\alpha$ -cetoglutarato formado a partir de glutamato, bajo estas condiciones, puede ser utilizado como sustrato gluconeogénico a través del oxalacetato, via fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa y/o como sustrato energético o precursor lipogénico a través del acetyl-CoA, via fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y piruvato quinasa (SNELL, 1980).

Además, el incremento de la actividad glutamato deshidrogenasa, en ambos órganos, podría estar relacionado con el papel preponderante que juega este enzima en el mantenimiento del equilibrio ácido-base durante la acidosis metabólica que podría acompañar a esta situación nutritiva (BROSNAN et al., 1978). En este sentido, WALTON y COWEY (1977) mostraron que los altos niveles de actividad glutamato deshidrogenasa encontrados, principalmente en hígado y riñón de trucha, están implicados en la producción "in vivo" de amonio, durante la alimentación con una dieta rica en proteínas.

La relación entre los diferentes parámetros cinéticos de estos enzimas y la cantidad de proteína se han examinado. Los resultados ponen de manifiesto, como cabía esperar ,un aumento significativo de la velocidad máxima y eficiencia catalítica de los enzimas hepáticos sin cambios en los valores de la Km y razón de actividad.

Este comportamiento confirma de forma indirecta que, en definitiva, el aumento en la actividad de estas enzimas se debe a un incremento en la concentración celular de los mismos, como consecuencia del incremento en la síntesis proteica característica de esta situación nutricional.

## 5.2.-ADAPTACION DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO A UNA DIETA ALTA EN CARBOHIDRATOS

La utilización de los hidratos de carbono de la dieta, por especies carnívoras como la trucha arcoiris, es muy pobre. 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 los 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). La hiperglucemia inducida por altos niveles de hidratos de carbono en la dieta (COWEY et al. 1977a; De la HIGUERA y CARDENAS, 1985) puede ser explicada, en parte, por la ausencia de una glucoquinasa inducible en hígado (COWEY et al. 1977b). En contra de estos resultados y de los de NAGAYAMA y OSHIMA (1974), que estudiaron en carpa, trucha y anguila la actividad de la hexoquinasa hepática, y observaron actividades diez veces menores que en mamíferos. FIDEU et.al.(1983) pusieron de manifiesto una regulación nutricional de la glucólisis, en hígado de trucha, a nivel de síntesis de enzimas clave de esta ruta. Estos autores encontraron un aumento de los niveles de hexoquinasa con dieta rica en carbohidratos y una disminución con dietas ricas en proteína y en el ayuno; la PFK disminuyó su actividad en estas dos últimas situaciones nutritivas pero no experimentó cambios para la dieta rica en glúcidos; la PK solo se afectó por el ayuno, disminuyendo su nivel de actividad en estas condiciones. Es de destacar que los niveles de actividad relativos fueron  $HK=25PK$  y  $PFK=20PK$  (FIDEU et.al. 1983).

Aún cuando la trucha arcoiris presenta una pobre utilización de la glucosa, posee una cierta capacidad adaptativa a un aumento de los hidratos de carbono dietarios (COWEY et.al.1977a,b; FURUICHI y YONE, 1980; HILTON y ATKINSON, 1982; FIDEU et.al., 1983), llegando incluso a sustituir parcialmente, aunque a niveles inferiores a los lípidos, el destino energético y gluconeogénico de la proteína de la dieta, favoreciendo su utilización con fines estructurales (PIEPER y PFEFFER, 1979; SHIMENO et.al., 1979).

Estos estudios nutritivos, de conversión del alimento y de actividad y adaptabilidad de las rutas metabólicas de utilización de la glucosa, relacionados con la posibilidad de inclusión de los hidratos de carbono en dietas para peces, a niveles que trasciendan en la rentabilidad de formulas-pienso, ponen de manifiesto que los límites de inclusión son bajos: efectos negativos de su inclusión en procesos digestivos y escasa actividad de las vías de oxidación de la glucosa .

Otro aspecto que juega un papel notable en ese ajuste de la dieta, dirigido al mejor uso de los glúcidos, sin mermar el crecimiento o estado de salud de los animales, es el destino gluconeogénico de los aminoácidos y sus posibilidades de control. Los peces carnívoros, en su medio natural, ingieren alimentos ricos en proteína que contienen pocos hidratos de carbono, de ahí que estos peces tengan una vía gluconeogénica más activa que la oxidativa con objeto de suministrar glucosa a aquellos tejidos que, como los glóbulos rojos, sistema nervioso y gónadas la utilizan como principal fuente de energía. Además, al estar sometidos a periodos de ayuno, sobre todo invernales, deben acumular glucógeno para estas circunstancias, glucógeno que se forma, en última instancia, a partir de los aminoácidos.

La vía gluconeogénica es regulable por influencias nutritivas (COWEY et.al., 1977a,b; De la HIGUERA y CARDENAS, 1985; HILTON y ATKINSON, 1982; WALTON, 1986) y hormonales (COWEY et.al., 1977a,b; De la HIGUERA y CARDENAS, 1985). El efecto de la composición de la dieta parece depender no solo del nivel de hidratos de carbono, que pudieran ejercer retroalimentación negativa, mediada o

no por el sistema endocrino, sino de las disponibilidades de sustrato ( aminoácidos, especialmente). En este sentido, HILTON y ATKINSON (1982) observaron que al aumentar el aporte hidrocarbonado, sustituyendo isocalóricamente a los lípidos, la incorporación de  $C^{14}$ -alanina en  $C^{14}$ -glucosa disminuye; sin embargo, esta disminución es mucho mayor cuando el aumento del aporte glúcido se hace a costa de la proteína, para mantener isocalóricas las dietas experimentales, según los resultados obtenidos por COWEY et.al.(1977a) y De la HIGUERA y CARDENAS (1985)

Los resultados obtenidos en este trabajo indican, de forma clara y definitiva, que la trucha arcoiris tiene una capacidad muy limitada para adaptar su metabolismo a un incremento de carbohidratos en la dieta, confirmando el valor limitado que, desde un punto de vista nutricional, presenta este tipo de principio inmediato para los peces carnívoros (PHILLIPS, 1969).

En este sentido, HILTON y ATKINSON (1982) demostraron que cuando los niveles de azúcares digestibles alcanzan un valor de 140 g/Kg de dieta estos no son eficazmente utilizados. En condiciones normales, la dieta natural de la trucha arcoiris contiene escasas cantidades de carbohidratos, por lo que es lógico pensar que estos peces no hayan desarrollado un sistema óptimo capaz de metabolizar, a velocidades adecuadas y de forma eficiente, cualquier aumento de este principio inmediato en su alimentación. Apoyando estas afirmaciones, varios autores han demostrado que la velocidad de oxidación aerobia de la glucosa por los peces es considerablemente menor que la de los mamíferos, incluso asumiendo la diferencia de temperatura que caracteriza ambos grupos de animales (LIN et al., 1978; COWEY y SARGENT, 1979).

A pesar de estas observaciones, la trucha, en nuestro trabajo, adaptó en cierta medida el metabolismo al incremento de carbohidratos digestibles en la dieta. En relación con la capacidad oxidativa hepática, del exceso de glucosa procedente de la dieta, nuestros resultados están en cierto sentido de acuerdo con lo expresado anteriormente. El comportamiento cinético de uno de los enzimas clave de la ruta glucolítica, la

fosfofructoquinasa, se vió afectada bajo esta condición nutricional.

El análisis de los datos obtenidos confirma que la actividad PFK hepática aumenta significativamente, aunque sólo a concentraciones subsaturantes de fructosa 6-fosfato. Este cambio, que llega a ser del orden del 50%, se traduce en una disminución del valor de Km del 55%, indicando que el efecto que produce el exceso de carbohidratos en la dieta, sobre la actividad PFK, está más relacionado con cambios alostéricos o de modulación que por un efecto sobre la inducción enzimática (SEGAL, 1973). De igual forma, la dieta alta en carbohidratos produjo un aumento en la actividad del otro enzima glucolítico ensayado, la piruvato quinasa. Este aumento, que sólo afectó a concentraciones celulares de sustrato sin cambios en la velocidad máxima, alcanzó valores del 45%, lo que se tradujo igualmente en una disminución del valor de Km, para el fosfoenolpiruvato del orden del 40% .

Hay que mencionar, no obstante, que la aparición de este tipo de cambios en la capacidad de control enzimático, mas propios de una actuación puntual capaz de controlar de forma inmediata una situación creada momentáneamente que de una adaptación metabólica creada a largo plazo confirma la limitada capacidad metabólica que la trucha presenta frente a un aporte alto de carbohidratos, puesto que una mayor y permanente utilización de este nutriente forzosamente implicaría un aumento significativo de los niveles intracelulares de estos enzimas. Además, la ingesta global de esta dieta fué muy baja, lo que pone de manifiesto el que muchos de los animales permanecieron casi en ayunas durante todo el experimento. Por ello, pudimos apreciar en nuestros análisis dos poblaciones de resultados, aunque no demasiado diferentes desde el punto de vista absoluto, puesto que para el estudio se hacían grupos de tres animales distintos, si cualitativamente diferentes, y que probablemente corresponderían en un caso a los que tomaron alimento y en otro a los que no lo hicieron.

En este sentido, HILTON y ATKINSON (1982) pusieron de manifiesto que un aumento en los niveles de carbohidratos digeribles de hasta 110 g/Kg dieta en la

dieta, administrados durante 16 semanas, incrementa significativamente (75%) la actividad piruvato quinasa medida ésta a velocidad máxima, pero no la modifica cuando los niveles de carbohidratos digestibles son mayores. Esta diferencia cualitativa con nuestros resultados podría explicarse por el hecho de que las dietas utilizadas por estos autores conforme crecían en carbohidratos disminuían en grasa, por lo que el aumento de actividad piruvato quinasa estaría más relacionado con la necesidad de proveer de acetil-CoA, necesario para llevar a cabo una lipogénesis y cetogénesis activa con objeto de restablecer los niveles adecuados de estos productos. Apoyando esta idea estos autores (HILTON y ATKINSON, 1982) muestran, bajo sus condiciones experimentales, un incremento significativo de la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa para el suministro de equivalentes de reducción, requeridos para la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, la actividad piruvato quinasa no se afectó a niveles mayores de carbohidratos, y por tanto menores de lípidos, a pesar del incremento en la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Todo esto indica claramente que algún factor limita la operatividad de la lipogénesis a partir de carbohidratos, puesto que, probablemente bajo estas condiciones el acetil-CoA requerido para la síntesis de ácidos grasos procederá del catabolismo de aminoácidos. Todo ello demuestra que debe existir una relación óptima de carbohidratos/lípidos en las dietas de la trucha la cual podría maximizar el metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis hepática y de esta forma conseguir la máxima eficacia en el uso de los carbohidratos de la dieta.

Un hecho de especial mención para el caso de la piruvato quinasa consiste en la diferencia significativa existente entre los valores absolutos de actividad enzimática en los tejidos estudiados siendo mayor para el riñón. Esto que es una constante en el resto de los vertebrados parece explicarse por la diferente capacidad que presentan ambos tejidos para la utilización de la glucosa con fines energéticos. En mamíferos la médula renal y los túbulos distales de la corteza renal presentan un metabolismo francamente glucolítico (GARCIA-SALGUERO et al., 1988 a, b; 1989) mientras que el hígado presenta una tasa de oxidación de la glucosa muy reducida a pesar de

ser el organo productor de este metabolito por excelencia (KATZ y McGARRY, 1984), puesto que son los ácidos grasos los utilizados preferentemente con fines energéticos.

El resto de los enzimas estudiados, pertenecientes unos al metabolismo glucídico, fructosa 1,6-bisfosfatasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y otros al metabolismo nitrogenado, alanina aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa en hígado no mostraron cambios significativos de su comportamiento cinético, tras la administración de una dieta alta en carbohidratos.

La ausencia de cambios en la actividad del enzima gluconeogénico, fructosa 1,6,-bisfosfatasa tanto de hígado como riñón cuando por el contrario cabia esperar una drástica disminución ante el alto aporte exógeno de azúcares confirman de nuevo la limitada capacidad de estos animales para adaptar su metabolismo a este macronutriente. Estos resultados contrastan fuertemente con la capacidad de adaptación que este enzima posee en el hígado y riñón de mamíferos (GARCIA-SALGUERO et al., 1988 a, b; 1989). A pesar de todo ello y teniendo en cuenta que es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa el enzima clave del proceso gluconeogénico para la mayoría de los sistemas biológicos, podriamos pensar que bajo nuestras condiciones nutricionales sea este el enzima que presente la mayor capacidad de adaptación. En este sentido, HILTON y ATKINSON (1982) no encontraron diferencias significativas en la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa, con el aumento de los niveles de carbohidratos en la dieta, cuando esta es expresada en términos de gramos de hígado; mientras que sí encontraron una fuerte disminución (75%) de la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa bajo estas condiciones nutritivas, tanto expresada en terminos de g de hígado como de Kg de peso corporal de la trucha.

La falta de efecto en las actividades glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, alanina aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa por parte del exceso de carbohidratos de la dieta se relaciona perfectamente con el bajo contenido de proteína que se aporta en la dieta alta en carbohidratos que junto con la disminución de la ingesta provocan una mayor liberación de aminoácidos endógenos a sí como de lípidos, también de origen

endógeno, contrarestandose con toda seguridad las dos situaciones que confluyen bajo esta condición nutricional.

Por otra parte, la situación nutricional provocada por la administración de una dieta alta en carbohidratos no produjo cambios significativos en el comportamiento cinético de los enzimas renales estudiados. Estos resultados contrastan fuertemente con la capacidad de adaptación que el riñón de mamíferos, y en concreto de la rata, presenta bajo estas condiciones, al menos en lo que respecta al metabolismo glucídico. En este sentido GARCIA-SALGUERO y LUPIAÑEZ (1988; 1989a,b) muestran que la administración de una dieta alta en carbohidratos, durante 48 y 96 horas, provoca un aumento (100%) en la capacidad glucolítica de la corteza renal como consecuencia del aumento en la velocidad de los enzimas piruvato quinasa y fosfofructoquinasa solo a concentraciones subsaturantes de sustrato (GARCIA-SALGUERO y LUPIAÑEZ, 1988; 1989a). Por el contrario, esta misma situación provocó una fuerte disminución (75%) en la capacidad gluconeogénica del mismo tejido ya que tanto las actividades fructosa 1,6-bisfosfatasa como fosfoenolpiruvato carboxiquinasa disminuyeron de forma paralela a lo que lo hizo la síntesis de glucosa. Sin embargo, los cambios encontrados en el comportamiento cinético de estos enzimas gluconeogénicos fué cualitativamente diferente (GARCIA-SALGUERO, LUPIAÑEZ 1989 a, b). Mientras que la actividad fructosa 1,6-bisfosfatasa solo se modificó a concentraciones celulares de fructosa 1,6-bisfosfato, la actividad fosfoenolpiruvato carboxiquinasa lo hizo a lo largo de toda la curva de saturación para el fosfoenolpiruvato.

Finalmente, merece la pena mencionar la casi exacta correspondencia cualitativa existente entre el valor de los diferentes parámetros cinéticos, fundamentalmente velocidad máxima, aunque no por supuesto en términos absolutos ya que es diferente la expresión de estos valores, varia con los mostrados en bibliografía científica, para todos los enzimas estudiados en ambos tejidos. Para ello basta revisar los trabajos de KNOX et al. (1980) WALTON y COWEY (1982) y WALTON (1986).

### 5.3.-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO A UNA DIETA ALTA EN GRASA

Los efectos que, sobre la utilización nutritiva de la dieta, tiene la elevación del nivel lipídico dietario son fundamentalmente y desde el punto de vista práctico, un aumento de la utilización de la proteína para crecimiento con la consiguiente mejora en los índices de retención de proteína y conversión del alimento (De la HIGUERA et al., 1977a; TAKEUCHI et al., 1978; CARDENETE, 1985) que cursa paralelo a una disminución en el consumo de oxígeno, debida al mayor incremento calórico de la alimentación que produce la utilización proteica en relación a la de los lípidos (CHO et al., 1982) y, al mismo tiempo, al efecto de sustitución calórica que ejercen los lípidos, donde el destino energético de los aminoácidos se traduce en una menor eliminación de productos finales del catabolismo proteico (ATHERTON y AITKEN, 1970; GARCIA et al., 1981; CARDENETE, 1985) que, por su efecto negativo sobre el medio, pueden tener importantes consecuencias en determinadas circunstancias como, por ejemplo, un aumento de la temperatura y/o menor flujo de agua en las instalaciones de cultivo.

Estos efectos generales de indudable interés práctico para la piscicultura, deben tener su reflejo a nivel bioquímico. La capacidad adaptativa de una determinada ruta metabólica, a variaciones en la composición de la dieta, nos dará una información valiosa sobre las posibilidades de introducir variaciones en el contenido relativo de macronutrientes, sin llegar a forzar esa ruta e inducir, en consecuencia, situaciones nutritivas y/o fisiológicas no deseables.

El metabolismo de los lípidos, en peces, comienza a ser conocido a un nivel cada vez más íntimo. Las publicaciones científicas se han incrementado notablemente en los últimos años y prueba de ello son las numerosas revisiones publicadas (HENDERSON y TOCHER, 1987; WALTON y COWEY, 1982; WATANABE, 1987; etc...).

De la información disponible, aquella más directamente relacionada con este trabajo es la relativa a

las características bioquímicas y a las influencias sobre procesos generales "in totum": lipogénesis y movilización de depósitos grasos. En relación a la síntesis de ácidos grasos se ha observado que los salmónidos en algunos aspectos, tiene un comportamiento similar a aves y mamíferos, en los que el producto mayoritario final del proceso es el palmitato (BRINDLEY et al., 1969; KUMAR et al., 1972), mientras que otros peces, como la carpa, sintetizan también como mayoritario el miristato (EBERHAGEN et al., 1969).

LIN et al., (1977a) llegaron también a conclusiones de similitud bioquímica entre pollos y rata, y el salmón coho, al estudiar la respuesta de éste a diferentes dietas. La actividad de enzimas generadores de equivalentes de reducción, necesarios para la síntesis de ácidos grasos son, para una determinada situación nutritiva, mucho mayores en hígado que en tejido adiposo. Además, cuando se aumenta, desde 2,5 a 10% el contenido lipídico de la dieta la actividad de estos enzimas (G,6-P DH, enzima málico, 6-P-gluconato DH) se redujo significativamente en hígado, pero no experimentaron cambios en tejido adiposo.

Al estudiar la actividad lipogénica hepática, esos mismos autores encontraron que el ayuno prolongado (26 días) reduce significativamente la actividad de enzimas lipogénicos (LIN et al., 1977b). También la composición de la dieta puede alterar la actividad de estos enzimas en el hígado, siempre que les dé tiempo a inducirlos en este sentido.

La administración de una dieta alta en grasa constituye una situación nutricional extraordinariamente aceptable por la trucha, incluso aún más que la propia dieta alta en proteínas, como lo demuestran todos los valores de los índices de utilización del alimento estudiados. Los peces se adaptan fácilmente a este tipo de dieta lo que se traduce forzosamente en un aumento considerable de los niveles de grasa en el interior del animal, influyendo con toda seguridad en aquellas rutas metabólicas íntimamente relacionadas con el metabolismo de las grasas.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la dieta

alta en grasa produjo cambios significativos en el comportamiento cinético de la mayoría de los enzimas analizados y relacionados con el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas; esos cambios tuvieron preferentemente lugar en hígado. Por lo que respecta al riñón, estos cambios lo fueron en menor grado para los enzimas glucolíticos y gluconeogénicos mientras que no se vieron alterados de forma significativa la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y los enzimas relacionados con el metabolismo nitrogenado; alanina aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa.

Una de las primeras consecuencias manifestadas tras la administración de una dieta alta en grasa 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.

Este aumento de los ácidos grasos provoca, entre otros efectos, un considerable incremento en la velocidad de utilización de los mismos. Se puede por tanto preveer que durante la oxidación "in vivo" de los ácidos grasos, por el hígado y otros tejidos periféricos, se incrementarían las concentraciones intramitocondriales de acetil-CoA y ATP así como la razón NADH/NAD. Todos estos cambios pueden explicar la diferente desviación que sufre cualquier esqueleto carbonado que llega al punto de ramificación del piruvato ya sea hacia la ruta oxidativa, a través del ciclo de Krebs (vía piruvato deshidrogenasa) o hacia el camino gluconeogénico (vía piruvato carboxilasa). Este último proceso es de especial significancia bajo la administración de una dieta alta en grasa puesto que existe un activo metabolismo de los ácidos grasos plasmáticos (FRENCH et al., 1981); y el hígado, al menos en la trucha arcoíris, incrementa enormemente su capacidad para oxidar estos ácidos grasos (FRENCH et. al., 1981).

El hígado de la trucha arcoíris es uno de los pocos sistemas en peces teleósteos del que se dispone de información detallada sobre el mecanismo de control del flujo gluconeogénico. La oxidación de ácidos grasos produce la estimulación de la gluconeogénesis hepática a partir de lactato en hepatocitos de trucha (MOMMSEN y

SUAREZ 1984). Este fenómeno tiene lugar como consecuencia de la inhibición de la actividad piruvato deshidrogenasa y la activación concomitante de la piruvato carboxilasa (SUAREZ y HOCHACHKA, 1981). Aunque hasta ahora no ha sido aislada y caracterizada la piruvato deshidrogenasa de trucha, es probablemente seguro el poder asumir una semejanza en las propiedades reguladoras con el enzima de otros sistemas biológicos, entre las que se pueden citar la retroinhibición por NADH, ATP y acetyl-CoA y el control por fosforilación-desfosforilación (BATENBURG y OLSON 1976).

