

Prov. 7. 14/19

T
14
95

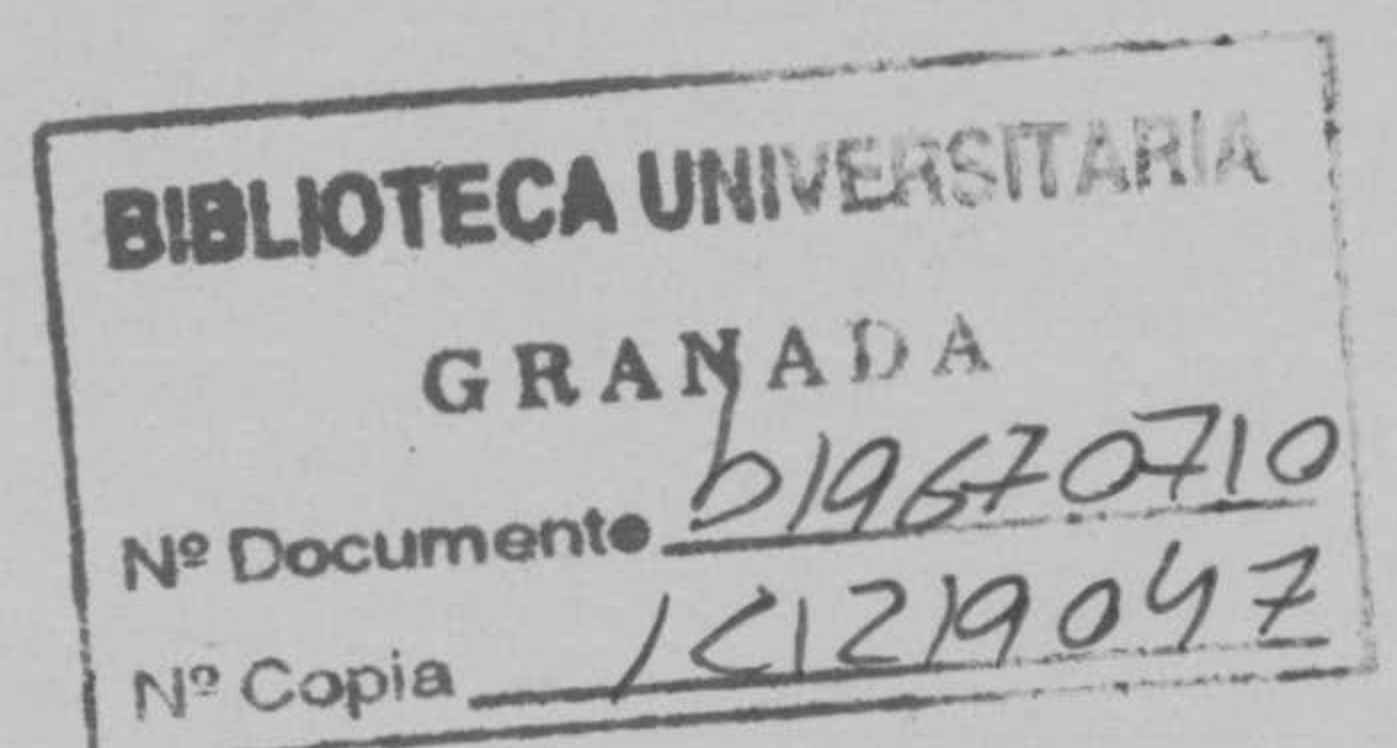
**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE GRANADA**



TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIAS NUTRICIONALES Y DEL PESO CORPORAL
SOBRE LAS VELOCIDADES FRACCIONARIAS DE SINTESIS Y
DEGRADACION PROTEICAS Y SU RELACION CON LAS
VELOCIDADES DE CRECIMIENTO EN EL HIGADO Y
MUSCULO BLANCO DE LA TRUCHA ARCO IRIS
(*Oncorhynchus mykiss*).**

JUAN PERAGON SANCHEZ



**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

**INFLUENCIAS NUTRICIONALES Y DEL PESO CORPORAL
SOBRE LAS VELOCIDADES FRACCIONARIAS DE SINTESIS Y
DEGRADACION PROTEICAS Y SU RELACION CON
LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO EN
EL HIGADO Y MUSCULO BLANCO
DE LA TRUCHA ARCO IRIS
(*Oncorhynchus mykiss*).**

JUAN PERAGON SANCHEZ

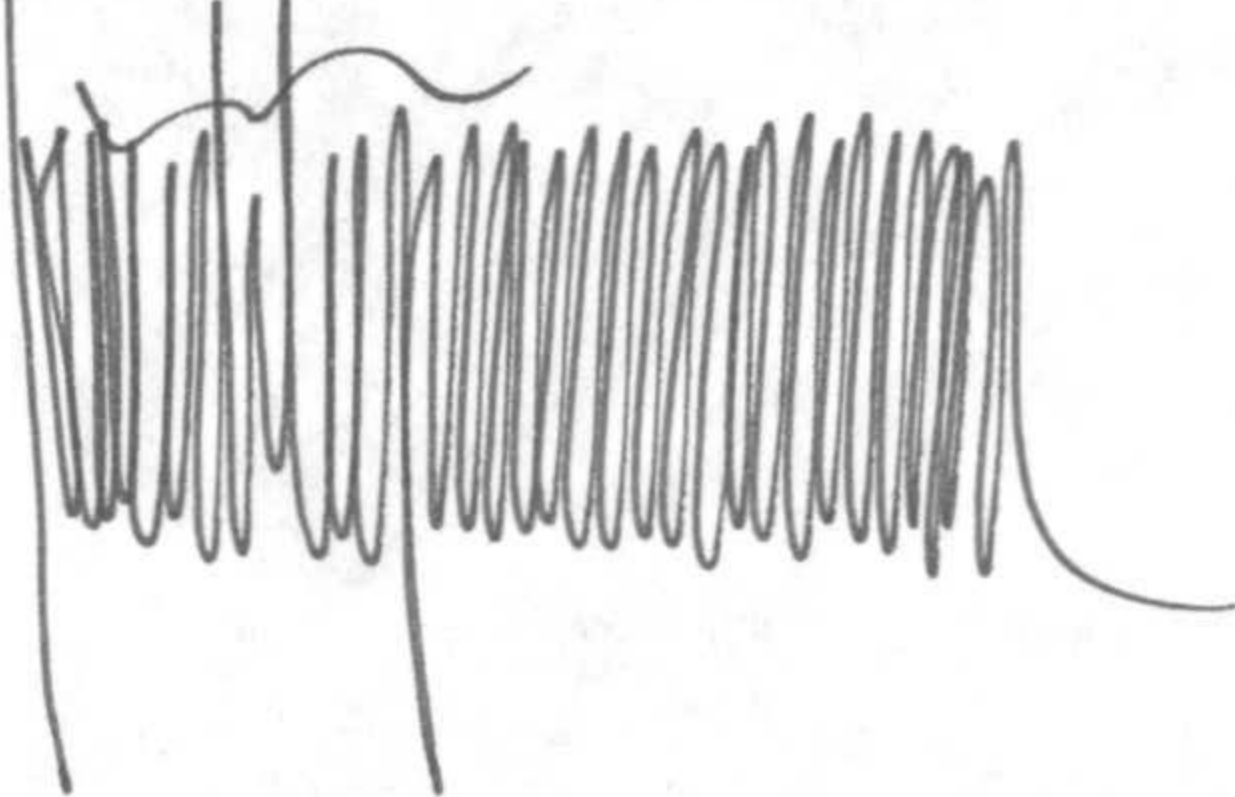
Granada, 28 de mayo de 1993

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE GRANADA

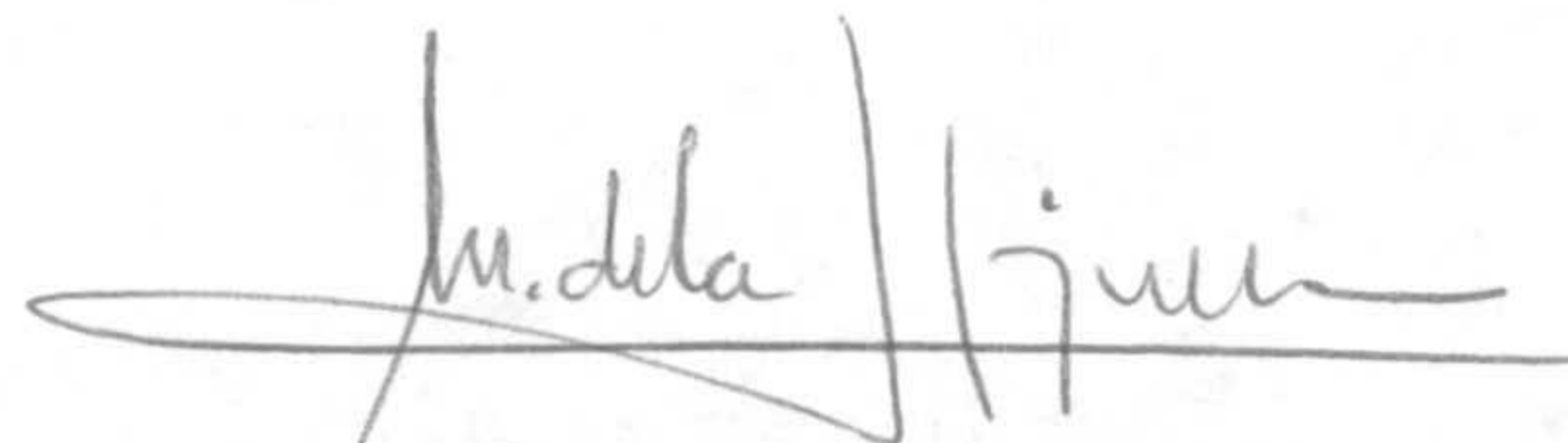
Tesis presentada para optar al
Grado de Doctor en Ciencias
por el Ldo. Juan Peragón Sánchez.



Directores:



Dr. José Antonio Lupiáñez Cara
Catedrático de Bioquímica
y Biología Molecular.



Dr. Manuel de la Higuera González
Catedrático de Fisiología Animal.

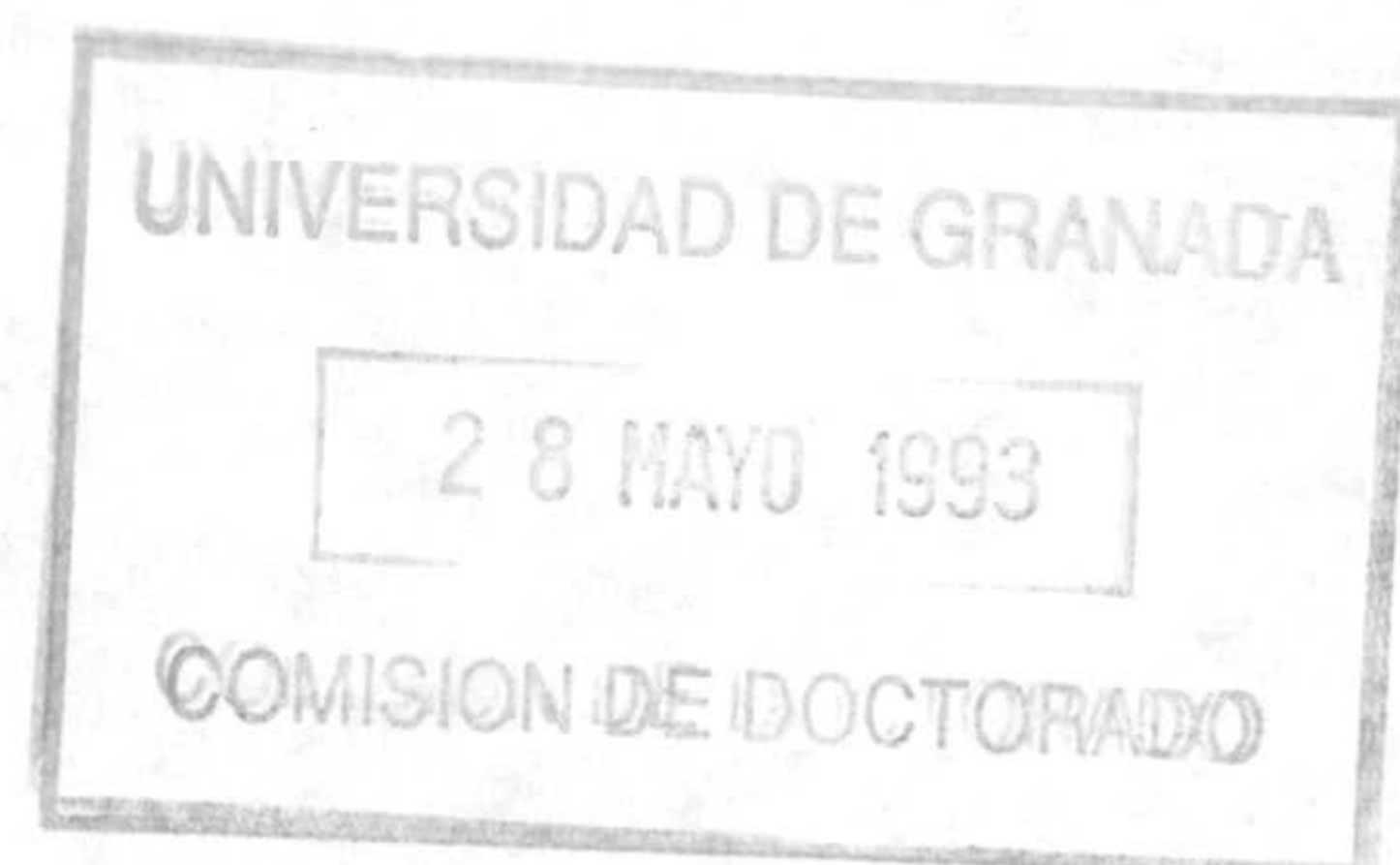
UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 2 IIII 1992
ENTRADA NUM. 721

UNIVERSIDAD DE GRANADA
[28 IV 1992]
COMISION

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente memoria "Influencias nutricionales y del peso corporal sobre las velocidades fraccionarias de síntesis y degradación proteica y su relación con las velocidades de crecimiento en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris" han sido realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Dr. D. José Antonio Lupiáñez Cara, en colaboración con el Departamento de Biología Animal siendo co-director el Dr. D. Manuel de la Higuera González. El presente trabajo se ha financiado por el Proyecto de Investigación nº MAR-89-0412 de la CICYT.

Algunos de los resultados recogidos en esta Memoria han sido presentados en los siguientes congresos: IV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, IV Portuguese-Spanish Biochemistry Congress, Reunión de la Sociedad Española de Nutrición en Murcia, Abril 1992, V International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, VII Panamerican Association of Biochemical Societies (PAABS) Congress, XVIII Congreso Nacional de Bioquímica, SEB 93.

Algunos de los resultados recogidos en esta Memoria han sido publicados en: Toxicological and Environmental Chemistry, Fish Nutrition in Practice Proceedings, Aquaculture.



OBJETIVOS

I. INTRODUCCION TEORICA

I.1. CRECIMIENTO Y TURNOVER PROTEICO	4
I.1.1. Influencias del estado del desarrollo y tamaño corporal sobre la capacidad de crecimiento y turnover proteico en mamíferos.	5
I.1.1.1. Crecimiento normal.	5
I.1.1.2. Crecimiento Acelerado	11
I.1.1.3. Control hormonal del crecimiento y desarrollo celular. ...	17
I.1.2. Influencias del estado del desarrollo y tamaño corporal sobre la capacidad de crecimiento y turnover proteico en peces.	19
I.1.2.1. Cambios en la síntesis de proteínas musculares bajo crecimiento normal y estimulado en los peces.	19
I.1.2.2. Cambios en la síntesis de proteínas a lo largo del desarrollo en peces.	21
I.2. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN MAMIFEROS.	25
I.2.1. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN EL ANIMAL COMPLETO.	25
I.2.2. INFLUENCIAS NUTRICIONALES SOBRE EL TURNOVER DE PROTEINAS EN EL HOMBRE.	28
I.2.2.1. Efecto de la ingesta dietaria.	28
I.2.2.1.1. Respuesta a una comida.	28
I.2.2.1.2. Respuesta a la dieta.	29
I.2.2.1.2.1. Frecuencia de alimentación.	29
I.2.2.1.2.2. Papel de la proteína y de la energía.	30
I.2.2.3. Efecto del Estado Nutricional.	34
I.2.3. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN EL MUSCULO BLANCO.	36
I.2.3.1. Efectos de una deficiencia moderada y severa de proteína y energía.	36
I.2.3.1.1. Alimentación y deficiencia total de proteína. ...	36
I.2.3.1.2. Deficiencia moderada de proteína y energía. ...	38
I.2.3.1.3. Cambios en la expulsión de 3-metilhistidina. ...	40
I.2.3.1.4. Cambios en las velocidades de síntesis de fracciones de proteínas musculares.	41
I.2.3.1.5. El efecto de la malnutrición sobre el contenido de DNA muscular y sobre la síntesis por unidad de DNA.	42
I.2.3.1.6. Efectos de la malnutrición sobre el contenido de	

	RNA y sobre la síntesis por unidad de RNA. . . .	44
	I.2.3.1.6.1. Cambios en la concentración de RNA.	44
	I.2.3.1.6.2. Cambios en la actividad del RNA (K_{RNA}).	46
	I.2.3.1.6.3. Mecanismos productores de los cambios en la concentración y actividad del RNA.	47
	I.2.3.1.6.4. Cambios en la actividad y niveles de factores específicos.	49
I.2.3.2.	Concentración de aminoácidos y turnover proteico en el músculo.	51
I.2.3.3.	La regulación de la degradación de proteínas musculares.	52
I.2.3.	REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER DE PROTEINAS HEPATICAS...	55
I.2.3.1.	Efectos agudos del cambio dietario.	55
I.2.3.2.	Efectos de la deficiencia prolongada sobre el turnover de proteínas sintetizadas en el hígado.	58
I.2.3.3.	Síntesis de proteínas hepáticas en relación al RNA.	65
	I.2.3.3.1. La cantidad de RNA hepático y su regulación.	65
	I.2.3.3.2. Medida de la actividad ribosómica en el hígado.	68
I.2.3.4.	Efectos selectivos sobre la síntesis de proteínas hepáticas plasmáticas y fijas.	69
	I.2.3.4.1. Cambios en las poblaciones de ribosomas libres y unidos a membranas.	69
	I.2.3.4.2. Cambios en la disponibilidad de mRNA para ciertas proteínas específicas.	70
I.2.3.5.	Efectos sobre la síntesis proteica por ribosomas hepáticos como un todo.	71
I.2.5.	REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN LOS PECES.	73
I.2.5.1.	METABOLISMO PROTEICO EN PECES.	73
	I.2.5.1.1. Introducción.	73
	I.2.5.1.2. Características fisiológicas y metabólicas.	74
	I.2.5.1.3. Regulación de la actividad SerDH de hígado de rata. . .	79
	I.2.5.1.4. Regulación de la actividad TyrAT de hígado de rata. . .	81
I.2.5.2.	VELOCIDADES DE TURNOVER PROTEICO EN EL ANIMAL COMPLETO Y EN LOS PRINCIPALES TEJIDOS DE PECES. ESTUDIOS INICIALES.	84
I.2.5.3.	REGULACION NUTRICIONAL DE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO Y TURNOVER DE PROTEINAS.	87

I.2.5.3.1. Velocidades de crecimiento y turnover de proteínas en el bacalao, pulpo y mejillón.	88
I.2.5.3.2. Crecimiento proteico y síntesis en los tejidos.	90
I.2.5.3.3.1. Movilización de reservas energéticas.	94
I.2.5.3.3.2. Cambios en las actividades enzimáticas.	97
I.2.5.3.3.3. Velocidades de crecimiento y turnover proteico en peces durante el ayuno.	97
I.2.5.3.3. Ayuno y Realimentación.	93
I.2.5.3.3.1. Movilización de reservas energéticas.	94
I.2.5.3.3.2. Cambios en las actividades enzimáticas.	97
I.2.5.3.4. Realimentación.	102
I.2.5.3.4.1. Respuesta metabólica postprandial y restauración de las reservas energéticas.	102
I.2.5.3.4.2. Velocidades de turnover proteico en diferentes tejidos de peces ayunados.	104
II. METODOS	
II.1. ANIMALES.	106
II.1.1. Selección y transporte.	106
II.1.2. Adaptación y desinfección.	107
II.1.3. Selección y clasificación inicial.	108
II.1.4. Indices de conversión del alimento y la proteína.	108
II.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	109
II.2.1. Experimento de Desarrollo.	109
II.2.2. Regulación Nutricional.	110
II.2.2.1. Formulación y elaboración de las dietas.	110
II.2.2.2. Diseño experimental.	112
II.3. CURVAS DE CRECIMIENTO.	112
II.4. VELOCIDADES DE TURNOVER PROTEICO.	114
II.4.1. Precipitación de las proteínas. Separación de las fracciones ácido soluble e insoluble.	115
II.4.2. Preparación de una solución de aminoácidos procedentes de las dos fracciones.	115
II.4.3. Aislamiento y determinación de la radioactividad específica de la fenilalanina libre y unida a las proteínas.	116
II.4.3.1. Transformación de la fenilalanina en β -feniletilamina. ..	116
II.4.3.2. Separación y extracción de la β -feniletilamina.	117
II.4.3.3. Determinación de la radioactividad de la β -feniletilamina.	117
II.4.3.4. Determinación de la concentración de β -feniletilamina total.	118

II.5. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE DNA Y RNA TISULAR.	119
II.5.1. Precipitación de Acidos Nucleicos y proteínas. Eliminación de sustancias contaminantes.	119
II.5.2. Separación y extracción de la fracción de RNA del DNA.	120
II.5.3. Determinación de la concentración de RNA.	122
II.5.4. Determinación de la concentración de DNA.	123
II.6. Ensayo de la actividad serina deshidratasa en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (<u>Oncorhynchus mykiss</u>).	125
II.6.1. Fundamento.	125
II.6.2. Preparación de los extractos.	125
II.6.3. Protocolo de ensayo.	125
II.6.4. Cálculos.	126
II.7. Ensayo de la actividad tirosina aminotransferasa en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris.	127
II.7.1. Fundamento.	127
II.7.2. Preparación de los extractos.	128
II.7.3. Protocolo de ensayo.	128
II.3.4. Cálculos.	128
II.8. Análisis estadístico de los resultados.	130
 III. RESULTADOS	
III.0. Validez del método.	131
III.1. Influencia del estado de desarrollo sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico en hígado y músculo blanco de trucha arco iris (<u>Oncorhynchus mykiss</u>).	134
1.1. Evolución de las velocidades de crecimiento en los diferentes estadios experimentales, su relación con el tiempo y el peso corporal.	134
1.2. Comportamiento alimenticio de la trucha arco iris a lo largo de diferentes estadios de desarrollo.	137
1.3. Naturaleza del crecimiento de los tejidos.	138
1.3.1. Relación entre el turnover proteico y el crecimiento celular en el hígado.	138
1.3.2. Síntesis proteica y su relación con los cambios en la concentración de ácidos nucleicos en el hígado de la trucha arco iris.	140
1.3.3. Turnover proteico y crecimiento celular en el músculo blanco.	142
1.3.4. Síntesis proteica y su relación con la concentración de ácidos nucleicos en el músculo blanco de la trucha arco iris.	143
III.2. Comportamiento cinético de la serina deshidratasa (SerDH) y tirosina aminotransferasa (TyrAT) de hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (<u>Oncorhynchus mykiss</u>) en diferentes estadios de desarrollo.	145