Por otra parte, preparaciones de piruvato carboxilasa de hígado de trucha parcialmente purificadas requieren para su activación la participación del acetyl-CoA como efector alostérico y de ahí su equivalencia con el enzima de mamíferos. El enzima de trucha prefiere el ATP como sustrato en lugar de otro nucleósido trifosfato y usa ADP y AMP como inhibidores competitivos (SUAREZ y HOCHACHKA 1981). La piruvato carboxilasa está localizada exclusivamente en las mitocondrias de todas las especies animales estudiadas y los teleosteos no son una excepción (SUAREZ y HOCHACHKA, 1981; WALTON y COWEY, 1979; BARRIT et al., 1976; PHILLIPS y HIRD 1977; MOMMSEN et al., 1985). Por tanto, la carboxilación del piruvato, primera reacción que utiliza compuestos de tres átomos de carbono derivados de precursores tales como alanina o lactato en el proceso gluconeogénico tiene lugar en la matriz mitocondrial (SUAREZ y HOCHACHKA, 1981). Por otra parte, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, presenta una diferente localización intracelular que varía con el órgano (por ejemplo hígado o riñón), especie y/o estado fisiológico o nutricional. Todo esto trae como resultado una gran variabilidad en la compartimentación donde ocurre la síntesis de fosfoenolpiruvato y en donde tiene lugar la ruta entre el piruvato y el fosfoenolpiruvato.

Todo lo anteriormente expuesto demuestra claramente el efecto estimulador que los ácidos grasos ejercen sobre la gluconeogénesis en la mayoría de los sistemas biológicos. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no pudimos observar cambios significativos en la actividad hepática de uno de los enzimas

gluconeogénicos que participan de forma activa en el control de flujo de esta ruta biosintética, la fructosa 1,6-bisfosfatasa. Por el contrario, hemos podido poner de manifiesto cambios significativos en el comportamiento cinético del enzima renal, en el cual se produce un incremento en la actividad fructosa bisfosfatasa a concentraciones subsaturantes de fructosa 1,6-bisfosfato. No obstante, estos resultados no invalidan el hecho de que bajo esta situación nutricional se incrementa la gluconeogénesis hepática puesto que el peso central en este control se podría centrar en el otro enzima gluconeogénico como es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

El efecto estimulador de los ácidos grasos sobre la gluconeogénesis a partir de lactato en hepatocitos aislados de trucha (MOMMSEN y SUAREZ, 1984) es especialmente notable puesto que en esta especie la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa hepática está localizada preferentemente en la mitocondria (WALTON y COWEY, 1979). En las especies donde la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa hepática se encuentra casi exclusivamente en el compartimento mitocondrial, el oxalacetato generado por la carboxilación del piruvato por la piruvato carboxilasa, es convertido en fosfoenolpiruvato dentro de la mitocondria. A continuación, el fosfoenolpiruvato es transportado fuera de la mitocondria para completar el resto de las reacciones de la ruta gluconeogénica en el citosol (WATFORD et al., 1981).

Por otra parte, en aquellas especies que presentan la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa con una localización citosólica tal como la rata (BALLARD y HAUSON, 1967), el oxalacetato deberá ser transformado fuera de la mitocondria para su posterior conversión en fosfoenolpiruvato. Puesto que la membrana interna de la mitocondria es impermeable al oxalacetato este metabolito deberá ser en primer lugar convertido en otros compuestos capaces de salir, tales como el aspartato o malato. En hígado de rata, la gluconeogénesis a partir de lactato tiene lugar a través de la ruta oxalacetato-aspartato, mientras que la gluconeogénesis a partir de otros precursores del piruvato tal como la alanina, tiene lugar a través de la ruta oxalacetato-malato (KREBS et al.,

1967). Esta diferenciación en el comportamiento tiene como razón molecular la necesidad de generar el NADH necesario para que tenga lugar la reacción citoplasmática de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa en la dirección de formación de glucosa. Las especies animales que poseen significativas cantidades de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa hepática en ambos compartimentos, citosol y mitocondrio pueden utilizar ambas rutas, Oxalacetato-Fosfoenolpiruvato y Oxalacetato-Aspartato (malato). Mientras que en aquellas especies como, la trucha, donde la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, es preferentemente mitocondrial (WALTON y COWEY 1979; MOMMSEN et al., 1985), la ruta preferida es por tanto la de Oxalacetato-Fosfoenolpiruvato.

Por todo esto, podemos suponer que la capacidad gluconeogénica en una situación nutricional que se caracteriza por la administración de una dieta alta en grasa necesita un control previo en la disponibilidad de todos sus requerimientos tales como sustratos y otros elementos indispensables para la operatividad de esta ruta. En este sentido, el lactato procedente de la actividad metabólica de los tejidos periféricos así como los diferentes aminoácidos, entre los que cabe mencionar la alanina, procedentes tanto de la dieta como de los propios depósitos intracelulares, pueden constituirse en los mejores sustratos. Por otra parte, el exceso de acetil-CoA (FRENCH et al., 19981) debe ser oxidado completamente con fines energéticos a través de una mayor actividad del ciclo de Krebs, lo que requiere a su vez grandes cantidades de oxalacetato.

Este panorama metabólico parece confirmar la existencia de dos almacenes independientes de oxalacetato en el hígado de trucha, los cuales no se mezclan libremente en la matriz mitocondrial (SUAREZ y MOMMSEN, 1988). Uno de los almacenes de oxalacetato estaría generado principalmente por la carboxilación del piruvato procedente de diversas fuentes, y que al no estar disponible para la acción de la malato deshidrogenasa no se vería afectado por el estado redox de la matriz mitocondrial. En nuestras condiciones experimentales, esta fuente de oxalacetato podría venir determinada por aquellos sustratos cuyas rutas de transformación generen

NADH citosolico tales como lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa citoplasmáticas y cuyo destino es principalmente gluconeogénico.

El otro almacén de oxalacetato mitocondrial forma parte integral del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y por tanto está directamente influenciado por cambios en la razón NADH/NAD.

Nuestros resultados parecen confirmar esta hipótesis, por una parte, hemos puesto de manifiesto un incremento en la actividad alanina aminotransferasa citoplasmática probablemente como consecuencia de un fenómeno de inducción en la síntesis de esta proteína. Este aumento de la actividad enzimática provoca una elevación en la concentración de piruvato el cual será carboxilado a oxalacetato y éste será utilizado vía PEP para la formación de glucosa. La cantidad de NADH requerida para este proceso de síntesis será provista por la actividad de la lanzadera de la malato deshidrogenasa al utilizar el malato, procedente, en parte, del esqueleto carbonado de la alanina y/o de los aminoácidos que entran a nivel de los intermediarios del ciclo de Krebs. El oxalacetato formado en esta ruta constituye el pool sensible al estado redox mitocondrial .

Como parte del oxalacetato es utilizado en la transferencia de equivalentes de reducción hacia el citosol es necesario que exista un flujo significativo de formación de oxalacetato con objeto de poder ser utilizado en la oxidación del exceso de acetil-CoA procedente de la degradación de los ácidos grasos que tiene lugar bajo esta condición nutricional. Este suplemento de oxalacetato vendría dado por un aumento en la velocidad de transformación de PEP citosólico a piruvato por acción de la piruvato quinasa para que esté sea posteriormente transformado en el oxalacetato necesario para aumentar la velocidad del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

En este sentido, nuestros resultados muestran un significativo aumento de la actividad de la piruvato quinasa hepática y renal. Este incremento tiene lugar a lo largo de toda la curva de saturación, sin cambios en el valor de la  $K_m$  para el fosfoenolpiruvato. Estas

modificaciones del comportamiento cinético del enzima nos indican de nuevo un fenómeno de inducción enzimática. Este aumento en la velocidad del enzima piruvato quinasa provoca el efecto deseado que no es más que el incremento en los niveles mitocondriales de oxalacetato.

Todo ello, junto con la capacidad adaptativa que este enzima presenta en el resto de las situaciones nutricionales analizadas hasta ahora, nos permiten confirmar el auténtico papel regulador de la piruvato quinasa. No obstante, durante un cierto tiempo se consideró a la piruvato quinasa de hígado de teleosteos como un enzima no regulador (GUDERLEY et al., 1978; MOON y HULBERT, 1980; GUDERLEY y CARDENAS, 1980) aunque, como hemos dicho antes los resultados de este estudio y otras investigaciones recientes (SAND, 1988; WRIGHT et al., 1989) indican claramente lo contrario. A pesar de que lo mencionado anteriormente parezca contradictorio, una posible explicación para esta discrepancia la constituye el hecho de que existen claras diferencias en el estado fisiológico de los animales utilizados, así como en las preparaciones de los homogenados hepáticos en los ensayos de actividad de los diferentes estudios llevados a cabo (GUDERLEY et al., 1978; MOON y HULBERT, 1988; GUDERLEY y CARDENAS, 1980; SAND, 1988; WRIGHT et al., 1989).

Aunque el papel regulador de la piruvato quinasa está relacionado con un fenómeno de inducción enzimática puesto en marcha tras la administración de una dieta alta en grasa durante cuatro semanas, no es menos cierto que otras situaciones fisiológicas y patológicas, en donde se requiera una respuesta más inmediata, provocan cambios en la actividad del enzima previamente existente. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo ya sea a través de la presencia de moduladores alostéricos y/o por modulación covalente (SAND, 1988; WRIGHT et al., 1989). Por otra parte, los parámetros cinéticos medidos para la piruvato quinasa en este trabajo utilizando un extracto hepático preparado con tampón adecuado para preservar las propiedades reguladoras del enzima, coinciden en gran medida con los valores obtenidos por otros investigadores utilizando hepatocitos aislados o tejido completo congelado inmediatamente (WRIGHT et al., 1989).

En este sentido, WRIGHT et al. (1989) han puesto de manifiesto que la alanina no tiene efecto alguno sobre la actividad piruvato quinasa de trucha, sin embargo, si se comporta como un potente inhibidor de la piruvato quinasa hepática de mamíferos y del hepatopaneas de invertebrados (MUNDAY, et al.,1980). Por el contrario, concentraciones relativamente bajas de fructosa 1,6-bisfosfato activan significativamente la piruvato quinasa, disminuyendo el valor  $S_{0.05}$  para el PEP modificando el perfil de la curva de saturación del PEP, pasando de una curva sigmoide a una hiperbola (WRIGHT, et al.,1989). La sensibilidad de la piruvato quinasa de trucha a la fructosa 1,6-bisfosfato ha sido también descrita en otras especies de teleósteos ( SAND, 1988).

Finalmente, la administración durante cuatro semanas de una dieta alta en grasas produjo una significativa disminución de la actividad de uno de los principales enzimas del ciclo de las pentosas fosfato, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, en hígado de trucha. Como comentamos anteriormente el papel de este ciclo es múltiple siendo uno de los principales objetivos el de generar la suficiente cantidad de equivalentes de reducción en forma de NADPH para la síntesis de ácidos grasos y otros tipos de lípidos tales como el colesterol y sus derivados.

Como cabía esperar, el aumento intracelular de ácidos grasos procedentes de la dieta provoca una fuerte inhibición de todos los sistemas enzimáticos relacionados con su síntesis. En nuestro caso, hemos puesto de manifiesto que la inhibición tiene lugar a lo largo de toda la curva de saturación sin que existan cambios significativos en el valor de la  $K_m$  para la glucosa 6-fosfato. Esta modificación de la actividad enzimática está relacionada con una reducción drástica de los niveles del enzima a consecuencia de la puesta en marcha de un claro fenómeno de represión enzimática. En este caso la extraordinaria capacidad de adaptación de este enzima en el hígado de trucha es semejante al que tiene lugar bajo estas mismas condiciones antilipogénicas en mamíferos. En estos animales, en los que más se ha estudiado esta capacidad de adaptación, se ha demostrado que el cambio de una situación lipogénica a otra lipolítica provoca cambios

del orden de 15 a 30 veces en la actividad hepática de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de 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 del ARN mensajero para este enzima (PROSTKO et al., 1989). Indudablemente, en el caso de la trucha, se hace necesario profundizar en el estudio para determinar los eventos moleculares que se ponen en marcha durante esta situación nutritiva en relación con las variaciones en la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

#### 5.4-ADAPTACIONES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO AL AYUNO

La restricción de alimento provoca alteraciones del metabolismo cuya naturaleza, tiempo necesario para desarrollar los mecanismos adaptativos y capacidad externa del mantenimiento activo de una determinada ruta, varía según la especie y su estado fisiológico. Por ejemplo, en los mamíferos, en 24-48 horas, los depósitos de glucógeno se agotan y se activa la lipólisis con objeto de preservar el resto de las reservas hidrocarbonadas y las proteínas de los tejidos periféricos (GOODMAN y RUDERMAN, 1980; GOODMAN et.al., 1981). De forma similar las aves movilizan preferentemente los depósitos grasos, disminuyendo, simultáneamente, los lípidos hepáticos y las actividades de los enzimas lipogénicos (PEARCE, 1980).

Los peces representan un grupo más heterogéneo en cuanto a respuestas adaptativas generales, actividad de las correspondientes rutas metabólicas y modificaciones enzimáticas concretas, dependientes fundamentalmente del medio ( $T^a$ , salinidad, etc...) y de los hábitos alimenticios de cada especie. En líneas muy generales y en función del régimen carnívoro rico en proteínas, de la mayoría de las especies estudiadas, se puede decir que la movilización de proteína muscular, durante el ayuno es el principal aspecto comparado de este grupo de animales (COWEY y SARGENT, 1979; MOMMSEN et al., 1980; RENARD y MOON, 1980; JOHNSTON 1981). Los aminoácidos movilizados pueden ser o catabolizados para la obtención de energía

(MOMMSEN et al., 1980) o desviados hacia la formación de glucosa (MOON y JOHNSTON, 1980; COWEY et al., 1977a ) u otros fines anabólicos. Por supuesto, los peces también adaptan otras rutas metabólicas a las circunstancias del ayuno y en eso también existen diferencias entre especies como se descubrirá más adelante.

En relación al catabolismo aminoacídico el aumento significativo de la actividad AAT y GDH en hígado de trucha estaría asociado a la movilización de proteína en los tejidos periféricos para, al menos en parte suministrar restos carbonados para gluconeogénesis. De hecho el aumento de la FBPasa apoya este planteamiento. Estos resultados estarían en la línea de los obtenidos por MORATA et al. (1982) quienes detectaron en ayuno prolongado un aumento de la AAT y GOT desde el día 30 al 60 de ayuno, junto a un aumento del amonio plasmático y de la actividad de enzimas gluconeogénicos (LDH, PEPCK, FBPasa, G6Pasa) hepáticos ; sin embargo , las diferencias con el control (día 0) no llegan a hacerse significativas a lo 60 días pero sí a los 30, con valores inferiores a los control.

Un aumento de la aspartato aminotransferasa (GOT) también ha sido descrito en hígado de trucha, despues de 9 semanas de ayuno, por JURSS y NICOLAI (1976). El aumento de ambas aminotransferasas (GOT y AAT) ha sido igualmente descrito en el hígado de *Anguilla japonica*, durante el ayuno (INUI y YOKOTE, 1974). Sin embargo, tras ayuno prolongado, no se modificaron las actividades hepáticas de las enzimas AAT y GOT en *Anguilla rostrata* (MOON, 1983) aunque sí lo hizo, unas cinco veces, la AAT del músculo rojo. Un patrón similar de respuesta se ha observado en ayuno, a corto plazo, en la rata (PALOU et al., 1980). Este aumento de la AAT, en músculo rojo, paralelo a una proteólisis incrementada, aumentaría las disponibilidades de alanina en plasma, importante sustrato gluconeogénico, como se ha demostrado en mamíferos (PALOU et al., 1980) y en salmón sockeye (MOMMSEN et al., 1980).

La fuente principal de energía, durante el ayuno en la trucha arcoiris parece ser la grasa como se deduce de la importante reducción de las reservas lipídicas (DENTON y YUOSEF, 1976) del tejido adiposo periférico (MORATA et

al., 1982); de hecho la movilización de la grasa visceral, según WEATHERLEY y GILL (1981), es completa tras tres semanas de ayuno. La movilización se detecta precozmente por la elevación de los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos (BILINSKI y GARDNER, 1968; SHIBATA et al., 1974; MOON, 1983).

Ante la movilización de la grasa durante el ayuno, apoyada por muchos autores, parece lógico que la biosíntesis lipídica esté deprimida en estas circunstancias. En este sentido, el suministro de equivalentes reducidos, necesarios para la síntesis de ácidos grasos y otros procesos, debe estar igualmente inhibido. Un proceso especialmente importante para la generación de dichos equivalentes de reducción (NADPH fundamentalmente) es el ciclo de las pentosas fosfato, del que hemos determinado la actividad de la G6-PDH. Este enzima, en vertebrados superiores, posee una gran capacidad para modificar su actividad en respuesta a la alimentación, disminuyendo significativamente durante el ayuno (NIEMEYER et al., 1962; McDONALD y JOHNSON, 1965).

Las truchas respondieron al ayuno en el mismo sentido que la rata, disminuyendo la actividad G6-PDH como han demostrado YAMAUCHI et al. (1975) para otra especie de trucha, *Salvelinus fontinalis*. Sin embargo en la trucha arcoiris BUHLER y BENVILLE (1969) no encontraron cambios en la actividad específica hepática de este enzima, en respuesta al ayuno o a la composición de la dieta.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la privación de alimento durante cuatro semanas, produjo en las truchas los cambios adaptativos del metabolismo cuantitativa y cualitativamente mas grandes de todos los observados en el resto de las situaciones nutricionales estudiadas .

Sin embargo, y al contrario de lo que cabría esperar, la actividades y el comportamiento cinético de los enzimas glucolíticos, fosfofrutoquinasa y piruvato quinasa, no sufren cambios significativos en ninguno de los tejidos utilizados, hígado y riñon. Estos resultados demuestran una vez mas la reducida significación que presenta para estos animales la utilización de glucosa, lo

que contrasta fuertemente con lo que ocurre en mamíferos.

Estos resultados están en cierta forma de acuerdo con los mostrados por MOON et al. (1989). Estos autores no encontraron cambios significativos en la actividad óptima de la fosfofructoquinasa y glucogeno fosforilasa de hígado de la trucha arcoiris. Sin embargo, y a diferencia con nuestros resultados, describen una disminución de la piruvato quinasa hepática a concentraciones subsaturantes de fosfoenolpiruvato, lo que se traduce a una disminución del orden del 60% en la razón de actividad. MOON et al. (1989) explican esta reducción de actividad con la capacidad que presenta este enzima para sufrir un proceso de fosforilación-desfosforilación.

Como es sabido, este enzima está sujeto a este tipo de modificación covalente en el hígado de mamíferos, en el que está implicado el sistema de la proteinquinasa dependiente del AMP cíclico (KRAUS-FRIEDMAN, 1984). La fosforilación disminuye la razón de actividad y paralelamente incrementa la sensibilidad para sus efectores alostéricos. El glucagón y las catecolaminas son los agentes responsables del incremento en la fosforilación de la piruvato quinasa en mamíferos. En este sentido MOMMSEN y SUAREZ (1984) han presentado evidencias que apoyan el hecho de la fosforilación de la PK del hígado de trucha mediante altas dosis de glucagón.

Aunque desde nuestro punto de vista el significado de un cambio de estas características tras un largo periodo de ayuno (6 semanas) es reducido, podemos dar dos posibles razones que expliquen el desacuerdo con nuestros resultados. En primer lugar una de estas razones es la diferencia existente en el tiempo de tratamiento. En este sentido, MORATA et al. (1982) observaron que los cambios que tienen lugar en las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo glucídico comienzan a ser significativos a partir de la cuarta semana de ayuno. En segundo lugar, MOOM et al. (1989) utiliza para el estudio específico de la piruvato quinasa hepática, un tampón de homogenización adecuado para no modificar el estado de fosforilación del enzima.

Por lo que respecta al proceso gluconeogénico, nuestros resultados demuestran claramente que la biosíntesis de glucosa se encuentra incrementada durante el ayuno, tal y como indican los aumentos en las actividades de los enzimas intimamente relacionados con la gluconeogénesis bajo estas condiciones, fructosa 1,6-bisfosfatasa y alanina aminotransferasa.

Estudios previos han demostrado claramente, con algunas excepciones, incrementos en la actividad de enzimas gluconeogénicos hepáticos en diferentes teleósteos sometidos a ayuno (NAGAI y IKEDA, 1971a; MORATA et al., 1982; BEVER, et al., 1977; MOON et al., 1989; FRENCH et al. 1981). MOON et al. (1989) ponen de manifiesto incrementos significativos en la actividad máxima de los enzimas hepáticos fructosa 1,6-bisfosfato, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y alanina aminotransferasa en un 55%, 100% y 132% respectivamente. Estos incrementos son practicamente semejantes a los obtenidos por nosotros, excepto para el caso de la fructosa 1,6-bisfosfatasa para la que obtuvimos incrementos del orden del 110% pero a concentraciones subsaturantes de sustrato. Un aumento semejante fué mostrado para la actividad del enzima de fuente renal. Todo esto indica que el ayuno incrementa significativamente el potencial gluconeogénico de hígado y riñón de la trucha.

Un gran número de evidencias demuestran que los peces teleósteos no incurren en una severa hipoglucemia como resultado de un prolongado ayuno (NAGAI e IKEDA 1971a; BEVER et al., 1977; ZAMMIT y NEWSHOLMES, 1979; CORNISH y MOON, 1985), manteniendo de forma aproximada las concentraciones de glucosa sanguínea con las de peces alimentados. No obstante y aunque tales observaciones abundan en la literatura científica los mecanismos que lo llevan a cabo no están completamente aclarados. En algunas especies, como la aguililla americana, puede estar relacionada con la concomitante depresión metabólica que tiene lugar bajo el ayuno y que tiene como resultado una disminución, entre otras, de la velocidad de utilización de la glucosa (CORNISH y MONN 1985). En contraposición a esta hipótesis podemos mencionar la de la activación de la gluconeogénesis durante el ayuno. Hepatocitos aislados de

diferentes peces teleósteos (RENARD y MOON 1980; FRENCH et al., 1981) muestran mayores velocidades en la gluconeogénesis a partir de lactato y aminoácidos que en las células hepáticas aisladas de estos peces sometidos a alimentación. Por tanto, aunque la concentración de glucosa plasmática varía considerablemente entre especies y puede fluctuar con el tiempo, es raro alcanzar una severa hipoglucemia. Es por tanto fácil de entender que esta estrategia es esencial para los peces teleósteos, muchos de los cuales sufren cambios estacionales drásticos ya sea por la disponibilidad del alimento, por el diferente comportamiento alimentario o por la anorexia existente durante el periodo de freza.

Otro de los cambios importantes que tiene lugar durante el ayuno es el aumento en la proteólisis muscular, lo cual trae consigo cambios en las concentraciones de aminoácidos plasmáticos y por tanto intracelulares. En la trucha arcoiris, la administración de una dieta alta en proteínas/baja en carbohidratos origina una elevación de los niveles de aminoácidos plasmáticos así como una mayor velocidad gluconeogénica a partir de alanina (COWEY et al., 1977a, b). Por el contrario, la administración de una dieta baja en proteínas /alta en carbohidratos produce todo lo contrario como lo demuestra nuestros resultados y los mostrados por otros investigadores (COWEY et al., 1977a, b).

Por otra parte, durante la vida de muchos peces, los periodos de ayuno están acompañados por ejercicio intenso como es el caso de muchos salmonidos durante los periodos de migración y freza. Bajo estas condiciones, el músculo esquelético sufre una mayor proteólisis dando lugar a una mayor liberación de aminoácidos al torrente circulatorio (MOMMSEN et al., 1980). La alanina liberada puede ser utilizada tanto como sustrato oxidativo como gluconeogénico por el hígado y riñón (FRENCH et al., 1981; RENARD y MOON, 1980).

Aunque el control hormonal del metabolismo de los peces teleósteos ha recibido muy poca atención, parece muy probable que la mayor parte de los fenómenos de adaptación mostrados son consecuencia de la acción molecular de estos mensajeros.

Los efectos del glucagon e insulina sobre la gluconeogénesis en hígado de mamíferos y concretamente de rata, constituyen, sin lugar a dudas, las repuestas hormonales más conocidas (KRAUS-FRIEDMAN, 1984). En peces teleósteos el glucagon actúa generalmente como una hormona hiperglucemiante mientras que la insulina ejerce claros efectos hipoglucémicos (INCE, 1981).

En este sentido, MOON et al. (1989) han demostrado que durante el ayuno de seis semanas la trucha arcoiris provoca un descenso significativo de estas hormonas pancreáticas. Sin embargo, los cambios relativos de estas hormonas son de tal índole que la razón glucagon / insulina se aumenta 3 veces durante el ayuno. Este aumento en la concentración de glucagon frente a la de insulina es probablemente la razón molecular primaria del incremento de la actividad de los enzimas gluconeogénicos, el cual eleva el potencial gluconeogénico del hígado durante el ayuno, del mismo modo que ocurre en mamíferos.

El presente trabajo muestra además incrementos significativos en la actividad de la glutamato deshidrogenasa hepática. También hemos podido observar una tendencia al aumento de este enzima en riñón. La operatividad de este enzima proporcionara intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos lo que implica una mayor disponibilidad de sustratos gluconeogénicos así como un incremento del potencial oxidativo mitocondrial lo cual podría ser necesario para eliminar el exceso de acetil-CoA formado durante esta situación nutricional. El ATP generado bajo estas condiciones estaría destinado, entre otros fines, para el aumento de la gluconeogénesis. En este sentido, MOON et al. (1989) han puesto de manifiesto un aumento significativo en la actividad citrato sintasa hepática cuando ésta es ensayada a concentraciones saturantes de acetil-CoA y oxalacetato.

Finalmente, nuestros resultados muestran un descenso significativo en la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa hepática de trucha durante el ayuno. Esta disminución (50%) tiene lugar a lo largo de toda la curva de saturación para la glucosa 6-fosfato sin cambios significativos en los valores de Km por este sustrato, por

lo que se puede asegurar que este cambio en la actividad enzimática está relacionado con una clara represión de la síntesis de este enzima durante el ayuno y es consistente con la disminución de la capacidad lipogénica característica de esta situación nutricional, de la misma manera que ocurre en mamíferos (PROSTKO et al., 1989) y también descrita en la anguila americana (ASTER y MOON, 1981). Hasta este momento no se conocen cuales son los mediadores específicos de la transcripción génica de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa frente a diversas situaciones lipolíticas como el ayuno y la dieta alta en grasas, o lipogénicas como la administración de una dieta alta en carbohidratos o en proteínas. 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 este sentido, se ha podido comprobar que los efectos de diferentes situaciones nutritivas sobre la transcripción génica y la estabilización del ARN mensajero ha sido también observado para otros enzimas relacionados con el proceso lipogénico, incluyendo la sintasa de ácidos grasos (BACK et al., 1986) y enzima málico (GODMAN et al., 1985). Indudablemente, una mayor profundización en este estudio se ha de llevar a cabo para facilitar el progreso científico en este área del metabolismo.



6-CONCLUSIONES



1.-Desde el punto de vista nutricional, las truchas alimentadas con una dieta de alto contenido graso (16 %) alcanzaron los mejores índices de conversión del alimento (I.C.) y de utilización de la proteína dietaria para crecimiento.

2.-Las diferentes condiciones nutricionales ensayadas produjeron, de forma general, cambios adaptativos importantes en el comportamiento cinético del conjunto de los enzimas reguladores estudiados y correspondientes a diversas zonas del metabolismo intermediario. Estos cambios de adaptación metabólica fueron siempre significativamente más importantes en el tejido hepático que en riñón, de acuerdo con el papel bioquímico que juega cada órgano tanto en su metabolismo individual como en el relacionado con el resto de los animales.

3.-La administración durante cuatro semanas de una dieta alta en proteínas (60%) produjo importantes cambios adaptativos en el metabolismo intermediario del hígado y riñón de las truchas, reflejados por las variaciones del comportamiento cinético de los enzimas piruvato quinasa, fructosa 1.6-bisfosfatasa, alanina aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa. Como cabía esperar, los cambios más importantes tuvieron lugar en los enzimas relacionados con la utilización del exceso de aminoácidos procedentes de la dieta, de manera que el aumento de la actividad alanina aminotransferasa y glutamato deshidrogenasa encontradas está relacionado con un incremento en la síntesis de estos enzimas.

Por otra parte los aumentos encontrados en la actividad de los enzimas fructosa 1.6-bisfosfatasa y piruvato quinasa explican el doble destino que presenta el exceso del esqueleto carbonado de estos aminoácidos: incremento de la síntesis de monosacáridos vía gluconeogénesis y aumento de su uso con fines energéticos, por oxidación completa vía ciclo de los ácidos tricarbónicos. Los cambios encontrados en riñón, fueron en general semejantes, aunque de menor grado.

4.-De acuerdo con la escasa capacidad de metabolizar los carbohidratos que presentan la mayoría de los Teleósteos, los resultados obtenidos, en nuestras condiciones experimentales parecen confirmar este comportamiento ya que sólo se observó una disminución en los valores de la Km para los enzimas glucolíticos fosfofructoquinasa y piruvato quinasa hepáticos, sin que se encontrasen cambios en ningún parámetro cinético de los enzimas renales. Estos resultados contrastan fuertemente con el comportamiento de estos enzimas y órganos en los mamíferos en respuesta a la dieta rica en hidratos de carbono.

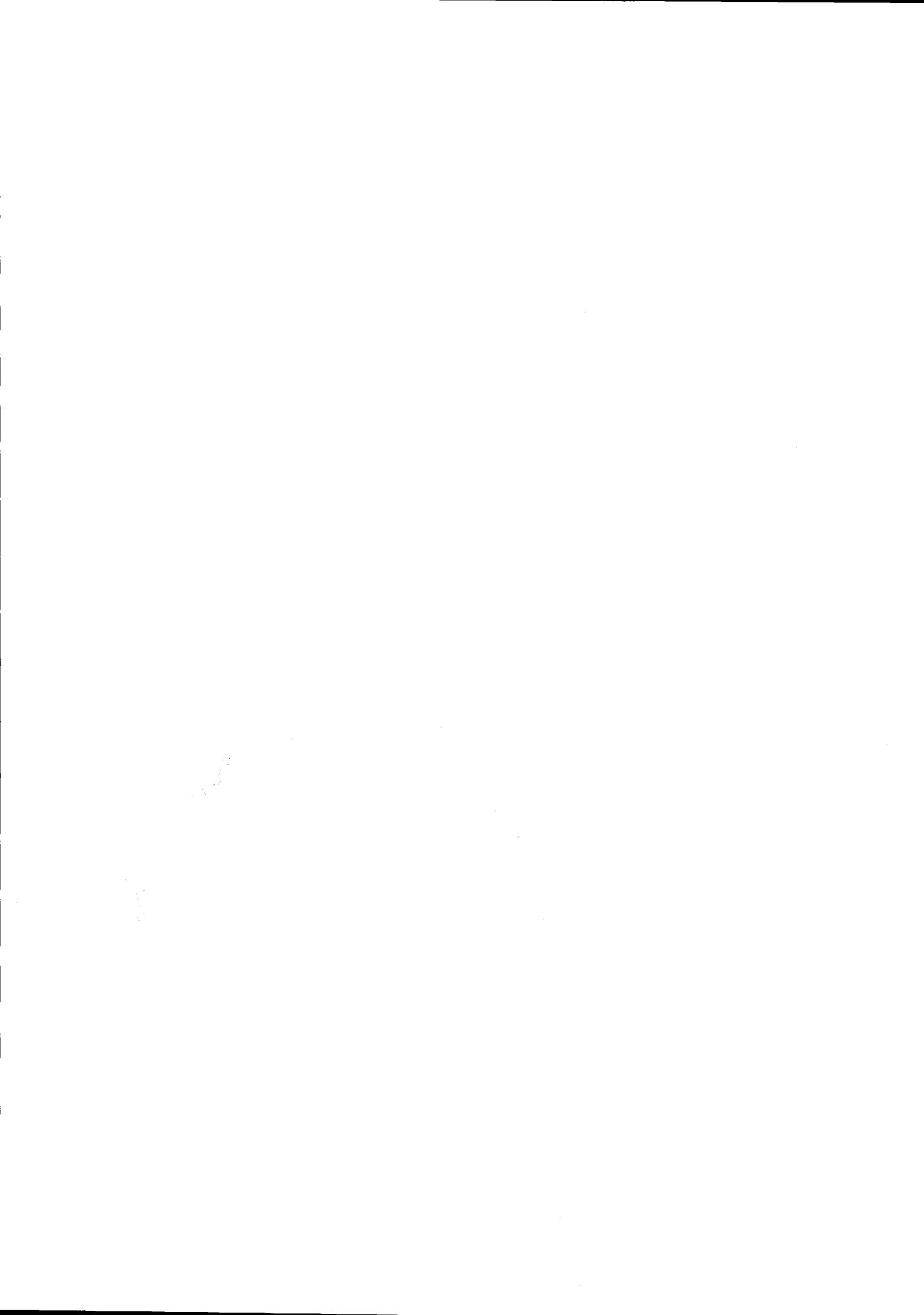
5.-Otra situación nutricional que dió lugar a importantes cambios adaptativos en el metabolismo de la trucha fué la administración de una dieta alta en grasas. De todas las variaciones enzimáticas observadas podemos destacar como más importante la drástica disminución en la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, que probablemente ocurre como consecuencia de una fuerte represión enzimática. El descenso de la actividad del fragmento oxidativo del ciclo de las pentosas fosfato ante el aporte exógeno de un exceso de grasa, está claramente relacionado con la innecesaria formación de equivalentes de reducción que, bajo estas condiciones nutricionales, son requeridos para la síntesis de ácidos grasos y colesterol.

6.-Durante el ayuno de cuatro semanas, el metabolismo intermediario hepático de la trucha se modificó de forma extraordinaria, de acuerdo con las variaciones intracelulares de diferentes metabolitos características de esta situación nutricional. Dichas variaciones están relacionadas con el incremento del contenido celular de aminoácidos y ácidos grasos procedentes de los depósitos del animal. El aumento endógeno de ácidos grasos provoca, al igual que ocurría con la dieta alta en grasas, una disminución de la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, mientras que un aumento de la actividad de los enzimas alanina aminotransferasa y glutamato

deshidrogenasa incrementa la utilización del exceso de aminoácidos liberados del músculo del animal. Parte del esqueleto carbonado de éstos compuestos parece dirigirse hacia la formación de glucosa, como demuestra el aumento de la actividad de la fructosa 1.6-bisfosfatasa hepática, uno de los enzimas reguladores de esta ruta metabólica. El patrón de comportamiento metabólico de la trucha frente al ayuno es, por tanto, semejante al que tiene lugar en mamíferos.

#### CONCLUSION FINAL.:

Finalmente, y teniendo en cuenta los diferentes aspectos estudiados en la presente Memoria, podemos concluir que, aún cuando los carbohidratos sean metabólicamente mal utilizados, los principales enzimas reguladores del metabolismo primario de la trucha muestran una notable capacidad de adaptación, a cambios sustanciales en el contenido de macronutrientes de la dieta.



## 7-BIBLIOGRAFIA



- ABEL, H.; PIEPER, A. y PFEFFER, E. (1978) "Vergleich des energetischem verwertum von protein und kohlehydraten bei regenbogenforellen." Z.Tierphysiol.Tierernähr.U.Futterm. 40 : 127-128.
- ABEL, H.; PIEPER, A. y PFEFFER, E. (1979) "Untersuchungen an wachsende regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) über die intermediäre anpassung an protein oder kohlenhydrates als energieträger im hutter." Z.Tierphysiol.Tierernähr.U.Futterm. 41 : 325-334.
- ABLETT, R.F.; SINNHUBER, R.O.; HOLMES, R.M. y SELIVONCHICK, D.P. (1981 a) "The effect of prolonged administration of bovine insulin in rainbow trout." Gen.Comp.Endocrinol. 43 : 211-217.
- ABLETT, R.F.; SINNHUBER, R.O. y SELIVONCHICK, D.P. (1981 b) "The effect of bovine insulin on <sup>14</sup>C-glucose and <sup>3</sup>H-leucine incorporation in fed an fasted rainbow trout." Gen.Comp.Endocrinol. 44 : 418-427.
- ABRAHAN, S.; HANSE, H.J.M. y HANSEN, F.N. (1984) "The effect of prolonged fasting on total lipid synthesis and enzymes activities in liver of the european eel *Anguilla anguilla*." Comp.Biochem.Physiol. 79 B : 285-289.
- ADROER, F.J.; OSUNA, A. y LUPIAÑEZ, J.A. (1987) "Fructose 1.6-bisphosphatase activity in two *Trypanosoma cruci* morphological farms." J.Parasitol. 73 : 438-441.
- ALEXIS, M.N. y PAPAPARASKEVA-PAPOUTSOGLOV, E. (1986) "Aminotransferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrates." Comp.Biochem.Physiol. 83 B : 245-249.
- ALEXSON, S.E.H. y CANNON, B. (1984). "A direct comparision between perioxosomal and mitochondrial preferences for fatty acyl  $\beta$ .oxidation predicts channelling of medium-chain and very-long-chain unsaturated fatty acids to perioxosomes." Biochem.Biophys. Acta 796 :

1-10.

ALLEN, R.L.; CLARK, N.J. y PHIPPS, D.A. (1983) "Histidine ammonia lyase from kidney of rainbow trout." *Biochem.Soc.Trans.* 11 : 350.

ALLIOT, E. y PASTOREAU, A. (1979). "Influence de la salinité sur la croissance et l'utilisation chez les loups juveniles (*Dicentrarchus labrax*)." *Vie Marine*, 1 : 13-17.

ALLIOT, E. ; PASTOREAU, A. y THEBAULT, H. (1983). "Influence de la temperature et de la salinité sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de *Dicentrarchus labrax*." *Aquaculture*, 31 : 181-194.

ANDREWS, J.W. y PAGE, J.W. (1974). "Growth factors in the fish-meal component of catfish diets." *J.Nutr.* 104 : 1091-1096.

ANDREWS, J.W.; PAGE, J.W. y MURRAY, M.N. (1977) "Supplementation of a purified casein diet for catfish with free amino acids and gelatin." *J.Nutr.* 107 : 1153-1156.

ARIAS, A. (1976). "Biologie du loup, *Dicentrarchus labrax*, de la région de Cadiz." *Publ. Ciem. CMG* 3 : 1-8.

ARAI, S. ; NOSE, T. y HOSHIMOTO, Y. (1972). "Amino acid essential for the growth of eel *Anguilla anguilla* and *Anguilla japonica*." *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 38 : 753-759.

ASTER, P.L. y MOON, T.W. (1981). "Influence of fasting and diet on lipogenic enzymes in the american eel *Anguilla rostrata* Le Seur." *J.Nutr.* 111 : 346-354.

ATHERTON, W.D. y AITKEN, A. (1970). "Growth nitrogen metabolism and fat metabolism in *Salmo gairdneri* Rich." *Comp.Biochem.Physiol.* 36 : 719-747.

ATKINS, G.L. y MIMMO, I.A. (1975) "A comparison of seven

- methods for fitting the Michaelis Mente equation." *Biochem.J.* 149 : 775-777.
- ATKINSON, J.L. (1966). "Regulation of enzyme activity." *Ann.Rev.Biochem.* 35 : 85-124.
- AUSTRENG, E. y REFSTIE, T. (1979) "Effects of varying dietary protein level in different families of rainbow trout." *Aquaculture*, 18 : 145-156.
- BACHAND, L. y LEARY, C. (1975). "Erythrocyte metabolism in the yellow perch (*Perca flavescens* Mitchill). I. Glycolitic enzymes." *Comp. Biochem. Physiol.* 50 B : 567-570.
- BACK, W.B.; GOLDMAN, M.J.; FISCH, J.E.; OCHS, R.S. y GOODRIDGE, A.G. (1986) "The fatty acid synthase gene in avian liver." *J.Biol.Chem.* 261 : 4190-4197.
- BALLARD, F.J. y HAUSON, R.W. (1967). "Phosphoenol pyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in the developing rat liver." *Biochem.J.* 104 : 866-871.
- BALARIN, J.D. y HALLER, R.D. (1982). "The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages." En: *Recent advances in Aquaculture* (J.F. Muir y R.J. Roberts eds.) 256-356 Croom Helm Londres.
- BALDWIN, J. y REED, K.C. (1976 a). "Effect of temperature on the properties of cytoplasmic NADP-malate dehydrogenase from liver of warm and cold acclimated rainbow trout." *Comp.Biochem.Physiol.* 54 B : 531-535.
- BALDWIN, J. y REED, K.C. (1976 b). "Cytoplasmic sources of NADPH for fat synthesis in rainbow trout liver. Effect of thermal acclimatation on enzyme activities." *Comp.Biochem.Physiol.* 54 B : 527-529.
- BARRITT, G.J.; ZANDER, G.L. y UTTER, M.F. (1976). "The regulation of pyruvate carboxylase activity and gluconeogenic tissue." En: *Gluconeogenesis : Its regulation in mammalian species.* Ed. R.W. Hanson y

M.E. Mehlman. Wiley N.Y.

- BATENBURG, J.J. y OLSON, S.O. (1976). "Regulation of pyruvate dehydrogenase by fatty acid in isolated rat liver mitochondria." J.Biol.Chem. 251 : 1364-1370.
- BAUERMEISTER, A. y SARGENT, J.R. (1979). "Wax esters : major metabolites in the marine environment." Trends. in Biochem.Sci. 4 : 209-211.
- BEAMISH, F.W.H. y MEDLAN, T.E. (1986). "Protein sparing effects in large rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Aquaculture, 55 : 35-42.
- BEAMISH, F.W.H. y THOMAS, E. (1984) "Effects of dietary protein and lipid on nitrogen loss in rainbow trout." Aquaculture. 41 : 359-371.
- BEHRISCH, H.W. (1969) "Fructose diphosphatase from migrating salmon." Biochem.J. 115 : 678-696.
- BELL, G.R. (1968). "Distribution of transaminases in the tissues of Pacific salmon with emphasis on the properties and diagnostic use of GOT." J.Fish.Res.Bd.Canada. 25 : 1247-1268.
- BELL, M.V.; HENDERSON, R.J.; PIRIE, B.J.S. y SARGENT, J.R. (1985 a) "Effects of starvation polyunsaturated fatty acid deficiencies on mortality growth and gill structure in the turbot *Scophthalmus maximus*." J.Fish.Biol. 26 : 181-191.
- BELL, M.V. ; HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R. (1985 b). "Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies." Comp.Biochem.Physiol. 81 B : 193-198
- BERGMAYER, H.U. y BERNT, E. (1974). "D-glucose determination with glucose-oxidase and peroxidase." Methods of enzymatic analysis Vol. 3 (Bergmeyer H.U.ed.) 1205-1212 Academic Press Londres.