2.1. Actividad SerDH en hígado de trucha arco iris.	145
2.2. Actividad SerDH en el músculo blanco de la trucha arco iris.	146
2.3. Actividad TyrAT de hígado de trucha arco iris en diferentes etapas del desarrollo del animal.	146
2.4. Actividad TyrAT de músculo blanco de trucha arco iris en diferentes etapas del desarrollo del animal.	147
III.3. Regulación nutricional de las velocidades de crecimiento y turnover proteico.	
Efectos nutricionales.	148
2.1. Efecto del cambio en el aporte de proteínas dietarias sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico del hígado y músculo blanco en la trucha arco iris.	148
2.1.1. Disminución en el aporte de proteínas y recambio de proteínas tisular.	148
2.1.1.1. Comportamiento alimenticio y evolución de las velocidades de crecimiento animales alimentados con dietas de diferente contenido proteico.	150
2.1.1.2. Efectos de la administración de una dieta baja en proteínas sobre la naturaleza del crecimiento hepático y su relación con el turnover proteico.	152
2.1.1.3. Síntesis proteica y su relación con la concentración de ácidos nucleicos en el hígado de trucha arco iris alimentadas con diferentes concentraciones de proteínas.	152
2.1.1.4. Efectos de la administración de una dieta pobre en proteínas sobre la naturaleza del crecimiento del músculo blanco y su relación con el turnover proteico.	153
2.1.1.5. Síntesis proteica y su relación con la concentración de ácidos nucleicos en el músculo blanco de la trucha arco iris alimentadas con diferentes concentraciones de proteína.	154
2.1.1.6. Efectos de la disminución en el aporte de proteínas dietarias sobre el comportamiento cinético de la SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha.	154
2.1.2. Sustitución de proteínas por grasas y recambio proteico tisular.	154
2.1.2.1. Comportamiento alimenticio y evolución de la velocidad de crecimiento del animal completo, en animales alimentados con dietas en las que se sustituye un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas.	155
2.1.2.2. Turnover proteico y naturaleza del crecimiento hepático.	155
2.1.2.3. Influencia de la sustitución de un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas sobre la	

relación entre la síntesis proteica y el contenido de ácidos nucleicos en el hígado de trucha.	156
2.1.2.4. Turnover proteico y naturaleza del crecimiento muscular.	157
2.1.2.4. Síntesis proteica y su relación con el contenido de ácidos nucleicos.	158
2.1.2.5. Actividad SerDH y TyrAT de hígado y músculo blanco de trucha arco iris.	158
2.1.3. Sustitución de proteínas por carbohidratos.	158
2.1.3.1. Crecimiento y alimentación.	158
2.1.3.2. Naturaleza del crecimiento hepático y turnover proteico.	159
2.1.3.3. Turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.	160
2.1.3.4. Crecimiento muscular y turnover proteico.	160
2.1.3.5. Turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.	161
2.1.3.6. Actividad SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha arco iris alimentadas con las dietas B y D.	161
2.2. Efectos de la modificación del contenido dietario de grasa sobre el comportamiento de la velocidades de crecimiento y turnover proteico en diferentes tejidos de trucha arco iris.	162
2.2.1. Efectos de la disminución en un 10 % de la concentración de grasa en la dieta sobre la capacidad de crecimiento y turnover proteico.	162
2.2.1.1. Ingesta y crecimiento en el animal completo.	162
2.2.1.2. Naturaleza del crecimiento hepático y turnover proteico.	163
2.2.1.3. Concentración de ácidos nucleicos y turnover proteico.	163
2.2.1.4. Naturaleza del crecimiento muscular y recambio de proteínas.	164
2.2.1.5. Turnover proteico y relación con la concentración de ácidos nucleicos.	164
2.2.1.6. Actividades SerDH y TyrAT de hígado y músculo.	165
2.2.2. Sustitución de grasas por carbohidratos.	165
2.2.2.1. Comportamiento alimenticio y crecimiento en el animal completo.	165
2.2.2.2. Crecimiento hepático y turnover proteico.	166
2.2.2.3. Concentración de ácidos nucleicos y turnover proteico.	166
2.2.2.4. Crecimiento muscular y turnover proteico.	167
2.2.2.5. Actividades SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha arco iris (<i>O. mykiss</i>).	167
2.3. Efecto de la eliminación de los carbohidratos dietarios sobre las capacidades de crecimiento y turnover proteico en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris.	168

2.3.1.	Crecimiento del animal completo y comportamiento alimenticio.	168
2.3.2.	Naturaleza del crecimiento hepático y turnover proteico.	169
2.3.3.	Turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.	169
2.3.4.	Naturaleza del crecimiento muscular y turnover proteico.	170
2.3.5.	Relación entre turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.	170
2.3.4.	Actividades SerDH y TyrAT.	170
III.3.	REGULACION NUTRICIONAL DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TURNOVER PROTEICO. AYUNO A LARGO PLAZO Y REALIMENTACION.	172
3.1.	Comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico en hígado y músculo de la trucha arco iris sometida a un ayuno prolongado.	172
3.1.1.	Pérdida de peso durante un ayuno prolongado en la trucha arco iris.	172
3.1.2.	Naturaleza de la pérdida de capacidad de crecimiento hepática y turnover proteico.	173
3.1.3.	Turnover proteico y niveles de ácidos nucleicos tisulares. .	173
3.1.4.	Pérdida de capacidad de crecimiento y turnover proteico en el músculo blanco.	174
3.1.5.	Turnover proteico y niveles de ácidos nucleicos.	174
3.1.6.	Actividades SerDH y TyrAT en hígado y músculo blanco de animales ayunados durante 70 días.	175
3.2.	Efectos de la realimentación durante 9 días con una dieta 40:18:23 sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico del hígado y músculo de la trucha arco iris tras haberselas sometido a un ayuno prolongado.	175
3.2.1.	Comportamiento alimenticio y crecimiento del animal completo.	175
3.2.2.	Crecimiento hepático y turnover proteico.	176
3.2.3.	Niveles de ácidos nucleicos y turnover proteico.	176
3.2.4.	Crecimiento muscular y recambio proteico.	177
3.2.5.	Turnover proteico y niveles de ácidos nucleicos en el músculo.	177
3.2.6.	Actividades SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha arco iris realimentadas con una dieta 40:18:23. . .	178

DISCUSION

IV.1. DESARROLLO Y TURNOVER PROTEICO EN EL HIGADO Y MUSCULO BLANCO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<u>Oncorhynchus mykiss</u>)	179
IV.1.1. Crecimiento y estado de desarrollo.	179
IV.1.2. Crecimiento hepático y recambio proteico en la trucha arco iris durante el desarrollo tisular.	183
IV.1.3. Crecimiento muscular y recambio proteico en la trucha arco iris durante el desarrollo tisular.	188
IV.1.4. Influencia del peso corporal sobre las actividades serina deshidratasa y tirosina aminotransferasa en el hígado y músculo blanco de truchas arco iris (<u>Oncorhynchus mykiss</u>).	194
IV.2. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN EL HIGADO Y MUSCULO BLANCO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (<u>Oncorhynchus mykiss</u>).	196
IV.2.1. Efecto de la proteína.	196
IV.2.1.1. Crecimiento y recambio proteico.	196
IV.2.1.2. Actividad SerDH del hígado de la trucha arco iris.	200
IV.2.2. Efecto de la grasa sobre las velocidades de síntesis y degradación de proteínas.	201
IV.2.3. Efecto de los carbohidratos sobre las velocidades de síntesis y degradación de proteínas.	203
IV.2.4. Ayuno y Realimentación.	205
IV.2.4.1. Velocidades de turnover proteico.	205
IV.2.4.2. Actividades SerDH y TyrAT.	209
V. CONCLUSIONES.	210
VI. BIBLIOGRAFIA.	213

OBJETIVOS

Las proteínas celulares se encuentran continuamente sometidas a un proceso dinámico de síntesis y degradación simultáneas, incluso cuando no hay ni ganancia ni pérdida de peso corporal, que puede consumir del 15 al 22 % de la energía corporal. Este fenómeno es crítico para el control de la masa de proteínas en general y de los niveles de enzimas específicos en particular. El análisis detallado de estos procesos así como su relación con el componente genético celular es imprescindible en todos aquellos estudios que pretendan estudiar el efecto de determinadas situaciones fisiológicas sobre la capacidad de crecimiento de un animal, tejido u órgano. La ingesta dietaria, el estado de desarrollo, las influencias hormonales, el nivel metabólico del tejido, son algunos de los factores que regulan la capacidad de turnover proteico en mamíferos.

Pocos son los estudios desarrollados en peces, organismos en los que aún hoy se conoce muy poco sobre sus peculiaridades metabólicas y en los que el componente proteico tanto de la dieta como del metabolismo celular tiene especial importancia, no solo como sillares estructurales indispensables, sino también como fuente energética primaria. Todo ello hace de especial interés el analizar la regulación del turnover proteico en el hígado y en el músculo blanco de la trucha arco iris a lo largo del desarrollo, y bajo diversas condiciones nutricionales. El comportamiento de ambos tejidos frente a todos estos procesos es muy diferente y está relacionado estrechamente con la misión desempeñada en cada caso, el primero como órgano coordinador de las necesidades metabólicas globales del organismo, con un recambio proteico elevado que le permite una rápida adaptación ante cambios ambientales momentáneos. El músculo se comporta como un almacén de proteínas movilizable en situaciones de stress nutritivo intenso.

Utilizando las técnicas más aplicadas en ratas, varios grupos han

cuantificado las velocidades de síntesis y degradación de proteínas en diferentes tejidos de peces. El grupo de Haschemeyer y el de Fauconneau, utilizando técnicas diferentes y especies distintas son los primeros en cuantificar las velocidades de turnover proteico en diferentes tipos de músculo y branquias. De los últimos trabajos de estos grupos, se desprende que además del tamaño corporal, el efecto de determinadas condiciones nutricionales como el ayuno y la realimentación, el tamaño de la ración y contenido energético influyen de forma clara sobre la velocidad de estos procesos.

Un enfoque diferente para estudiar el crecimiento a nivel celular y molecular es el analizar el comportamiento de sistemas enzimáticos específicos que se comportan como etapas limitantes en la velocidad de una determinada ruta metabólica. Así el grupo de Benfey, se centra en el estudio de la ornitina descarboxilasa, enzima esencial en la biosíntesis de poliaminas, compuesto de especial interés para la biosíntesis de grandes macromoléculas como DNA, RNA y proteínas; llegándose a correlacionar la actividad de este enzima con el crecimiento y la síntesis proteica en vertebrados superiores.

En nuestro caso, se ha estudiado el comportamiento cinético de dos enzimas importantes en el catabolismo de dos aminoácidos diferentes, la serina y la tirosina. En el hígado de la rata, la serina dehidratasa y tirosina aminotransferasa son dos enzimas claves en la regulación, el primero de la gluconeogénesis hepática y el segundo de la velocidad del catabolismo de la tirosina. Ambos se ven modulados por la composición de la dieta, factores hormonales y factores ambientales externos demostrándose la existencia de mecanismos de inducción enzimática incluso a nivel de mRNA en distintas situaciones. Entre los enzimas que degradan aminoácidos, solo la tirosina aminotransferasa y la serina dehidratasa se conoce que respondan a cambios en

la frecuencia alimenticia. Existen varios estudios, en los que se muestra la relación entre ambas actividades y el estado de desarrollo y el nivel nutricional en peces.

Los objetivos del presente trabajo han sido varios, inicialmente se pretende poner a punto la metodología experimental que permitiera el análisis detallado del comportamiento y naturaleza del crecimiento, en la trucha arco iris, tanto del animal completo como del hígado y del músculo blanco, integrándolo en un estudio global en el que se coordine la determinación de las velocidades de turnover proteico con la cuantificación de los niveles de ácidos nucleicos en ambos tejidos. Paralelamente, la segunda parte de este primer objetivo ha sido la puesta a punto de los ensayos enzimáticos que permitieran una correcta valoración del comportamiento de ambas actividades en los dos tejidos.

El conjunto de todo este amplio enfoque experimental nos permitió tener una idea precisa de la relación entre crecimiento, turnover proteico y actividades enzimáticas específicas en un determinado estado fisiológico del animal.

En segundo lugar se estudió el comportamiento de estos procesos a lo largo del desarrollo del animal, utilizando para ello diferentes grupos de peso y tamaño corporal.

La regulación nutricional es el siguiente aspecto a analizar. Se estudió la influencia del diferente aporte de macronutrientes, así como la sustituciones entre ellos, procurando separar el efecto de cada uno de ellos del efecto energético.

Por último, el análisis de una situación muy especial para los peces como es el ayuno prolongado y la realimentación posterior completó este estudio.

INTRODUCCION TEORICA

I.1. CRECIMIENTO Y TURNOVER PROTEICO

La capacidad de crecimiento de una especie concreta, además de estar determinada genéticamente está influenciada por multitud de factores que interactúan simultáneamente y que influyen de manera decisiva en su control. Factores genéticos, nutricionales, ambientales y fisiológicos determinan la capacidad de crecimiento del animal; de manera que de la acción combinada de todos ellos pueden obtenerse diferencias bastante acusadas en las velocidades de crecimiento tanto entre especies diferentes como entre organismos de la misma especie. No obstante, aunque existe una alta plasticidad en la capacidad de crecimiento inter e intraespecífica, los diseños de crecimiento típicos de cada especie se conservan bastante bien (Weatherley 1990).

El turnover de proteínas en un animal, tejido u órgano tiene dos fracciones principales: una, la encargada de mantener los niveles proteicos-enzimáticos necesarios en cada momento en el sistema estudiado y otra, la que permite que existan los precursores necesarios para los procesos de crecimiento del sistema en cada momento del estado del animal, tejido u órgano. La función principal de cada tejido, se encargará de regular la importancia de cada una de estas "fracciones" en ese tejido.

El crecimiento de un animal, tejido u órgano, puede entenderse como un incremento en la masa de proteínas resultado del balance positivo entre las velocidades de síntesis y degradación, procesos simultáneos y antagónicos. Sin embargo el concepto de crecimiento implica además el de desarrollo, asociado con cambio en la composición y tamaño relativo de los pools de proteínas específicos (Riis 1983).

En cuanto al tejido mayoritario en los peces, el músculo, cambia su

estructura y función con la edad, requerimientos de alimento y requerimientos físicos, y se refleja en su capacidad de producir energía para el anabolismo y la contracción. En este tejido, los requerimientos nutricionales, no solamente deben aportar los nutrientes básicos para el mantenimiento de las necesidades de precursores de los procesos catabólicos, además el exceso de nutrientes que normalmente acompaña una dieta control, son necesarios para inducir todos aquellos mecanismos implicados en la regulación de los procesos anabólicos (Millward 1990). La dinámica de crecimiento de este tejido tiene lugar por simultánea hipertrofia y reclutamiento de fibras, predominando esta primera en los períodos de crecimiento rápido y el reclutamiento de fibras es más importante en peces grandes, cuando el tamaño de la fibra es tal, que un crecimiento posterior puede impedir el desarrollo de sus funciones metabólicas. El crecimiento total de las fibras y del músculo está directa y linealmente relacionado con el crecimiento y tamaño total del cuerpo (Weatherley et al. 1988, Weatherley y Gill 1989, Weatherley 1990, Kiessling et al. 1991). Los estudios que relacionan la capacidad de crecimiento del animal completo y sus velocidades de turnover de proteínas se inician en mamíferos y son hasta este momento quizás los más avanzados.

I.1.1. Influencias del estado del desarrollo y tamaño corporal sobre la capacidad de crecimiento y turnover proteico en mamíferos.

I.1.1.1. Crecimiento normal.

Los numerosos estudios llevados a cabo en mamíferos, ponen de manifiesto la estrecha relación existente entre la pérdida de capacidad de crecimiento del

sistema estudiado a medida que envejece o aumenta de tamaño, y los cambios producidos en las velocidades de síntesis y degradación proteica resultado de alteraciones en la capacidad y eficacia de síntesis. La edad del individuo afecta primariamente a la porción de turnover de proteínas directamente relacionada con el crecimiento (Reeds 1989). En general, la pérdida de potencialidad mitótica se refleja en una disminución en la capacidad de crecimiento que es consecuencia de la caída en la velocidad, capacidad y eficacia de síntesis proteica en cada tejido.

En diferentes tejidos pueden operar distintos tipos de mecanismos de control del crecimiento. Así en el hígado y el riñón, y quizás en otros tejidos con recambio rápido, la comida (Hutson y Mortimore 1982, Botbol y Scornik 1985) y la ingesta proteica (Conde y Scornik 1976, Bur y Conde 1982) estimulan el crecimiento suprimiendo la degradación proteica. Este mecanismo puede aplicarse generalmente al control de masa proteica en células que han retenido la capacidad de proliferar (Ballard 1982). En el músculo esquelético, que una vez diferenciado tiene un relativamente limitado potencial proliferativo, la ingesta de alimento (Garlick et al. 1983), la rehabilitación nutricional (Millward et al. 1975, Millward y Waterlow, 1978) y la hipertrofia inducida por el trabajo (Turner y Garlick 1974, Laurent et al. 1978, Goldspink et al. 1983) uniformemente incrementa la síntesis proteica y generalmente incrementa la degradación (Reeds y Palmer 1986).

Riis (1983) intenta relacionar los resultados obtenidos por otros autores (Millward et al. 1975, Searle et al. 1972, McGraham y Searle 1972, Arnal et al. 1976, 1977, 1978) con diferentes técnicas y en diferentes especies (ratas y corderos) a lo largo de diferentes estadios de desarrollo (desde 23 a 330 días en las ratas, 1 a 16 semanas en los corderos) encontrando en el músculo esquelético

que al igual que le ocurre a la velocidad de crecimiento neto, la velocidad fraccionaria de síntesis proteica, que es muy alta en el recién nacido, disminuye rápidamente en el período postnatal. La velocidad del catabolismo también disminuye paralelamente a la disminución en la K_S aunque no en la magnitud en que lo hace la velocidad de síntesis. En ratas y corderos, la relación encontrada al representar K_S frente a crecimiento neto es tal, que altas velocidades de turnover proteico coinciden con altas velocidades de crecimiento y al contrario (Arnal 1977, Arnal et al. 1978). Este tipo de relación se ha encontrado también en el bazo, mientras que en el hígado y el tracto gastrointestinal, la K_S no cambia con la edad, permaneciendo con altos valores de síntesis y catabolismo (Millward y Garlick, 1972; Millward et al. 1975). Parece pues, que esta relación no es aplicable a pools de proteínas que están implicados fuertemente en la adaptación a variaciones a corto plazo en el aporte de aminoácidos. Aunque algunos autores (Millward et al. 1975) descargan sobre el catabolismo de las proteínas la mayor importancia en la limitación del depósito neto para el crecimiento, otros (Riis 1983) abogan también en favor del papel de la síntesis. Para Riis (1983), son la somatomedina y la insulina los factores más importantes para la adaptación de la síntesis proteica al crecimiento. La actividad de la somatomedina tiende a incrementarse con la edad y los niveles de hormona de crecimiento pueden incrementar o mantenerse sin cambios. Así la sensibilidad de los sistemas que sintetizan proteínas a la estimulación hormonal tiende a disminuir con la edad, pudiendo ser este un factor importante en el cese del crecimiento neto.

Waterlow et al. (1978) estudian el comportamiento de cinco variables problema, proteínas, DNA, RNA, velocidad de síntesis y velocidad de degradación durante el crecimiento normal del animal completo y los diferentes

tejidos de ratas desde su nacimiento (63 gramos) hasta que cumplieron un año (770 gramos). La velocidad fraccionaria de síntesis proteica (K_S) tiende a disminuir con la edad, siendo este cambio más marcado en el **músculo**, particularmente en músculos en los que las fibras glucolíticas predominan y ocurren durante los estadios iniciales del crecimiento. En algunos tejidos como el hígado o el riñón, existe poca o ninguna disminución en la K_S después de que las ratas han alcanzado 100-200 gramos en peso corporal. La degradación inicialmente es menor que la velocidad de síntesis y gradualmente se va convirtiendo igual a la síntesis a medida que el animal alcanza el estado adulto. No obstante, en cada tipo de músculo existe una velocidad mínima, por debajo de la cual no puede bajar tanto en el animal adulto, en el cual la célula ha alcanzado su tamaño máximo, como en animales malnutridos en los que la unidad de ADN es mantenida a bajo tamaño (Waterlow et al. 1978). Estos cambios coinciden además con: i) un incremento en la masa de proteínas total (5 veces o más en todos los tejidos excepto en cerebro); una extensa hiperplasia (aumento en la concentración de ADN total salvo en cerebro); un incremento en el tamaño de la unidad de DNA que fue más marcado en el músculo aunque existió en todos los tejidos, ii) una tendencia a disminuir en la concentración de RNA, iii) La K_{RNA} , la relación RNA/DNA y la K_{DNA} permanecen constantes durante el desarrollo. El incremento en la síntesis total que ocurre en un órgano o tejido durante el crecimiento depende principalmente del incremento en el número de células o unidades de DNA. La velocidad de crecimiento de la proteína muscular total y el valor final alcanzado depende casi enteramente de la velocidad de síntesis de DNA y la cantidad final de DNA muscular (velocidad y grado de hiperplasia). Así, para estos autores, si la velocidad de síntesis de proteína por unidad de DNA es constante, la curva de crecimiento es

determinada por la velocidad total de síntesis proteica (cantidad de DNA x síntesis por unidad de DNA) y no por la velocidad de degradación.

En ratas lactantes, se ha estudiado el comportamiento del turnover proteico del músculo esquelético in vivo en varios tipos de músculos en ratas desde 1 a 28 días de edad usando una dosis masiva de L-[43H]Phe de 50 μ Ci/rata y 150 μ mol Phe/100 gramos de peso (Davis et al. 1989). Durante este periodo, la masa de proteínas de los musculos incremento 110 veces, el ARN de 16 a 25 veces, la cantidad total de proteína sintetizada por día incrementaba cerca de 100 veces, mientras que la K_S disminuía de 2 a 3 veces como resultado de una disminución progresiva en la capacidad de sintetizar proteínas (C_S), de 3 a 5 veces, aunque la eficacia (K_{RNA}) incrementaba durante este periodo. Los resultados de este estudio junto con investigaciones previas sugieren que el incremento en la eficacia de la traducción ocurre antes en los músculos que mantienen el peso, asociándose en aquellos que no lo mantienen con la aparición de la movilidad. Ellos sugieren que el posible responsable del aumento en la K_{RNA} puede ser el incremento en la sensibilidad a la insulina inducida por el ejercicio. Los resultados de este estudio junto con investigaciones previas (Kelly et al. 1984, Lewis et al. 1984, Millward et al. 1975) sugieren que músculos esqueléticos inmaduros tienen altas C_S y bajas K_{RNA} y a medida que van madurando su C_S disminuye y la K_{RNA} incrementa. La disminución en la C_S continua a lo largo de toda la vida a mucha menor velocidad durante el período tras el destete que durante la lactancia, mientras que la K_{RNA} incrementa cerca del final de período de lactancia, cambiando después poco.

Goldspink y Kelly (1984) analizan los cambios producidos en el crecimiento y turnover proteico en el **hígado, riñón y animal completo** entre los dieciseis días de vida uterina y las 105 semanas tras el parto en la rata, utilizando una

técnica basada en la inyección simple y masiva de phe*. La disminución en las velocidades de crecimiento en el animal completo y en los dos tejidos se explican por cambios a lo largo del desarrollo, en las velocidades de síntesis y degradación. En todas las edades, la velocidad de turnover fué mayor en el hígado que en el riñón y en este mayor que en el animal completo. La disminución en las velocidades de síntesis se relacionaron con cambios en la capacidad y actividad ribosómica tisular. En el hígado, la caída en la velocidad entre 18-20 días de vida fetal (de 134 a 98 % por día) corresponde a una disminución en la capacidad ribosómica (C_s) y en la velocidad de síntesis por ribosoma (K_{RNA}). No se observaron ningún cambio significativo en ninguno de los parámetros entre el destete (3 semanas) y la senescencia (105 semanas). Al contrario, en el riñón y en el animal completo, las velocidades de síntesis y degradación, progresivamente disminuyeron (de 95 a 24 % día y de 70 a 11 %) a lo largo de la vida pre y post-natal principalmente como consecuencia de una disminución progresiva en la capacidad ribosómica pero con alguna caída en la actividad ribosómica también durante el estado fetal. La contribución de la síntesis de proteínas hepática a la cantidad total sintetizada por el animal completo, disminuye del 56 al 11 % al incrementar la edad, mientras que la contribución renal permanece casi constante (1.6 - 2.9 %). Las condiciones del estado estacionario se alcanzaron entre los 44 y 105 semanas post-parto, los valores de vida media para las proteínas corporales, renal y hepáticas fueron 6.4, 3.0 y 1.5 días respectivamente a las 105 semanas.

Por el contrario, Biggs y Booth (1990) utilizando una técnica de infusión constante de la leucina* en ratas Fischer 344, demuestran que la síntesis proteica en el **corazón** de rata no se suprime durante la senescencia.

Millican et al. (1987) estudian la síntesis proteica en el animal completo y

en tejidos individuales en ratones en varios estadios de preñez y lactación. La velocidad absoluta de síntesis proteica incrementaba en el animal completo desde 640 mg/día en ratas vírgenes a 1590 mg/día a los 18 días de la preñez y 2100 mg/día a los 15 días de lactación. Gran proporción de estos incrementos fueron ocasionados por la rapidez de crecimiento del feto y la placenta durante la preñez y por la síntesis proteica en la glándula mamaria durante la lactación que se encuentra muy activa (Sampson y Jansen, 1984a, 1985, Sampson et al. 1986, Sainz et al. 1986). También se observó una sustancial estimulación del crecimiento y la síntesis proteica en el hígado y tracto gastrointestinal. El crecimiento acelerado del hígado fué mantenido todo el periodo completo. Incrementos en el peso y contenido proteico del hígado durante la preñez y la lactación han sido descritos por otros autores en las ratas (Chatwin et al. 1969, Campbell et al. 1974, Remesar et al. 1981, Mayel-Afshar y Grimble, 1982, Siebritz et al. 1985). Sin embargo, el músculo gastronómico no mostró cambios en el metabolismo proteico, indicando la poca importancia de este tejido en la reserva proteica durante la preñez y lactación.

I.1.1.2. Crecimiento Acelerado

Las alteraciones experimentales en la velocidad de crecimiento de los tejidos han aportado una contribución importante a nuestro conocimiento de la relación entre crecimiento y turnover proteico. Son particularmente valiosos porque ellos pueden producir diferentes velocidades de crecimiento. Entre los métodos más utilizados están: la producción de algunos tipos de **hipertrofia esquelética** (Goldberg 1968,1969,1972; Laurent and Sparrow 1977; Turner y Garlick 1974; Goldspink 1976, 1977a y b) y **cardiaca** (Morkin et al. 1972, Coleman et al.

1989), **regeneración hepática** (Scornik, 1972,1974; Scornik and Botbol 1976; Swick and Ip 1974), **hipertrofia compensatoria renal** (Hill y Malamud 1974, Bucher and Malt 1971, Tomashefsky and Tannenbaum 1970), **crecimiento de glándulas salivares estimuladas por isoproterenol** (Barka 1970,1972; Hill y Malamud 1974) y **crecimiento de los adrenes estimulados por ACTH** (Canick y Vilee 1974).

En todos aquellos experimentos en los que se ha determinado la velocidad de pérdida de aminoácidos radioactivos como medida primaria de las velocidades de síntesis y degradación de proteínas, se llega a la conclusión de que en tejidos en crecimiento, se reduce la velocidad de degradación como indica la velocidad reducida de pérdida de actividad total. La velocidad de síntesis, cuando se determina por la velocidad de pérdida de radiactividad específica de las proteínas parece cambiar poco o incrementar ligeramente. La respuesta parece ser la misma para todos los tejidos. Estos resultados han llevado a algunos autores a proponer que la inducción del crecimiento por una reducción en la velocidad de la proteólisis es un fenómeno general en todos los tejidos (Goldberg y St.John, 1976). Al no tener en cuenta estas técnicas el problema de la reutilización de los aminoácidos endógenos, los resultados alcanzados no son completamente válidos.

Sin embargo, cuando se mide la velocidad de incorporación, entonces el mecanismo de hipertrofia no parece ser el mismo en todos los tejidos. En el músculo esquelético y cardiaco existe un incremento en la velocidad de síntesis que sobrepasa la necesaria para producir el crecimiento observado, lo cual implica un incremento en la velocidad de degradación. En hígado en regeneración, parece que existe una reducción en la velocidad de degradación similar a la observada tras una comida.

Buenos ejemplos de este tipo de estudios son los siguientes:

El rápido crecimiento del músculo soleo provocado por la tendotomía de su sinérgico, el gastronémico, inducido de 1 a 6 días, se correlacionó con incrementos tanto en las velocidades de síntesis como de degradación, siendo mayores los cambios inducidos en la síntesis (Goldspink et al. 1983). En una segunda parte del experimento, la atrofia inducida por el corte del nervio ciático en músculos soleos normales o sobrecargados, se asoció en ambos casos con la pérdida de ARN y proteínas, mientras que la síntesis disminuía y la degradación incrementaba, la denervación induce grandes cambios en los músculos sobrecargados. La disminución del crecimiento en el gastronémico tendotomizado y su rápida atrofia posterior tras la denervación adicional fue explicada por grandes incrementos en la degradación proteica con pocos o nulos cambios en la velocidad de síntesis. En las medidas de la síntesis y degradación se emplearon técnicas in vivo (Garlick et al. 1980) e in vitro (Fulks et al. 1975 y Waalkes y Underfriend 1957) fiables.

La administración de tiroxina en el conejo, es un método extensamente estudiado de producir hipertrofia cardiaca (Coleman et al. 1989). Esta hipertrofia está asociada con incrementos en las velocidades absolutas, fraccionarias, capacidad y eficacia de síntesis proteica (Parmacek et al. 1986). En todos los casos, la hipertrofia ocurre porque la velocidad acelerada de síntesis de nuevas proteínas, excede la velocidad de degradación (Morgan et al. 1987). En este caso la estimulación (de 37.9 a 164.1) de la síntesis es de mayor grado que la estimulación de la degradación (de 29.8 a 48.2). El cese de la administración de tiroxina produce una vuelta a la masa ventricular de animales controles, la velocidad de síntesis proteica también vuelve a la velocidad normal, y mientras que las velocidades absolutas de degradación de proteínas se mantienen

elevadas, las velocidades fraccionarias se mantienen sin cambio. No se ha encontrado cambios en la eficacia de síntesis durante la regresión de la hipertrofia de proteínas pero sí una disminución en la capacidad de síntesis, tampoco encuentran cambios en la concentración de DNA total o en la relación proteína/DNA, indicando que en ausencia de poliploidía, puede ocurrir algún grado de hiperplasia. El desarrollo y regresión de la hipertrofia se correlaciona con las alteraciones en el trabajo cardiaco mediado por la tiroxina. La técnica utilizada se basa en una infusión constante de leu* y en la medida de la incorporación a la fracción proteica así como la concentración de leu* en el plasma al final de la infusión (Parmacek et al. 1986). En una situación contraria, la atrofia cardiaca producida como resultado de la disminución del trabajo del miocardio (Klein et al. 1990) en corazones de ratas trasplantados heterotópicamente, se demuestra una disminución reproducible en la masa cardiaca y en la síntesis de proteínas total.

Parece que en el **músculo esquelético y cardiaco**, existen suficientes evidencias para mostrar que la hipertrofia implica una estimulación total en la síntesis proteica, debido a un incremento en la concentración ribosómica y en la actividad del RNA al menos durante los estados iniciales, aunque el mecanismo de estos cambios no se conozca (Waterlow et al. 1978). El hecho de que el crecimiento inducido por el trabajo ocurra en animales hipofisectomizados, diabéticos y ayunados, parece no implicar a ninguna de las hormonas normalmente asociadas con el crecimiento ni siquiera en un papel permisivo (Goldberg et al. 1975) aunque Cohen (1974) ha postulado que la tiroxina puede ser necesaria para que ocurra la hipertrofia cardiaca. Goldspink (1977a,b) reconoce dos componentes en la estimulación mecánica del crecimiento muscular, uno es el trabajo de la contracción isométrica y el otro es

el alargamiento pasivo, que produce crecimiento por la adición de nuevos sarcomeros incluso en músculos denervados (Williams y Goldspink, 1976). Es posible que el estímulo opere produciendo incrementos en el transporte de sustratos a través de la membrana plasmática, pero los datos del transporte de aminoácidos no proveen evidencias definitivas para esta hipótesis (Morkin 1974, Goldspink, 1977a). Rabinowitz (1974) ha discutido los posibles hechos iniciales posteriores al incremento en la velocidad del trabajo, en particular recoge los incrementos iniciales en el contenido de citocromo mitocondrial a una posible deplección de ATP. Cohen (1974) ha incorporado los cambios iniciales en la función mitocondrial en un esquema general, por donde el incremento en la fosforilación oxidativa induce liberación de un factor desconocido que estimula la síntesis proteica ribosomal. La creatina ha sido propuesta como la señal química que acompla el incremento en la actividad muscular con el incremento en la síntesis proteica (Ingwall 1976). También se ha sugerido que el calcio puede jugar una parte en la hipertrofia cardíaca (Kaplan y Richman 1976). Estos autores han encontrado que el calcio endógeno se eleva en corazones hipertroficados. También sugieren que el incremento en la concentración del calcio pueden jugar una parte en la acumulación de ARN a través de la inhibición de la degradación.

Una dificultad adicional es la extensión en la que los cambios en el contenido de RNA y la actividad reflejan la respuesta de las células contractiles mejor que las células no musculares, siendo de particular importancia en el corazón donde existen muchas células no musculares. A diferencia de lo que sugerían los estudios iniciales, las velocidades de degradación se incrementan.

Estos resultados están enteramente de acuerdo con los cambios observados durante el crecimiento normal en los que las velocidades de degradación tienden

a ser mayores en los animales que crecen más rápidamente desde el nacimiento hasta la vida adulta. Parece pues que en el músculo esquelético la mayoría de las formas de crecimiento rápido se acompañan por rápida degradación proteica, aunque no ocurre así en otros tejidos (Waterlow 1978)

A diferencia de lo que ocurre en el músculo, en el **hígado** existe una marcada supresión de la degradación de proteínas parece que es el principal componente de la respuesta del crecimiento durante la regeneración así como después de una comida.

Aunque en otros órganos la respuesta está menos definida, sin embargo en todos los casos las velocidades de síntesis han incrementado o bien se ha sugerido por cambios en las concentraciones de ribosomas. Ya que la velocidad de turnover en muchos tejidos es mayor que en músculo esquelético o cardiaco, puede apreciarse que pequeños cambios en las velocidades de síntesis y degradación pueden producir velocidades de crecimiento tan rápidas como las encontradas en la hipertrofia. Además, cambios inversos en la síntesis y degradación que son a veces asumidos por causas puramente a priori, podrían producir cambios dramáticos en la masa de proteínas. De hecho, excepto en hígados regenerados, las velocidades de crecimiento son usualmente menores que las de turnover. Probablemente cuando se produzca un cambio marcado en la síntesis o degradación, se acompañe por cambios paralelos en otros procesos.

Parece entonces que la forma en la que la degradación proteica cambia durante el crecimiento rápido varía de acuerdo con el tejido. Estos resultados reflejan una demanda funcional. Ya que cada órgano tiene una función característica es comprensible encontrar diferentes combinaciones de cambios en la síntesis y degradación durante el crecimiento del órgano, más que un único mecanismo para todos los tejidos (Waterlow et al. 1978).

I.1.1.3. Control hormonal del crecimiento y desarrollo celular.

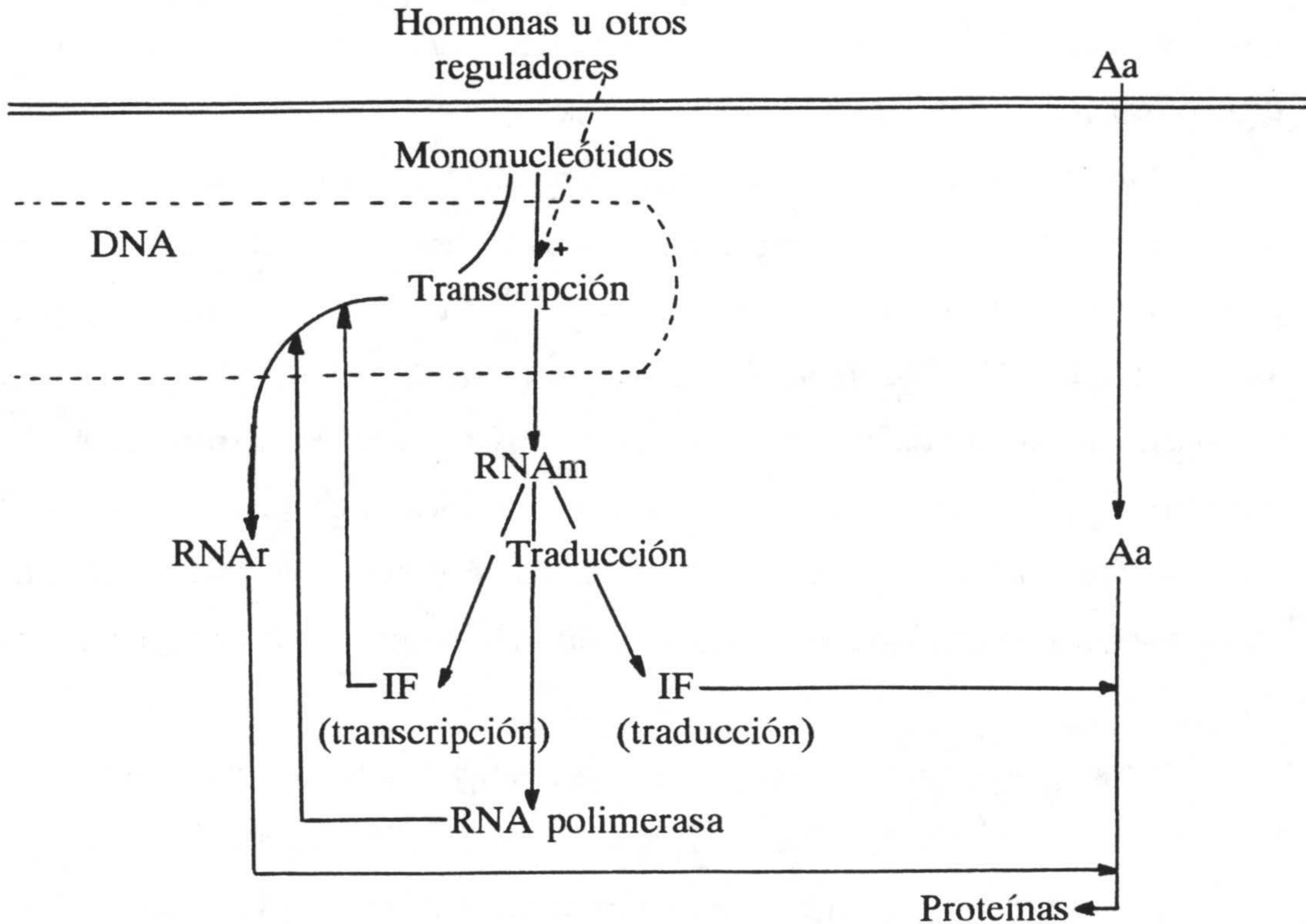
Las hormonas del crecimiento y desarrollo afectan a funciones biosintéticas de sus células diana en múltiples fases de la traducción y transcripción genética. Se asume que en gran medida el crecimiento y el desarrollo dependen de la inducción o síntesis preferencial de un predeterminado diseño proteico.

Las hormonas del crecimiento y desarrollo, cuando se administran precozmente o a animales experimentalmente deprivadas de ellas, afectan marcadamente a la actividad de síntesis proteica de sus células diana (Korner 1965a, Mueller 1965, Williams-Ashman et al. 1964, Tata 1964,1967a). También se conoce que al administrar in vivo la mayoría de la hormona promotora del crecimiento, afecta marcadamente a la síntesis proteica in vivo o in vitro al nivel de los ribosomas pero fallan al influir en la incorporación de aminoácidos cuando se añaden in vitro a ribosomas de sus células diana (Korner 1965a, Tata 1967a).

La síntesis de RNA en células diana es muy sensible a las hormonas del crecimiento y desarrollo, y parte de ese RNA sintetizado bajo la influencia hormonal es esencial para la expresión biológica de la actividad hormonal (Tata 1966a).

Entre los hechos iniciales que ocurren en células diana tras la administración de hormonas del crecimiento y desarrollo es una marcada alteración en la naturaleza de la síntesis de RNA nuclear. Una de la más simples explicaciones de la especificidad hormonal es la del control selectivo y directo de la síntesis de RNA mensajeros (Karlson 1963). Sin embargo, todas las evidencias de la regulación de la transcripción del RNA son indirectos.

Durante el crecimiento, un exagerado incremento en la síntesis de RNA ribosomal y partículas de ribonucleoproteínas puede ser un hecho común de células nucleadas para facilitar el transporte de RNAm del núcleo al citoplasma (Tata 1970).



Esquema I.2. Posibles mecanismos para la regulación de la síntesis proteica a nivel de la transcripción de proteínas reguladoras. IF= Factores de Iniciación. (Riis 1983).

Cuando el RNA nuevo se acumula en el citoplasma ocurre un simultáneo incremento en la velocidad de formación de membranas, especialmente las necesarias para que los ribosomas se unan. Parece como si existiese un mecanismo en la célula que coordine la formación y ensamblaje de membranas

del retículo endoplasmático de acuerdo con las demandas de la síntesis proteica. Hay pocas evidencias de que el crecimiento y el desarrollo puedan explicarse por un control traduccional directo por la hormona a nivel del ribosoma. Existe una síntesis limitada de DNA antes de la inducción de la síntesis de proteínas específicas (Tata 1970).

I.1.2. Influencias del estado del desarrollo y tamaño corporal sobre la capacidad de crecimiento y turnover proteico en peces.

I.1.2.1. Cambios en la síntesis de proteínas musculares bajo crecimiento normal y estimulado en los peces.

En resumen, en mamíferos, altas velocidades de depósito de proteínas durante el crecimiento rápido de mamíferos inmaduros o durante hipertrofia muscular pueden asociarse con altas velocidades de degradación proteica, pero altas velocidades de depósito inducidas por selección genética, estimulación hormonal o manipulación dietaria se asocia con una disminución en la degradación proteica (Millward et al. 1982).

Truchas arco iris con altos potenciales de crecimiento muestran una velocidad ligeramente mayor de síntesis de proteínas musculares que truchas con bajo crecimiento (Kaushik et al. 1984), incluso si estos dos grupos muestran crecimientos similares durante la medida. La síntesis de proteínas plasmáticas parecen ser menores en el grupo de alto crecimiento que en el de bajo (Fauconneau 1985). Pero, el crecimiento estimulado obtenido por tratamiento oral con esteroides estaba asociado con una pequeña disminución en la síntesis de proteínas musculares. Por lo tanto, en este caso, el crecimiento puede estar

asociado con una disminución en la degradación muscular de proteínas. Resultados obtenidos en peces aclimatados a dos temperaturas arrojan las mismas conclusiones (Somero y Doyle 1969, Fauconneau et al. 1981).

La natación continua a baja velocidad estimula la velocidad de crecimiento de salmónidos (Davison y Goldspink 1977, Greer-Walker y Emerson 1978, Nahhas et al. 1972, Davie et al. 1986). Recientemente se han investigado los cambios que acompañan a esta estimulación en la velocidad de crecimiento (Houlihan and Laurent 1987). En estos animales, se estimulan tanto la síntesis como la degradación, pero la preponderancia de la síntesis ocasiona el incrementar al doble la velocidad de crecimiento. Al finalizar la natación, la velocidad de síntesis proteica en el ventrículo cae hasta la de peces controles. Estos autores no encuentran hipertrofia ventricular descrita por otros (Hochachka, 1961) durante estas condiciones. Houlihan et al. (1988a) combinan los experimentos in vivo con otros in vitro para investigar los efectos del ejercicio sobre las velocidades de síntesis proteica en las cámaras del corazón de trucha. En un experimento de perfusión, incrementando la potencia cardiaca y la producción de potencia in vitro dos veces durante veinte minutos, se incrementaba la K_S aproximadamente 2,5 veces en el atrio y en el ventrículo pero no se afectan las del bulbo arterial. In vivo, no existen diferencias significativas en la K_S entre el atrio y el ventrículo, la natación continua a baja velocidad durante cuarenta minutos produce un aumento en la K_S en todas las cámaras excepto en el bulbo aproximadamente de un 32 %. Los incrementos in vivo e in vitro ocurren sin cambios en la razón RNA/proteína indicando una mejora en la actividad de síntesis proteica por unidad de RNA (K_{RNA}). Estos autores concluyen que los incrementos a corto plazo en la contractilidad cardiaca, posiblemente actuen a través de alargamientos mecánicos sobre el

músculo cardiaco estimulando la síntesis proteica particularmente en el ventrículo, a través de incrementos en la actividad ribosómica.

Los mecanismos de crecimiento muscular asociados con un incremento o disminución en la velocidad de turnover de proteínas son similares en peces y en mamíferos. Pero la velocidad de turnover de proteínas residentes en el músculo del pez es baja cuando se compara con la de otros tejidos y también cuando se compara con la velocidad de síntesis de proteína muscular. Así el depósito de proteínas en el músculo parece ser equivalente a un proceso de acumulación de ahí que se considere a este tejido como el almacén proteico por excelencia en estos animales (Fauconneau 1985).

I.1.2.2. Cambios en la síntesis de proteínas a lo largo del desarrollo en peces.

La disminución en la velocidad de síntesis de proteínas de diferentes tejidos y del animal entero durante el desarrollo (desde el neonato hasta el adulto) es una tendencia general en mamíferos (Waterlow et al. 1978, Arnal et al. 1983). Además en músculo la disminución en el depósito proteico de joven a adulto está asociado con una disminución en el turnover (Millward y Waterlow, 1978). En los peces, son muy importantes los cambios en el crecimiento durante el desarrollo. En trucha arco iris, la velocidad de síntesis y turnover proteico en el hígado y músculo son mayores en peces de 100 gramos que de 200-300 gramos (Fauconneau et al. 1981, Smith 1981). Durante el mismo período, midiendo las velocidades de incorporación de ^{14}C -leu in vivo en las proteínas plasmáticas, la síntesis proteica en el hígado fué menor en truchas que pesaban 80 gramos que en las que pesaban 280 g. Pero en el músculo no existen cambios

significativos en la velocidad de incorporación de aminoácidos (Fauconneau 1985). Como durante este período de desarrollo no existen cambios en la velocidad de crecimiento es difícil hacer deducciones sobre la naturaleza de los cambios encontrados.

Medidas de las velocidades de síntesis de proteínas durante los estadios iniciales del desarrollo, en huevos o en larvas con saco larvario, pueden proveer una estima de la eficiencia máxima de síntesis proteica en los peces. En los huevos de teleósteos (*Oryzias latipex*) la pérdida de radioactividad en las proteínas marcadas de la yema con ^{35}S -metionina y ^{14}C -leu proveen una estima de la utilización de la yema: 9.7 % día en embriones que muestran el establecimiento de la circulación completa (Monroy et al. 1961). En carpas que pesan 50 mg, la síntesis de proteínas corporal total y la velocidad de crecimiento fueron respectivamente estimadas en 300 % día y 18 % día (Fauconneau 1983). Al compararlas con la velocidad de síntesis de proteínas en el animal completo y la velocidad de crecimiento en trucha arco iris que pesan 100 gr: 4-5 % día y 1.5 % día (Fauconneau 1980) la disminución en la velocidad de turnover de larvas a inmaduros, asociada con la disminución en la velocidad de crecimiento es muy importante.

Existen cambios en la velocidad de síntesis proteica a través del desarrollo inicial del pez blanco. La incorporación de la radioactividad en la fracción TCA-soluble después de la inmersión del pez en una solución que contiene ^{14}C -Arg es mucho mayor en huevos y larvas con saco larvario comparada con la de larvas de natación libre (Fauconneau 1985).

La incorporación relativa de radioactividad en las proteínas del pez completo disminuye desde larvas alimentadas del saco a juveniles, pero parece que la disminución en la síntesis del pez completo de larvas alimentadas de natación

libre de 12 mg, a 230 mg no es muy importante. La velocidad más alta de incorporación de aminoácidos en las proteínas del animal completo se observa en larvas con saco larvario. Las velocidades de síntesis proteica del animal completo estimadas por la velocidad de incorporación de radioactividad son también muy altas, 100-400 % día, cuando se comparan los resultados obtenidos en muchos peces adultos (Smith and Haschemeyer 1980, Smith et al. 1980).