- BERGOT, F. (1979 a). "Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout." *Comp. Biochem. Physiol.* 64 A : 543-547.
- BERGOT, F. (1979 b). "Carbohydrates in rainbow trout diets: Effects of the level and source of carbohydrate and the number of meals on growth and body composition." *Aquaculture*, 18 : 157-167.
- BERGOT, F. (1979 c). "Problemes particuliers posés par l'utilisation des glucides chez la truite arc-in-ciel." *Ann. Nutr. Alim.* 33 : 247-257.
- BERGOT, F. y BREGUE, J. (1983). "Digestibility of starch by rainbow trout ; Effects of the physical state of starch and of the intake level." *Aquaculture*, 34 : 203-212.
- BERGOT, F. y FLECHON, J.E. (1970) "Forme et voie d'absorption intestinale des acides gras à chaîne longue chez la truite arc-in-ciel (*Salmo gairdneri* Rich.): I. Lipides en particules." *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 10 : 459-472.
- BEVER, K.; CHENOWETH, M. y DUNN, A. (1977). "Glucose turnover in kelp bass *Paralabrax* sp. in vivo studies with ( 6<sup>3</sup>H 614C ) glucose." *Am. J. Physiol.* 232 : R 66-R 72.
- BHATT, S. y KHANNA, S.S. (1976) "Histopathological effects of glucagon in a freshwater teleost *Clarias batrachus* L. Part. 1. The endocrine pancreas blood glucose and tissue glycogen." *Ind. J. Exp. Biol.* 14 : 145-149.
- BILINSKI, E. y GARDNER, L.J. (1968) "Effect of starvation on free fatty acid level in blood plasma and muscular tissue of rainbow trout *Salmo gairdneri*." *J. Fish. Res. Bd. Can.* 25 : 1555-1560.
- BIRNBAUN, M.J.; SCHULTZ, J. y FAIN, J.N. (1976)

- "Hormonestimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes." *Am.J.Physiol.* 231 : 191-197.
- BLACK, D. y LOVE, R.M. (1986) "The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of atlantic cod during starvation and refeeding." *J.Comp.Physiol. B.* 156 : 469-479.
- BOITEUX, A. ; HESS, B. y SEL'KOV, E.E. (1980). "Creative functions of instability and oscillations in metabolic systems." *Curr.Top.Cell.Regul.* 17 : 171-203.
- BOUCHE, G. (1975). "Recherches sur les acides nucleiques et la proteosynthese lors du jeune prolonge et la realimentation chez la carpe." *These.Doc.Sci.Univ.P.Sabatier. Toulouse.* pag. 188.
- BRAUNSTEIN, A.E. (1957). "Les voies principales de l'asimilation et disimilation de l'azote chez les animaux." *Adv.Enzymol.* 19 : 335-377.
- BRETT, J.R. y ZALA, C.A. (1975). "Daily patterns of nitrogen excretion and oxygen consumption of sockeye salmon under controlled conditions." *J.Fish.Res.Bd.*
- BRINDLEY, D.N.; MATSUMURA, S. y BLOCH, K. (1969) "Mycrobacterium phlei-phatty acid syntetase. A bacterial multienzyme complex." *Nature. Lond.* 224 : 666-669.
- BROMLEY, P.J. (1980). "Effect of dietary protein, lipid and energy content on the growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)." *Aquaculture*, 19 : 359-369.
- BROSNAN, J.T.; MCPHEEL, P.; HALL, B. y PARRY, M.D. (1978) "Renal glutamine metabolism in rats fed high-protein diets." *Ann.J.Physiol.* 235 : E 261-E 265.
- BROW, D.; FLEMING, N. y BALLS, M. (1975) "Hormonal control of glucose production by *Amphiura means* liver in

- Organ culture." Gen.Comp.Endocrinol. 27 : 380-388.
- BROWN,W.D. (1960). "Glucose metabolism in carp." J.Cell.Comp.Physiol. 55 : 81-85.
- BUCKLEY,J.T. y GROVES,T.D.D. (1979). "Influences of feed on the body composition of finfish." En : "Finfish nutrition and fishfeed technology." Halver,J.E. y Tiaws,K. eds. Heeneman Verlag.Berlin Vol.II : 0335-343.
- BUHLER, D.R. y BENVILLE, P. (1969). "Effect of feeding and of DDT on the activity of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase in two salmonid." J.Fish.Res.Bd.Can. 26 : 3209-3216.
- BUHLER, D.R. y HALVER, J.E. (1961) "Nutrition of salmonoid fishes. IX. Carbohydrate requeriments of chinook salmon." J.Nutr. 74 : 307-318.
- CAHILL, G.F.; HERRERA, M.G.; MORGAN, A.P.; SOELDNER, J.S.; STEINKE, J.; REICHARD, G.A. y KIPNIS, D.M. (1966) "Hormone-fuel inter-relationships during fastin." J.Clin.Invest. 45 : 1751.
- CARBONELL,J. ;FELIU,J.E. y MARCOS,R. (1973). "Pyruvate kinase. Classes of regulatory isoenzymes in mammanlian tissues." Eur.J.Biochem. 37 : 148-158.
- CARDENAS, P. (1980) "Influencia de algunas situaciones nutritivas y hormonales sobre la regulación de la gluconeogénesis en la trucha *Salmo gairdneri*." Tesis Doctoral. Fac. Ciencias Univ. Granada.
- CARDENETE,G. (1985). "Consecuencias nutritivas de la sustitución energética de la proteína dietária por grasa y/o hidratos de carbono en la trucha." Tesis Doc.Facultad de Ciencias.Univ. de Granada.1983.Edit. por Secr. de Publ. Univ. de Granada. 4 microfichas.
- CARDENETE,G. ;GARCIA,M. y ZAMORA,S. (1986). "Relación proteína/energía en las dietas para truchas.I.Efecto

sobre el crecimiento y diversos índices biométricos." Ars. Pharmaceutica, XXVII (2): 119-128.

CARDENETE, G. ; GARCIA, M. y ZAMORA, S. (1987). "Relación proteína/energía en las dietas para truchas. II. Efecto sobre la composición de distintas fracciones corporales." Ars. Pharmaceutica, XXVII (3) : 237-246.

CASAZZA, J.P. y VEECH, R.L. (1986) "The content of pentose-cycle intermediates in liver in starved fed ad libitum, and meal fed rats." Biol.J. 236 : 635-641.

CASEY, C.A. ; PERLMAN, D.F. ; VORHABEN, J.E. y CAMPBELL, J.W. (1983). "Hepatic ammoniogenesis in the channel catfish." Mol. Physiol. 3 : 107-126.

CASTELL, D.J. ; SINNHUBER, R.O. ; WALES, J.H. y LEE, D.J. (1972 a). "Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms." J. Nutr. 102 : 76-77.

CASTELL, D.J. ; SINNHUBER, R.O. ; WALES, J.H. y LEE, D.J. (1972 b). "Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Physiological symptoms of EFA deficiency. J. Nutr. 102 : 87-92.

CASTILLA, C. y MURAT, J.C. (1957) "Effects de l'insuline sur le métabolisme protéique dans le foie de carpe." Comptes Rendus des Séances Soc. Biol. Filiales 169 : 1605-1609.

CHAN, D.K.O. y WOO, N.Y.S. (1978 a) "Effect of glucagon on the metabolism on the japanese eel." Gen. Comp. Endocrinol. 35 : 216-225.

CHAN, D.K.O. y WOO, N.Y.L. (1978 b) "Effect of cortisol on the metabolism of the eel." Gen. Comp. Endocrinol. 35 : 205-215.

- CHANCE, R.E. ; MERTZ, E.T. y HALVER, J.E. (1964). "Nutrition of salmonoid fishes. VII. Isoleucine, leucine, valine and phenylalanine requirement of chinook salmon and interrelations between isoleucine and leucine for growth." J.Nutr. 83 : 177-185.
- CHANG, V.M. e IDLER, D.R. (1960). "Biochemical studies on sockeye salmon during spawning migration liver glycogen." Can.J.Biochem.Physiol. 38 : 553-558.
- CHAVIN, N. y SINGLEY, J.A. (1972) "Adrenocorticoids of the goldfish *Carassius auratus*." Comp.Biochem.Physiol. 33 : 629-653.
- CHESTER-JONES, I.; CHAN, D.K.O.; HENDERSON, I.W. y BALL, J.N. (1969). "The adrenocortical steroids, adrenocorticotropin and the corpuscles of stannius." En : In Fish Physiology. Ed. Hoar, W.S. y Randall, D.J. Academic Press New York Vol. II : 321-376.
- CHO, C.Y. ; SLINGER, S.J. y BAYLEY, H.S. (1982). "Bioenergetics of salmonid fishes : energy intake, expenditure and productivity." Comp.Biochem.Physiol. 73 : 25-41.
- CHO, C.Y. y KAUSHIK, S. (1985). "Effects of protein intake on fish diets." En : "Nutrition and feeding in fish." Eds. C.B. Cowey, A.M. Mackie; J.G. Bell. pag. 95-117. Academic Press London.
- CONNOCK, M.J. (1973). "Intestinal peroxisomes in the goldfish (*Carassius auratus*)." Comp. Biochem. Physiol. 82 A: 201-206.
- CORNISH, E.C.; CUSSEN, C.M.; HIRD, F.J. y TODD, P.E.E. (1978) "Comparative aspects of aminotransferases in the rat, pigeon and rainbow trout." Comp.Biochem.Physiol. 61 B : 375-378.
- CORNISH, E.C. y MOON, T.W. (1985). "Glucose and lactate

kinetics in american eel *Anguilla rostrata*." Am.J.Physiol. 249 : R 67- R 72.

COWEY, C.B. (1975). "Aspects of protein utilization by fish." Proc.Nutr.Soc. 34 : 57-63.

COWEY, C.B. (1979). "Protein and amino acid requeriment of finfish." En : "Finfish nutrition and fishfeed technology." Eds. J.E. Halver y R. Tiews Vol. I 3-16 Heeneman, Berlin.

COWEY, C.B. (1980). "Protein metabolism in fish." En: "Protein deposition in animals." Eds. P.J. Buttery y D.B. Lindsay. 271-288. Butterworths Londres.

COWEY, C.B. ; ADRON, J.W. y BLAIR, A. (1970 ). "Studies on the nutrition of marine featfish. The essential amino acid requeriment of plaice and sole." J.Mor.Biol.Ass. U K 50: 87-95.

COWEY, C.B. ; ADRON, J.W. y BLAIR, A. (1975) "Studies on the nutrition on marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice (*Pleuronectes platessa*) and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice." Br.J.Nutr. 33 : 219-231.

COWEY, C.B. ; BROWN, D.A. ; ADRON, J.W. y SHANKS, A.M. (1974) "Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of dietary protein content on certain cell components and enzymes in the liver of *Pleuronectes platessa*." Mar.Biol. 28 : 207-213.

COWEY, C.B. ; COOKE, J.D. ; MATTY, A.J. y ADRON, J.W. (1981) "Effects of quantity and quality of dietary protein on certain enzymes activities in rainbow trout." J.Nutr. 111 : 336-345.

COWEY, C.B. ; DE LA HIGUERA, M. y ADRON, J.W. (1977 a). "The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Br.J.Nutr. 38 : 385-395.

- COWEY, C.B. ; KNOX, D. ; WALTON, M.J. y ADRON, J.W. (1977 b). "The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Br.J.Nutr. 38: 463-470.
- COWEY, C.B. y LUQUET, P. (1983). "Protein metabolism and nutrition." Eds. M.Aznal , R.Pion y D.Bonin. I. 365-384. INRA Paris.
- COWEY, C.B. y SARGENT, J.R. (1979). "Nutrition." En : "Fish physiology" Vol.VIII.: "Bioenergetics and growth." Eds. W.S.Hoar , D.J.Randall y J.R.Brett. pag. 1-69. Academic Press New York.
- CRABTREE, B. y NEWSHOLME, E.A. (1972 a). "The activities of lipases and carnitine parmitoythtransferase in muscle from vertebrates and invertebrates." Biochem. J. 130: 697-705.
- CRABTREE, B. y NEWSHOLME, E.A. (1972 b). "The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase and lactate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates." Biochem.J. 126 : 49-58.
- CREACH, Y. (1967). "Transamination entre les acides amines et l'acide  $\alpha$ -cetoglutarique chez la carp." Arch.Sci.Physiol. 21 : 443-448.
- CREACH, Y. y GAS, N. (1971). "Quelques modifications biochimiques et structurales du muscle de la carp soumise au jeûne." J.Physiol. (Paris) 63 : 33 A.
- CREACH, Y. y SERFATY, A. (1974) "La jeûne et la réalimentation chez la carpe." J.Physiol.Paris. 68 : 245-260.
- D'APOLLONIA, S. y ANDERSON, P.D. (1980). "Optimal assay condition for serum and liver glutamate oxalacetate transaminase, glutamate piruvate transaminase and sorbitol dehydrogenase from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Can.J.Fish.Aqua.Sci. 37 : 163-169.

- DAS, A.B. y KRISHAMOORTHY, R.V. (1969). "Biochemical changes of muscle proteins in goldfish (*Carassius auratus*) during thermal acclimatization." *Experimenta*. 25 : 594-595.
- DAS, A.B. y POSSER, C.L. (1967). "Biochemical changes in tissue of goldfish acclimated to high and low temperatures. I. Protein synthesis." *Comp. Biochem. Physiol.* 21 : 449-467.
- DAVE, G.; JOHANSSON-SJOBECK, M.L.; LARSSON, A.; LEWANDER, K. y LIDMAN, U. (1975) "Metabolic and hematological effects of starvation in the european eel. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism." *Comp. Biochem. Physiol.* 52 A : 423-430.
- DEAN, J.M. y BERLIN, J.D. (1969). "Alteration in hepatocyte function of thermally acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Comp. Biochem. Physiol.* 29 : 307-312.
- DEAN, J.C.; GARLING, D.L. y NIELSEN, L.A. (1985) "Effects of dietary protein quantity and protein quality on growth rate and on selected enzymes activities in channel catfish." *Comp. Biochem. Physiol.* 83 B : 355-363.
- DE LA HIGUERA, M. y CARDENAS, P. (1985). "Influence of dietary composition of gluconeogenesis from L-(U-14C)-glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Comp. Biochem. Physiol.* 81 : 391-395.
- DE LA HIGUERA, M. y CARDENAS, P. (1986) "Hormonal effects on gluconeogenesis from U-14C glutamate in rainbow trout *Salmo gairdneri*." *Comp. Biochem. Physiol.* 85 B : 517-521.
- DE LA HIGUERA, M. ; MURILLO, A. ; VARELA, G. y ZAMORA, S. (1976). "Efecto de la dieta sobre la composición en ácidos grasos de la trucha (*Salmo gairdneri*)." *Ann. Inst. Inves. Vet.* XXV : 285-299.

- DE LA HIGUERA, M. ; MURILLO, A. ; VARELA, G. y ZAMORA, S. (1977 a). "The influence of high dietary fat levels on protein utilization by the trout (*Salmo gairdneri*).  
Comp.Biochem.Physiol. 56 A : 37-41.
- DE LA HIGUERA, M. ; ZAMORA, S. ; MURILLO, A. y VARELA, G. (1977 b). "Influencia de la ingesta grasa en la composición de la trucha y en su palatabilidad para el hombre." Ann.Bromatol. XXIX (2) : 221-230.
- DE LA HIGUERA, M. ; ZAMORA, S. ; MATAIX, F.J. y VARELA, G. (1979). "Utilización nutritiva de dietas adicionadas de grasa en la trucha (*Salmo gairdneri*).  
Ann.Inst.Inves.Vet. XXV : 285-299.
- DE LONG, D.C. ; HALVER, J.E. y MERTZ, E.T. (1958). "Nutrition of salmonid fishes. VI. Protein requirement of chinook salmon at two water temperatures." J.Nutr. 65 : 589-599.
- DEMAEL-SUARD, A. ; GARIN, D. ; BRICHON, G. ; MURE, M. y PERES, G. (1974). "Neoglucogenese a partir de la glycine <sup>14</sup>C chez la tanche (*Tinca vulgaris* L.) au cours de l'asphixie." Comp.Biochem.Physiol. 47 A: 1023-1033.
- DENTON, J.E. y YOUSEF, M.K. (1976) "Body composition and organ weight of rainbow trout *Salmo gairdneri*." J.Fish.Biol. 8 : 489-499.
- DÉPECHE, J. ; GILLES, R. ; DAUFRESNE, S. y CHIAPELLO, H. (1979). "Urea content and urea production via the ornithine urea cycle and urea production during the ontogenic developent of two teleost fishes." Comp.Biochem.Physiol. 63 A : 51-56.
- DE TORRENTO, M.P.A. y BRENNER, R.R. (1976). "Influence of environmental temperature on the fatty acid desaturation and elongation activity of fish (*Pimelodus maculatus*) liver microsomes." Biochem.Biophys.Acta. 424 : 36-44.

- DOWD, J.E. y RIGGS, D.S. (1965) "A comparission of estimates of Michaelis Menten kinetic constants from various linear transformations." J.Biol.Chem. 240 : 863-869.
- DRABOWSKA, H. y WOJNO, T. (1977). "Studies on the utilization by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of feed mixtures containing soya bean meal and an addition of amino acids." Aquaculture. 10: 297-310.
- DRIEDZIC, W.C. y HOCHACHKA, P.W. (1978). "Carbohydrate metabolism." En : Fish Physiology Vol. VII Ed. : Hoar, S.H. y Randall, D.J. 517-525 Academic Press New York.
- DUPRE, H.K. y SNEED, K.E. (1966). "Response of channel catfish fingerlings to different levels of major nutrients in purified diet." Teach. Pap. Bur. Sport. Fish Wildl. U.S.A. 9,21.
- EBERHAGEN, U.D.; MROSEK, H.; PFANZELT, N. y SEITZ, W. (1969) "Über das synthesisprodukt der fettsäure-synthese ans den lehren verschiedener wirbeltiere." Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 350 : 407-410.
- EISCHEID, A.M. y KOCHAKAIN, C.D. (1954) "Effect of cortisone acetate on aspartic-glutamic transaminase activity of mouse tissues." Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 85 : 339-341.
- EISENSTEIN, A.B. y STRACK, I. (1971) "Effect of high protein feeding on gluconeogenesis in rat liver." Diabetes, 20 : 577-585.
- EKBERG, D.R. (1958). "Respiration in tissues of goldfish adapted to high and low temperatures." Biol.Bull.Mar.Biol.Bab. Woods Hole ; 114 : 308-316, 326.
- EL MAGHRABI, M.R. ;CLAUS, T.H. ;PILKIS, J. y PILKIS, S.J. (1981). "Partial purification of rat liver enzyme

that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 : 1071-1077.

- EPPLE, A. (1969) "The endocrine pancreas." En : *Fish Physiology* Vol. 2 (Ed. Hoar & Randall) Academic Press, New York. 275-310.
- EVANS, D.H. (1984). "Modes of ammonia transport across fish gills." Abstract. B26 1st. Int. Cong. Comp. Physiol. Biochem. Liege, Belgium.
- FALGE, R. (1973) "Untersuchungen von Enzymaktivitäten im Darminhalt der Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) nach Fütterung mit natürlicher und halbsynthetischer Nahrung." *Diss. Univ. Rostock.*
- FARKAS, T. (1969) "Effects of agents modifying the level of cyclic 3,5-adenosine monophosphate in adipose tissue on mobilization of fats in fish and frogs." *Ann. Inst. Biol. Hung. Acad. Sci. Tihany*, 36 : 163.
- FARKAS, T. y CSENGERI, I. (1976). "Biosynthesis of fatty acids by the carp *Cyprinus carpio* L. in relation to environmental temperature." *Lipids*. 11 : 401-407.
- FARKAS, T ; CSENGERI, I. ; MAJOROS, F. y OLAH, J. (1978). "Metabolism of fatty acids in fish. II. Biosynthesis of fatty acids in relation to diet in the carp *Cyprinus carpio* L. 1758." *Aquaculture*. 14: 57-65.
- FARKAS, T. ; CSENGERI, I. ; MAJOROS, F. y OLAH, J. (1980). "Metabolism of fatty acids in fish. III. Combined effect of environmental temperature and diet on formation and disposition of fatty acids in the carp *Cyprinus carpio* L. 1758." *Aquaculture*. 20: 29-40.
- FAUCONEAU, B. (1985). "Protein synthesis and protein deposition." En : "Nutrition and feeding in fish." pag. 17-46. Academic Press Londres.
- FAUCONEAU, B. y ARNAL, M. (1985). "Protein synthesis and

- protein deposition in fish." En : "Nutrition and feeding in fish." Ed. C.B.Cowey, A.M.Mackie y J.G.Bell. pag. 17-46. Academic Press Londres.
- FAUCONEAU, B. ;ARNAL, M. y LUQUET, P. (1981). "In vivo protein synthesis in rainbow trout muscle; Effect of temperature acclimatation." *Reprod. Nutr. Develop.* 21: 293-301.
- FAUCONEAU, B. y KAUSHIK, S.J. (1985). "Protein synthesis and protein deposition." En : "Nutrition and feeding in fish." Ed. C.B.Cowey, A.M.Mackie y J.G.Bell. pag. 17-46. Academic Press Londres.
- FELIP, P. (1975). "Amino acid metabolism in man." *Ann.Rev.Biochem.* 44 : 933-955.
- FERRE, P.; PEGORIER, J.P.; WILLIAMSON, D.H. y GIRARD, J. (1979) "Interactions *in vivo* between oxidation of no-estirified fatty acids and gluconeogenesis in newborn rat." *Biochem.J.* 182 : 593-598.
- FIDEU, M.D. (1986). "Caracterización enzimática de la fosfofructoquinasa y piruvato quinasa de hígado de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.)." Tesis Doctoral Univ.Complutense de Madrid.
- FIDEU, M.D. ;PEREZ, M.L. ;HERRANZ M.J. y RUIZ-AMIL, M. (1984). "Thermic modulation of phosphofructokinase (PFK) of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)." *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 80B n.3 : 623-628.
- FIDEU, M.D. ;SOLER, G. y RUIZ-AMIL, M. (1983). "Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)." *Comp. Biochem. Physiol.* 74 B 4: 795-799.
- FONTAINE, A. (1975) "Hormones in fish" En : *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology.* Vol. 2. : 139-212. Eds. Malinis D.C. & Sargent J.R.
- FOSTER, G.D y MOON, T.W. (1986) "Cortisol and liver

- metabolism of immature american eel, *Anguilla rostrata*." Fish.Physiol.Biochem. 2 : 113-124.
- FOWLER, B.J.; ALLEN, R.L. y PHIPPS, D.A. (1979). "Isolation of L-histidine ammonia lyase from rainbow trout." Biochem.Soc.Trans. 7 : 1081-1083.
- FREED, M.J. (1971). "Properties of muscle phosphofructokinase of cold and warm acclimated *Carassius auratus*." Comp. Biochem. Physiol. 39 B: 747-764.
- FREEDLAND, R.A. y SZEPESEI, B. (1971) "Control of enzyme activity : nutritional factors." En : Enzyme Synthesis and Degradation in mammalian System. Ed. Rechcigl-Basel, M. & Karger, S. 103-140.
- FREEMAN, H.C. e IDLER, D.R. (1973). "Effects of corticosteroids on liver transaminases in two salmonids, the rainbow trout (*Salmo gairdneri*), and brook trout (*Salvelinus fontinalis*)." Gen.Comp.Endocrinol. 20 : 69-75.
- FRENCH, C.J.; HOCHACHKA, P.W. y MOMMSEN, T.P. (1983). "Metabolic organization of liver during spawning migration of sockeye salmon." Ann.J.Physiol. 245 : R 827-R 830.
- FRENCH, C.J.; MOMMSEN, T.P. y HOCHACHKA, P.W. (1981) "Amino acid utilization in isolated hepatocytes from rainbow trout." Eur.J.Biochem. 113 : 311-317.
- FRIED, H.G. y SCHREIBMAN, P.M. (1972). "Alterations of pentose shunt activity in tissues of teleost." Comp. Biochem. Physiol. 42 B : 517-522.
- FRYER, J.N. (1975) "Stress and adrenocorticosteroid dynamics in the goldfish *Carassius auratus*." Can.J.Zool. 53 : 1012-1020.
- FUJII, M. ; NAKAYAMA, H. y YONE, Y. (1976). "Effect of  $\omega$ 3 fatty acids on growth feed efficiency and fatty acid

composition of red sea bream *Chrysophrys major*." Rept. Fish. Res. Lab. Kyusho Univ. 3 : 65-86.

FUJII, M. y YONE, Y. (1976). "Studies on nutrition of red sea bream. XIII. Effect of dietary linoleic and  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids on growth and feed efficiency." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 42: 583-588.

FURUICHI, M. y YONE, Y. (1980). "Effect of dietary dextrin levels on the growth and feed efficiency the chemical composition of the liver and dorsal muscle and the absorption of dietary protein and dextrin in fishes." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish 46(2): 225-229.

FURUICHI, M. y YONE, Y. (1982) "Changes in activities of hepatic enzymes related to carbohydrate metabolism of fish in glucose and insulin-glucose tolerance test." Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48 (3) : 463-466.

FURUKAWA, A. ; TSUKARA, H. y FUNAE, K. (1966). "Studies on feed for fish. V. Result of the small floating net culture test to establish the artificial diet as complete yellowtail foods." Bull. Naikai reg. Fish. Res. Lab. 23: 45-56.

GARCIA, M. ; CARDENETE, G. y ZAMORA, S. (1984). "Efecto de la presencia de almidón en una dieta para truchas sobre la utilización de la proteína de la misma." XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Murcia, 16-18 de Mayo. 1984.

GARCIA, M. ; ZAMORA, S. y LOPEZ, M. A. (1981 a). "Crecimiento y composición corporal en la trucha: influencia de la sustitución parcial de proteína por grasa en la dieta." Ars. Pharmaceutica, XXII (3) : 343-354.

GARCIA, M. ; ZAMORA, S. y LOPEZ M. A. (1981 b). "The influence of partial replacement of protein by fat in the diet on protein utilization by the rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Comp. Biochem. Physiol. 68 : 457-460.

GARCIA DE FRUTOS, P. ; BONAMOSA, L. ; FERNANDEZ, F. y

- BAANANTE, I.V. (1988). "Fructosa 2.6-bisfosfato en el hígado de dorada (*Sparus aurata*): relación con el estado de nutrición." Simposio sobre el cultivo intensivo de peces continentales. Univ. Complut. de Madrid.
- GARCIA-SALGUERO, L.; HORTELANO, P. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989). "Role of  $\alpha$ -adrenergic stimulate in the control of rat renal ammoniogenesis." Biochem. Biophys. Res. Commun. 162 : 116-123.
- GARCIA-SALGUERO, L.; MARTINEZ-LOPEZ AMORES, V.; HORTELANO, P. y LUPIAÑEZ, J.A. (1988). "Metabolic behaviour in isolated populations of proximal and distal rat renal tubules." Chemosphere. 17 : 1049-1056.
- GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1988 a) "Long term control of renal carbohydrate metabolism. I. Effect of starve-feed cycles on renal tubules gluconeogenesis." Int. J. Biochem. 20 : 943-950.
- GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1988 b) "Metabolic adaptation of the renal carbohydrate metabolism. I. Effects of starvation on the gluconeogenic and glycolytic fluxes in the proximal and distal renal tubules." Mol. Cell. Biochem.
- GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989 a) "Long term control on renal carbohydrate metabolism. II. Effect of starve-feed cycles on renal tubule glycolysis." Comp. Biochem. Physiol. 92 B : 67-74.
- GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989 b) "Metabolic adaptation of the renal carbohydrate metabolism. II. Effects of a high carbohydrate diet on the gluconeogenic and glycolytic fluxes in the proximal and distal tubules." Mol. Cell. Biochem. 85 : 91-100.
- GARCIA-SALGUERO, L. y LUPIAÑEZ, J.A. (1989 c) "Metabolic adaptation of the renal carbohydrates metabolism. III. Effect of a high protein diet on the

- gluconeogenic and glucolytic fluxes in the proximal and distal renal tubules." *Mol.Cell.Biochem.* 90 : 99-110.
- GARIN, D. y DEMAEL, A. (1979) "Metabolisme glucidique et intermédiaire." En : *Nutrition des Poisson.* Ed. C.N.R.S. Paris. 185-213.
- GARLING, D.L. y WILSON, R.P. (1976). "The optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerlings." *J.Nutr.* 106 : 1368-1375.
- GARLING, D.L. y WILSON, R.P. (1977). "Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and body composition of fingerling channel catfish." *Prog.Fish.Cult.* 39(1) : 43-47.
- GAUDET, M. ; RACICOT, J.G. y LERAY, C. (1973). "Enzyme activities of plasma and selected tissues in rainbow trout *Salmo gairdneri* R." *J. Fish. Biol.* 7: 505-512.
- GLOCK, G.E. y McLEAN, P. (1953). "Glucose-6 phosphate dehydrogenase activity of rat liver." *Biochem. J.* Vol. 54 : 400-408.
- GODMAN, M.J. ; BACK, D.W. y GOODRIDGE, A.G. (1985). "Nutritional regulation of the synthesis and degradation of malic enzyme messenger RNA in duck liver." *J.Biol.Chem.* 260 : 4404-4408.
- GOLDENBERG, H. ; HUFTTINGER, M. ; KAMPFER, P. y KRAMAR, R. (1978). "Preparation of peroxisomes from carp liver by zonal rotor density gradient centrifugation." *Histochem.* 10 : 103-113.
- GOLDSTEIN, L. ; BOYD, T.A. ; MAC ELROY, A.E. ; CHA, C.J. y FORSTER, R.P. (1975). "Free amino acids in tissues of the skate *Raja erinacea* : regulation of concentrations and transport during adaptation to a dilute sea water environment." *Bull.Mount.Desert.Island.Biol.Lab.* 15: 42-43.

- GOLDSTEIN, L.; FORSTER, R.P. y FANELLI, G.N. (1964) "Gill blood flow and ammonia excretion in the marine teleost *Myoxocephalus scorpius*." Comp.Biochem.Physiol. 12 : 489-499.
- GOODMAN, M.N.; McELANEY, M.A. y RUDERMAN, N.B. (1981) "Adaptation to prolonged starvation in the rat : curtailment of skeletal muscle proteolysis." Ann.J.Physiol. 241 : 321-327.
- GOODMAN, M.N. y RUDERMAN, N.B. (1980) "Starvation in the rat. I. Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA and protein." Am.J.Physiol. 239 : 269-276.
- GUDERLEY, H. y CARDENAS, J.M. (1980). "A study of the catalytic properties of pyruvate kinase isoenzymes from and examination of their functional relationships." J.Exp.Zool. 212 : 269-277.
- GUDERLEY, H.E.; FIELDS, J.H.A.; CARDENAS, J.M. y HOCHACHKA, P.W. (1978) "Pyruvate kinase from liver and kidney of *Arapaima gigas*." Can.J.Zool. 56 : 852-859.
- GUPPY, M. y HOCHACHKA, P.W. (1979). "Pyruvate kinase functions in hot and cold organs of tuna." J.Comp.Physiol. 129 B: 185-191.
- HALL, E.R. ; COTTAM, G.L. y GUDERLEY, H.E. (1978). "Isoenzymes of PK in invertebrates their physical, chemical kinetic and immunological properties." Int.J.Biochem. 9 : 785-793.
- HALVER, J.E. (1957). "Nutrition of salmonid fishes. IV. An amino acid test diet for chinook salmon." J.Nutr. 62: 245-254.
- HALVER, J.E. ; DE LONG, D.C. y MERTZ, E.T. (1957). "Nutrition of salmonid fishes. V. Classification of essential amino acids for chinook salmon." J.Nutr. 63 : 95-105.

- HALVER, J.E. y SHANKS, W.E. (1960). "Nutrition of salmonid fishes. VIII. Indispensable amino acid for sockeye salmon." *J.Nutr.* 72 : 340-346.
- HANSEN, H.J.M. y ABRAHAM, S. (1983). "Influence of temperature, environment salinity and fasting on the patterns of fatty acids synthesized by gills liver of the European eel (*Anguilla anguilla*)." *Comp.Biochem.Physiol.* 75 B: 581-587.
- HANSEN, H.O. y KNUDSEN, J. (1981). "The influence of environmental and incubation temperature on fatty acid synthetase from flounder *Platichthys flesus* L. liver." *Comp.Biochem.Physiol.* 70 B : 515-520.
- HANSON, R.H. ; RUDOLPH, F.B. y LARDY, H.A. (1973). "Rabbit muscle phosphofructokinase. The kinetic mechanism of action and the equilibrium constant." *J.Biol.Chem.* 248: 7852-7859.
- HARDING, D.E. ; ALLEN, O.W. y WILSON, R.P. (1977). "Sulfur amino acid requirements of catfish: L-methionine and L-cystine." *J.Nutr.* 107: 2031-2035.
- HASCHEMEYER, A.E.V. (1968). "Compensation of liver protein synthesis in temperature-acclimated toadfish *Opsanus tau*." *Biol.Bull.* 135 : 130-140.
- HASCHEMEYER, A.E.V. (1969). "Studies on the control of protein synthesis in low temperature acclimation." *Comp.Biochem.Physiol.* 28 : 535-552.
- HASCHEMEYER, A.E.V. (1983). "A comparative study of protein synthesis in nototheniids and icefish at Palmer station Antarctica." *Comp.Biochem.Physiol.* 76 B: 541-543.
- HASCHEMEYER, A.E.V. y MATHEWS, R.W. (1982). "Effects of temperature extremes on protein synthesis in liver of toadfish *Opsanus tau* in vivo." *Biol.Bull.Mar.Biol.Lab. Woods Hole* vol. 162: 18-27.

- HASCHENMEYER, A.E.V. y SMITH M.A.K. (1979) "Protein synthesis in liver, muscle and gill of nullet (*Mugil cephalus* L.) in vivo". Biol. Bull. 156 : 93-102.
- HAYASHI, S.; ISE, K.; ITAKURA, T. y OOSHIRO, Z. (1982). "Biochemical properties of glutamate dehydrogenase purified from eel liver." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 48 : 697-701.
- HAYASHI, S. y OOSHIRO, Z. (1975) "Gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused liver of the eel". Bull.Japan.Soc.Scient.Fish. 41 : 201-208.
- HAZEL, J.R. y PROSSER, C.L. (1974) "Molecular mechanisms of temperature compensation in porkilotherms". Physiol.Rev. 54 : 620-677.
- HAZEL, J.R. y PROSSER, C.L. (1979) "Incorporation of (1-14C) acetate into fatty acids and sterols by isolated hepatocytes of thermally acclimated rainbow trout". J.Comp.Physiol. B 134 : 321-330.
- HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R. (1981) "Lipid biosynthesis in rainbow trout fed diets of different fat content." Comp.Biochem.Physiol. 69 C : 31-37.
- HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R. (1984) "Lipid metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets containing partially hydrogenated fish oil". Comp.Biochem.Physiol. 78 B : 557-564.
- HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R. (1985) "Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". Comp.Biochem.Physiol. 82 B : 79-85.
- HENDERSON, R.J.; SARGENT, J.R. y PIRIE, B.J.S. (1982). "Perioxosomal oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout *Salmo gairdneri* fed diets of marine zooplankton." Comp.Biochem.Physiol. 73 B :

565-570.

HENDERSON R.J. y TOCHER, D.R. (1987) "The lipid composition and biochemistry of freshwater fish". Prog.Lipid Res. Vol. 26 : 281-347.

HERS, H.G. y HUE, L. (1983) "Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis". Ann.Rev.Biochem. 52 : 617-653.

HERZBERG, G.R. (1983). "The influence of dietary fatty acid composition on lipogenesis." Adv.Nutr.Res. 5 : 221-253.

HIDALGO, F. y ALLIOT, E. (1988) "Influence of water temperature on protein requirement and protein utilization in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*". Aquaculture 72 : 115-129.

HILLE, S.; DEUFEL, J.; KAUSCH, H. y PLATZ, F. (1980) "Entstehung eines fettlebersyndroms bei regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) in abhängigkeit vom kohlenhydrat-und proteingehalt des puttors, sowie bei Überfrüttzung." Arch.Hydrobiol.Suppl. 59 : 1-16.

HILTON, J.W. (1982) "The effect of pre-fasting diet and water temperature on liver glycogen and liver weight in rainbow trout *Salmo gairdneri* Rich. during fasting." J.Fish.Biol. 20 : 69-78.

HILTON, J.W. y ATKINSON, J.L. (1982) "Responses of rainbow trout to increased levels of carbohydrates in practical trout diet." Br.J.Nutr. 47 : 597-607.

HILTON, J.W. ; ATKINSON, J.L. y SLINGER, S.J. (1983) "Effect of increase dietary fiber on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)". Can.J.Fish.Aquat.Sci. 40 (1) : 81-85.

HILTON, J.W. y SLINGER, S.J. (1981) "Nutrition and feeding of rainbow trout". Can.Spec.Publ.Fish.Aquat.Sci. 55:

15 p.

- HOCHACHKA, P.W. (1962) "Thyroidal effects on pathways for carbohydrate metabolism in Teleosts." Gen.Comp.Endocrinol. 2 : 499-505.
- HOCHACHKA, P.W. (1967) "Organization of metabolism during temperature compensation in Mollecular mechanism of temperature adaptation." A symposium presented a Berkeley meeting of the American association for the advancement of science. Publication n. 84 Washington 177-203.
- HUGGINS, A.K.; SKUTSCH, G. y BALDWIN, E. (1969) "Ornithine urea cycle enzymes in teleostean fishes." Comp.Biochem.Physiol. 28 : 587-603.
- HUGHES, G.S. y RUMSEY, G.L. (1983) "Dietary requirements of essential branched-chain amino acids by lake trout." Trans.Am.Fish.Soc. 112 : 812-817.
- HULBERT, W.C. y MOON, T.W. (1978) "The potential for lactate utilization by red and white muscle of the eel (*Anguilla rostrata*)." Can.J.Zool. 56 : 128-135.
- IDLER, D.R.; RONALD, A.P. y SCHMIDT, P.J. (1959). "Biochemical studies on sockeye salmon during spawning migration. VII. Steroid hormones in plasma." Can.J.Biol.Physiol. 37 : 1227-1238.
- INABA, D.; OGINO, G.; TAKAMATSU, C.; UEDA, T. y KUROKAWA, K. (1963) "Digestibility of dietary components in fish. II Digestibility of dietary protein and starch in rainbow trout." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 29 (3) : 242-244.
- INCE, B.W. (1983) "Secretin-stimulated insulin release *in vivo* in european eels *Anguilla anguilla* L." J.Fish. Biol. 22 : 259-263.
- INCE, B.W. (1985) "Pancreatic control of metabolism." En :

Control process in Fish.Physiol. 89-102.

- INCE, B.W. y THORPE, A. (1974) "Effects of insulin and of metabolite loading on blood metabolites in the european silver eels." Gen.Comp.Endocrinol. 23 : 460-471.
- INCE, B.W. y THORPE, A. (1975) "Hormonal and metabolite effects on plasma free fatty acids in the northern pike *Esox lucius* L." Gen.Comp.Endocrinol. 27 : 144-152.
- INCE, B.W. y THORPE, A. (1976) "The *in vitro* metabolism of <sup>14</sup>C-labelled glucose and <sup>14</sup>C-glycine in the insulin treated northern pike." Gen.Comp.Endocrinol. 28 : 481-486.
- INCE, B.W. y THORPE, A. (1977). "Plasma insulin and glucose responses to glucagon and catecholamines in the european silver eel (*Anguilla anguilla* L.)." Gen.Comp.Endocrinol. 33 : 453-459.
- INCE, B.W. y THORPE, A. (1978) "The effects of insulin on plasma amino acids of northern pike." J.Fish.Biol. 12 : 503-506.
- INUI, Y.; ARAI, S. y YOKOTE, M. (1975) "Gluconeogenesis in the eel. IV. Effects of hepatectomy, alloxan and mammalian insulin on the behaviour of plasma amino acids." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 41 : 1105-1111.
- INUI, Y. e ISHIOKA, H. (1983 a) "Effects of insulin and of glucagon on the incorporation of glycine into the protein of the liver and opercular muscle of the eel *in vivo*." Gen.Comp.Endocrinol. 51 : 208-212.
- INUI, Y. e ISHIOKA, H. (1983 b) "Effects of insulin and of glucagon on amino acid transport into the liver and opercular muscle of the eel *in vivo*." Gen.Comp.Endocrinol. 51 : 213-218.
- INUI, Y. y OSHIMA, Y. (1966) "Effects of starvation on

- metabolism and chemical composition of eel." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 32 : 492-501.
- INUI, Y. y YOKOTE, M. (1974) "Gluconeogenesis in the eel. I. Gluconeogenesis in the fasted eel." Bull.Freshwater.Fish.Res.Lab. 24 : 33-45.
- INUI, Y. y YOKOTE, M. (1977) "Effects of glucagon on amino acid metabolism in japanese eel *Anguilla japonica*." Gen.Comp.Endocrinol. 33 : 167-173.
- INUI, Y.; YU, J.Y.L. y GORBMAN, A. (1978) "Effect of bovine insulin on the incorporation of (<sup>14</sup>C)-glycine into protein and carbohydrate in liver and muscle of hagfish." Gen.Comp.Endocr. 36 : 133-141.
- JACKIM, E. y LAROCHE, G. (1973) "Protein synthesis in *Fundulus heteroclitus* muscle." Comp.Biochem.Physiol. 44 A : 851-866.
- JACKSON, A.J. y CAPPER, B.S. (1982) "Investigations into the requirements of the tilapia *Sarotherodon mossambicus* for dietary methionine, lysine and arginine in semi-synthetic diets." Aquaculture 29 : 289-297.
- JANICKI, R. y LINGIS, J. (1970) "Mechanism of ammonia production from aspartate in teleost liver." Comp.Biochem.Physiol. 37 : 101-105.
- JANSSENS, P.A. y LOWREY, D. (1987) "Hormonal regulation of hepatic glycogenolysis in the carp *Cyprinus carpio*." Am.J.Physiol. 252 : R 653-R 660.
- JANSSENS, P.A. y WATERMAN, J. (1988) "Hormonal regulation of gluconeogenesis and glycogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured *in vitro*." Comp.Biochem.Physiol. 91 A n. 3 : 451-455.
- JEFFERSON, L.S.; EXTON, J.H.; BUTCHER, R.W.; SUTHERLAND, E.W. y PARK, C.R. (1968) "Role of adenosine-3.5 monophosphate in the effects on the insulin and

anti-insulin serum liver metabolism." J.Biol.Chem.  
243 : 1031-1038.

JENSEN, G.S. (1981) "A comparison of some properties of miocardial phosphofructokinase from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the deiving turtle (*Pseudemis scripta*)." Comp.Biochem.Physiol. 70 B : 161-164.

JOBLING, M. (1980 a) "Gastric evacuation in plaice *Pleuronectes platessa* L. effects of dietary energy level and food composition." J.Fish.Biol. 17 : 547-551.