Hansen et al. (1989) utilizando un ensayo in vitro con ribosomas aislados de larvas de bacalao con una alta velocidad de crecimiento, encuentran que la capacidad para incorporar aminoácidos a la proteína era 20 veces mayor que la que mostraban ribosomas aislados de músculo de bacalao.

De estas observaciones se deduce que la disminución en la velocidad de crecimiento a lo largo del desarrollo está asociada con una gran disminución en la síntesis de proteínas del animal completo e incluso con una disminución en el turnover de proteínas del animal completo. Los cambios relativos en la composición de proteínas corporales y particularmente en la proporción de músculo no son lo suficientemente grandes para explicar esta disminución en el turnover de proteínas en el animal completo.

A medida que el animal se hace más grande, su capacidad de crecimiento disminuye (Brett, 1979). Para estudiar la relación entre la velocidad de crecimiento y el tamaño corporal, si se representa el logaritmo de la velocidad de crecimiento instantánea (K_G) frente al logaritmo de la biomasa, se obtiene una línea recta con una pendiente de -0.32 para la trucha marrón. Brett (1978) sugiere que una pendiente de -0.4 es apropiada para todos los salmónidos.

En la trucha arco iris, las velocidades fraccionarias de síntesis y degradación están relacionadas con el tamaño corporal según una ecuación alométrica ($Y=a.X^b$), en la que los exponentes han sido calculados por Houlihan et al.

(1986), usando esta relación encontraron que existía una correlación significativa para cada tejido (branquias, músculo blanco, rojo y ventrículo) entre el descenso en la K_S y la K_D con el incremento del tamaño corporal, mostrando unos valores para un número de tejidos, similar a los encontrados para el consumo de oxígeno específico de cada peso (Rao 1968). La similaridad de esta escala sugiere que estos dos conceptos pueden estar asociados. Esto ha sido sugerido para mamíferos (Waterlow 1980, Meier et al. 1981), peces (Kaushik et al. 1982) y *Mytilus* (Hawkins et al. 1986). En humanos, se ha observado que la contribución proporcional de la síntesis proteica al metabolismo es también constante (Young et al. 1975).

Se ha encontrado una disminución en las velocidades de síntesis de proteínas con el incremento en el tamaño corporal (Fauconneau 1984, 1985, Dabrowski 1986, Fauconneau et al. 1986). Houlihan et al. (1986) estudian la influencia del tamaño corporal (25, 85 y 363 gr) sobre la velocidad de crecimiento y turnover proteico en branquias, ventrículo, músculo rojo y músculo blanco de la trucha arco iris tras una inyección simple de ^3H -phe. Todos los tejidos salvo el músculo blanco que presenta una ligera alometría positiva, presentan crecimiento isométrico. Durante el crecimiento, las velocidades fraccionarias de síntesis y degradación de proteínas en todos los tejidos disminuyen paralelamente. El orden mostrado por los tejidos en cuanto a su velocidad de recambio proteico a lo largo del crecimiento fué: branquias > ventrículo > músculo rojo > músculo blanco. Pero calculando la cantidad absoluta de proteína sintetizada por cada tejido entonces el orden fué: músculo blanco = branquias > músculo rojo > ventrículo. En las branquias (altas velocidades de turnover), solo el 4 % de la proteína sintetizada se almacena como crecimiento, mientras que en el músculo blanco (baja velocidad de turnover) el 75 % de esta proteína se almacena.

I.2. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN MAMIFEROS.

I.2.1. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN EL ANIMAL COMPLETO.

La síntesis proteica en animales, responde rápida y marcadamente a una alteración en el estado nutricional. Cambios en la ingesta proteica, pueden producir alteraciones en el turnover proteico, produciendo cambios en el crecimiento y en la acreción de proteínas. El ayuno (Muramatsu et al. 1987a) y la disminución en la ingesta de proteínas y energía (Muramatsu et al. 1987b, Kita et al. 1989), inhiben la síntesis proteica en los pollos. Tras un periodo de ayuno, la realimentación con una comida individual restaura rápidamente la síntesis proteica en el animal completo que estaba deprimida (Aoyagi et al. 1990). A diferencia de lo que ocurre en el ayuno, esta rápida reconversión fue llevada a cabo no por incrementos en la cantidad de RNA (CS) sino por aumento en la eficacia de síntesis de cada RNA (KRNA). Esta activación en la fase de traducción en la realimentación temprana posiblemente sea debida a un aumento en la velocidad de iniciación que se conoce inhibida por el ayuno (Harmon et al. 1984). El incremento en la ingesta de proteínas dietarias produce activación de la síntesis en los cerdos (Reeds et al. 1981), y en las ratas (Laurent et al. 1984) donde además se incrementa la degradación tanto en el animal completo como en el músculo blanco. Resultados similares se han encontrado en aves (Muramatsu et al. 1987b).

Se ha sugerido que la síntesis proteica está estrechamente relacionada con el metabolismo energético, parece ser que parte del incremento en la producción

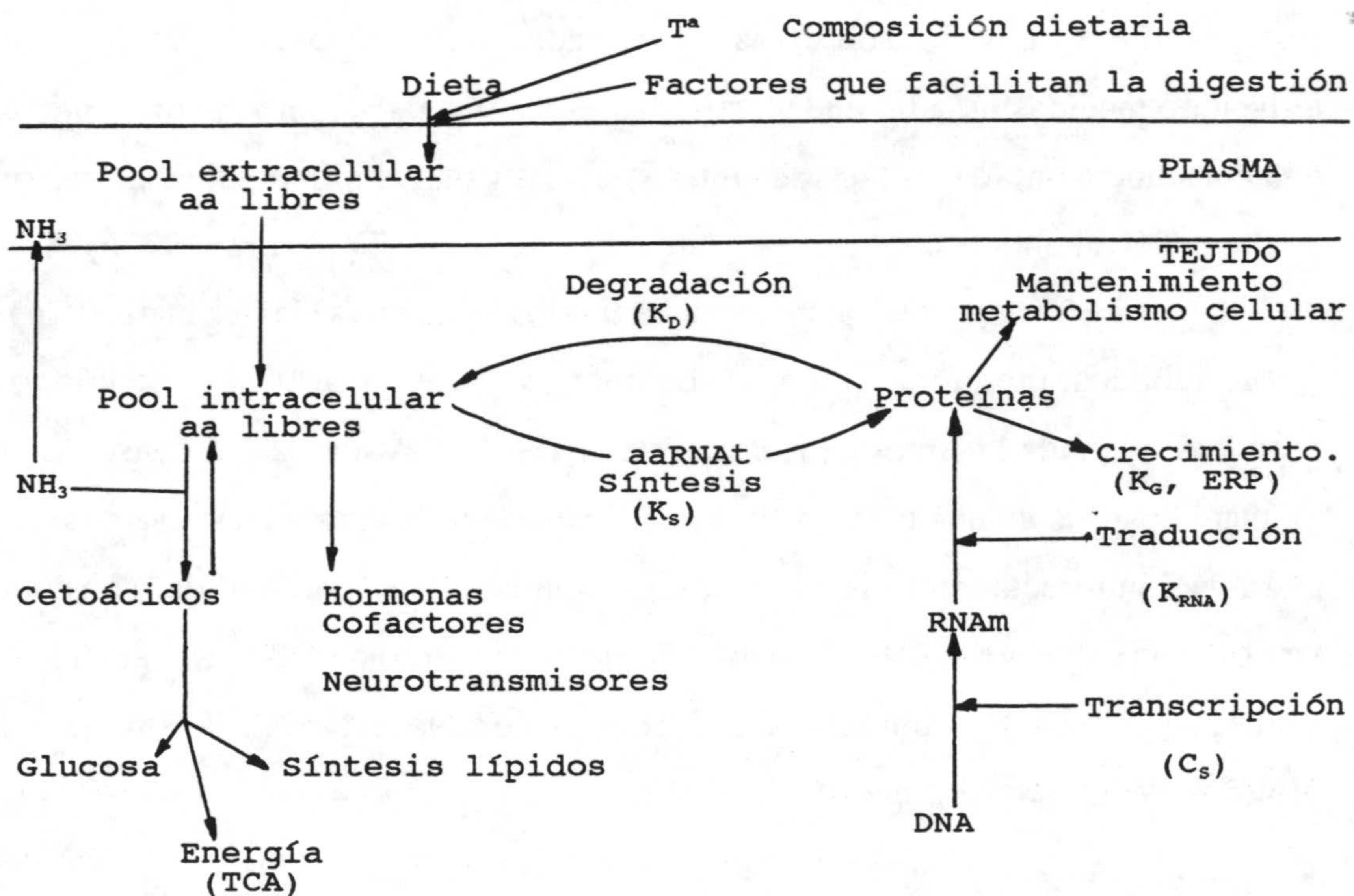
de calor asociado a la ingestión de alimento (Specific Dynamic Action) podría explicarse como un incremento en los gastos energéticos ocasionados por la síntesis de proteínas. (Waterlow et al. 1978, Webster, 1981). Así mientras que en pollos bien alimentados, la síntesis proteica contabiliza del 20 al 28 % de la producción total de calor (Muramatsu y Okumura 1985), en un estado ayunado, la contribución es menor, del 14 al 17 % (Muramatsu et al. 1987a). Los resultados con cerdos demuestran que la producción de calor asociado con el consumo de proteínas podría explicarse por cambios en la síntesis proteica mientras que con el consumo de grasas y carbohidratos, sería peor explicado (Reeds et al. 1982, Garlick 1986).

Kita et al. (1988) encuentra como el aumento en el nivel energético de la dieta, desde 84 a 293 KJ/día, manteniendo constante el aporte proteico en los pollos, producía un incremento en la K_S cuando el aporte energético oscilaba entre 84 y 167 KJ/día, mientras que la respuesta de la K_D fué menos sensible. Aunque encuentran un aumento en la producción de calor cuando la ingesta energética incrementaba de 84 a 167 KJ/día, la contribución de la síntesis a la producción de calor total no se afectaba por variaciones en la ingesta energética.

En general, una ingesta energética restringida, parece reducir la síntesis proteica además de en el animal completo en los cerdos (Rees et al. 1981) y en el hombre (Golden et al. 1977, Garlick et al. 1980b, Winterer et al. 1980), en otros tejidos como la glándula mamaria en la rata (Jansen y Husaker, 1986) y músculo esquelético (Winterer et al. 1980). Al contrario, el exceso energético arroja resultados contradictorios y mientras que Motil et al. (1981) encontraron en el hombre que un exceso en la ingesta energética no modifica la síntesis proteica del animal completo. En el hígado y músculo esquelético de ratas

(Glick et al. 1982) se observa una reducción en la síntesis por sobrealimentación aunque en este estudio existe un aumento en el consumo tanto de proteína como de energía.

Kita et al. (1989) demuestra como al menos en los pollos, el exceso de proteína dietaria reduce la síntesis de proteínas en el animal completo. Posiblemente esta reducción esta relacionada con la alteración del status hormonal del animal, encontrándose en estas condiciones el nivel plasmático de glucagón elevado (Nakano y Herka 1979), el cual tiene un conocido efecto inhibidor de la síntesis proteica (Tavill et al. 1973, Waterlow et al. 1978).



Esquema 1.3. Metabolismo Proteico. Principales rutas de utilización de aminoácidos y su relación con el turnover proteico.

I.2.2. Influencias nutricionales sobre el turnover de proteínas en el hombre.

I.2.2.1. Efecto de la ingesta dietaria.

I.2.2.1.1. Respuesta a una comida.

El incremento en la disponibilidad de aminoácidos que acompaña la administración de una comida estimula la síntesis neta en el hígado y en el músculo en las ratas (Munro 1951) siendo necesario un aporte energético adecuado para poder utilizar eficazmente el nitrógeno ingerido.

Parece que los efectos de la administración de una comida, pueden producir cambios a corto plazo sobre las velocidades de turnover proteico. Así, utilizando medidas basadas en la actividad específica del plasma, para mantener una constancia en los valores de síntesis proteica tras el alimento, es necesario o mantener el aporte continuo de alimento (Golden y Waterlow 1977b) o al menos suministrar cantidades iguales a intervalos frecuentes (James et al. 1976).

Resultados preliminares en el hombre, sugieren que la ingestión de proteínas estimula la síntesis (Waterlow et al. 1978). Midiendo el consumo de oxígeno después de una comida en niños después de la malnutrición se observa una relación directa entre la extensión del aumento post-prandial del consumo de oxígeno y la velocidad de ganancia de peso (Brooke y Ashworth 1972) sugiriéndose que la administración de una comida estimula la síntesis de proteínas y el depósito neto.

I.2.2.1.2.Respuesta a la dieta.

La respuesta del depósito de proteínas a cambios en el aporte proteico y energético es el resultado de cambios en las velocidades de turnover de los grandes pools de proteínas, especialmene del pool de proteínas muscular.

I.2.2.1.2.1. Frecuencia de alimentación.

Tanto en ratas (Garlick et al. 1973) como en cerdos (Danfaer 1980) se ha estudiado el efecto de la frecuencia de suministro del alimento sobre la velocidad de síntesis de proteínas musculares. Un número elevado de comidas produce una velocidad de síntesis proteica elevada y casi constante, mientras que a bajas raciones las velocidades de síntesis muestran grandes variaciones diurnas. Los valores del balance de nitrógeno pueden indicar que estos resultados son la consecuencia de un menor depósito proteico y una utilización menos eficaz de la proteína cuando se aporta el alimento con menos frecuencia (Riis 1983).

Las variaciones diurnas en las velocidades de turnover de proteínas musculares están determinadas aparentemente por efectos hormonales. Variaciones en el aporte exógeno de aminoácidos no ejercen mucha influencia directa sobre el turnover de proteínas musculares. El pool de proteínas hepáticas actua como un tampón frente a tales variaciones en el aporte a otros tejidos (Elwyn 1970).

I.2.2.1.2.2. Papel de la proteína y de la energía.

Tradicionalmente el efecto térmico del alimento se asocia con el contenido proteico de la comida y se denomina Acción Dinámico Específica del alimento (SDA) (Lusk 1928). Comidas ricas en proteínas inducen un gasto energético mayor y más prolongado que comidas ricas en grasas o carbohidratos (Welle et al. 1981, Karst et al. 1984, Nair et al. 1983). Este efecto es atribuido a los altos costes de la síntesis de enlaces peptídicos (Rennie et al. 1982, McNurlan et al. 1987) junto con los costes de la ureogénesis y gluconeogénesis (Flatt 1978). Robinson et al. (1990) determinan la velocidad de recambio proteico y el gasto energético durante un período de ayuno y durante períodos de alimentación con dietas isocalóricas altas en carbohidratos o en proteínas. La respuesta a las nueve horas de alimentación con dietas ricas en proteínas fue mayor que la de la dieta rica en carbohidratos. La velocidad del turnover de nitrógeno en el animal completo sobre nueve horas incrementaba de 17.6 gr en el ayuno a 27.4 g durante la alimentación con carbohidratos (NS) y hasta 58.2 con la alimentación alta en proteína ($p < 0.001$). Usando estimas teóricas, basadas en los requerimientos de ATP, del coste metabólico de la síntesis de proteínas, el 36 % de la respuesta térmica a la alimentación con carbohidratos y el 68 % en el caso de la rica en proteínas, puede contabilizarse por el aumento en la síntesis de proteínas comparado con el estado ayunado. El valor estimado del coste energético de la síntesis de proteína fue de 0.84 Kcal/gr proteína sintetizada, muy cercana al calculado por consideraciones bioquímicas.

Millward et al. (1975, 1976) han determinado la KS en tejidos musculares de ratas sobre varias dietas. En la línea con los resultados iniciales de Waterlow y Stephen (1968) muestran que el bajo aporte proteico y energético produce una

marcada reducción en la K_s . Así en ratas de 23 días alimentadas con un 10 % de proteína, la K_s de 0.29 se convierte en 0.14 en ratas alimentadas al 6.8 % diario (Millward et al. 1975). Bajas ingestas energéticas también reducen la velocidad de síntesis al 50 % (Millward et al. 1976).

En los trabajos preliminares, Picou y Taylor-Roberts (1969) y Golden et al. (1977a) se estudia el comportamiento de las necesidades de síntesis proteica en niños que se recuperan de una malnutrición alimentados con diferentes niveles de proteína dietaria. En estas circunstancias, parece que el nivel de proteína en la dieta no influye sobre la capacidad de síntesis proteica que se mantiene constante, produciéndose el crecimiento por disminución en la velocidad de degradación. La velocidad de degradación disminuye en los alimentados con raciones proteicas más bajas. En las ingestas altas, donde existe balance positivo de nitrógeno, posiblemente las velocidades de retención de nitrógeno y ganancia de peso estén limitadas por el aporte energético (Ashworth et al. 1968, Waterlow et al. 1977). Steffee et al. (1976) estudian el flujo de nitrógeno y la velocidad de síntesis de proteínas en hombres adultos jóvenes alimentados con dos niveles diferentes de ingesta proteica, 1.5 y 0.38 g/kg/día, doce o quince días. Los resultados sugieren que en sujetos normales el nivel de ingesta proteica tiene poco o ningún efecto sobre el turnover de proteínas total. Los niveles energéticos se mantuvieron relativamente constantes. Para estudiar el efecto combinado de la proteína y la energía, Waterlow et al (1978) estudian el turnover de proteínas en pacientes obesos con [U-14C]tyr, [1-14C]leu y [15N]gli que reciben 2000 Kcal (8.4MJ) y 70 gr proteína o 500 cal (2.1 MJ) con o sin 50 gr de proteína, 2 a 3 semanas. Los resultados demuestran que cuando la dieta contenía proteína la reducción en la ingesta energética no provocaba cambios en la velocidad de síntesis. Cuando la baja

ingesta energética no llevaba proteína el turnover caía un 50 % reduciéndose un poco la velocidad metabólica (Sender et al. 1975, Waterlow et al. 1978). Estos resultados parecen contradictorios con los encontrados inicialmente en niños y en adultos normales en los que la ingesta proteica parece no tener efectos. Aunque los sujetos no son comparables, son necesarios más trabajos que aclaren la relación proteína-energía y turnover proteico en el hombre.

La disminución prolongada en la actividad muscular causada por inmovilización o reposo en cama, se asocia con un estado catabólico caracterizado por atrofia muscular, un balance negativo de nitrógeno (Deitrick et al. 1948), y resistencia a la insulina (Lipman et al. 1972, 1970, Stuart et al. 1988), principalmente debida a disminución en la absorción de glucosa estimulada por la insulina en el músculo esquelético (Stuart et al. 1988). Utilizando una técnica de infusión constante de leucina, Stuart et al. (1990), estudian la síntesis y degradación antes y después de siete días de completo reposo en cama. Con una dieta de contenido proteico mínimo, 0.6 gr/kg peso corporal/día, la degradación de proteínas corporales totales se mantuvo sin cambios, pero la síntesis disminuyó. Incrementando la cantidad de proteína (1 gr/Kg de peso corporal/día) en dietas isocalóricas no se encontró influencias del reposo en cama sobre la velocidad de síntesis y degradación. Estas observaciones están de acuerdo con la hipótesis de que un incremento isocalórico de proteínas de cantidades mínimas a generosas puede tener efectos positivos sobre el balance neto de proteínas en parte incrementando la acción estimuladora de la insulina sobre el metabolismo proteico (Stuart et al. 1990).

El efecto de cambios dietarios sobre la degradación de proteínas musculares varía aparentemente con el tiempo de duración de los diferentes regímenes dietarios. En ratas (Waterlow y Stephen 1968, Millward et al. 1975, 1976,

Haverberg et al. 1975) se ha encontrado que la respuesta temprana e inicial a una menor ingesta energética y proteica fué un incremento en la velocidad de degradación de proteína muscular. En ratas y en el hombre (Young et al. 1973, Haverberg et al. 1975, Funabiki et al. 1976) el ayuno y raciones libres de proteína producen una progresiva disminución en la excreción de 3-metilhistidina. Otros estudios con la administración isotópica muestran que una disminución en la degradación de proteínas musculares es parte de una adaptación a un bajo aporte energético y proteico (Waterlow y Stephen 1968, Millward et al. 1976). El tiempo necesario para este cambio adaptativo de incremento a disminución en la velocidad de degradación es aparentemente más largo en animales jóvenes que maduros (Goto y Kametaka 1974). La disminución adaptativa en la degradación de proteínas musculares no inhibe la caída en el balance de nitrógeno con un cambio en el menor aporte proteico, pero por supuesto disminuye el efecto del cambio dietario. Esto no da razones que argumenten frente a la conclusión de que el tamaño del pool de proteínas musculares es determinado principalmente por la velocidad de síntesis (Millward et al. 1976). Resultados de estudios sobre variaciones diurnas en el turnover de proteínas muestran que la síntesis de proteínas muscular es muy sensible al aporte nutricional.

Dos semanas de ayuno total se caracterizan por unas extensas pérdidas de nitrógeno (Cahill 1970, 1971) y un incremento en el turnover de leucina plasmática después de 1 y 3 días de ayuno. Para estudiar la influencia de la depleción de proteínas dietarias previa sobre la pérdida de nitrógeno y el turnover proteico durante un ayuno total, Larivière et al. (1990) miden la cinética de aparición de leucina plasmática y la excreción urinaria de N-3-metilhistidina en sujetos obesos y normales prealimentados con dieta

normal o baja en proteínas. En los sujetos obesos, después de diez días de ayuno, la pérdida de nitrógeno aumenta un 17 % cuando se prealimenta con dietas deficientes en proteínas. El flujo y la oxidación de leucina plasmática del grupo control incrementaba en el ayuno temprano y disminuía a los diez días. Los resultados del grupo de deplección fueron similares en valor absoluto a pesar de la dieta deficiente en proteínas precedente. En otros experimentos con sujetos normales, después de suministrar diez días una dieta libre en proteínas, el flujo de leucina disminuyó un 19 %. Tras tres días de ayuno, el flujo de leucina fue 16 % mayor que en la dieta de mantenimiento, pero 44 % mayor que el valor de la dieta libre de proteínas tres días antes. Estos resultados son compatibles con la posibilidad de que los sucesos metabólicos en el ayuno temprano estén compuestos de la disminución en el turnover de proteínas en algunos compartimentos del cuerpo debido a deficiencias proteicas e incremento en el turnover en otros debido al bajo nivel de insulina (Larivière et al. 1990).

I.2.2.3. Efecto del Estado Nutricional.

Todos los trabajos publicados sobre la malnutrición y el turnover de proteínas se han hecho en niños.

Aunque los primeros trabajos (Picou y Taylor-Roberts 1969) mostraban una altas velocidades de turnover en niños malnutridos, Golden et al. 1977a, demuestra que esto no es así, debiéndose los resultados iniciales posiblemente a una incorrecta planificación experimental. Montgomery (1962) demuestra que el consumo de oxígeno estaba reducido en niños malnutridos pero que se eleva después de pocos días de tratamiento.

La fase de reconversión de la malnutrición se caracteriza por una ganancia de peso a una velocidad 20 veces mayor que la de un niño normal (Ashworth et al. 1968, Ashworth 1969, Waterlow et al. 1976). Las velocidades de síntesis incrementan desde el inicio de la reconversión, incluso antes de apreciarse ganancia de peso (Golden et al. 1977b). Tanto la velocidad de síntesis como la de degradación, están relacionadas con la ingesta energética. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en músculo de rata durante crecimiento rápido. Aunque en estudios iniciales (Golden et al. 1977a) la velocidad de degradación aparentemente disminuye con el incremento en la ingesta proteica. Golden et al. (1977b) muestran como la degradación incrementa como la ingesta energética. Waterlow et al. (1978) especula que cuando la energía es limitante, el organismo se adapta por una reducción en la velocidad de degradación proteica, cuando ni la energía ni la proteína es limitante, las velocidades se determinan por la capacidad del sistema para la síntesis.

I.2.3. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN EL MUSCULO BLANCO.

I.2.3.1. Efectos de una deficiencia moderada y severa de proteína y energía.

I.2.3.1.1. Alimentación y deficiencia total de proteína.