JOBLING, M. (1980 b) "Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization in plaice." J.Fish.Biol. 17 : 325-334.

JOHNSTON, I.A. (1975) "Pyruvate kinase from the skeletal musculature of the carp (*Carassius carassius* L.)." Biochem.Biophys.Res.Commun. 63 : 115-120.

JOHNSTON, I.A. (1981) "Quantitative analysis of muscle breakdown during starvation in the marine flatfish *Pleuronectes platessa*." Cell.Tissue.Res. 214 : 369-386.

JORGENSEN, J.B. y MUSTAFA, T. (1980) "The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in flounder (*Platichthys flesus* L.). II High energy phosphate compounds and the role of glycolitic and gluconeogenetic enzymes." Comp.Biochem.Physiol. 67 : 249-256.

JÜRSS, K. (1978) "The effects of pyridoxine deficiency on aminotransferase activity in liver and white muscle of rainbow trout." Comp.Biochem.Physiol. 61 B : 385-398.

JÜRSS, K. (1979) "Effects of temperature, salinity and feeding on aminotransferase activity in the liver and white muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri*

- R.)." *Comp.Biochem.Physiol.* 64 B : 213-218.
- JÜRSS, K. (1981 a) "Influence of temperature and ratio of lipid to protein in diets on aminotransferase activity in the liver and white muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)." *Comp.Biochem.Physiol.* 68 B : 527-533.
- JÜRSS, K. (1981 b) "The effect of vitamin B<sub>6</sub> deficiency on the free amino acids and two aminotransferases of white muscle from *Salmo gairdneri*." *Comp.Biochem.Physiol.* 70 B : 829-832.
- JÜRSS, K.; BITTORF, T.H. y VÖKLER, T.H. (1984) "Biochemical investigations on salinity and temperature acclimation of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Rich." *Zool.Jh.Physiol.* 88 : 67-81.
- JÜRSS, K; BITTORF, T.H. y VÖKLER, T.H. (1985) "Influence of salinity and ratio of lipid to protein in diets on certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)." *Comp.Biochem.Physiol.* Vol. 81 B n. 1 : 73-79.
- JÜRSS, K. y NICOLAI, B. (1976) "Biochemical changes in liver and muscle of the rainbow trout *Salmo gairdneri* during starvation." *Zool.Jahrb.Abt.Allg. Zool.Physiol.Tiere.* 80 : 101-109.
- KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.I. y ONO, K. (1979) "Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids." *Comp.Biochem.Physiol.* 63 B : 295-298.
- KAPLAN, J.H. y PITOT, H.C. (1970) "The regulation of intermediary amino acid metabolism in animal tissues." "Mamalian protein metabolism" Vol. IV : 387-443.
- KATZ, J. y McGARRY, J.D. (1984) "The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism ?." *J.Clin.*

Invest. 74 : 1901-1909.

- KATZ, J. y WOOD, H.G. (1960) "The use of glucose-C<sup>14</sup> for the evaluation of the pathways of glucose metabolism." J.Biol.Chem. 235 : 2165-2177.
- KAUSHIK, S.J. (1979) "Application of a biochemical method for the estimation of amino acid needs in fish : quantitative arginine requirements of rainbow trout in different salinities." En : Finfish Nutrition and Fish Feed Technology. Ed. Halver Tiews Vol. 1 : 197-207.
- KAUSHIK, S.J.; FAUCONNEAU, F. y BLANC, J.M. (1984) "A study of nitrogen excretion and oxygen consumption in 5 half-sibling families of rainbow trout." Reprod.Nutr.Develop. 24 : 431-438.
- KAUSHIK, S.J. y FAUCONNEAU, F. (1984) "Efect of lysine administration on plasma arginine and on some nitrogenous catabolites in rainbow trout." Comp.Biochem.Physiol. 79 : 459-462.
- KAYAMA, M.; TSUCHIYA, Y. y MEAN, J.F. (1963) "A model experiment of aquatic food chain with special significance in fatty acid conversion." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 29 : 452-458.
- KELLY, G.J. y TURNER, F.J. (1971) "Cooperativity in pea-seed phosphofructokinase." Biochem.Biophys. Acta 242 : 559-568.
- KEPPLER, D. y DECKER, K. (1974) "Glycogen : Determination with amyloglucosidase." Methods of enzymatic analysis Vol. 3 (Bergmeyer H.V. ed.) 1127-1131 Academic Press, London.
- KETOLA, H.G. (1982) "Amino acid nutrition of fish : requirements and supplementation of diets." Comp.Biochem.Physiol. 73 B : 17-24.
- KIM, K.I.; KAYES, T.B. y AMUNDSON, C.H. (1984)

"Requirements for sulfur-containing amino acids by rainbow trout." Fed.Proc. 43-856.

KITAMIKADO, M.; MORISHITA, T. y TACHINO, S. (1964)  
"Digestibility of dietary protein in rainbow trout.  
II Effects of starch and oil contents in diets and  
size of fish." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 30 (1) :  
50-54.

KLETZIEN, R.F.; PROSTKO, C.R.; STUMP, D.J.; McCLUNGS,  
J.K. y DREHER, K.L. (1985) "Mole cloning of DNA  
sequences complementary to rat liver glucose  
6-phosphate dehydrogenase in mRNA." J.Biol.Chem. 260  
: 5621-5624.

KNOX, D.; WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1980) "Distribution  
of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish  
tissues." Mar.Biol. 56 : 7-10.

KONO, N. y UYEDA, K. (1973) "Chicken liver  
phosphofructokinase. I Crystallization and  
physico-chemical properties." J.Biol.Chem. 248 :  
8592-8602.

KRAUS-FRIEDMAN, N. (1984) "Hormonal regulation of hepatic  
gluconeogenesis." Physiol.Rev. 64 : 170-259.

KREBS, H.A. (1972) "Some aspects of the regulation of fuel  
supply in omnivorous animals." Adv.Enzyme Regl. 10 :  
397-420.

KREBS, H.A.; GASCOYNE, T y NOTTON, B.M.  
(1967). "Generation extramitochondrial reducing power  
in gluconeogenesis" Biochem.J. 102 : 275-282.

KUMAR, S.; PHILLIPS, G.T. y PORTER, J.W. (1972)  
"Comparative biochemistry of fatty acid synthetizing  
enzyme systems." A review. Int.J.Biochem. 3 : 15-32.

LARSSON, A. y LEWANDER, K. (1972) "Effects of glucagon  
administration to eels *Anguilla anguilla*."  
Comp.Biochem.Physiol. 43 A : 831-836.

- LARSSON, A. y LEWANDER, K. (1973) "Metabolic effects of starvation in the eel." *Comp.Biochem.Physiol.* 44 A : 367-374.
- LATZKO, E. y GIBB, M. (1974) "Alkaline C-fructose-1.6 diphosphatase." *Methods of enzymatic analysis Vol. 2* (Bergmeyer H.U. ed.) 881-884 Academic Press London.
- LEAVER, J. y BURT, J.R. (1980) "Purification and properties of phosphofructokinase from cold (*Gadhus morhua*) muscle." *Comp.Biochem.Physiol.* 69 B : 127-132.
- LEE, M.; KRUPKA, R.M. y COOK, R.A. (1973) "Cooperativity in human erythrocyte phosphofructokinase." *Biochemistry* 12 : 3503-3507.
- LEE, D.J. y PUTMAN, G.B. (1973) "The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet." *J.Nutr.* 103 : 916-922.
- LEGER, C. (1981) "Effet d'un jeûne prolonge sur la composition en lipides et en acides gras de la truite arc-in-ciel (*Salmo gairdneri*)." *Aquaculture*, 25 : 195-206.
- LEGER, C.; LUQUET, P. y BOUDON, M. (1975) "Effects de la suppression des glucides dans l'alimentation de la truite arc-in-ciel a la temperature de 10 °C. II. Evolution des compartiments corporels avec référence particulier aux acides grass des familles  $\omega$  9;  $\omega$  6 et  $\omega$  3." *Ann.Hydrobiol.* 6 : 71-93.
- LEGER, C.; LUQUET, P. y BOUDON, M. (1976) "Effects de la suppression des glucides dans l'alimentation de la truite arc-in-ciel a la temperature de 16 °C. II. Evolution des compartiments corporels avec référence particulier aux acides grass des familles  $\omega$  9;  $\omega$  6 et  $\omega$  3, et influence de un changement de temperature." *Ann.Hydrobiol.* 7 : 185-201.

- LEHMAN, J. (1970 a) "Über die abhängigkeit der enzymaktivitäten in rumpfmuskel der goldorfe (*Idus idus*) von der vordehaudlungstemperatur." Int.Revueges Hydrobiol. 55 (3) : 413-429.
- LEHMAN, J. (1970 b) "Verauderungen der enzymaktivitäten nach einem wechsel der adaptations temperatur, untersucht am seit enzumpfmuskel der goldfisches (*Carassius auratus*)." Int.Revue.Ges.Hydrobiol. 55 (5) : 763-781.
- LEWANDER, K.; DAVE, G.; JOHANSSON-SJOBECK, M.L.; LARSSON, A. y LIDMAN, U. (1976) "Metabolic effects of insulin in the european eel (*Anguilla anguilla*)." Gen.Comp. Endocrinol. 29 : 455-467.
- LIEBSON, L. y PLISETKAYA, E.M. (1968) "Effect of insulin on blood sugar level and glycogen content in organs of some cyclostomes and fish." Gen.Comp.Endocrinol. 11 : 381-392.
- LIEBSON, L.; PLISETKAYA, E.M. y MAZINA, T.I. (1968) "The NEFA content in the blood of cyclostomata and fishes and the effect of epiniphrine and insuline." J.Evol. Biochem.Physiol. 4 : 121.
- LIED, E.; LUND, B. y VON DER DECKEN, A. (1982) "Protein synthesis in vitro by epaxial muscle polyribosomes from cod. *Codus morhua*." Comp.Biochem.Physiol. 72 B : 187-193.
- LIED, E. y ROSENLUND, G. (1984) "The influence of the ratio of protein energy to total energy in the feed on the activity of protein synthesis "in vivo", the level of ribosomal RNA and the RNA-DNA ratio in cohite trunk muscle of atlantic cod (*Codus morhua*)." Comp.Biochem.Physiol. 77 A : 489-494.
- LIKIMANI, T.A. y WILSON, R.R. (1982) "Effect of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue." J.Nutr. 112 : 112-117.

- LIN, H.; ROMSOS, D.R.; TACK, P.I. y LEVEILLE, G.A. (1977  
a) "Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum)." J.Nutr. 107 : 846-854.
- LIN, H.; ROMSOS, D.R.; TACK, P.I. y LEVEILLE, G.A. (1977  
b) "Effects of fasting and feeding various diets on hepatic lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum)." J.Nutr. 107 : 1477-1483.
- LIN, H.; ROMSOS, D.R.; TACK, P.I. y LEVEILLE, G.A. (1977  
c) "Influence of diet on in vitro and in vivo rates fatty acids synthesis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum)." J.Nutr. 107 : 1677-1682.
- LIN, H.; ROMSOS, D.R.; TACK, P.I. y LEVEILLE, G.A. (1978)  
"Determination of glucose utilization in coho salmo (*Oncorhynchus kisutch*. Wal.) with (6-<sup>3</sup>H) and (U-<sup>14</sup>C) glucose." Comp.Biochem.Physiol. 59 : 189-191.
- LIU, D.H.W.; KRUEGER, H. y WANG, C. (1970) "Catabolic pathways for glucose in the cichlid fish *Cichlasoma bimaculatum*." Comp.Biochem.Physiol. 36 : 173-181.
- LÖHR, G.W. y WALLER, D.H. (1960) "Glucose-6-phosphate dehydrogenase." Methods of enzymatic analysis Vol. 2 (Bergmeyer H.V. ed.) 636-641. Academic Press London.
- LOVE, R.M.; ROBERTSON, I. y STRACHAN, I. (1968). "Studies on the North sea cod. VI. Effects of starvation 4. Sodium and Potassium." J.Sci.Agric. 19 : 415-422.
- LOWENSTEIN, M.J. (1972) "Ammonia production in muscle and other tissues. The purine nucleotide cycle." Physiol.Rev. 52 : 382-413.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, J.L. y RANDALL, R.J. (1951). "Protein measurement with the folim phenol reagent." J.Biol.Chem. 193.

- LUQUET, P. (1976) "Alimentation proteique et alimentation energetique des poisson du mer." *Oceanis* 2 (5) : 131-139.
- LUQUET, P.; LEGER, C. y BERGOT, F. (1975) "Effects de la suppression des glucides dans l'alimentation de la truité arc-in-ciel a la temperature de 10° C .I. Croissance en fonction du niveau d'ingestion proteique." *Ann.Hydrobiol.* 6 : 61-70.
- LUQUET, P.; LEGER, C. y BERGOT, F. (1976) "Effects de la suppression des glucides dans l'alimentation de la truité arc-in-ciel a la temperature de 16° C. I. Croissance en fonction du niveau d'ingestion proteique." *Ann.Hydrobiol.* 7 : 179-184.
- MALLETTE, L.E.; EXTON, J.H. y PARK, C.R. (1969) "Control of gluconeogenesis from amino acid in perfused rat liver." *J.Biol.Chem.* 24,1, : 5713-5723.
- MARCUS, C.J.; GELLER, A.M. y BYRNE, W.L. (1973) "Studies on bovine hepatic fructose 1.6-bisphosphate substrate inhibition and the kinetic mechanism." *J.Biol.Chem.* 248 : 8567-8573.
- MARLISS, E.B.; AOKI, T.T.; UNGER, R.H.; SOELDNER, J.S. y CAHILL, G.F. Jr. (1970) "Glucagon levels and metabolic effects in fasting man." *J.Clin.Invest.* 49 : 2256-2270.
- MASTERS, C.J. y HORGAN, D.J. (1962) "Glutamate transaminase activity in sheep tissue, and the response to prolonged protein depletion." *Aus.J.Biol.Sci.* 15 : 690-699.
- MATHEWS, R. y HASCHENMEYER, A.E.V. (1978) "Temperature dependency of protein synthesis in toad fish liver in vivo." *Comp.Biochem.Physiol.* 61 B : 479-484.
- MAZEAUD, M.M. y MAZEAUD, F. (1981) "Adrenergic responses to stress in fish." En : *Stress in fish.* Ed. Pickering. Academic Press London- 49.

- MAZID, M.A.; YANAKA, Y.; KATAYAMA, T.; SIMPSON, K.L. y CHICHESTER, C.O. (1978) "Metabolism of amino acid in aquatic animals. III. Indispensable amino acids for *Tilapia rilli*." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 44 : 739-742.
- MAYNARD, L.A. y LOOSLI, J.K. (1962) "Animal nutrition." Ed. Mc Graw-Hill New York. 533 p.
- McBEAN, R.L.; NEPEL, M.J. y GOLDSTEIN, L. (1966) "Glutamate dehydrogenase and ammonia production in the eel." Comp.Biochem.Physiol. 18 : 909-920.
- McCARTNEY, T.H. (1965) "Effect of supplemental fats in the diet and water temperature on the serum cholesterol and phospholipids of brown trout." Fish.Res.Bull. 29.
- McCORKLE, F.M.; CHAMB, E. y YARBROUGH, D.J. (1979) "Seasonal effects on selected tissue enzyme channel catfish *Ictalurus punctatus*." Comp.Biochem.Physiol. 62 B : 151-153.
- McDONALD, B.E. y JOHNSON, B.C. (1965). "Metabolic response to realimentation following chronic starvation in the adult male rat." J.Nutr. 87 : 161-167.
- McGARRY, J.D. y FOSTER, D.W. (1980) "Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production." Ann.Rev.Biochem. 49 : 395-420.
- McLAREN, B.A.; HERMAN, E.F. y ELVEHJEM, C.A. (1946) "Nutrition of rainbow trout : studies with purified rations." Arch.Biochem. 10 : 433-441.
- McLEOD, R.A.; JONAS, R.E.E. y ROBERTS, E. (1963) "Glycolytic enzymes in the tissues of salmonid fish (*Salmo gairdneri*)." Can.J.Biochem.Physiol. 41 : 1971-1981.
- MESTER, R. y IODACHESCU, D. (1972) "L'effect de

- acclimatation aux temperatures basses sur l'alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase du muscle squeletique chez les toches d'etang (*Misquernus fissilis* L.)." C.R.Trebd.Seauc.Acad.Paris Ser. D 275: 1083-1086.
- MERT, E.T. (1972) "The protein and amino acids needs." Fish Nutrition (Ed. Halver J.E.) : 105-143, Academic Press New York.
- MIGLIORINI, R.H.; LINDER, C.; MOURA, J.L. y VEIGA, J.A.S. (1973) "Gluconeogenesis in a carnivorous bird (Black vulture)." Am.J.Physiol. 225 : 1389-1392.
- MIKSICEK, R.J. y TOWLE, H.C. (1982). "Changes in the rates of synthesis and messenger RNA levels of hepatic glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenasae following induction by diet or thyroid hormone" J.Biol.Chem. 257 : 11289-11835.
- MINICK, M.C. y CHAVIN, W. (1972) "Effects of vertebrate insulins upon serum FFA and phospholipid levels in the goldfish, *Carassius auratus*." Comp.Biochem.Physiol. 41 A : 791-804.
- MOMMSEN, T.P.; FRENCH, C.J. y HOCHACHKA, P.W. (1980) "Sites and pattern of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon." Can.J.Zool. 58 : 1785-1799.
- MOMMSEN, T.P. y SUAREZ, R.K. (1984) "Control of gluconeogenesis in rainbow trout hepatocytes : role of pyruvate branchpoint and phosphoenolpyruvate-pyruvate cycle." Mol.Physiol. 6: 9-18.
- MOMMSEN, T.P.; WAISH, P.J. y MOON, W.C. (1985) "Gluconeogenesis in hepatocytes and kidney of atlantic salmon." Mol.Physiol. 8 : 89-100.
- MOON, T.W. (1983) "Metabolic reserves and enzyme activities with food deprivation in immature

- american eel, *Anguilla rostrata* Le Seur." Can.J.Zool. 61 : 802-811.
- MOON, T.W.; FOSTER, G.D. y PLISETKAYA, E.M. (1989). "Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks" Can.J.Zool. 67 : 2189-2193.
- MOON, T.W. y HULBERT, W.C. (1980) "Regulatory properties of pyruvate kinase isolated from tissues of the American eel (*Anguilla rostrata* Le Seur)." Comp.Biochem.Physiol. 65 B : 283-290.
- MOON, T.W. y JOHNSTON, I.A. (1979) "Starvation and enzymes activities in skeletal muscle and liver of a teleost fish. *Pleuronectes platessa*." Biochem.Soc.Trans. 7 : 1045-1046.
- MOON, T.W. y JOHNSTON, I.A. (1980) "Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscle and liver of plaice." J.Comp.Physiol. 136 B : 31-38.
- MOON, T.W. y JOHNSTON, I.A. (1981) "Amino acids transport and interconversions in tissues of caught and food deprived plaice, *Pleuronectes platessa* L." J.Biol. 19 : 653-663.
- MORATA, P.; VARGAS, A.M.; SANCHEZ-MEDINA, F.; GARCIA, M.; CARDENETE, G. y ZAMORA, S. (1982 a) "Evolution of gluconeogenesis enzymes activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout *Salmo gairdneri*." Comp.Biochem.Physiol. 71 B : 65-70.
- MORATA, P.; VARGAS, A.M.; PITA, M.L. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1982 b) "Involvement of gluconeogenesis in the hyperglycemia induced by glucagon, adrenaline and cyclic AMP in rainbow trout *Salmo gairdneri*." Comp.Biochem.Physiol. 73 A : 379-381.
- MORATA, P.; VARGAS, A.M.; PITA, M.L. y SANCHEZ-MEDINA, F. (1982 c) "Hormonal effects on the liver glucose

- metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Comp.Biochem.Physiol.* 72 B : 543-545.
- MOSSE, P.R.L. (1980) "An investigation of gluconeogenesis in marine teleost and the effect of long-term exercise on hepatic gluconeogenesis." *Comp.Biochem.Physiol.* Vol. 67 B : 583-592.
- MUNDAY, K.A.; GILES, I.G. y POAT, P.C. (1980) "Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase." *Comp.Biochem.Physiol.* 67 B : 403-411.
- MURAI, T.; AKIYAMA, T. y NOSE, T. (1981) "Use of crystalline amino acid coated with casein in diet for carp." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish* 47 : 523-527.
- MURAI, T.; AKIYAMA, T. y NOSE, T. (1982) "Effects of casein coating on utilization of dietary amino acids by fingerling carp and channel catfish." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish* 48 : 487-792.
- MURAMATSU, K. y ASHIDA, K. (1962) "Effect of dietary protein level on growth and liver enzymes activities of rats." *J.Nutr.* 76 : 143-150.
- MURAMATSU, K.; TAKADA, R. y UWA, K. (1984) "Adaptative responses of liver and kidney lysine ketoglutarate reductase and lysine oxidation in rats fed graded levels of dietary lysine and caseine." *Agri.Biol.Chem.* 48 : 703-711.
- MURAT, J.C. y SERFATY, A. (1975). "Effects de l'adrenaline du glucagon et de l'insuline sur le metabolisme glucidique de la carpe : influence de la temperature. *CR.Soc.Biol.* 169 : 228-232.
- NACE, C.S.; SZEPESEI, B. y MICHAELIS, D.E. (1979). "Regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme in liver and adipose tissue; effect of dietary trilinolein level in starve-refed and *ad libitum* fed rats." *J.Nutr.* 109 : 1097-1102.

- NAGAI, M. e IKEDA, S. (1971 a) "Carbohydrate metabolism in fish. I. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glucogen and lipid contents in carp." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 37 : 404-409.
- NAGAI, M. e IKEDA, S. (1971 b) "Carbohydrate metabolism in fish. II. Effect of dietary composition on metabolism of glucose-6-<sup>14</sup>C in carp." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 37 : 410-414.
- NAGAI, M. e IKEDA, S. (1972) "Carbohydrate metabolism in fish. III. Effect of dietary composition on metabolism of glucose-U-<sup>14</sup>C and C-<sup>14</sup> glutamate in carp." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 38 : 137-143.
- NAGAI, M. e IKEDA, S. (1973) "Carbohydrate metabolism in fish. IV. Effect of dietary composition on metabolism of acetate-U-<sup>14</sup>C and L-alanine-<sup>14</sup>C in carp." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 39 : 633-643.
- NAGASHIMA, K.; NAKAGAWA, T y NAGAYAMA, F. (1989 a) "Properties of phosphofructokinase from carp, eel and rainbow trout liver." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 55 (5) : 897-903.
- NAGASHIMA, K.; NAKAGAWA, T. y NAGAYAMA, F. (1989 b) "Properties of fructose-1.6-bisphosphate from carp, eel and rainbow trout." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 55 (5) : 905-909.
- NAGAYAMA, F. y OSHIMA, I. (1974) "Studies on the enzyme system of carbohydrate metabolism in fish. I. Properties of liver hexoquinase." Nippon Suisan Gakkaishi. 40 : 285-290.
- NAGAYAMA, F.; OSHIMA, K. y UMESAWA, (1972) "Distribution of glucose-6-phosphate metabolizing enzymes in fish." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 38 : 589-593.
- NARAYANSINGH, T. y EALES, J.G. (1975) "Effects of thyroid hormones on in vivo <sup>14</sup>C leucine incorporation

into plasma and tissue protein of brook trout and rainbow trout." *Comp.Biochem.Physiol.* 52 B : 399-405.

N.C.R. (1981) "Nutrient requirements of coldwater fishes." National Academy Press Washington D.C.

NEWGARD, C.B.; MOORE, S.V.; FOSTER, D.W. y McGARRY, J.D. (1984). "Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathways." *J.Biol.Chem.* 259 : 6958.

NICHOLLS, F.; NICHOLLS, P. y SAND, O. (1976) "Phosphofructokinase and related glycolytic enzyme activities in flounder (*Platichthys flesus* L) liver." *Comp.Biochem.Physiol.* 54 B : 461-466.

NICOLAIDES, N. y WODAL, A.H. (1962) "Impaired pigmentation in chinook salmo fed diet deficient in essential fatty acids." *J.Nutr.* 78 : 431-437.

NIELSEN, J.B.K. (1977) "Effects of thyroid hormone on elongation factor. I. Levels in toadfish liver." *Biol.Bull.* 153 : 442-449.

NIEMEYER, H.; CLARK-TURRI, L.; GRACE, E. y VERGARA, F.E. (1962). "Selective response of liver enzymes to the administration of different diets after fasting." *Arch.Biochem.Biophys.* 98 : 77-85.

NINNO, R.E.; De TORRENTO, H.A.P.; CASTUMA, J.C. y BRENNER, R.R. (1974) "Specificity of 5 and 6 fatty acids desaturases in rat and fish." *Biochem.Biophys.Acta* 360 : 124-133.

NOSE, T. (1972) "Changes in pattern of free plasma amino acids in rainbow trout after feeding." *Bull.Fresh.Fish.Res.Lab.* 22 : 137-144.

NOSE, T. (1979) "Summary report on the requirement of essential amino acids for carp." *Finfish Nutrition*

and Finfeed Technology (Ed. Halver J.E. y Tiews K.)  
145-156 Heenemann Berlin.

- NOSE, T.; ARAIS, S.; LEE, D.L. y HASHIMOTO, Y. (1974) "A note on amino acids essential for growth of young carp." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 40 : 903-908.
- NORDLIIE, F.C. y LEFFLER, C.W. (1975) "Ionic regulation and the energetics of osmoregulation in *Mugil cephalus* Lin." Comp.Biochem.Physiol. 51 A : 125-131.
- OGINO, C.; CHIOU, J.Y. y TAKEUCHI, T. (1976) "Protein nutrition in fish. VI. Effects of dietary energy sources on the utilization of protein by rainbow trout and carp." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish 42 : 213-218.
- ONO, T.; POTTER, V.R.; PITOT, H.C. y MORRIS, H.P. (1963) "Metabolic adaptations in rat hepatomas. III. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and pyrimidine reductases." Cancer Res. 23 : 385-391.
- OTTOLENGHI, C.; PUVIANI, A.C.; BARRUFALDI, A. y BRIGHENTI, L. (1982) "In vivo effects of insulin on carbohydrate metabolism in catfish *Ictalurus melas*." Comp.Biochem.Physiol. 72 A : 35-41.
- OWEN, J.M.; ADRON, J.W.; MIDDELTON, C. y COWEY, C.B. (1975) "Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* L. and rainbow trout *Salmo gairdneri* Rich." Lipids 10 : 528-531.
- OWEN, J.M.; ADRON, J.W.; SARGENT, J.R. y COWEY, C.B. (1972) "Studies on the nutrition of marine flat fish. The effect of dietary fatty acids of the plaice *Pleuronectes platessa*." Mar.Biol. 13 : 160-166.
- PAGE, J.W. y ANDREWS, J.W. (1973) "Interaction of dietary levels of protein and energy on channel catfish." J.Nutr. 103 : 1339-1346.

- PALMER, T.N. y RYMAN, B.E. (1972) "Studies on oral glucose intolerance in fish." *J.Fish.Biol.* 4 : 311-319.
- PALOU, A.; REMESAR, X.; AROLA, M. y ALEMANY, M. (1980) "Changes in alanine amino transferase activity in the several organ in the rat induce by a 24 hr. fast." *Horm.Metab.Res.* 12 : 505-508.
- PATENT, G.J. (1970) "Composition of some hormonal effects on carbohydrate metabolism in a elasmobranch *Squalus acanthias* and a holocephalan *Hydrocephalus colliei*." *Gen.Comp.Endocrinol.* 14 : 215-242.
- PEARCE, J. (1980) "The response of liver enzymes to feed restriction and subsequent *ab lib.* feeding in the taying hen." *Br.J.Nutr.* 44 : 81-87.
- PEQUIN, L. y SERFATY, A. (1963) "L excrétion ammoniacale chez un téléostéen duciole *Cyprinus carpio*." *Comp.Biochem.Physiol.* 10 : 315-324.
- PERET, J.; FOUSTOCK, S.; CHENEZ, M.; BOIX-JOYEUX, B. y ASSAN, R. (1981) "Plasma glucagon and insulin concentration and hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate kinase during and upon adaptation of rat to a high protein diet." *J.Nutr.* 111 : 1173-1184.
- PERET, J. y CHANEZ, M. (1976) "Influence of diet cortisol and insulin on the activity of PC and PEPCK in the rat liver." *J.Nutr.* 106 : 103-110.
- PETER, R.E.; HONTELA, A.; COOCK, A.F. y PAULENCU, C.R. (1978) "Daily cycle in serum cortisol levels in the goldfish : effects of photoperiod, temperature and sexual conditions." *Can.J.Zool.* 56 : 2443-2448.
- PHILLIPS, A.M. (1966) "The effect of changes in protein quality, calories sources and calories levels upon the growth and chemical composition of brown trout." *Fisheries Res.Bull.* 29 : 6-14.

- PHILLIPS, A.M. (1969) "Nutrition, digestion and energy utilization." En : Fish Physiology. Ed. : Hoar, W.S. y Randall, D.J. Vol. I : 391-432.
- PHILLIPS, A.M. y BROCKAWAY, D.R. (1959) "Dietary calories and the production of trout in hatcheries." Prog.Fish.-Cult. 21 : 3-16.
- PHILLIPS, A.M.; LIVINGSTON, D.L. y POSTON, H.A. (1964) "The effect of three supplemental fats on the growth rate and body chemistry of brown trout." Fish.Res.Bull. n. 28.
- PHILLIPS, A.M.; LIVINGSTON, D.L. y POSTON, H.A. (1966) "Use of calorie sources by brown trout." Prog.Fish.-Cult. 28 : 67-72.
- PHILLIPS, A.M.; TUNISON, A.V. y BROCKAWAY, D.R. (1948) "Utilization of carbohydrates by trout." Fish.Res.Bull. N.Y. II ; State of New York Conservation Department Albany 44 pp.
- PHILLIPS, J.W. y HIRD, F.J.R. (1977). "Gluconeogenesis in vertebrate livers." Comp.Biochem.Physiol. 57 B : 127-131.
- PICKETT, M.H.; HEW, C. y DAVIES, P.L. (1983) "Seasonal variation in the level of antifreeze protein mRNA from winter flounder." Biochem.Biophys. Acta 739,1, : 97-104.
- PIEPER, A. (1977) "Untersuchungen über die Verwertung einiger Kohlehydrate durch Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Rich.)." Diss.Univ.Göttingen.
- PIEPER, A. y PFEFFER, E. (1979) "Carbohydrates as possible sources of dietary energy for rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.)." En : Proc. World Symp. on Fish Nutrition and Fishfeed Technology. Hamburg 20-23 June 1978. Berlin 1979.
- PIEPER, A. y PFEFFER, E. (1980). "Studies on the effect

- of increasing proportions of sucrose or gelatinized maize starch in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) on the nutrition of dietary energy and protein." *Aquaculture*, 20 : 333-342.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R. y CLAUS, T.H. (1988). "Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." *Ann.Rev.Biochem.* 57 : 755-783.
- PLISETKAYA, E.M. (1980) "Fatty acid levels in blood of cyclostomas and fish." *Envrion.Biol.Fish.* 5 : 273-290.
- PLISETKAYA, E.M.; BHATTACHARYA, S.; DICKOFF, W.N. y GORBMAN, A. (1984) "The effects of insulin on amino acid metabolism and glycogen content in isolated liver cells of juvenile coho salmon." *Comp.Biochem.Physiol.* 78 A : 773-778.
- PLISETKAYA, E.M. y MARINA, T.I. (1969) "The effect of hormones on NEFA content in the blood of the Baltic lamprey (*Lampreta fluviatilis* L.)." *J.Evol.Biochem.Physiol.* 5 : 457.
- POCRNJIK, Z.; MATHEWS, R.W.; RAPPAPORT, S. y HASCHEMEYER, A.E.V. (1983) "Quantitative protein synthetic rates in various tissues of temperature fish in vivo by methods of phenylalanine swamping." *Comp.Biochem.Physiol.* 74 B : 735-738.
- POSTON, H.A. (1975) "Influence of dietary protein and energy on swimming stamina growth, and body composition of brown trout." *Prog.Fish.-Cult.* 37(4): 257-261.
- POSTON, H.A.; RIIS, R.C.; RUMSEY, G.L. y KETOLA, H.G. (1977) "The effect of supplemental dietary amino acids, minerals and vitamins on salmonids fed cataractogenic diets." *Cornell.Vet.* 67 : 472-509.
- PROSTKO, C.R. ; FRITZ, R.S. y KLETZIEN, R.C. (1989). "Nutritional regulation of hepatic glucose

- 6-phosphate dehydrogenase." *Biochem.J.* 258 : 295-299.
- RANDALL, R.F. y ANDERSON, P.J. (1975) "Purifications and properties of the pyruvatekinase of sturgeon muscle." *Biochem.J.* 145 : 569-573.
- RANDLE, P.J.; NEWSHOLME, E.A. y GARLAND, P.B. (1964) "Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate and of alloxan-diabetes and starvation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscle." *Biochem. J.* 93 : 652-665.
- REEDS, P.J. y LOBLEY, G.E. (1980) "Protein synthesis : are the real species differences." *Proc.Nutr.Soc.* 39 : 43-52.
- REFSTIE, T. y AUSTRENG, E. (1981) "Carbohydrates in rainbow trout diets. III. Growth and chemical composition of fish from different families fed four levels of carbohydrates in the diet." *Aquaculture*, 25 : 35-49.
- REINITZ, G. y HITZEL, F. (1980) "Formulation of practical diets for rainbow trout based on desired performance and body composition." *Aquaculture*, 19 : 243-252.
- REMESY, C.; DEMIGNE, C. y AUTRERE, J. (1978) "Inter organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rat fed high-carbohydrate or high-protein diets." *Biochem. J.* 170 : 321-329.
- REMESY, C.; FAFOURNOUX, P. y DEMIGNE, C. (1983) "Control of hepatic utilization of serine, glycine and threonine in fed and starve rats." *J.Nutr.* 113 : 28-39.
- RENARD, J.M. y MOON, T.W. (1980). "Starvation and the metabolism of hepatocytes isolated from american eel *Anguilla rostrata* Le Seur." *J.Comp.Physiol.* 135 : 127-137.
- RENNIE, M.J. y HOLLOSZY, J.O. (1977) "Inhibition of

- glucose uptake and glycogenolysis by availability of oleate in well oxygenated perfused skeletal muscle." *Biochem.J.* 185 : 451-454.
- RICHARDS, C.S. y UYEDA, K. (1980) "Changes in the concentration of activation factor of phosphofructokinase in hepatocytes in response to glucose and glucagon." *Biochem.Biophys.Res.Common.* 97 : 1535-1540.
- RINGROSE, R.C. (1971) "Calorie-to-protein ratio for brook trout (*Salvelinus fontinalis*)." *J.Fish.Res.Bd.Can.* 28 : 1113-1117.
- ROBERTS, B. y ANDERSON, P.J. (1985) "The purification and kinetic characterization of eel cohoite muscle pyruvate kinase." *Comp.Biochem.Physiol.* 80 B n. 1 : 51-56.
- ROBINSON, E.H.; WILSON, R.P. y POE, W.E. (1980) "Total aromatic amino acid requirement, phenylalanine requirement and tyrosine replacement value for fingerling channel catfish." *J.Nutr.* 110 : 1805-1812
- ROBINSON, E.H.; WILSON, R.P. y POE, W.E. (1981) "Arginine requirement and apparent absence of a lysine-arginine antagonist in fingerling channel catfish." *J.Nutr.* 111 : 46-52.
- ROBINSON, J.S. y MEAD, J.F. (1973) "Lipid adsertion and deposition in rainbow trout." *Can.J.Biochem.* 51 : 1050-1058.
- ROGERS, Q.R. (1976) "Amino acid imbalances in protein metabolism and nutrition." Ed. Cole, D.J.A. 279-301 Butterworths, London.
- ROGERS, Q.R. y MORRIS, J.G. (1980) "Why does the cat requere a high protein diet?," *Nutrition of the Dog and Cat.* 45-46 (Ed. Anderson ) Pergamon Press Oxford
- ROGERS, Q.R.; MORRIS, J.G. y FREEDLAND, R.A. (1977) "Lack

of hepatic enzymes adaptation to low and high levels of dietary protein in the adult cat." *Enzymes*, 22 : 348-356.

ROSEN, F.; ROBERTS, N.R. y NICHOL, C.A. (1959) "Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamic-pyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis." *J.Biol.Chem.* 234 : 476-480.

ROSS, B.D.; HEMS, R. y KREBS, H.A. (1967) "The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver." *Biochem.J.* 102 : 942-951.

ROWSELL, E.V.; CARNIE, J.A.; WAHBI, S.D. y AL-TAI, A.H. (1979) "L-serine dehydratase and L-serine pyruvate aminotransferase activities in different animal species." *Comp.Biochem.Physiol.* 63 B : 543-555.

RUMSEY, G.L. (1981) "Why does the salmonid require a high protein diet?." *Salmonid*, 5 : 20-24.

RUMSEY, G.L.; PAGE, J.W. y SCOTT, M.L. (1983) "Methionine and cystine requirements of rainbow trout." *Prog.Fish.-Cult.* 45 : 139-143.

SAKAGUCHI, M. y KAWAI, A. (1970) "Histidine metabolism in fish. V. The effect of dietary deficiency and fasting on the activity of histidine deaminase and urocariase in carp liver." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 36 : 783-787.

SALTIE, A.R. y CUATRECASAS, P. (1986) "Insulin stimulated the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid." *Proc.Natl.Acad.Sci.*

SALTIE, A.R.; FOX, J.A.; SHEIINE, P. y CUATRECASAS, P. (1986) "Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generated modulators of cAMP phosphodiesterase." *Science (Wash)* 233 : 267-272.

- SALVATORE, F.; ZAPPIA, V. y COSTA, C. (1965) "Comparative biochemistry deamination of L-amino acids in elasmobranch and teleost fish." *Comp.Biochem.Physiol.* 16 : 303-310.
- SAND, O. (1981 a) "Kinetic properties of phosphofructokinase from the flounder (*Platichthys flesus* L.)." *Comp.Biochem.Physiol.* 69 B n. 3 : 435-443.
- SAND, O. (1981 b). "Purification and properties of phosphofructokinase from liver of the flounder (*Platichthys flesus* L.)." *Comp.Biochem.Physiol.* 68 B : 77-81.
- SAND, O. (1984) "Purification and properties of pyruvate kinase from liver of the flounder (*Platichthys flesus* L.)." *Comp.Biochem.Physiol.* 79 B : 473-479.
- SAND, O. (1986) "Kinetic properties of liver pyruvate kinase from the flounder (*Platichthys flesus* L.)." *Comp.Biochem.Physiol.* 84 B n. 1 : 91-96.
- SAND, O. (1988). "The effects of fructose 1.6-diphosphate on pyruvate kinase from the liver of the flounder *Platichthys flesus* L." *Comp.Biochem.Physiol.* 90 B : 401-407.
- SAVINA, M.V. y WOJTCAR, A.B. (1977). "Enzymes of gluconeogenesis and the synthesis of glycogen from glycerol in various organs of lamprey *Lamprreta fluviatilis*." *Comp.Biochem.Physiol.* 57 B : 185-190.
- SAXENA, S.C. y ZANDEE, D.I. (1971) "Biosynthesis of lipids and fatty acids in skin and body of a fresh water carp *Scardinius erythrophthalmus* after injection of sodium (1-C<sup>14</sup>)-acetate." *Arch.Int.Physiol.Biochem.* 79 : 499-510.
- SCHMIDT, E. (1974) "Glutamate dehydrogenase uv. assay." *Methods of enzymatic analysis* Vol. 2 (Bergmeyer ed.) 650-656 Academic Press New York.

- SEGAL, H.L. (1973) "Enzymatic interconversions of active and inactive forms of enzymes." *Science*. 180 : 25-32.
- SELLNER, P.A. y HAZEL, J.R. (1982) "Time course of changes in fatty acid composition of gills and liver for rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.) during thermal acclimation." *Exp.Zool.* 221 (2) : 159-168.
- SESHADRI, B. (1959) "Effect of insulin injection on the amino nitrogen content of free and protein bound amino acids in the skeletal muscle of the murrelet *Ophiocephalus striatus*." *Curr.Sci.(India)* 28 : 121-122.
- SHANKS, W.E.; GAHMER, G.D. y HALVER, J.E. (1969) "The indispensable amino acid for rainbow trout." *Prog.Fish.-Cult.* 24 : 68-73.
- SHATTON, J.B.; HALVER, J.E. y WEINHOUSE, S. (1971) "Glucose-6 P-dehydrogenase in rainbow trout liver." *J.Biol.Chem.* 246 : 4878-4885.
- SHERIDAN, M.A. y BERN, H.A. (1986) "Both somatostatin and the caudal neuropeptide, urotensin. II. Stimulate lipid mobilization from coho salmo liver incubated "in vitro." *Requer.Pept.* 14 : 333.
- SHIBATA, T. (1977) "Enzymological studies on the glycolytic system in the muscles of aquatic animals." *Hokkaido University. Japan* 24 : 1-80.
- SHIBATA, N.; KINUMAKI, T. y ICHIMURA, H. (1974) "Triglyceride, cholesterol, free fatty acid, glucose and protein contents in plasma of culture rainbow trout." *Bull.Tokai Reg.Fish.Res.Lab.* 77 : 77-87.
- SHIMENO, S. (1974) "Studies on carbohydrate metabolism in fishes." *Rep.Fish.Lab.Kochi.Univ.* 2 : 1-103.

- SHIMENO, S. (1982) "Studies on carbohydrate metabolism in fish." V.S. Kothekar p. : 123.
- SHIMENO, S.; HOSOKAWA, H.; TAKEDA, M.; TAKAYAMA, S.; FUKUI, A. y SASAKI, H. (1981) "Adaptation of hepatic enzymes to dietary lipid in young yellow tail." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 47 : 63-69.
- SHIMENO, S.; HOSOKAWA, H. y TAKEDA, M. (1979) "The importance of carbohydrate in the diet of a carnivorous fish." Proc. World Symp. Finfish Nutrition Fishfeed Technology Hamburg 20-23 June 1978. Vol. I Berlin 1979 Ed. Halver J.E. y Tiews K.
- SHIMENO, S. y TAKEDA, M. (1972) "Studies on hexose monophosphate shunt of fish. I. Properties of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase of barracuda." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 38 : 645-650.
- SHIMENO, S. y TAKEDA, M. (1973) "Studies on hexose monophosphate shunt of fishes. II. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 39 : 461-466.
- SINGH, R.P. y NOSE, T. (1967) "Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout." Bull.Freshwat.Fish.Res.Lab. Tokio 17 : 21-25.
- SMITH, M.A.K. (1981) "Estimation of growth potential by measurement of tissue protein synthetic rates in feeding and fasting rainbow trout *Salmo gairdneri* R." J.Fish.Biol. 19 : 213-220.
- SMITH, M.A.K. y HASCHEMEYER, A.E.V. (1974) "Studies on protein metabolism and growth in fish." Biol.Bull. 147 : 500-508.
- SMITH, M.A.K. y HASCHEMEYER, A.E.V. (1980) "Protein metabolism and cold adaptation in Antarctic fishes." Physiol.Zool. 53 : 373-382.
- SMITH, R.R. (1971) "A method for measuring digestibility and metabolizable energy of fish feeds." Prog.Fish.