Quizás los cambios mas agudos en la síntesis proteica muscular se den en respuesta a la ingesta de alimento. Garlick et al. 1973 demuestran como en ratas adaptadas a un ritmo de alimentación, cada seis horas, el suministro de alimento venía a prevenir el descenso en la velocidad de síntesis que se producía al trasurrir el tiempo después de la comida, tal que si éste no se suministraba durante un día, al principio del segundo día de ayuno llegaba a ser el 50 % del valor inicial. No se detectaron cambios en la velocidad de degradación, posiblemente debido a que la variabilidad entre animales impidió observar cambios en el crecimiento.

La deficiencia total de proteína, tanto el ayuno como la administración de una dieta sin proteína, se caracteriza por producir una disminución inicial en la KS que posteriormente es acompañada por un cambio paralelo en la KD.

Los cambios en la síntesis y degradación durante un período más prolongado de ayuno (4 días) tanto en ratas jóvenes como adultos mostraron como el descenso inicial en la velocidad de síntesis es el responsable de la parada del crecimiento. Posteriormente y debido a que continua esta tendencia, disminuye también la velocidad de degradación. Así durante las primeras cuarenta y ocho horas no existe pérdida de aminoácidos para la provisión de energía. Tanto en jóvenes como adultos existe disminución en la velocidad de

síntesis. En la rata joven, existe un aumento progresivo de la velocidad de degradación. En el adulto tras cuatro días de ayuno, la velocidad de degradación es doble del valor inicial, aunque menor que en ratas jóvenes, posiblemente esto refleja los relativamente pequeños requerimientos energéticos y los grandes almacenes de grasa en la rata adulta (Waterlow et al. 1978).

La administración de una dieta libre de proteínas durante treinta días, al igual que en el ayuno, provoca una inmediata reducción en el primer día de la KS (Garlick et al. 1975). Durante los próximos ocho días tanto la síntesis, como la degradación disminuyen más o menos igual, de manera que en este período no existen pérdidas de proteínas musculares. Así cuando el aporte de proteínas es deficiente existe un período inicial antes de que el músculo empiece a perder cantidades significativas de proteínas. A los treinta días la velocidad de síntesis ha caído bastante, manteniéndose sin cambios la velocidad de degradación, existe una pérdida neta de proteína del 3 % día.

El ayuno disminuye la síntesis proteica en el músculo esquelético de ratas lactantes jóvenes más rápidamente que en las lactantes viejas o destetadas aunque la capacidad de síntesis disminuya por igual en los dos tratamientos. La síntesis de proteínas se mantiene resistente al ayuno en el músculo soleo hacia el final del período de lactancia en asociación con la maduración de la función locomotora. Los cambios en la KS fueron paralelos a los de la KRNA (Davis et al. 1991).

Caster et al. (1984) sugieren que la depleción proteica producida por la alimentación con dieta libre de proteína, disminuye la capacidad de las ratas para incrementar el turnover de proteínas muscular en respuesta a la T3.

Magnusson et al. (1990) estudiando la síntesis proteica en músculo esquelético durante el ayuno y la realimentación, encontrando que además de

la disminución en la velocidad de síntesis en animales ayunados (40 %), dos horas de realimentación provocan un "overshoot" en la síntesis proteica del orden del 135 %. Aunque el contenido en RNA disminuyó durante 36 horas de ayuno un 33 %, de 21.6 hasta 14.5 mg/g proteína, tras 24 horas de realimentación permanece bajo, 14.8 mg/g proteína.

Se cree que los cuerpos cetónicos pueden jugar un papel en la economía proteica del músculo esquelético en animales y humanos bajo condiciones catabólicas tales como el ayuno prolongado (Robinson y Williamson 1980, Sherwin et al. 1975). Se ha sugerido que estos compuestos inhiben la degradación de proteínas en el músculo esquelético (Newsholme y Leech, 1983) aunque su influencia sobre la síntesis no se haya concretado suficientemente. Wu y Thompson (1989) concluyen que los cuerpos cetónicos disminuyen la velocidad de síntesis proteica en músculo esquelético de pollos alimentados y ayunados así como la velocidad de degradación de proteínas en músculos de pollos alimentados disminuyendo la concentración de glutamina por un aumento en su oxidación.

I.2.3.1.2. Deficiencia moderada de proteína y energía.

En experimentos en los que se restringe la ingesta proteica o energética, inicialmente parece que es la propia velocidad de crecimiento del animal la que determina la magnitud de la velocidad de degradación.

Heard et al. (1977) someten a ratas jóvenes a dos tratamientos caracterizados por el aporte restrictivo de proteína; el alimentar ad libitum con dietas con el 3.5 % de proteína o bien dar raciones restringidas de dietas al 10 % de proteína. Ninguno de los regímenes produjo una pérdida de proteína

muscular. La respuesta del músculo es una reducción en la velocidad de síntesis muy rápida. Esta reducción se acompaña al menos en los estadios iniciales por una disminución en la velocidad de degradación.

Teniendo en cuenta que en el músculo, altas velocidades de degradación coinciden con altas velocidades de crecimiento y que la degradación disminuye a medida que disminuye el crecimiento, parece que es el crecimiento por él mismo el inductor de las altas velocidades de degradación. La reducción encontrada por la deficiencia dietaria lleva la velocidad de degradación a estar cercana al valor de mantenimiento encontrado en ratas que crecen completamente y a veces por debajo de este como en las ratas con ingesta restringida (Waterlow et al. 1978).

Sin embargo, otros experimentos demuestran como velocidades de crecimiento bajas son compatibles con velocidades de recambio proteico similares a las encontradas en animales controles. Stewart et al. (1975) utiliza una raza de ratas caracterizadas por habersele suministrado durante veinte generaciones la dieta necesaria para cubrir los requerimientos proteicos de animales adultos salvo la reproducción, lactación y crecimiento. Son ratas que nacen pequeñas con alta mortalidad y crecen lentamente hasta alcanzar el tamaño adulto que es el 50 % del tamaño normal. Al principio, el patrón de crecimiento muscular es muy lento, incrementando hasta los cien días de edad, aunque nunca llegan a igualarse a los controles. Aunque las velocidades de síntesis y degradación en los primeros dos meses son mucho menores que en animales controles, a los 4 meses se van equiparando y en el tiempo en que crecen completamente son de la misma magnitud. Las bajas velocidades de degradación en estos animales son una respuesta adaptativa, ocurriendo el crecimiento incluso cuando la síntesis está reducida (Waterlow et al. 1978).

Adeola et al. (1989) encuentran una estrecha relación entre la concentración de la proteína dietaria y la actividad de la ATPasa dependiente de Na y K y el consumo de O₂, de forma que la inducción de la actividad ATPasa está estrechamente asociada con incrementos en la velocidad de síntesis proteica inducida en estas condiciones de altos aportes proteicos.

I.2.3.1.3. Cambios en la expulsión de 3-metilhistidina.

En general, los cambios encontrados en la degradación de proteínas musculares descritos anteriormente están soportados por las evidencias obtenidas de la excreción de 3-metilhistidina en las ratas (Haverberg et al. 1975) y en el hombre (Young et al. 1973) durante el ayuno y la deficiencia proteica. De acuerdo con los resultados obtenidos por una infusión constante (Garlick et al. 1975) existe una progresiva disminución en la velocidad de turnover de proteínas contractiles.

En ratas con una ingesta energética severamente disminuida, la expulsión de metilhistidina alcanza los valores más altos que en ninguno de los controles.

Nishizawa et al. (1977) estudia la excreción de metilhistidina en ratas alimentadas incrementando la proteína dietaria de 10 a 60% y con cantidades de alimento restringidas en todos los casos para que no existan diferentes velocidades de crecimiento. La excreción de 3-metilhistidina aumenta al aumentar la ingesta proteica lo que implica que la K_D aumenta al aumentar la masa muscular. Estos resultados parecen difíciles de justificar. Waterlow et al. (1978) no encuentran aumentos en el turnover de proteínas en animales alimentados con el 60 % de proteínas, pero también es cierto que no se le redujo la ración.

I.2.3.1.4. Cambios en las velocidades de síntesis de fracciones de proteínas musculares.

La deficiencia proteica parece que afecta por igual a las diferentes fracciones de las proteínas musculares, tal que parece que se mantiene constante la relación entre la fracción citoplasmática y la miofibrilar.

La mayoría de los estudios indican que en ratas malnutridas, el colágeno se acumula a velocidades cercanas a las normales (Mendes y Waterlow 1958, Anasuya y Narasinga Rao 1970).

Widdowson et al. (1960) muestran que durante un período de malnutrición crónica existen pocos cambios en la cantidad relativa de la fracción sarcoplasmática y miofibrilar. Dickerson y McCance (1960) encuentran resultados similares en gallos, pero además que en condiciones de malnutrición muy severa en animales viejos, tal que existe una pérdida de 90 % de proteína intracelular la pérdida en las dos fracciones fué casi idéntica. Aunque Yamaguchi y Kandatsu (1967) recoge pérdidas semejantes en ratas deficientes, ellos encuentran las pérdidas mayores en la fracción sarcoplasmática. En los trabajos de Millward et al (1974), tampoco se alteran las cantidades relativas de ambas fracciones ni en el ayuno ni en la realimentación.

El mantenimiento de una composición constante durante el crecimiento o atrofia de una mezcla de proteínas con diferentes velocidades de turnover puede solo producirse por cambios en sus velocidades relativas de síntesis y/o degradación.

Waterlow et al. (1978), miden las velocidades relativas de síntesis de proteínas sarcoplasmáticas (S) y actomiosina (A) en ratas de diferentes edades en animales alimentados (en crecimiento) y tras una noche de ayuno. Durante

el ayuno nocturno el cociente de las velocidades de síntesis de las dos fracciones (S/A) fué 2 para todas las edades salvo las más jóvenes que fué 1.72. El hecho de que a medida que incrementa la velocidad de crecimiento las velocidades de síntesis de las dos fracciones tienden hacia un valor similar puede explicar que algunos autores encuentren velocidades similares de síntesis para estas diferentes proteínas. Al crecer las ratas, la relación disminuye como resultado de un mayor aumento en la velocidad de síntesis de actomiosina. El ayuno de cuatro días implica la pérdida de proteínas y una mayor disminución en la velocidad de síntesis de actomiosina. En otras palabras, la velocidad de síntesis de la fracción con el turnover proteico menor es más sensible a cambios nutricionales. Resultados similares se han recogido en corazones fetales mantenidos en cultivo (Wildenthal et al. 1976).

Tales cambios son importantes para mantener la composición constante. Pueden ocurrir también cambios en las velocidades de degradación que se incrementa marcadamente en respuesta al ayuno prolongado.

Cambios en las velocidades relativas de síntesis pueden producirse por alteraciones en el número relativo de moléculas de RNAm específicos así como en la velocidad de traducción (Lodish 1974).

I.2.3.1.5. El efecto de la malnutrición sobre el contenido de DNA muscular y sobre la síntesis por unidad de DNA.

Cheek y Hill (1970) encuentran en ratas con una restricción energética pero un adecuado aporte proteico, disminuye la velocidad de incremento del DNA muscular pero no la relación proteína/DNA, implicando una mayor sensibilidad de la formación de nuevos núcleos a la restricción energética que el depósito

proteico.

La acumulación de DNA en el músculo es también sensible al contenido de proteína dietaria, Mendes y Waterlow (1958) encuentran un rápido aumento en el DNA total tras la realimentación, no existen cambios en animales mantenidos a bajas raciones durante veintiocho días. Howarth (1972) alimentando a ratas con dietas con el 6 % de proteína dietaria el incremento en el DNA del músculo gastronómico se inhibía completamente mientras que el crecimiento en la proteína muscular no estaba completamente suprimido. Trenkle (1974) encuentran que la restricción proteica y energética inhibe la síntesis de DNA en músculo, siendo esta más sensible a estas deficiencias que la acumulación de proteína.

Waterlow et al. (1978) encuentran en ratas malnutridas la velocidad de incremento en el DNA es menor que en los controles particularmente en el destete (30 días de edad). Como resultado, al año existe un déficit del 40 % en el DNA muscular total. El tamaño de la unidad de DNA, nunca fué menor que el valor control. La KDNA solo fué deprimida en ratas muy jóvenes. En estas ratas, la proliferación nuclear durante el destete se inhibió y los núcleos existentes fueron menos activos. Esta actividad reducida resultado de una relación RNA/DNA reducida, así como de una incapacidad para alcanzar las altas velocidades de síntesis por unidad de RNA observadas en animales bien alimentados. El efecto combinado fué una reducción del 75 % en la KDNA a los 30 días de edad. Porque la KDNA en las demás edades era normal, la limitación de la K_s que determina la disminución en el crecimiento fué el resultado de un insuficiente número de núcleos.

Todo ello está de acuerdo con lo que ocurre cuando existe una malnutrición más severa cuando se suprime el crecimiento enteramente y se induce la

pérdida de proteínas se, el tamaño de la unidad de DNA disminuye y las velocidades de síntesis de proteínas por unidad de DNA (K_{DNA}) disminuyen. En este caso los nucleos existentes son menos activos (Waterlow et al. 1978) .

La malnutrición durante la preñez y la lactación produce un deterioro permanente del crecimiento, mientras que el efecto de la malnutrición después del destete parece que no es irreversible quedando siempre la posibilidad de recuperarse (McCance y Widdowson 1974, Widdowson y McCance 1975, McCance 1976).

Parece pues, que el principal determinante del tamaño muscular es el número de unidades de DNA, es decir el contenido total de DNA, mejor que el tamaño de la unidad de DNA.

I.2.3.1.6. Efectos de la malnutrición sobre el contenido de RNA y sobre la síntesis por unidad de RNA.

I.2.3.1.6.1. Cambios en la concentración de RNA.

Young (1970, 1974) encuentra que la concentración de RNAr cambia paralelamente con RNA tisular total en el músculo en respuesta a una deficiencia proteica. Esto junto con que el RNAr representa al menos el 80 % del RNA total, hace que podamos asumir que los cambios en la concentración de RNA tisular total reflejen las alteraciones en la concentración de ribosomas o capacidad de síntesis proteica.

De los estudios de Howarth y Baldwin (1971) y Waterlow et al. (1978) se deduce que la concentración de RNA es muy sensible a cambios en las condiciones dietarias, incluso más que la pérdida de proteínas.

Young y Alexis (1968) demuestran que las concentraciones ribosómicas se reducen en músculos de ratas deficientes en proteínas asociándose con disminución en la actividad ribosómicas in vitro. Howarth y Baldwin (1971) recogían que en ratas alimentadas con cantidades restringidas de una buena dieta durante 3 semanas la concentración de RNA muscular se redujo un 60 % y rápidamente fué restaurada por la realimentación. Howarth continua este estudio, ensayando el efecto de la concentración de proteína dietaria sobre la acumulación de RNA y proteína en el músculo. La concentración de RNA fué muy sensible a la ingesta proteica. Una dieta libre de proteína inducía la pérdida de solo el 20 % de proteína muscular a los 14 días, pero el 65 % del RNA se perdió. Aunque alimentando a ratas con dietas con el 6 % de proteína, existía ganancia de proteína a velocidad reducida, se produce una caída en la concentración de RNA muscular. A elevadas concentraciones de proteína dietaria, la acumulación de RNA ocurre a velocidades elevadas.

Waterlow et al. (1978) estudian los efectos del ayuno y la realimentación en ratas bien alimentadas así como los efectos de largos períodos de deficiencia proteica y energética. La concentración de RNA muscular responde a cambios dietarios agudos. En ratas alimentadas existen cambios diurnos. Durante el ayuno, el contenido en RNA cae inmediatamente, provocando una rápida caída en la relación RNA/proteína. A medida que continua el ayuno, la pérdida de RNA es paralela a la pérdida de proteínas, por lo cual la relación RNA/proteína cesa en su caída. Las pérdidas pueden ser muy extensas. Después de tres semanas en una dieta baja en proteínas, un régimen libre de proteína o bajo en energía la relación RNA/proteína disminuye un 60 %, mientras que largos períodos inducen pérdidas del 75 %.

I.2.3.1.6.2. Cambios en la actividad del RNA (K_{RNA}).

El primer intento de combinar las medidas de los cambios en la concentración de RNA y la actividad en términos cuantitativos fué el de Henshaw et al. (1971). Midiendo la velocidad de síntesis con un método basado en una única inyección masiva de $[^{14}\text{C}]\text{lys}$, demuestran que el ayuno reduce el RNA muscular un 30 % pero existe una disminución mucho más marcada en la actividad del RNA (entre la mitad y la cuarta parte de éste). El ayuno producía una disminución de la KS del 8 al 2 % por día en algunos casos, de ahí que concluyese que los cambios en la actividad del RNA sea el principal factor que controle la síntesis proteica muscular. También encontraron un considerable grado de variabilidad en sus valores controles para la actividad del RNA estrechamente correlacionados en una cierta extensión con la diversidad de las velocidades de crecimiento de las ratas. Los valores de la actividad del RNA encontrados por este método son bastante menores que los obtenidos por el método de una infusión constante para el músculo aunque los del hígado son muy similares (Waterlow et al. 1978).

Bergen (1974) usa también esta técnica en dos experimentos sobre los efectos de la dieta sobre la síntesis proteica en músculo e hígado. El suministro de una dieta alta o baja en grasa influye sobre el crecimiento, así como los valores obtenidos para la actividad del RNA fueron similares a los recogidos por Henshaw et al. (1971). Aunque en el segundo experimento los valores controles fueron mayores, la restricción dietaria de la ingesta energética parece reducir la actividad del RNA aunque no significativamente.

Waterlow et al. (1978), encuentran que la actividad del RNA se deprime más por la deficiencia energética que por la carencia de proteína. Solo las ratas

ayunadas 2 ó 4 días o alimentadas con la dieta restringida (baja en energía) fueron significativamente menores que en los controles, no siendo este el caso de animales alimentados con dietas libres de proteína (valores dentro del amplio rango de los controles aunque muy cercanos al límite de la significancia) posiblemente debido al amplio rango de variabilidad de los valores controles. No encontraron valores tan pequeños como los encontrados por Henshaw et al. (1971). Concluyen que la concentración de RNA en el músculo es muy sensible a la restricción dietaria, disminuyendo progresivamente con el tiempo. La actividad RNA por el contrario cambia abruptamente con un nuevo nivel reducido el cual en general no disminuye mucho después.

En animales jóvenes malnutridos durante algunas generaciones no se encontró la alta actividad del RNA encontrada en animales controles. La relación RNA/proteína disminuía a medida que los animales eran mayores pero no existen muchas diferencias entre los malnutridos y los bien alimentados.

I.2.3.1.6.3. Mecanismos productores de los cambios en la concentración y actividad del RNA.

No están claros los mecanismos por los que la concentración de RNA muscular se reduce por la malnutrición. Los cambios en la actividad ribosómica tienden a ocurrir más rápidamente que los cambios en su concentración, lo cual hace tentador especular que los efectos sobre la síntesis y/o degradación de ribosomas son secundarios a una disminución inicial en la síntesis a nivel de la eficacia de traducción, p.e. en el hígado la pérdida de RNA que ocurre tras una deficiencia proteica es al menos en parte, el resultado de un incremento en la velocidad de degradación del RNA (Enwonwu y Munro 1970). Munro (

sugiere que estos cambios podrían producirse por un aumento en la proporción de ribosomas en la forma de monómeros y subunidades nativas, partículas que podría esperarse sean más susceptibles a la degradación que los polisomas. Produciéndose así una disminución en la iniciación tendiendo a la desaparición de los polisomas. Otros posibles efectos secundarios sobre la producción de ribosomas podrían ser la influencia de las proteínas ribosómicas específicas necesarias tanto en la transcripción y procesamiento del RNAr como en la formación ribosómica.

La indentificación de la fase limitante de la velocidad que produce el efecto sobre la actividad de los ribosomas musculares necesita el estudio de los componentes subcelulares del aparato de síntesis proteica.

El desarrollo de mejoras en las técnicas de aislamiento de ribosomas musculares (Heywood et al. 1967, 1968, Chen y Young 1968, Earl y Morgan 1968) estimulan muchos estudios sobre la actividad de ribosomas musculares incubados in vitro.

Young y Alexis (1968) encuentran que al suministrar una dieta con solo el 3 % de proteína dietaria durante seis días, los ribosomas musculares tienen solo el 50 % de la actividad de los controles. Se relacionó este descenso con la disminución en la agregación de polisomas (Young y Alexis, 1968; Young et al. 1968). Von der Decken y Omstedt (1970) recogen una disminución similar de ribosomas de ratas alimentadas con una dieta libre de proteínas restaurándose la actividad tras un día de realimentación con una buena dieta. Otros trabajos posteriores han observado resultados similares con ribosomas musculares de ratas deficientes en proteínas (Howarth y Baldwin 1971). Más recientemente Jefferson ha descrito un incremento en la proporción de subunidades en músculo de ratas ayunadas, indicando una disminución en la agregación

ribosomal (Li y Jefferson 1977).

El imbalance de aminoácidos tiende a producir una caída en la concentración de aminoácidos del tejido y por esto puede esperarse que afecte a la síntesis de proteína muscular. Sidransky y Verney (1967) encuentran una reducción en la actividad de ribosomas musculares de ratas alimentadas con dietas deficientes en Thr, aunque otros autores fueron incapaces de demostrarlo in vivo (Yoshida et al. 1966, Benevenga et al. 1968). Von der Decken y Omstedt investigando el efecto del valor biológico de la proteína sobre la actividad ribosomal encuentran que la actividad ribosomal refleja los cambios en ese valor biológico de la proteína (Omstedt y Von der Decken 1972, 1974, Von der Decken y Omstedt 1972, Omstedt et al. 1973). También encuentran que dietas basadas en mezclas de aminoácidos deficientes en lys, met o thr producen ribosomas menos activos y que la actividad podría restaurarse añadiendo el aminoácido que falta a la dieta.

Los estudios de ribosomas aislados presentan dos serios problemas: i) la velocidad de síntesis de proteínas de estos ribosomas aislados no es la misma en el animal intacto ya que la mayoría de estas preparaciones no pueden iniciar nuevas cadenas polipeptídicas (Henshaw et al. 1971). Siendo particularmente seria en el músculo. ii) El rendimiento de estas técnicas es muy bajo (Chen y Young 1968), de forma que queda la duda de la representatividad de las observaciones in vitro.

I.2.3.1.6.4. Cambios en la actividad y niveles de factores específicos.

Rannels et al. (1976) encuentran que en el músculo esquelético de ratas ayunadas la actividad del factor de iniciación eIF2 cae, aunque cuando se

expresa por mg RNA no existen cambios durante el ayuno. Esto hace que se sugiera que la pérdida de actividad del eIF2 extraíble es parte de una disminución coordinada en la cantidad del aparato de biosíntesis de proteínas. Rannels et al (1977) confirman esta hipótesis ya que la estimulación aguda por la insulina de la iniciación de la cadena polipeptídica no es acompañada por aumentos en la actividad del eIF2 extraíble.

Los trabajos de Young y colaboradores (Alexis et al. 1972, Alexis y Young 1973, Alexis et al. 1974, Young 1976) sugieren que un fenómeno similar ocurre con el factor de elongación EF2. Encuentran que la diferencia en la actividad de síntesis proteica en ribosomas de músculos controles y malnutridos se eliminan si se retiraba proteínas ribosómicas por tratamiento con tampones de elevada fuerza iónica, correlacionándose con disminuciones en la concentración del EF2 aunque al igual que el eIF2, era paralelo a cambios en el contenido ribosómico.

Otra posibilidad es que el grado de carga del RNAt se reduzca en la malnutrición regulando así la iniciación (Manchester 1976) y la elongación.

Stephen (1968) recoge que no existen cambios en la actividad de los enzimas que activan los aminoácidos (aminoacil-RNAt transferasas) en músculos de ratas deprimidas en proteínas aunque la actividad aumenta en hígado en la malnutrición, tanto en la rata (Mariani et al. 1963, Gaetani et al. 1964) y en el niño (Stephen y Waterlow 1968). Alexis y Young (Young 1974) confirman los resultados de Stephen no encontrando cambios en la actividad de la leu- y lis-RNAt sintetasas semi purificadas. Esto significa que en ratas deprimidas en proteínas debido a la pérdida de ribosomas se incrementa relativamente las actividades de estos enzimas cargadores. Debido a esto, los estudios realizados in vitro no han podido indentificar las etapas particulares

encargadas de limitar la velocidad de síntesis proteica en músculo como resultado de una deficiencia dietaria.