Cult. 33 : 132-134.

SNELL, K. (1980) "Muscle alanine synthesis and hepatic gluconeogenesis." *Biochem.Joc.Trans.* 8 : 205-213.

SOMERO, G.N. y DOYLE, F. (1973) "Temperature and rates of protein degradation in the fish *Gillichthys mirabilis*." *Comp.Biochem.Physiol.* 46 B : 463-474.

SOMERO, G.N. y HOCHACHKA, P.W. (1968) "The effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinases of the rainbow trout and the antarctic fish *Trematomus bernacchii*." *Biochem.J.* 110 : 395-400.

SPANNOF, L. y PLANTIKOW, L. (1983) "Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout." *Aquaculture*, 30 : 95-108.

SPIES, J.R. (1957) "Colorimetric procedures for amino acid. II. Ninhydrin method." *Methods in enzymology*. Vol. III (Colowick S.P.S. y Kaplan N.O. ed.) 468-471 Academic Press, New York.

STICKNEY, R.R. y ANDREWS, J.W. (1972) "Effects of dietary lipids on growth feed conversion, lipids and fatty acids composition of channel catfish." *J.Nutr.* 102 : 249-258.

STIEBER, S.T. y CVANCARA, V.A. (1977) "Tissue deamination of L-amino acids in the teleost *Stizostedion vitreum*." *Comp.Biochem.Physiol.* 56 B : 285-287.

STORER, J.H. (1967) "Starvation and the effects of cortisol in the goldfish *Carassius auratus*." *Comp.Biochem.Physiol.* 20 : 939-948.

SUAREZ, R.K. y HOCHACHKA, P.W. (1981). "The pyruvate branch point in fish liver mitochondria: effects of acylcarnitine oxidation on pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase activities" *J.Comp.Physiol.* 143 : 275-279.

- SUAREZ, R.K. y MOMMSEN, T.P. (1988). "Gluconeogenesis in teleost fishes." *Can.J.Zool.* 65 : 1869-1882.
- TACON, A.G.J. y COWEY, C.B. (1985) "Protein and amino acid requirements." *Fish Energetic, New Perspectives.* (Ed. Tytler P. y Callow P.) 155-183 Croom Helm, Sydney.
- TAKEDA, M.; SHIMENO, S.; HOSOKAWA, H.; KAJIYAMA, H. y KAISYO, T. (1975) "The effect of dietary calorie-to-protein ratio on the growth, feed conversion and body composition of young yellow tail." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 41 : 43-47.
- TAKETA, K. y POGELL, B.M. (1965) "Allosteric inhibition of rat liver fructose-1.6-diphosphatase by adenosine 5,-monophosphate." *J.Biol.Chem.* 240 : 651-661.
- TAKEUCHI, T; ARAI, S.; WATANABE, T. y SHIMMA, Y. (1980) "Requirement of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids." *Bull.Jap.Sci.Soc.Fish.* 46 : 345-353.
- TAKEUCHI, T. y WATANABE, T. (1977 a) "Requirement of carp for essential fatty acids." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 43 : 541-551.
- TAKEUCHI, T. y WATANABE, T. (1977 b) "Dietary levels of methyl laureate and essential fatty acids requirement of rainbow trout." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 43 : 893-898.
- TAKEUCHI, T. y WATANABE, T. (1979) "Effect of excess amounts of essential fatty acids on growth of rainbow trout." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 45 : 1517-1519.
- TAKEUCHI, T. y WATANABE, T. (1982 a) "Studies on nutritive value of dietary lipids in fish. XXIV. The effect of starvation and enviromental temperature on proximate and fatty acid composition of carp and rainbow trout." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 4, 48 : 1306-1307.

- TAKEUCHI, T. y WATANABE, T. (1982 b). "Effect of various polyunsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of rainbow trout *Salmo gairdneri*, coho salmon *Onchorynchus kisutch*, chum salmo *Onchorynchus keta*." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 48 : 1745-1752.
- TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. y NOSE, T. (1978 a)"Requirement for essential fatty acids of chum salmo (*Onchorynchus keta*) in freshwater environment." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 45 : 1319-1323.
- TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. y OGINO, C. (1978 b) "Optimus ratio of protein to lipid in diets of rainbow trout." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 44 : 683-688.
- TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. y OGINO, C. (1978 c) "Supplementary effect of lipids in a high protein diet of rainbow trout." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 44 : 677-681.
- TAKEUCHI, T.; YOKOYAMA, M.; WATANABE, T. y OGINO, C. (1978 c) "Optimun ratio of dietary energy to protein for rainbow trout." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 44 (7) : 729-732.
- TASHIMA, L.S. y CAHILL, G.F. (1968) "Effects of insulin in the toadfish *Opsanus tau*." Gen.Comp.Endocrinol. 11 : 262-271.
- TEJWANI, G.A. (1983) "Regulation of fructose-bisphosphatase activity." Adv.Enzymol. 54 : 121-193.
- TEPPERMAN, H.M. y TEPPERMAN, J. (1958). "The hexosemonphosphate shunt and adaptive hyperlipogenesis." Diabetes, 7 : 478-485.
- TEPPERMAN, H.M. y TEPPERMAN, J. (1965). "Effect of saturated fat diets on rat liver NADP-linked enzymes." Am.J.Physiol. 209 : 773-779.
- THEBAULT, H. (1985) "Plasma essential amino acid changes

- in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after feeding deficient and supplemented in L-methionine." *Comp.Biochem.Physiol.* 82 A : 233-237.
- THORPE, A. e INCE, B.W. (1974) "The effects of pancreatic hormone, catecholamines and glucose loading on blood metabolites in northern pike." *Gen.Comp.Endocrinol.* 23 : 29-44.
- TIEW, K.; GROPP, J. y KOOPS, H. (1976) "On the development of optimal rainbow trout pellet feeds." *Arch.Fish Wiss.* 27 : 1-29.
- TONDEUR, F. y SARGENT, J.R. (1979) "Biosynthesis of macromolecules in chloride cells in the gills of the common eel *Anguilla anguilla* adapting to sea water." *Comp.Biochem.Physiol.* 62 B : 13-16.
- TRUSCOTT, B. (1979) "Steroid metabolism in fish. Identification of steroid moieties of hydrolyzable conjugates of cortisol in the bile of trout *Salmo gairdneri*." *Gen.Comp.Endocrinol.* 38 : 196-206.
- TSUKAHARA, H.; FURUKAWA, A. y FUNAE, K. (1967) "Studies in feed for fish. VIII. The effects of dietary fat on the growth of yellow tail (*Seriola quinqueradiata* Temminak et Schegel)." *Bull.Naikai reg.Fish.Res.Lab.* 24 : 29-50.
- UMMINGER, B.L.; BENZIGER, D. y LEVY, S. (1975) "In vitro stimulation of hepatic glycogen phosphorylase activity by epinephrine and glucogen in the Killifish *Fundulus heteroclitus*." *Comp.Biochem.Physiol.* 51 : 111-116.
- VAN WAARDEN, A. (1981) "Nitrogen metabolism in goldfish *Carassius auratus* L. Activities of transamination reactions, purine nucleotide cycle and glutamate dehydrogenase in goldfish tissues." *Comp.Biochem. Physiol.* 68 B : 407-413.
- VAN WAARDEN, A. (1983) "Aerobic and anaerobic ammonia

- production by fish." *Comp.Biochem.Physiol.* 74 B : 675-684.
- VELLAS, F. y PARENT, J.P. (1983) "Le catabolisme des acides amines chez les poissons." *Ichthyophysiol.Acta* 7 : 76-88.
- VENKATACHARI, S. (1974) "Effect of salinity adaptation on nitrogen metabolism in the freshwater fish *Tillapia mossambica*. I. Tissue protein and amino acid levels." *Mar.Biol.* 24 : 57-63.
- VLAMING de, J.P. y PARDO, M (1975) "In vitro" effects of insulin on liver lipid and carbohydrate metabolism in the teleost *Notemigonus crysoleucas*." *Comp.Biochem.Physiol.* Vol. 51 B : 489-497.
- VIOLA, S. y RAPPORT, V. (1979) "The extra-caloric effect of oil in the nutrition of carp." *Bamdgeh* 31 : 51-68.
- VOSS, B. y JANKOWSKY, H.D. (1986) "Temperature dependence of lipogenic in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." *Comp.Biochem.Physiol.* 83 B : 13-22.
- WAKIL, S.J.; STOOPS, J.K. y JOSHI, V.C. (1983). "Fatty acid synthesis and its regulation." *Ann.Rev.Biochem.* 52 : 537-579.
- WALTON, M.J. (1985) "Aspects of amino acid metabolism in teleost fish." En : "Feeding and Nutrition of Fish." (Ed. Cowey; Bell; McKie.) Academic Press London. 46-47.
- WALTON, M.J. (1986) "Metabolic effects of feeding a high protein/low carbohydrate diet as compared to a low protein/high carbohydrate diet to rainbow trout *Salmo gairdneri*." *Fish.Physiol.Biochem.* 1 : 7-15.
- WALTON, M.J. (1987) "Nutrición en acuicultura." Vol. I. (Ed. J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta.)

225-272 Caycit.

- WALTON, M.J.; COLOSO, R.M.; COWEY, C.B.; ADRON, J.W. y KNOX, D. (1984 b) "The effects of tryptophan levels on growth and metabolism of rainbow trout." Br.J.Nutr. 51 : 279-287.
- WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1977) "Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout." Comp.Biochem.Physiol. 57 B : 143-149.
- WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1979 a) "Gluconeogenesis by isolated hepatocytes from rainbow trout *Salmo gairdneri*." Comp.Biochem.Physiol. 62 B : 75-79.
- WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1979 b) "Gluconeogenesis from serine in rainbow trout *Salmo gairdneri* liver." Comp.Biochem.Physiol. 62 B : 497-499.
- WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1979 c) "Distribution and some kinetic properties of serine catabolizing enzymes in rainbow trout *Salmo gairdneri* R." Comp.Biochem.Physiol. 68 B : 147-150.
- WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1982) "Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish." Comp.Biochem.Physiol. 73 B : 59-79.
- WALTON, M.J.; COWEY, C.B. y ADRON, J.W. (1982) "Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and lysine content." J.Nutr. 112 : 1525-1535.
- WALTON, M.J.; COWEY, C.B. y ADRON, J.W. (1984 a) "The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout *Salmo gairdneri*." Br.J. Nutr. 52 : 115-122.
- WALTON, M.J.; COWEY, C.B. y ADRON, J.W. (1984 c) "Cap amino acid metabolism in teleost fish." In : "Nutrition and Feeding in fish." Ed. Cowey, C.B.; Mckie, A.M.; Bell, J.G.) 1985 pag. 47-68.

- WARMAN, A.W. y BOTTINO, N.R. (1978) "Lipogenic activity of catfish liver." *Comp.Biochem.Physiol.* 59 B : 153-161.
- WATANABE, T. (1987) "Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces." En : *Nutrición y alimentación en acuicultura*. Ed. : Espinosa, J.; Labarda, U. CAYCIT Vol. II pag. 99-149.
- WATANABE, T.; KOBAYASHI, I.; UTSUE, O. y OGINO, C. (1974 a) "Effect of dietary methyl linolenate on fatty acid composition of lipids in rainbow trout." *Bull. Jap.Soc.Sci.Fish.* 40 : 387-394.
- WATANABE, T.; OGINO, C.; KOSHIISHI, Y. y MATSUNAGA, T. (1974 b) "Requirement of rainbow trout for essential fatty acids." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 40 : 493-499.
- WATANABE, T.; TAKASHIMA, F. y OGINO, C. (1974 c) "Effect of dietary methyl linoleate on growth of rainbow trout." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 40 : 181-188.
- WATANABE, T.; TAKEUCHI, T. y OGINO, C. (1975 b) "Effect of methyl linoleate and linolenate on growth of carp II." *Bull.Jap.Soc.Sci.Fish.* 41 : 263-269.
- WATANABE, T.; TAKEUCHI, T. y OGINO, C. (1979) "Studies on the sparing effect of lipids on dietary protein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." En : *Finfish nutrition and Fishfeed Technology*. (Ed. Halver & Tiews Vol. I : 113-125) Heeneman, Berlin.
- WATANABE, T.; UTSUE, O.; KOYBAYASHI, I. y OGINO, C. (1975 a) "Effect of dietary methyl linoleate and linolenate on growth of carp I." *Bull.Jap.Soc.Sci. Fish.* 41 : 257-262.
- WATFORFD, M; HOD, Y; CHIAO, Y.B.; UTTER, M.F. y HANSON, R.W. (1981). "the unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. The significance of a cytosole from phosphoenolpyruvate carboxykinase" 256 : 10023-10027.

- WEATHERLEY, A.H. y GRILLS, H.S. (1981) "Recovery growth following periods of restricted rations and starvation in rainbow trout *Salmo gairdneri* Rich." J.Fish.Biol. 18 : 195-208.
- WEATHERLEY, A.H. y GRILLS, H.S. (1985) "Dynamic of increase in muscle fibers in fishes in relation to size and growth." *Experientia*, 41 : 353-354.
- WHITING, S.J. y WIGGS, A.J. (1978). "Effect of sexual maturation and of oeshadiol on liver glycogen and tyrosine aminotransferase activity in brook trout." *Comp.Biochem.Physiol.* 46 B : 625-634.
- WILLIAMSON, D.H. (1981) "Mechanism for the regulation of ketogenesis." *Biochem.Soc.Trans.* 9 : 346-347.
- WILLIANSON, J.R.; CHEUNG, W.Y.; COLES, H.S. y HERCZEG, B.E. (1967) "Glycolitic control mechanism. IV. Kinetics of glycolitic intermediary changes during electrical discharge and recovery in the main organ of *Elechoforus electricus*." *J.Biol.Chem.* 242 : 5112-5118.
- WILSON, R.P. (1973) "Nitrogen metabolism in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. I. Tissue distribution of aspartate and alanine aminotransferase and glutamic dehydrogenase." *Comp.Biochem.Physiol.* 46 B : 617-624.
- WILSON, R.P.; HARDING, D.E. y GARLING, D.L. (1977) "Effect of dietary pH on amino acid utilization and lysine requirement of fingerling channel catfish." *J.Nutr.* 107 : 166-170.
- WINFREE, R.A. y STICKNEY, R.R. (1981) "Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion and body composition of *Tillapia aurea*." *J.Nutr.* 111 : 1001-1012.
- WITTEMBERGER, C. y GIURGEA, R. (1973) "Transaminase

- activities in muscle and liver of the carp." Rev.Roum.Biol.-Zoologie, 18 : 414-441.
- WOO, N.Y.S. y FUNG, A.C.Y. (1981) "Studies on biology of red sea bream. IV. Metabolic effects of starvation at low temperature." Comp.Biochem.Physiol. 69 A : 461-468.
- WRIGHT, P.A.; PERRY, S.F. y MOON, T.W. (1989). "Regulation of hepatic gluconeogenesis and glucogenolysis by catecholamines in rainbow trout during enviromental hypoxia" J.Exp.Biol. 147 : 169-188.
- YAMADA, K.; KOBAYASHI, K. y YONE, Y. (1980) "Conversion of linolenic acid to  $\omega$  3-highly unsaturated fatty acids in marine fishes and rainbow trout." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 46 : 1231-1233.
- YAMADA, K.; TANAKA, Y. y KATAYAMA, T. (1981) "Feeding experiments with carp by fed amino acid diet by increasing the number of feedings for day." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 47 : 1247-1252.
- YAMAUCHI, T.; STEGEMAN, J.J. y GOLDBERG, D.M. (1975) "The effects of starvation and temperature acclimatation on pentose phosphate pathway dehydrogenases in brook trout liver." Arch.Biochem.Biophys. 167 : 13-20.
- YANNI, H.M. (1964) "Effects of insulin and excess glucose on the carbohydrates, water and fat contents of the tissues of *Clarias lazera*." Z.Vergl.Physiol. 48 : 264-631.
- YONE, Y. (1975 b) "Nutritional studies of red sea bream." Proc.First Int.Conf.Aquac.Nutrit.Newark. Delaware Univ. Delaware 39-64.
- YONE, Y. (1978) "Essential fatty acids and lipid requirements of marine fish." In : Dietary lipids in Aquaculture. (Ed. Jap.Soc.Sci.Fish.) 43-59 Koseisha-Koseikaku in Tokyo.

- YONE, Y. y FUJII, (1975 a) "Studies on nutrition of red sea bream. XI. Effect of  $\omega$ -3 fatty acid supplement in a corn oil in diet on growth rate fed efficiency." Bull.Jap.Soc.Sci.Fish. 41 : 73-77.
- YU, T.C. y SINNHUBER, R.O. (1979) "Effect of dietary  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids on growth and feed conversion efficiency of coho salmo *Oncorhynchus kisutch*." Aquaculture, 16 : 31-38.
- YU, T.C. y SINNHUBER, R.O. (1981) "Use of beef tallow as an energy source in coho salmo (*Oncorhynchus kisutch*) rations." Can.J.Fish. Aquat.Sci. 38 (3) : 367-370.
- YU, T.C.; SINNHUBER, R.O. y PURNAM, G.B. (1977) "Effect of dietary lipids on fatty acid composition of body lipid in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Lipids 12: 495-499.
- ZAKIN, D.; PARDINI, R.S.; HERMANN, R.K. y SANBERLICH, M.E. (1967). "Mechanism for the differential effects of high carbohydrate diets on lipogenesis in rat liver." Biochem.Biophys.Acta. 144 : 242-251.
- ZAMMIT, V.A.; BEIS A; NEWSHOLMES E.A. (1979) "The role of 3-oxo acid-CoA transferase in the regulation of Ketogenesis in the liver " FEBS lett 103:212-215.
- ZAMMIT, V.A. y NEWSHOLME, E.A. (1979) "Activities of fat and ketone-body metabolism and effect of starvation on blood concentration glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish." Biochem.J. 194 : 313-322.
- ZAMORA, S. y ECHEVARRIA, G. (1987) "Los hidratos de carbono en la nutrición de los peces." En : Nutrición y alimentación en acuicultura. Ed. : Espinosa, J.; Labarta, U. CAICYT Vol. II : 167-189.
- ZEBIAN, M.F. (1977). "Fraction  $\alpha$ -aminé libre et degradation oxydative de quelques acides amines chez

la carpe *Cyprinus carpio* . I. Importance des facteurs nutritionales." These Doct.Spec. Toulouse 89 p.

ZEBIAN, M.F. y CREACH Y. (1979) "Fraction  $\alpha$ -amine libre et degradation oxidative de quelques acides amines chez la carpe. Importance des facteurs nutritionnels" En: "Finfish nutrition and fishfeed technology" Eds:Halver y Teiws. Vol II: 531-544.

ZEITOUN, I.H.; HYALVER, J.E.; ULLREY, D.E.; TACK, P.I. (1973) "Influence of salinity on protein requirement of rainbow trout fingerlings" J.Fish.Res.Bd.Can. 30: 1867-1873.

ZEITOUN, I.H.; ULLREY, D.E.; TACK, D.I.; MAGGEE, W.T.(1974) "Influences of salinity on protein requirements of coho salmo (*Oncorhynchus Kisutch*) smolts" J.Fish.Board.Can. 31; 1145-1148.

ZIMMERMAN, H.J.; DUJOUNE, C.A. y LEVY, R. (1968) " The correlation of serum levels of two transaminases with tissue levels in six vertebrates species" Comp. Biochem.Phisiol. 25: 1081-1089.

ZNIKL, J.G.; BUSH R.M.; CORNELIUS, C.E. y FREEDLAND R.A.(1971) "Comparative studies on plasma tissue sorbitol, glutamic, lactic and hydroxybutiric dehydrogenase and transaminase activities in the dog." Res.Vet.Sci. 12: 211-214.

**DILIGENCIA:**

Reunido el Tribunal examinador en el día de  
la fecha, constituido por:

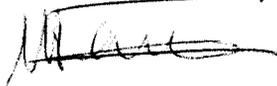
- D. Gregorio Varela Mosquera
- D. Manuel Carrillo Estevez
- D. Paloma Montelano de la Destina
- D. Bernabé Soler Pau
- D. Laura García Rojas

Para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don  
M<sup>te</sup> José Sanchez-Munoz Jorcano  
se acordó por Unanimitad otorgar la califica-  
ción de Apto Cum Laude  
a que conste, se extiende firmada por los  
ponentes del Tribunal, la presente diligen-  
cia.

Granada, a 10 de Octubre de 1990

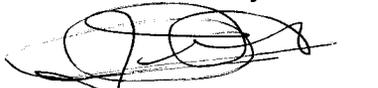
El Secretario,

El Presidente,



Laura García

El Vocal,



BERNABÉ SOLER

El Vocal,

Paloma Montelano  
PALOMA MONTELANO

El Vocal



MANUEL CARRILLO

FE DE ERRATAS:

- pag. 88: donde pone NADH debe poner NADPH
- pag. 101 y 184: la concentración de aminoácidos plasmáticos esta calculada en mg/ml y no mM como se indica en el texto
- pag. 184: el número correspondiente a la tabla incluida en esta pagina es el 4.5 y no el 4.1 con el que aparece numerada