I.2.3.2. Concentración de aminoácidos y turnover proteico en el músculo.

El hecho de que tanto en niños malnutridos (Holt et al. 1963, Whitehead y Dean, 1964) como en ratas alimentadas con dietas bajas en proteínas (Adibi et al. 1973, Lunn et al. 1976a, Heard et al. 1977) se produzcan reducciones en los niveles plasmáticos de aminoácidos esenciales y en particular los aminoácidos de cadena ramificada, dan la idea de que la concentración de aminoácidos puede ser limitante de la velocidad de síntesis proteica. No es fácil determinar la extensión de las bajas concentraciones de aminoácidos toleradas antes de que se inhiba la síntesis proteica.

In vivo, no existen evidentes relaciones entre la depresión en la síntesis y reducción en la concentración de aminoácidos. Los resultados de Wannemacher y Allison (1968) y Garlick et al.(1975) obtenidos en situaciones experimentales en las que el animal ha perdido hasta el 30 % bien del peso corporal o bien del nitrógeno muscular, demuestran que en estas deplecciones severas, una reducción del 80 % en la K_s del músculo fué acompañada por solo una pequeña caída en la concentración de aminoácidos esenciales totales. En el hígado la caída en la concentración de aminoácidos fué mayor, coincidiendo con un aumento en la K_s . Otros resultados (Millward et al. 1975) de una deprivación menos severa están de acuerdo con estas conclusiones.

En situaciones de ayuno (Adibi y Drash 1970, Adibi 1971, Millward et al. 1974), deficiencia energética (Millward et al. 1974) y en situaciones en las que el crecimiento está inhibido por una alteración del balance hormonal (diabetes,

hipofisectomía y tratamiento con glucocorticoides, Millward et al. 1976) la concentración de aminoácidos de cadena ramificada incrementaba.

Al alimentar a las ratas con cantidades de proteína sobrantes, las concentraciones de aminoácidos aumentaban un 30 % pero no se observó ningún efecto ni sobre el crecimiento ni sobre las velocidades de síntesis proteica (Waterlow et al. 1978).

Giovanetti y Stothers (1975) en experimentos con diferentes fuentes proteicas muestran como situaciones caracterizadas por la mayores velocidades de crecimiento coinciden con las concentraciones menores concentraciones de aminoácidos.

En trabajos con preparaciones de musculo esqueletico y cardiaco perfundido se demuestra también que en situaciones donde la síntesis proteica está muy baja (carencia de insulina) coinciden con altas concentraciones de aminoácidos limitantes de la velocidad (Jefferson et al.1977).

No existen pues evidencias de que haya una relación entre las concentraciones de aminoácidos y la velocidad de síntesis. Altas o bajas concentraciones de aminoácidos pueden asociarse con altas o bajas velocidades de crecimiento y síntesis proteica. Deben existir otros factores implicados en la regulación de la síntesis proteica en el músculo diferente al de los aminoácidos (Waterlow et al. 1978).

I.2.3.3. La regulación de la degradación de proteínas musculares.

Se pueden distinguir dos tipos de respuesta de la degradación de proteínas musculares in vivo. En el primer diseño, los cambios a los que se ve sometida la velocidad de degradación són paralelos a los que sufre la velocidad de

síntesis y cambios en ambas velocidades se dan en la misma dirección. Ejemplos de esto son las altas velocidades de degradación y síntesis que caracterizan el crecimiento rápido en animales jóvenes y en músculos mantenidos en hipertrofia. Por otra parte, la respuesta al aporte deficiente de energía y proteína, en el cual la velocidad de degradación parece caer mano a mano con la síntesis.

La cuestión clave es si la velocidad de degradación de proteínas muscular está unida en alguna manera o determinada por la velocidad de síntesis. Esto eleva la pregunta general de si es posible visualizar un sistema autoregurable del turnover proteico en el cual una alteración en la velocidad de síntesis se compensa automáticamente por cambios compensados en la velocidad de degradación.

El segundo diseño de respuesta es el incremento en la degradación de proteína muscular que ocurre en un estress nutricional más extremo, tal como un ayuno prolongado y quizás en una infección traumática o severa. Entonces la velocidad de degradación va en dirección opuesta a los cambios en la síntesis. Aunque son pocos los estudios que relacionan turnover proteico e injuria.

El turnover de proteínas muscular en el ayuno, muestra que estos dos diseños se aunan en otro. En la rata, en un primer estado existe una disminución en la K_S sin cambios en la K_D suprimiéndose el crecimiento en animales jóvenes. Esta es la respuesta inmediata a una severa restricción proteica y energética que puede persistir durante varios días. Períodos más largos de restricción producen un segundo estado en el cual existe una posterior caída en la síntesis acompañada por una disminución en la velocidad absoluta y relativa de degradación. Una pérdida neta de proteína puede ocurrir incluso

cuando la KD está reducida ya que la KS estará reducida incluso mas. Cambios similares se inducen cuando el crecimiento se suprime por la diabetes o hipofisectomia mejor que por restricción dietaria. La caída en la excrección de 3-metilhistidina observada en el ayuno, sugiere que esta respuesta ocurre tambien en el hombre (Young et al. 1973).

El tercer estado representa el tradicional estado hipercatabólico en el que existe un marcado incremento en la degradación, mientras que la síntesis permanecía baja. En la rata, esto ocurre solo después de algunos días de ayuno o como resultado de la restricción proteica y energética combinada (Haverberg et al. 1975). Este tipo de respuesta no se ha descrito en otros órganos. La señal para el aumento en la degradación en el ayuno e injuria no se conoce. En ambas condiciones la concentración de glucocorticoides en el plasma están elevadas. En el ayuno el nivel de insulina es bajo, no así en la injuria, aunque la sensibilidad a esta hormona esté disminuida.

Los experimentos realizados in vitro (Fulks et al. 1975, Rannels et al. 1975, Jefferson et al. 1974, 1977) indican que tanto la insulina como los aminoácidos suprimen la degradación incluso in vivo, en ayunos iniciales y en deficiencias proteicas, cuando la concentración de insulina es baja, la K_D del músculo cae. Aunque se ha propuesto un papel regulador de los aminoácidos de cadena ramificada, en unas situaciones aumentan y en otras disminuyen.

I.2.3. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER DE PROTEINAS HEPATICAS.

I.2.3.1. Efectos agudos del cambio dietario.

El hígado es probablemente el único entre los tejidos y órganos en que su contenido proteico puede cambiar continuamente. Por su situación, recibe la perfusión cíclica de aminoácidos y sustratos energéticos. Dependiendo la extensión y frecuencia de dicho aporte del diseño alimenticio.

En respuesta a comidas que contienen proteínas, el contenido de proteínas hepático aumenta un 25 % y empieza a disminuir de nuevo después de 18 horas. El incremento en el peso de los hígados parece ocurrir antes del incremento en proteínas, aumentando el peso un 27 % con las primeras seis horas, mientras que las proteínas permanecen constantes, implicando una laguna en la respuesta anabólica al aporte de aminoácidos dietarios. En las ratas que se les da la comida libre de proteínas existe una caída estable en las proteínas hepáticas totales (Millward et al. 1974 y Waterlow et al. 1978).

Asociados con estas variaciones existen cambios en la actividad de enzimas hepáticos. Quizás el mayor ejemplo es el de la TAT que se induce por la ingestión cíclica de proteínas (Fishman et al. 1969).

Para discutir el turnover de proteínas en el hígado es particularmente necesario tener en mente la existencia de dos tipos de proteínas: las fijas y las exportables. Cambios en la KS de proteínas hepáticas fijas se midieron sobre períodos de 6 horas a lo largo del día por el método de la infusión constante (Waterlow et al. 1978). Mientras que la síntesis proteica permanece casi constante, la velocidad de degradación se ve marcadamente afectada por la

ingesta de alimento, suprimiéndose completamente después de una comida. Medidas de dilución del marcaje durante períodos cortos, 6 horas, han confirmado esta conclusión (Augustine y Swick 1977). Uno puede por esto cuestionar el concepto de que el hígado está en un estado estacionario en animales bien alimentados, depende del diseño de ingesta de alimento (?).

La K_s de las proteínas hepáticas parece mantenerse incluso en animales ayunados o alimentados con una dieta libre de proteínas para períodos superiores a 48 horas. La conclusión es que la síntesis de proteínas hepáticas fijas no es sensible al aporte de proteína y energía a corto plazo y que los cambios en la masa de proteínas son resultado de cambios en la K_D . Esta conclusión está soportada por los experimentos de Mortimore y colaboradores sobre hígados perfundidos (Mortimore y Ward 1976). Ellos demuestran que la pérdida neta de proteínas hepáticas ocurre en ausencia de insulina y aminoácidos, producida por un aumento en la velocidad de degradación con poco o sin cambios en la velocidad de síntesis.

McNurlan et al.(1979), utilizando un método de una única inyección masiva de [^{14}C]leucina encuentra que el ayuno de dos días produce una disminución en la velocidad total de síntesis de proteínas hepática tanto en el hígado (del 87 al 62 %) como en la mucosa del yeyuno (del 136 al 105 %). La presencia de insulina o aminoácidos en el perfusado produce solo pequeños incrementos en la síntesis.

El hecho de que un influjo de aminoácidos dietarios parece tener poco efecto sobre la síntesis de proteínas hepáticas es poco sorprendente, especialmente desde que Fischman et al. (1969) recoge cambios diurnos en los perfiles polisómicos con aumento en la agregación en la noche. Una explicación para esto podría ser un incremento selectivo en la síntesis de proteínas

exportables después de una comida que no se mostrarían en medidas hechas con infusión de seis horas. Sin embargo no existen evidencias de que esto ocurriese.

Las ratas deplecionadas en proteínas responden a la realimentación con un incremento inmediato en las proteínas, DNA y RNA hepáticos. La masa de proteínas hepáticas aumenta un 28 % durante el primer día. La K_S fué más alta que la control y permaneció sin cambios durante el primer día. Por eso, el aumento inicial en el contenido en proteínas se producirá por una reducción en la K_D (Waterlow et al. 1978).

Conde y Scornick (1976) tras la realimentación de ratas sometidas a condiciones nutricionales deprimidas en proteínas, encuentran que al principio de la realimentación, los hígados habían perdido el 50 % de sus proteínas y estaban aún en balance negativo de nitrógeno, la velocidad total de síntesis de proteínas fijas y exportables era 72 % de las ratas controles. Resultado de una caída en la actividad del RNA ya que la relación RNA/proteína (C_S) se mantuvo sin cambios. La realimentación induce un rápido e inmediato incremento inmediato en la masa de proteínas hepáticas que es más del doble en dos días, asociado con un aumento en la K_S . La actividad del RNA vuelve a su valor normal y la RNA/proteína aumenta. La degradación se encontraba reducida durante la realimentación. El hecho de que la K_G fuese mucho mayor que la K_S implica una caída en la K_D . Estos, junto con experimentos posteriores (Amils et al. 1977) hacen suponer que la caída en la degradación que caracteriza el hígado en crecimiento rápido es un fenómeno general que afecta a todas las proteínas, incluso las anormales, y no representa la suma del turnover de proteínas individuales controladas separadamente.

El incremento en la síntesis total en la realimentación, probablemente implique un incremento en la síntesis de proteínas exportables (Morgan y Peters

1971, Kirsch et al. 1968).

Los cambios agudos en el turnover de proteínas hepáticas se pueden resumir como sigue:

- La K_S de proteínas fijas parece ser insensible a la ingesta dietaria. La K_D varía a través del día, regulando la respuesta de la masa de proteínas hepáticas a la ingesta o ausencia de alimento.

- Cuando previamente ratas malnutridas se realimentan existe un dramático aumento en la masa de proteínas hepáticas. Esto resulta al menos en parte de un incremento en la síntesis de proteínas hepáticas fijas. Existe probablemente también una caída en la degradación aunque esta evidencia no está demostrada claramente.

- La síntesis de albúmina disminuye cuando se restringe la ingesta dietaria, pero no sabemos la rapidez de la respuesta y si la velocidad de síntesis varía en relación a comidas normales. Cuando animales deprimidos se realimentan, la síntesis de albúmina es pronto restaurada a velocidades normales o supernormales.

1.2.3.2. Efectos de la deficiencia prolongada sobre el turnover de proteínas sintetizadas en el hígado.

La rápida velocidad de pérdida de proteínas hepáticas que ocurre en respuesta al ayuno o deficiencia proteica no puede mantenerse más de un corto tiempo. Addis et al. (1936) muestran que el 28 % de las proteínas hepáticas se pierden después de diez días con una dieta libre de proteínas, y que la mayoría de esta pérdida tiene lugar en los primeros dos días. Coward et al (1977) han medido la pérdida de proteína hepática en ratas alimentadas con dietas que

contenían diferentes proporciones de proteínas ad libitum o en cantidades restringidas, durante períodos de 4 semanas. Se mantuvo un adecuado aporte energético, la restricción de ingesta proteica incluso a muy bajos niveles, induce una pérdida de solo 20-30 % de proteína hepática durante un período de dos semanas. Ingestas energéticas inadecuadas producen una pérdida mucho más severa, de más del 60 %. La pérdida más severa que pueden soportar fué el 62 % de proteínas hepáticas, no sobreviviendo más de tres semanas. La velocidad de pérdida de proteínas fué mucho menor después de la primera semana, cayendo hasta 5 % por día de pérdida. Esto puede estar relacionado con algún tipo de adaptación.

A corto plazo parece que la masa de proteínas hepáticas actúa como una reserva que permite a la síntesis de proteínas plasmáticas mantenerse luchando contra las fluctuaciones en el aporte de aminoácidos dietarios. Esta reserva está obviamente limitada, desde que la masa total de proteínas hepáticas en la ratas es solo alrededor del doble de la masa total de albúmina.

En resumen, está claro que las velocidades del turnover de proteínas hepáticas fijas y albúmina, responden mejor con diferencia a la deficiencia proteica y que cualquier descripción de esto debe tener en cuenta la escala de tiempo. La masa de proteínas hepáticas fluctúa en respuesta a cambios dietarios agudos y cae rápidamente al principio si el aporte de aminoácidos se reduce. Esta caída se lleva a cabo por un incremento en la velocidad de degradación desde que la K_s se mantiene alrededor del nivel normal. En la restricción a largo plazo existe una tendencia para estabilizar la masa de proteínas hepáticas a una más alta velocidad fraccionaria de turnover que en el estado alimentado. Es posible que la velocidad de síntesis de albúmina esté "protegida" durante un corto tiempo, pero después ésta cae progresivamente. En alguna extensión, esto

es compensado por una caída en la velocidad de degradación.

Waterlow y Stephen (1968) estudian la velocidades de recambio de proteínas hepáticas séricas mediante una técnica de infusión constante de $[^{14}\text{C}]\text{lys}$. En todos los grupos y salvo en las ratas mantenidas con dietas con baja proteína dietaria durante cinco semanas, la K_s fué igual o un poco mayor que en animales controles bien alimentados. Haider y Tarver (1969) midieron la velocidad de síntesis de proteínas hepáticas en ratas alimentadas con dietas entre 0 y 64 % de proteínas durante 5 a 7 semanas. Encontraron una importante correlación inversa entre el contenido en proteína dietaria y la K_s de las proteínas hepáticas que cayó desde el 70 % por día en ratas alimentadas con una dieta libre en proteínas al 28 % por día de la dieta alta en proteínas, aunque la relación RNA/proteína (C_s) no varió correspondientemente. Schimke (1964) y Chee y Swick (1976) encuentran resultados muy similares que confirman los anteriores.

En experimentos más recientes la velocidad de síntesis de proteínas en ratas malnutridas es más variable. Todas las dietas deficientes, tanto la baja o la libre en proteína así como la restringida en energía, la K_s de las proteínas hepáticas está bien mantenida. En segundo lugar, existe alguna indicación de un incremento en la K^s cuando las ratas son alimentadas después de la deplección.

En el hígado una respuesta inmediata a la deficiencia de energía o proteína es un aumento en la velocidad de degradación. Si a largo plazo la velocidad de pérdida de proteínas disminuye, esto puede solo significar que las velocidades de síntesis y degradación se haran mas cercanamente iguales (Garlick et al. 1975).

Waterlow et al. (1978) concluyen que la explicación de las caídas encontradas en dos de los estudios iniciales es que al determinarse la síntesis

total y mantenerse regulada debe ser la fracción exportable la que se reduce por la depleción proteica. Así los resultados encontrados por estos autores confirman esto, mientras que la K_s de las proteínas fijas eran bien mantenidas en ratas deficientes, las proteínas séricas totales fueron reducidas. Esto se reflejaría principalmente en la síntesis de proteínas producidas por el hígado.

Haider y Tarver (1969) muestran que la síntesis de albúmina en ratas alimentadas con dietas libres de proteínas ocurre solo al 40 % de la velocidad de ratas alimentadas al 8 % de proteína. Kirsch et al. (1968) hace medidas separadas de la síntesis de albúmina con [^{14}C]carbonato y de la degradación con [^{131}I]albúmina, sobre doce días de depleción proteica siguiendo la realimentación. La velocidad de síntesis empezó a caer después de 4 días y alcanzó un tercio del valor control después de doce días. La velocidad de degradación fué mantenida en el nivel inicial durante la primera semana, y entonces cayó así que el estado estacionario se alcanzó después de doce días. Al realimentar la velocidad de síntesis inmediatamente alcanza un valor mayor que el normal, la velocidad de degradación se eleva más lentamente, tal que en este estado existe síntesis neta de albúmina y un incremento en la concentración sérica de albúmina. Jeejeebhoy et al. (1973) han descrito también cambios secuenciales en la síntesis de albúmina que se aceleran después de dos días. La última velocidad de síntesis de albúmina fué solo el 6 % de la velocidad inicial. La transferrina sigue un diseño similar a la albúmina, pero la reducción en su velocidad de síntesis no fué tan grande.

Waterlow et al. (1978) intentan demostrar las interacciones entre los cambios en el turnover de proteínas hepáticas y la síntesis de proteínas exportables. Sus trabajos en combinación con los resultados de Morgan y Peters (1971) y Jeejeebhoy et al. (1973) arrojan las siguientes conclusiones:

i) En el animal alimentado, el nitrógeno que entra en el hígado y se utiliza para la síntesis (174 mg) el 83 % se usa para la síntesis de proteínas exportables y el restante para el crecimiento de proteínas hepáticas propias. La síntesis de proteínas exportables comprende el 28 % de la síntesis total.

ii) Tras dos días de dieta libre en proteínas, la cantidad de aminoácidos absorbidos se reduce en gran medida (63 mg). El hígado contribuye con 34 mg de la síntesis de proteínas exportables, que solo cae un tercio e incluso contabiliza casi la misma proporción de la síntesis total. Los resultados de Jeejeebhoy et al. (1973) sugieren que la síntesis de albúmina puede ser más sensible que la de otras proteínas plasmáticas producidas en el hígado, de hecho, la síntesis de albúmina disminuye 30 % después de dos días de dieta libre en proteínas.

iii) Después de nueve días con la dieta, el diseño es muy diferente. Las proteínas hepáticas están ahora casi en un estado estacionario y no contribuyen a la síntesis de proteínas exportables. Esta síntesis ahora contabiliza solo el 12 % de la síntesis total de proteínas en el hígado.

Este análisis si es correcto, muestra que entre el segundo y noveno día de la dieta restringida existe un cambio en las prioridades del hígado, una mucho menor proporción de la síntesis es dedicada a las proteínas exportables.

La liberación de aminoácidos procedentes de tejidos periféricos en respuesta a un aporte energético inadecuado no produce ningún efecto positivo sobre la masa de proteínas del hígado que sufre un fuerte descenso como consecuencia principalmente de aumentos en la velocidad de degradación. Los experimentos de Addis et al. (1936) demuestran que el ayuno produce una pérdida incluso mayor que la dieta libre de proteínas. El 40 % de las proteínas hepáticas se perdió después de siete días de ayuno, la mayoría de estos en los dos primeros

días. Esta gran pérdida de proteínas hepáticas ocurre incluso con una restricción menos severa en la ingesta energética (Coward et al. 1977). Los resultados recogidos por Waterlow et al. (1978) demuestran que en el ayuno o cuando se redujo la ingesta energética sobre grandes períodos, la KS de proteínas hepáticas fijas se mantiene a un buen nivel alrededor del normal ya que la K_D puede ser alta. Los efectos de la deficiencia energética sobre las proteínas hepáticas fijas son por esto del mismo tipo a las de la deficiencia proteica, pero quizás más severa.

Cuando se trata de la fracción de proteínas exportables, la situación parece diferente, existen evidencias tanto en animales como en el hombre que la concentración de albúmina sérica se mantiene a un relativamente alto nivel a pesar de una inadecuada ingesta energética. Los dos síndromes de la malnutrición en la niñez: marasmus y Kwashiorkor, en general, el primero debido principalmente a deficiencias energéticas, el segundo a proteica (Waterlow y Alleyne 1971, Alleyne et al. 1977). En marasmus, la concentración de albúmina sérica es característicamente mayor que en Kwashiorkor a pesar de una gran reducción en la masa proteica hepática (Waterlow et al. 1957) y el edema y el hígado graso son mucho menos prominentes. En marasmus con una gluconeogénesis activa existe elevados niveles de glucocorticoides y bajos de insulina séricos, mientras que al contrario ocurre en Kwashiorkor (Alleyne et al. 1977). La concentración de hormona de crecimiento es alta en ambas condiciones. No está claro si el diseño hormonal causa las diferencias metabólicas entre ambos síndromes o son consecuencia de estos. Millward et al. (1976b) y Lunn et al. (1976b) han recogido que los glucocorticoides en ratas alimentadas con dietas bajas en proteínas producen un gran incremento en la masa de proteínas hepáticas. Evidentemente los efectos anabólicos de los

corticosteroides anulan la influencia de la deficiencia proteica en el hígado, pero no la deficiencia energética. Se ha postulado que el aumento en la hormona del crecimiento es provocado por la baja concentración de albúmina (Pimstone et al. 1973).

Los contrastes entre los dos síndromes, tanto en los animales y en el hombre, han provocado la sugerencia que con la restricción energética un mejor aporte de aminoácidos al hígado, derivado de la degradación de proteínas muscular tiene un efecto protector resumido en esta frase: "el marásmico vive sobre su propia carne". Esta idea no parece muy lógica teniendo en cuenta que una gran proporción del nitrógeno que efluye del músculo en ayuno es ala y gln y destinado para la producción de urea (Aoki et al. 1974). Es difícil de reconciliar estos resultados con los niveles de aminoácidos esenciales y no esenciales en suero más o menos normales en ambos síndromes (Saunders et al. 1967, Lunn et al. 1976a).

Parece que existe una correlación recíproca entre la disponibilidad de ácidos grasos y las velocidades de síntesis de proteínas hepáticas (Martín-Requero et al. 1979; Ayuso et al. 1986), así condiciones fisiológicas ó patológicas acompañadas de hiperlipemias tienen en común una disminución de la velocidad de síntesis de proteínas hepáticas (Cahill et al. 1966, Parrilla 1978, Girbés et al. 1984, Perez-Sala et al. 1987). También la administración de agentes lipolíticos o ácidos grasos exógenos (Martín-Requero et al. 1979, Ayuso et al. 1986, Ayuso-Parrilla et al. 1979) producen una inhibición aguda de la síntesis de proteínas hepáticas. En estudios con células hepáticas aisladas se ha demostrado como concentraciones de ácido oleico de 0.2 a 1 mM (rango fisiológico) producen un efecto inhibitor de la incorporación de marcaje a la proteína dependiente de los ácidos grasos de larga cadena. En experimentos con células

procedentes de animales ayunados y sin fuentes energéticas exógenas, muestran que la inhibición de la oxidación de ácidos grasos pueden jugar un doble papel en la regulación de la síntesis de proteínas hepáticas tanto como combustible energético principal cuando no existen otros sustratos endógenos y pueden actuar controlando alguna fase reguladora clave de este proceso.

I.2.3.3. Síntesis de proteínas hepáticas en relación al RNA.

A pesar del alto número de experimentos realizados sobre la síntesis de proteínas en el hígado, ha sido difícil un diseño de determinar coherente de los mecanismos reguladores. Debido a los dos tipos de síntesis, proteínas secretadas y citoplasmáticas, ha sido difícil relacionar con la capacidad (CS) y actividad (KRNA) del RNA ribosomal.

I.2.3.3.1. La cantidad de RNA hepático y su regulación.

La cantidad total de RNA hepático varía en respuestas a casi cualquier cambio en el estado nutricional (Munro 1964a). La rapidez de esta respuesta es bastante remarcable. La relación RNA/DNA es una medida del contenido total de RNA ya que la cantidad de DNA no cambia. Tras una comida, existe un aumento durante el tiempo de alimentación, seguida por una progresiva caída durante el período post-absortivo. Esto no ocurre si la comida está libre de proteínas. A diferencia que en el músculo, donde los cambios en RNA son mayores que en las proteínas, en el hígado, generalmente ocurren a la misma velocidad (Kosterlitz 1947). En ratas alimentadas, la relación RNA/proteína

cambia muy poco y permanece constante durante el ayuno. De hecho en algunos momentos las pérdidas de proteínas ocurren más rápidamente ya que la relación RNA/proteína aumenta (Millward et al. 1974). Estos resultados están de acuerdo con los valores normales encontrados para la K_s , normal o alta, en la malnutrición. Ambos parámetros no pueden compararse directamente sin una estima separada de las velocidades de síntesis de proteínas secretadas.

Hirsch y Hiatt (1966) concluyen que en el ayuno, los ribosomas se perdían como resultado de una síntesis disminuida así como una degradación aumentada. Enwonwu y Munro (1970) y Enwonwu et al. (1970) recogen que la degradación de RNA aumenta como una respuesta inicial al ayuno y deplección proteica, pero disminuye después de pocos días a una velocidad menor que la de los controles. Ambos estudios estiman la velocidad de degradación con técnicas de dilución isotópicas, técnicas que presentan algunos problemas serios como la reutilización de nucleótidos marcados (Blodel y Potter 1968) y el hecho de que la heterogeneidad del turnover ribosomal puede introducir errores.

Estudios más recientes demuestran que el ayuno o la retirada de aminoácidos inducen una caída en la actividad polimerasa, un retraso en la maduración de la subunidad y unas velocidades reducidas en la síntesis de RNAr, y estos cambios pueden revertirse por la realimentación (Munro et al. 1975).

Al contrario de esta respuesta aguda, una deficiencia proteica más prolongada puede inducir un incremento en la velocidad de síntesis de RNAr descubriéndose incrementos en la actividad RNA polimerasa (Waterllow et al. 1978).

Lewis y Winick (1977) recogen que en ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas durante una semana, existe un aumento en la actividad específica

del RNA nucleolar deduciendose que la síntesis y velocidad de procesamiento del RNA 45S se incrementa y sugiere que el incremento en la degradación del RNAr que ocurre en respuesta a una deplección proteica en alguna manera estimula la síntesis de RNAr por el nucleolo.

Puede ocurrir una respuesta bifásica del hígado a la deprivación de proteínas o al ayuno. Inicialmente la velocidad de degradación del RNAr se incrementó y la síntesis se reduce o se mantiene sin cambios ya que el RNA se pierde. Después de esto, aunque el incremento en la degradación puede continuar, la síntesis aumenta igual que la degradación, ocasionando un nuevo estado estacionario con el turnover incrementado. Si esto fuese así, los cambios en el RNAr serían paralelos con los cambios en el turnover proteico.

Quizás no sorprenda que exista una incrementada velocidad fraccionaria de síntesis de RNAr después de que el número de ribosomas por célula disminuye durante la depresión proteica (33 % después de 30 días de deficiencia dietaria). Como resultado, incluso si no existe un incremento en la velocidad absoluta de síntesis por núcleo, la velocidad fraccionaria de síntesis aumentaría un tercio. Algún incremento en la actividad nucleolar resultaría en un incluso mayor incremento en la K_s .

Se sabe poco sobre los mecanismos por los que se controla este turnover de RNAr, la desagregación polisómica (Enwonwu y Munro 1970, Clifford et al. 1972), la actividad ribonucleásica (Enwonwu y Munro 1970, Norman et al. 1973) y el incremento en la actividad lisosomal (Waterlow et al. 1978) pueden ser algunos de los mecanismos implicados. Otra posibilidad es que los cambios rápidos en el RNAr que siguen a la realimentación, o los que ocurren durante la regeneración del hígado pueden implicar alteraciones en la velocidad de "desgaste" del RNAr (Waterlow et al. 1978).

I.2.3.3.2. Medida de la actividad ribosómica en el hígado.

Debido a que en éste órgano se sintetizan proteínas estructurales fijas y exportables y que el método de infusión constante estima solo las fijas, una estima correcta de la actividad ribosómica total puede solo obtenerse si la síntesis se mide con un método en un corto espacio de tiempo. Tanto Morgan y Peters (1971) y Conde y Scornick (1976) observan caídas en la actividad ribosómica del 25-30 % después de alimentar con una dieta libre de proteínas durante 10 y 6 días respectivamente. Medidas preliminares hechas con un método de gran dosis (Waterlow et al. 1978) indican pocos cambios después de nueve días de dieta libre en proteínas. Henshaw et al. (1971) y McNurlan, recogen solo pequeños cambios durante los estadios iniciales de ayuno, pero Henshaw et al. (1971) encuentra una muy marcada caída después de 3.5 días.

También parece que los cambios relativamente modestos en la actividad total de los ribosomas hepáticos en animales malnutridos representan un efecto compuesto de dos diferentes: una caída en la síntesis relativamente grande de albúmina y posiblemente de otras proteínas plasmáticas y una velocidad de síntesis de proteínas celulares sin cambios o en algunos casos incrementada.

Además de esto, existen diferencias funcionales entre dos poblaciones de ribosomas, los unidos al retículo endoplasmático y los citoplasmáticos libre, los primeros parecen responsables de la medida de la síntesis de proteínas secretadas y los segundos de las fijas. Aunque esta división no es tan tajante.

I.2.3.4. Efectos selectivos sobre la síntesis de proteínas hepáticas plasmáticas y fijas.

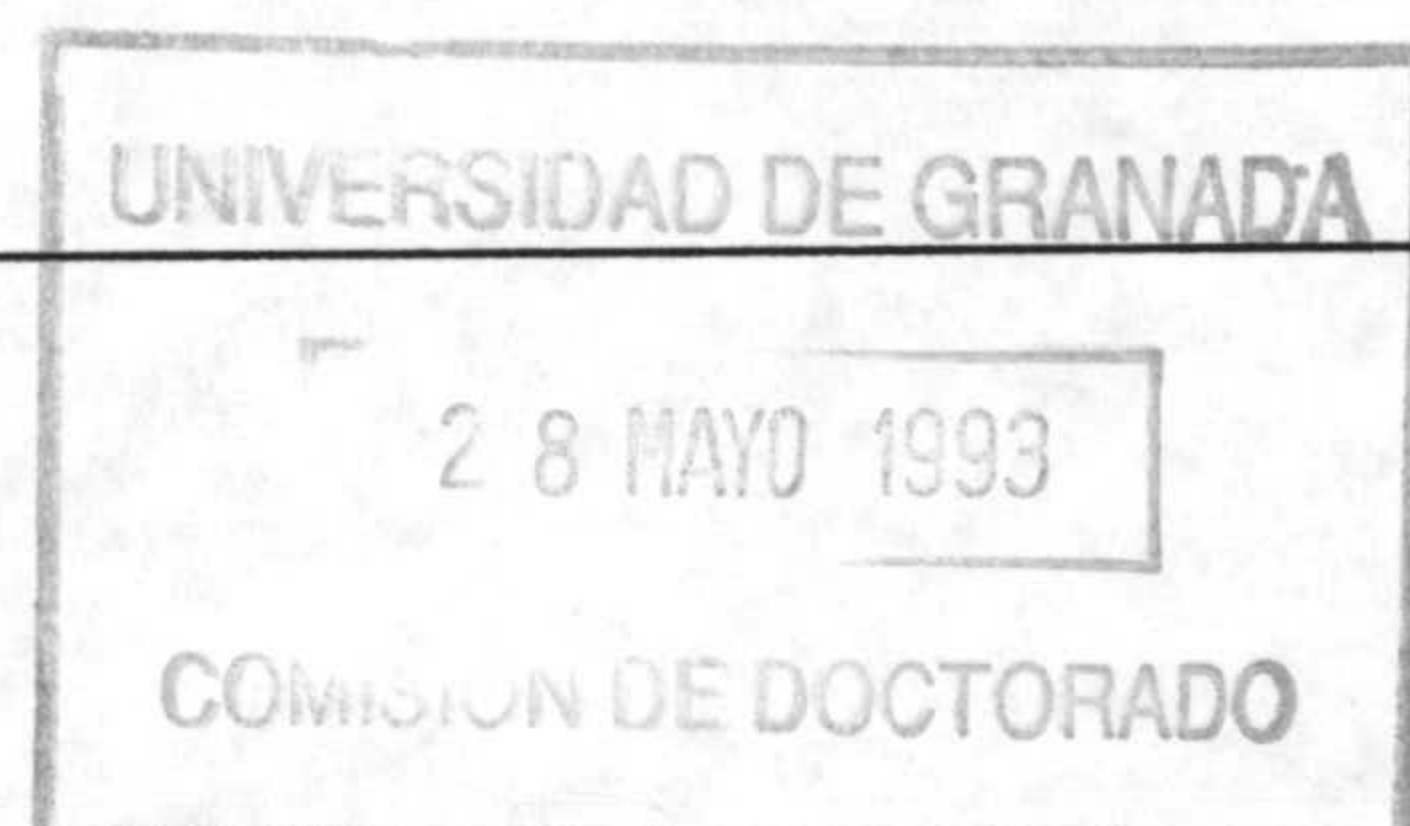
I.2.3.4.1. Cambios en las poblaciones de ribosomas libres y unidos a membranas.

Un número de investigadores han tratado de determinar si la población unida a la membrana es más sensible al stress nutricional que la población libre. Enwonwu (1972) no encuentra cambios en la distribución de las cantidades relativas de las dos poblaciones de ribosomas (un tercio libre, dos tercios unidos) después de 7 semanas de una dieta que contiene el 0.5 % de proteína. Existe una desagregación masiva de los poliribosomas libres con acumulación de subunidades y monómeros, pero no está claro en qué extensión se desagregaron los ribosomas unidos.

De estos estudios se puede concluir que si la agregación de ribosomas se toma como una medida de su actividad funcional, los ribosomas responsables de la síntesis de proteínas exportables se afectan particularmente por las deficiencias nutricionales.

Gaetani et al. (1969) examina los cambios en las dos poblaciones ribosómicas en hígado de ratas alimentadas con dietas libres de proteínas o bajas en energía. Ambos regímenes tienden a producir desagregación preferencial de los ribosomas unidos. La agregación de los ribosomas libres fué particularmente bien mantenida en ratas deficientes en proteínas.

Rothschild et al. (1968) recoge que los ribosomas libres no se afectaron en animales ayunados, pero que las poblaciones unidas se mantenían desagregadas. La síntesis de albúmina fué menor del 50 % en hígados ayunados. Los autores



concluyen que esta caída fué iniciada por desagregación selectiva de ribosomas unidos.

I.2.3.4.2. Cambios en la disponibilidad de mRNA para ciertas proteínas específicas.

Aunque la regulación nutricional de la actividad ribosomal se ve usualmente en terminos de alteraciones en la velocidad de traducción de poblaciones de RNA existentes mejor que por cambios en la disponibilidad del RNAm por él mismo; es posible que cambios selectivos en las velocidades de síntesis de algunas proteínas en un tejido en relación con otros tales como los observados en el hígado puede resultar de alteraciones en la disponibilidad de ciertos RNAm. Se ha intentado relacionar la cantidad de síntesis de albúmina in vivo con la cantidad de albúmina sintetizada en un sistema libre de células dependiente de mensajero al cual se le añadió RNA extraído de ribosomas hepáticos. Esto indicaría la cantidad relativa de mRNA traducible. Ratas alimentadas con dietas libre de proteínas durante dos días, la velocidad de síntesis de albúmina in vivo disminuyó de 14.6 a 8 % de la síntesis total y existe una caída proporcionalmente similar en la caída de albúmina sinttizada in vitro. Después de realimentación durante dos días la velocidad de síntesis de albúmina fué parcialmente restaurada in vivo e in vitro.

Estos resultados no demuestran inequívocamente que un cambio en la cantidad de mRNA traducible para la albúmina es responsable del efecto sobre la síntesis de albúmina in vivo. Se puede postular también que algún otro factor, relacionado con cambios ultraestructurales produce en una disminución selectiva en la traducción del mRNA de la albúmina y que el mRNA no traducido

entonces hacerse vulnerable a la degradación. Sin embargo permanece como hipótesis hasta que exista más información disponible.

Morgan y Peters (1971) concluyen que la reducción en la velocidad de síntesis de albúmina en ratas deficientes en proteínas no puede ser debido a una disminución en el mRNA porque este puede ser revertido por realimentación de aminoácidos en presencia de actinomicina D. Esta conclusión está basada sobre la habilidad de la actinomicina D para prevenir la síntesis de nuevos RNA. Sin embargo, sus resultados indican que la dosis de actinomicina D no inhiben la síntesis de RNA completamente y es posible que en esta situación la síntesis de RNAr se inhiba más que la de mRNA (Perry y Kelley 1970).

I.2.3.5. Efectos sobre la síntesis proteica por ribosomas hepáticos como un todo.

La mayoría de los estudios han examinado los ribosomas preparados de los sobrenadantes postmitocondriales totales después del tratamiento con detergentes ya que una proporción sustancial de ribosomas unidos se pierden en la preparación de los sobrenadantes postmitocondriales, las muestras obtenidas deberían verse enriquecidas en ribosomas libres. En ratas ayunadas, la administración de una mezcla de aminoácidos o de ciertos aminoácidos aumentan la agregación de ribosomas en polisomas (Munro et al. 1975). Independiente de ciertas hormonas (Clemens y Pain 1974). En ciertas situaciones p.e. alimentación forzada con mezclas inbalanceadas algunos aminoácidos pueden convertirse en limitante de la velocidad.

En hígados perfundidos se han observado resultados del mismo tipo: la formación de polisomas es promovida por la adición de elevados niveles de

aminoácidos esenciales (Jefferson y Korner 1969, Kelman et al. 1972, Rothschild et al. 1969) y el efecto es aumentado por la adición de insulina al perfusado (Ekren et al. 1971, Van den Borre y Webb 1972).

El principal problema en estos estudios es que ellos no se relacionan con los efectos de la síntesis proteica in vivo y en hígados perfundidos. In vivo, la privación nutricional no reduce la K_s de proteínas fijas y tiene solo un pequeño efecto sobre la velocidad total de síntesis proteica por ribosoma. Similarmente en hígados perfundidos, existen evidencias de que el aporte de aminoácidos no tiene efecto sobre la velocidad de síntesis de proteínas hepáticas fijas (Peavy y Hansen 1976) o de albúmina (Tavill et al. 1973). No está claro por qué los polisomas estarían desagregados en ratas ayunadas o permanecen en ritmos diurnos relacionadas con el alimento como muestran Fishman et al. (1969) y es difícil relacionar los cambios en los perfiles ribosómicos con el estado del tejido completo.

Una razón para explicar las discrepancias puede ser debida a que no se han hecho comparaciones sistemáticas entre las medidas entre la velocidades de síntesis in vivo o en hígados perfundidos junto con la determinación de la extensión de la agregación polisómicas. Con los presentes datos es difícil de ver si realmente existe una inconsistencia entre los efectos observados a nivel de ribosomas y en el animal completo, o si las discrepancias son debidas a diferencias en el estado fisiológico del animal o preparaciones perfusadas en experimentos individuales.

I.2.5. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN LOS PECES.

I.2.5.1. METABOLISMO PROTEICO EN PECES.

I.2.5.1.1. Introducción.

Los constituyentes celulares que forman los diferentes tejidos de un organismo se encuentran en un continuo recambio metabólico ("turnover"). El objetivo de este, es mantener la maquinaria celular dispuesta a responder ante cualquier variación en las condiciones ambientales. Se trata pues de un equilibrio dinámico en el que síntesis y degradación se encuentran enfrentadas. En el caso de las proteínas, moléculas "estructurales" por excelencia, este recambio tiene especial interés, pues del balance neto entre ambos procesos dependerá la velocidad de acumulación y organización de estas macromoléculas, en definitiva el crecimiento neto del animal, tejido u órgano. Además, otra "porción" del turnover total es la responsable de la regulación de los niveles enzimáticos específicos. Teniendo en cuenta todo esto, puede entenderse perfectamente, el gran interés que tiene en cualquier evaluación de la capacidad de crecimiento de un animal, tejido u órgano, el analizar detalladamente la velocidad de síntesis de proteínas (K_S), la de degradación (K_D) y el flujo neto o acumulación (K_G).

Teniendo en cuenta lo poco que se conocen las particularidades metabólicas de estos organismos, este tipo de estudios son muy necesarios e importantes para descifrar el comportamiento de las principales rutas que metabolizan aminoácidos en los diferentes tejidos de estas especies.

I.2.5.1.2. Características fisiológicas y metabólicas.

Entre los condicionantes fisiológicos que determinan el comportamiento metabólico de los diferentes tejidos de estas especies, están:

Al ser poiquilothermos, no gastan energía en el mantenimiento de la temperatura corporal, las velocidades de reacción y la extensión de algunas rutas metabólicas se ven afectadas por la temperatura ambiente.

El medio acuático les permite un menor gasto energético en mantener la posición corporal (Cowey, 1980).

Respiración y osmoregulación requieren elevados gastos metabólicos.

Condiciones mediambientales y hábitos etológicos (específicos) p.e. cambios estacionales en la disponibilidad del alimento, migración, etc, pueden condicionar el aporte de comida necesario para un crecimiento óptimo.

En teleósteos, al ser el producto final del metabolismo nitrogenado el amonio, energéticamente menos costosa su producción que la urea o el ácido úrico, no precisa gastos energéticos adicionales como en mamíferos.

El contenido proteico de la dieta de estas especies es de especial importancia debiendo oscilar alrededor del 22-50 % para alcanzar unas condiciones de crecimiento óptimo (Cowey 1979, 1980, Millikin 1982). Como otros peces, los salmónidos tienen relativamente altos requerimientos dietarios de aminoácidos esenciales y proteínas, en algunos casos pueden ser mas del doble que en ratas, pollos y cerdos (Mertz 1972, Cowey 1975 y 1979, Ogino, 1980). Este elemento, además de la misión estructural cumple una importante misión energética. Aunque existe una alta ingestión de proteína dietaria que es bien digerida, la utilización neta de esta proteína es menor, especialmente en los peces adultos, que en muchos mamíferos o aves (Rumsey 1981, Nijkamp et al. 1974) debido

a que una gran cantidad de dicha proteína es rápidamente catabolizada.

Proteínas y lípidos son las principales fuentes energéticas para estos organismos. Estas proteínas son utilizadas en su mayoría como combustibles energéticos, pudiendo según Philips (1969) llegar a aportar el 70 % de las calorías dietarias utilizables. Un porcentaje menor será utilizado con misión estructural.

Los carbohidratos son relativamente poco utilizados por los peces, tanto es así que puede servir como ejemplo que mientras en mamíferos las reservas de glucógeno hepáticas tras el ayuno nocturno están prácticamente agotadas, en los peces no se alteran apenas incluso tras varios meses de ayuno (Chang e Idler 1960, Dave et al. 1975). No obstante, la glucosa ó glucógeno, siguen siendo necesarios como combustible para diferentes tejidos como cerebro, glóbulos rojos y músculo blanco.

Estudiando la cinética de absorción de aminoácidos al torrente sanguíneo se demuestra que después de ser alimentados con dietas que contienen proteínas completas, la concentración de aminoácidos en sangre de especies de agua caliente: carpa (Plakas et al. 1980), pez gato (Wilson et al. 1985), tilapia (Yamada et al. 1981), alcanzan el nivel máximo más rápidamente que en las especies de agua fría: trucha arco iris (Nose 1972, Walton y Wilson 1986) 12-24 hrs (Yamada et al. 1981). Los tiempos requeridos para restablecer las condiciones iniciales también eran más cortos en las especies de agua caliente. Probablemente sea debido al efecto de la temperatura sobre la velocidad de digestión. Si lo que se le suministra a los animales es una mezcla de aminoácidos en vez de una proteína completa, la absorción es más rápida, tendiendo a alcanzarse concentraciones máximas más altas (Plakas et al. 1980, Yamada et al. 1981). En la trucha arco iris Yamada et al. (1981), encuentra

incrementos en la mayoría de los aminoácidos a las doce horas de la comida, mientras que en los estudios de Ingham y Arme, 1977, Schlisio y Nicolai 1978, se observa un aumento en todos los aminoácidos esenciales y de los no esenciales solo el glutámico y el aspártico aumentan significativamente. La diferencia de la velocidad de absorción de los aminoácidos en ambos tipos de situaciones dietarias puede ser una de las razones para explicar la peor utilización de los aminoácidos libres para obtener el crecimiento óptimo.

Los aminoácidos absorbidos vía circulación portal pasan al hígado y posiblemente se dan los mismos tipos de reacciones que ocurren en otros animales.

Existen pocos datos sobre los cambios en las concentraciones de aminoácidos en los tejidos de peces después de las comidas, en la trucha arco iris, la concentración total de aminoácidos en hígado tendió a mantenerse bastante estable durante todo el período posterior a la comida (Walton y Wilson 1986), algunos aminoácidos esenciales mostraron una cierta correspondencia con los cambios plasmáticos, mientras que no ocurrió lo mismo con los no esenciales. Las concentraciones de aminoácidos esenciales en plasma y músculo aunque no en hígado, mientras una correlación con su concentraciones en la dieta (Nose 1972, Plakas et al. 1980, Wilson et al. 1985, Walton y Wilson 1986). Posiblemente debido a su interconversiones metabólicas los aminoácidos no esenciales no muestran esta dependencia. En estudios realizados en trucha arco iris (Walton y Cowey 1982, Gras et al. 1978, 1982, Shirai et al. 1983, Ogata y Arai, 1985, Walton y Wilson, 1986) se encuentra como hígado y riñón contienen la mayor concentración de todos los tejidos, aunque el tejido muscular contiene las mayores cantidades como porcentaje total del cuerpo. Las proporciones 1:1 pueden pasar a 10:1 para el glutámico, aspártico y glicocola en hígado y riñón.

La glicocola presenta niveles frecuentemente altos en el músculo donde contribuye en más del 50 % del total.

Después de las comidas, el aporte de aminoácidos a los tejidos supera sus capacidades biosintéticas (proteínas, hormonas, purinas, neurotransmisores, cofactores, etc) y el excedente es catabolizado. El principal centro del catabolismo es el hígado donde el primer paso es eliminar el grupo amino que es excretado como amoniaco en teleósteos; y la formación de un alfacetoácido que puede oxidarse via ciclo de los acidos tricarboxilicos, o convertirse en glucógeno o triglicéridos y almacenarse como tales. Este primer paso se da principalmente mediante transdesaminación dependiente de la glutamato deshidrogenasa y transaminasas específicas (Walton y Cowey 1977, Van Waarde 1981, 1983, Casey et al. 1983, Campbell et al. 1983). El otro mecanismo de producción de amonio, el ciclo de los nucleótidos de purina dependiente de la AMP desaminasa, puede ser importante en el músculo, donde la producción de amonio es proporcional a la carga de trabajo a realizar (Van Waarde 1983).

Además del aporte dietario de aminoácidos plasmáticos, los relativamente pequeños pooles tisulares de aminoácidos libres cuentan con otra fuente muy importante, los aminoácidos procedentes de la degradación de proteínas tisulares, que se encuentran en un recambio continuo, pudiendo contribuir con el 70-80 % (Millward et al. 1976) del pool total en las ratas, mientras que en los peces es menos del 50 % (Cowey y Luquet 1983). La capacidad de regulación del contenido total del pool intracelular de aminoácidos libres y por lo tanto de las velocidades de síntesis proteica por parte de las condiciones nutricionales parece que son mayores en peces que en mamíferos.

Los enzimas que inician el catabolismo de aminoácidos tienden a estar concentrados en el hígado y presentan altos valores de Km (en general del orden

de 1 a 10 mM). Las concentraciones de aminoácidos en los tejidos tienden a ser mayores que la K_m de las enzimas que inician la síntesis proteica, las aminoacil sintetasas, que generalmente tienen K_m s muy bajas en mamíferos del orden de 0.1 a 1 mM (Krebs 1972, Rogers 1976), lo cual provocaría una cinética de orden cero. Al presentar K_m s mas altas, las enzimas de las primeras etapas del catabolismo de estos aminoácidos, las actividades enzimáticas pueden responder directamente ante variaciones en la concentración de sustrato siguiendo posiblemente una cinética de primer orden. Por esto, a bajas concentraciones de sustrato predominarían los procesos de síntesis, siendo menor la velocidad catabólica que automáticamente se incrementará con el incremento en las concentraciones de sustrato p.e. tras las comidas (Walton y Cowey 1982).

De las aminotransferasas descritas, algunas son muy específicas, mientras que otras reaccionan con varios sustratos. Aunque las que se hayan medido mas frecuentemente en estudios de peces sean la aspartato y alanina aminotransferasa, existen otras como la tirosina aminotransferasa (TyrAT) y serina deshidratasa (SerDH) que participan en la regulación de la degradación de su correspondientes aminoácidos al verse moduladas por las condiciones dietarias. Así Whiting and Wiggs (1977) encuentra que los niveles de TAT hepática se incrementa en truchas ayunadas y que tambien eran mayores en peces alimentados con una dieta alta en proteínas y baja en carbohidratos que los alimentados con baja en proteínas y alta en carbohidratos. En las ratas, entre las enzimas que degradan aminoácidos solo se conocen la respuesta de la TyrAT y SerDH a cambios en la frecuencia alimentaria (Potter et al. 1968, Watanabe et al. 1968, Lichtenstein et al. 1974).

I.2.5.1.3. Regulación de la actividad SerDH de hígado de rata.

La L-serina dehidratasa [L-serina hidrolasa (desaminante)] (EC 4.2.1.13) (SerDH) es el enzima que cataliza la desaminación dependiente de piridoxal fosfato de la serina y treonina para producir piruvato y α -cetoglutarato respectivamente. Es característica su relativamente alta vida media, aproximadamente 20 hrs (Jost et al. 1968), en comparación con la de otros enzimas que catabolizan aminoácidos como la tirosina aminotransferasa (1.5 hrs) (Schimke y Doyle 1970). Se considera como un enzima clave, implicado en la gluconeogénesis. La SerDH de hígado de rata es un enzima inducible cuya actividad fluctua dependiendo de la composición dietaria y el estado hormonal a que se ve sometido el animal (Snell 1984).

Ratas alimentadas con una dieta rica en proteínas muestran un incremento de unas 100 veces la actividad SerDH comparadas con ratas mantenidas con una dieta sin proteínas (Pitot y Peraino 1963, Nakagawa 1971). Cuando las ratas se mantenían con una dieta libre de proteínas y con una intubación forzada de un hidrolizado de caseína, la actividad SerDH hepática incrementaba muy rápidamente, suprimándose ese incremento por una ingesta simultánea de glucosa (Pitot y Peraino 1964, Peraino y Pitot 1964).

Los niveles de RNAm específico de la SerDH se pierden rápidamente y su cantidad se reduce a la mitad 3 horas después de cambiar de una dieta rica en proteínas a otra sin proteínas. La actividad enzimática disminuyó mucho más lentamente (Ogawa et al. 1991).

Ogawa et al. (1991) encuentran evidencias directas de que el nivel de RNAm incrementa al incrementar el contenido de proteínas de la dieta. El incremento paralelo de la actividad enzimática sugiere que los RNAm existentes

son fielmente traducidos. La actividad enzimática y el contenido de RNAm son ambos extremadamente bajos o indetectables en ratas alimentadas con dieta sin proteínas. El hecho de que la síntesis de SerDH en hígado, se regule primariamente a nivel transcripcional está de acuerdo con los resultados de la inducción hormonal del enzima (Kanamoto et al. 1991).

La estabilidad del RNAm para la SerDH puede variar de 2 hrs a 2 semanas en hígado de rata normal y neoplásico (Pitot et al. 1965, Noda et al. 1984).

Morris y Peraino (1976) muestran como las velocidades de síntesis de la SerDH presentan una ritmicidad circadiana, que a causa de su relativa alta vida media no se manifestaba claramente como cambios en los niveles enzimáticos, a diferencia de lo que ocurre p.e. con la TyrAT (de vida media aproximada, 1.5 hrs) en la que los cambios circadianos en el nivel enzimático son fiel reflejo de los cambios en sus velocidades de síntesis (Wurtman 1974, Hardeland et al. 1973). Parece que tanto las fluctuaciones circadianas de la velocidad de síntesis de la SerDH como en los niveles de TyrAT no son debidos al efecto de los glucocorticoides (Morris y Peraino 1976, Wurtman 1974, Hardeland et al. 1973, Reinolds et al. 1971).

Recientemente se ha descubierto que las ratas mantenidas en condiciones dietarias estandar el nivel de RNAm específico muestra variaciones circadianas del orden de 20 veces, encontrándose las máximas concentraciones por la tarde y las mínimas por la mañana (Ogawa et al. 1991). Esta ritmicidad se encuentra también en ratas alimentadas con dieta alta en proteínas, pero desaparece cuando a las ratas se les suministra dietas sin proteínas durante 5 días.

Morris y Peraino (1976) sugieren que existe una estrecha relación entre la respuesta catabólica del órgano y las fluctuaciones en los niveles de síntesis

de la SerDH en respuesta a los glucocorticoides. Precediendo la respuesta de la síntesis de este enzima a otros sucesos como la reducción en el peso corporal o la ingesta de alimento que se produce tras la administración de triamcinolona. Sugieren que los cambios en este enzima son parte del proceso por el cual se produce el balance negativo de nitrógeno típico de esta situación. La actividad TyrAT y triptófano oxigenasa (Schimke y Doyle 1970) también se incrementa en estas condiciones.

I.2.5.1.4. Regulación de la actividad TyrAT de hígado de rata.

En la rata, la tirosina aminotransferasa (EC 2.6.1.5., TyrAT) es un enzima específico del hígado, paso clave en el control del catabolismo de la tirosina (Tanaka e Ichihara 1975). Su actividad cambia durante la maduración del hepatocito (Greengard 1970) y es regulada por algunas hormonas (Csanyl et al. 1967, Watanabe et al. 1968 y Wurtman 1974) y factores dietarios (Watanabe et al. 1968). La transcripción de la TyrAT puede estimularse por glucocorticoides (Granner y Beale 1985, Schmid et al. 1987) y por glucagón, el cual actúa vía AMPc (Hashimoto et al. 1984, Schmidt et al. 1987). Ambos estímulos pueden estar implicados en la activación del gen (Ruiz-Bravo y Ernest 1982). También se han descrito influencias del ritmo circadiano sobre su actividad (Viola-Magni y Magni 1986) posiblemente debidas a cambios en la síntesis de enzima (Servillo et al. 1991).

En cuanto a las influencias nutricionales, la composición de la dieta parece jugar un importante papel, pues los carbohidratos reducen la actividad TyrAT (Peraino et al. 1966) mientras que las proteínas la incrementan (Yanage et al. 1975). En un ciclo artificial de luz/oscuridad en el que los animales son

ayunados 22 hrs (luz) y el alimento se le suministra solo 2 hrs durante la oscuridad, el incremento de 12 a 60 % del contenido en proteínas en la dieta provoca un agudo incremento en la actividad TyrAT precedido por un incremento en el RNAm de la TyrAT, 30 minutos después de la comida (Granner y Hargrove 1983).

Servillo et al. (1991) estudian la actividad TyrAT y la síntesis de su RNAm específico a diferentes horas del día en el hígado de ratas de 3, 12 y 24 meses. La actividad enzimática presenta un ritmo circadiano con un pico a la medianoche en los animales 3 y 12 meses, y a las 3.00 hrs para los animales de 24 meses. La expresión del RNA específico también cambia durante el día, indicando fluctuaciones circadianas que cambian con la edad; a los tres meses, el pico es a las 19.00 hrs, precediendo al de la actividad enzimática, en las de 12 meses es a la medianoche y en la de 24 meses a la 3.00 hrs. Los resultados demuestran que el ritmo circadiano de la actividad TyrAT es debido a una expresión genética diferente a lo largo del día, influenciada por la edad.

El gen de la TAT se expresa preferentemente en células parenquimáticas del hígado adulto (Hargrove y Granner 1985).

La TyrAT hepática es uno de los enzimas del grupo que antes aparece en el hígado postnatal (Sereni et al. 1959, Greengard 1970). La expresión de la TyrAT está virtualmente ausente en el feto. Actividad enzimática (Sereni et al. 1959) y RNAm (Perry et al. 1983, Rothrock et al. 1987) se acumula poco a poco tiempo después del nacimiento, cuando se activa la transcripción del gen (Rothrock et al. 1987). Aunque inactivo en el feto, el gen de la TyrAT es capaz de expresarse antes del nacimiento. La actividad TyrAT puede inducirse precozmente por una inyección de glucagón o de dibutilil AMPc en el útero (Greengard y Dewey 1967, Perry et al. 1983, Ruiz-Bravo y Ernest 1982), liberación prematura del

feto (Holt y Oliver 1968) así como en explantes de hígado fetal (Ruiz-Bravo y ERnest 1982,1985, Wicks 1968) o cultivos en monocapa (Yeoh et al. 1985). Se ha sugerido que los hepatocitos fetales sufren un suceso diferenciable antes del nacimiento, traduciendo en que el gen de la TAT potencialmente se exprese (Yeoh et al. 1979). La ausencia de expresión durante la gestación es probablemente debido a un(os) componente(s) inhibidores dentro del ambiente uterino (Cake 1986, Ho et al. 1981, Perry et al. 1983) como p.e. altos niveles de insulina presentes en fetos de gestación avanzada.

El sistema de cultivo de hepatocitos fetales provee un modelo útil de estudiar los mecanismos moleculares de la expresión del gen de la TyrAT durante el desarrollo. Shelly et al. (1989) demuestran que hepatocitos fetales de 15 días adquieren la capacidad de expresar la TyrAT cuando se mantienen en cultivo. El incremento en el RNAm de la TyrAT en hepatocitos de 15 y 19 días de gestación mantenidos en cultivos fué proporcional a cambios en la transcripción del gen indicando que la expresión de la TyrAT en hepatocitos fetales mantenidos in vitro se controla principalmente al nivel de la transcripción como se ha demostrado tanto para cultivos primarios de hígados adultos (Hashimoto et al. 1984, Schmid et al. 1987) y la activación de la expresión de la TyrAT después del nacimiento (Rothrock et al. 1987). Estudios inmunocitoquímicos demuestran que el incremento en la expresión de la TyrAT se correlaciona con un incremento en la proporción de hepatocitos que expresan este enzima más que un incremento simultáneo de todos los hepatocitos (Shelly et al. 1989).

I.2.5.2. VELOCIDADES DE TURNOVER PROTEICO EN EL ANIMAL COMPLETO Y EN LOS PRINCIPALES TEJIDOS DE PECES. ESTUDIOS INICIALES.

El objetivo central del presente trabajo es el analizar el comportamiento, regulación y capacidad adaptativa de otro amplio y complejo grupo de reacciones metabólicas cuyo resultado final será el mantenimiento de unos niveles proteicos adecuados a la situación metabólica concreta. Responsables de estos niveles lo serán las velocidades de síntesis y degradación de proteínas, compuestos que se encuentran en un recambio metabólico continuo. Tal es la importancia de estos procesos, que pueden consumir sobre el 24-42% del consumo total de oxígeno en los el bacalao en crecimiento (Houlihan et al. 1988) y en mamíferos puede ser del 15-22 % (Reeds et al. 1985). Además de ser responsables del mantenimiento del sistema enzimático-estructural de la célula perfectamente dispuesto y preparado para funcionar en las condiciones más idóneas según el ambiente celular instantáneo en cada momento, otra fracción del turnover proteico es la responsable del crecimiento celular neto en forma de depósito proteico. Ambas facetas van a determinar los niveles y capacidad reguladora de las velocidades de síntesis, degradación y crecimiento en los diferentes tejidos del pez.

El estudio de las velocidades de síntesis y degradación proteica en organismos vivos ha presentado y presenta aun hoy, serias dificultades metodológicas, no obstante paralelamente a los trabajos realizados en mamíferos, se han ido aplicando estas técnicas en peces inicialmente como punto de comparación con lo que ocurre en otras especies y posteriormente como la mejor manera de estimar el efecto de determinadas condiciones fisiológicas sobre la

capacidad de crecimiento de las distintas especies y órganos. La utilización de una técnica basada en la inyección intravenosa de una dosis masiva de precursor marcado ($^3[^{2-4}\text{H}]\text{phe}$) combinada con la fácil determinación de la concentración de ese precursor en los distintos tejidos ha hecho posible el inicio de estos estudios en estos animales.

El grupo de Haschemeyer inicia los primeros estudios en peces antárticos (Haschemeyer 1983) y en toadfish (Opsanus tau, Pocrnjic et al 1983). Aplicando la técnica descrita por Garlick et al. 1980, con algunas modificaciones (mayor extracción, y una dosis de 45 $\mu\text{C}/100$ g peso) obtienen unos valores de K_s para el hígado de 10 y 14 % y para el músculo blanco de 0.37 y 0.2 % para *N.coriceps* y *O.tau* respectivamente.

El grupo de Fauconneau utiliza una técnica diferente basada en la infusión de L-leu[U-14C]. Los valores obtenidos varían según sea considerado como pool precursor de referencia, los aminoácidos libres en plasma ó en los tejidos (Fauconneau y Arnal 1985). La velocidad de síntesis proteica para el animal completo fué muy baja cuando se compara con la del hígado o tracto gastrointestinal, se estimó ser de 7 a 7.6 g proteína/Kg peso corporal y por día (10° C o 18° C respectivamente). La eficacia del depósito proteico para el animal completo fué mayor del 25 % debido a los altos valores del músculo blanco. Sin embargo, junto con trabajos anteriores (Fauconneau et al. 1980, 1981) demuestran como hígado, tracto gastro intestinal y branquias son tejidos con un metabolismo proteico muy elevado, K_s altas, adaptando su capacidad de turnover a cambios de temperatura. Sin embargo en el músculo blanco de la trucha arco iris, la mayoría de la proteína sintetizada es depositada, junto con una baja velocidad de síntesis (aproximadamente 2 %) encuentra una muy alta eficacia de depósito que a 18° C es mas del 70 %, a diferencia de lo que ocurre en

homeotermos donde la K_G y K_S són muy parecidas (Waterlow et al. 1978). Este comportamiento del tejido muscular junto con el hecho de que este es el principal tejido en peso y contenido proteico del animal, el que contribuye con el 30 % a la síntesis de proteínas total y 40 % del crecimiento del pez, lo hacen un candidato perfecto a ser el almacén de proteínas del animal, que es muy parecido a llamarlo el reservorio energético, si tenemos en cuenta el papel de la proteína en el metabolismo de estos animales.

La síntesis proteica puede expresarse en relación al RNA para dar una estima de la eficacia de síntesis. Aunque las diferencias en la eficacia de síntesis son bajas entre los tejidos, son significativas (Cowey y Luquet 1983), siendo mayor hígado que en el músculo. (Fauconneau 1980, Smith 1981) como en mamíferos como el cerdo (Garlick et al. 1976). Sin embargo en los peces, las velocidades de síntesis proteica parecen ser menores que en mamíferos con similares contenidos de RNA, posiblemente debida esta alteración a las diferencias de temperatura experimentadas por peces y mamíferos (Fauconneau 1985).

Variaciones interespecíficas de la síntesis proteica pueden explicarse por diferencias en la temperatura ambiental (Haschemeyer et al. 1979, Haschemeyer 1983). La contribución de las proteínas plasmáticas a la síntesis de proteínas hepáticas totales parece ser muy constante en diferentes especies, del orden del 20 al 35 % (Smith et al. 1980, Smith y Haschemeyer 1980) aunque es menor en la trucha arco iris a 11 °C (Smith 1981). En el hígado las velocidades de degradación medidas a 15°C en la carpa y en la trucha no son diferentes de las velocidades de síntesis observadas a temperatura similar en proteínas intrahepáticas o proteínas totales (Fauconneau 1975). Esto prueba que la síntesis de proteínas en el hígado se dirige principalmente hacia la renovación de

proteínas.

En el músculo, las variaciones interespecíficas de la velocidad de síntesis proteica pueden también estar relacionadas con la temperatura ambiente. Pero en el músculo la síntesis proteica está dirigida principalmente al depósito (Fauconneau et al. 1981, Smith 1981). Mientras que en mamíferos el turnover de proteínas muscular puede alcanzar el 60 % de la síntesis proteica (Reeds y Loble 1980), en los peces solo representa una pequeña proporción. El hecho de que el crecimiento muscular en el pez ocurra principalmente por fenómenos de hiperplasia (Strickland 1983, Weatherley y Gill, 1984) puede explicar esta peculiaridad. Aunque la velocidad de síntesis en la fracción miofibrilar es aproximadamente la mitad que en la sarcoplasmática (Das y Krishnamoorthy 1968), la degradación total de proteínas muscular es muy similar a la de las fibras (Somero y Doyle 1973).

I.2.5.3. REGULACION NUTRICIONAL DE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO Y TURNOVER DE PROTEINAS.

En estos estudios se trata de integrar los efectos de las velocidades de síntesis y degradación de los tejidos individuales que dan lugar a la acumulación neta de proteínas, velocidad de crecimiento. El otro objetivo es ver cómo el tamaño de la ración influye sobre estas velocidades en animales continuamente alimentados.

No parece claro que los incrementos postprandiales en la síntesis tras un período de ayuno descritos anteriormente, se encuentren también en animales diariamente alimentados, p.e. en Salmones no se han encontrado (Fauconneau et al. 1989).

La dificultad de las estimas de la K_D instantánea hacen que no se esté seguro de que la respuesta postprandial se traduzca en una respuesta anabólica.

Aunque se acepte que esta estimulación se produzca, al menos en algunos tejidos, el problema posterior es qué tiempo después de cada comida se utiliza para medir el efecto de ésta.

Se han conseguido considerables avances usando como alimento algas marcadas con N^{15} para *Mytilus* y midiendo el enriquecimiento del amonio producido en N^{15} así como midiendo el exceso de N^{15} absorbido por los animales (Hawkins et al. 1989).

I.2.5.3.1. Velocidades de crecimiento y turnover de proteínas en el bacalao, pulpo y mejillón.

En estas tres especies se encuentra que incrementos en las velocidades de crecimiento producidos por variación en el tamaño de la ración estaban acompañados por incrementos en la síntesis de proteínas del organismo completo (Hawkins 1985, Houlihan et al. 1988b, 1990a) semejante a lo que ocurre en mamíferos (Millward et al. 1981, Jepson et al. 1988, Millward 1989).

Para el bacalao esta relación se puede concretar en la ecuación $Y = -0.575 + 1.13X$ donde Y equivale al % de peso corporal ganado por día y X es el peso de la comida ingerida por día expresada como porcentaje del peso corporal/día (Hawkins 1985, Houlihan et al 1988b).

En el bacalao, es de especial interés que cuando las velocidades de crecimiento son las mas altas, las velocidades de síntesis de proteínas son de 2 a 4 veces mayores que las velocidades de acrección (crecimiento) y la eficacia de retención para el organismo completo aumento el 40 %. Existe un

aparentemente paradójico incremento en la proteólisis con incrementos en la velocidad de crecimiento, un fenómeno también conocido en mamíferos (Millward 1989).

Existe una estrecha relación entre proteína ingerida y proteína sintetizada en el bacalao, para cada gramo de proteína ingerida, se sintetizaba un gramo de proteína y 0.36 gr de esta se retenía como crecimiento. De la misma manera estos autores encuentran una estrecha relación entre la relación RNA/proteína en el músculo blanco, crecimiento y velocidades de síntesis de proteínas en regímenes de alimentación constante a lo largo del tiempo, a diferencia de lo que ocurre tras el suministro de una única comida (Houlihan et al. 1989). Parece así como en las ratas en el bacalao también sea la proteína dietaria más que la energía el estímulo primero para el crecimiento muscular (Millward 1989).

Octopus vulgaris crece muy rápidamente, a una velocidad equivalente a la de mamíferos de tamaño comparable (Calow 1987). En estos animales, un incremento en la velocidad de crecimiento se acompañan por aumento en la velocidad fraccionaria de síntesis y disminución en la de degradación (Houlihan et al. 1990a). En el mejillón, se describe un comportamiento similar a diferencia de lo que ocurre en el bacalao y en mamíferos (Millward et al. 1980, Waterlow 1984).

La máxima eficacia de retención de proteínas (EPR) en el bacalao, es ligeramente mayor que valores comparables para mamíferos, entre el 27 y el 33 % citados por Hawkins (1985). Para la trucha, los valores descritos son entre el 30 y el 40 % (Fauconneau 1985, Fauconneau y Arnal 1985). Al contrario, *Octopus* y *Mytilus* tienen eficacias de retención de proteínas muy elevadas. Aunque debe puntualizarse que son de esperar incrementos en la EPR con

incrementos en la K_G debido a disminuciones en la proporción de síntesis total dirigida hacia el mantenimiento del metabolismo basal (Houlihan et al. 1988b).

Esta disminución en la velocidad de la K_D con el aumento en la velocidad de la K_G encontrado en *Mytilus* ha sido propuesto como una forma de "economía proteica" así mismo este mecanismo podría suponer ventajas energéticas para el organismo (Hawkins 1985). En el caso del pulpo, es posible que estas disminuciones en la K_D en animales que crecen rápidamente contribuyan a la temprana senescencia, característica de estas especies (O'Dor y Wells 1987), ya que disminuiría la velocidad de reparación de proteínas anormales.

I.2.5.3.2. Crecimiento proteico y síntesis en los tejidos.

La relación lineal encontrada entre crecimiento proteico y síntesis de proteínas para el organismo completo descrita para el bacalao y pulpo. Se repite para tejidos individuales aunque existen algunas diferencias tisulares (Houlihan et al. 1988b, 1990b).

En los peces, el músculo blanco contribuye con el 40-60 % del contenido proteico total y con el 30-40 % de la síntesis de proteína total (Fauconneau y Arnal 1985, Houlihan et al. 1988b). Mas importante el músculo es el mayor sitio de acumulación de proteínas en el pez, poseyendo una baja degradación proteica (Fauconneau 1985, Houlihan et al. 1986, Houlihan y Laurent 1987, Houlihan et al. 1988b). La K_S del músculo blanco es la mas sensible al estado nutricional del pez (Fauconneau et al. 1981, Smith 1981, Lied et al. 1985); en el bacalao esta incrementa hasta siete veces al incrementar la velocidad de crecimiento y demostrando así la estrecha relación entre ambas.

Estas observaciones permiten creer que la medida de las velocidades fraccionarias del músculo blanco son un buen indicador de las velocidades de crecimiento del animal completo (Smith 1981, Fauconneau et al. 1990). La pendiente de la línea que relaciona la K_G y la K_S es 1.76 para la trucha arco iris y 1.53 para el bacalao (Houlihan et al. 1986). Estas pendientes son del mismo rango que la de cerdos y niños malnutridos (Young et al. 1975).

Podría ser interesante comparar las velocidades de crecimiento del pez y el peso relativo del músculo blanco para testar la hipótesis de que la proporción del bajo recambio en el músculo blanco determina la ERP del organismo completo.

En estudios llevados a cabo en ribosomas aislados de músculo epaxial de *Pollachius virens* inmaduros con un peso medio de un kilo mantenidos en ayuno o alimentados con diferentes cantidades de energía dietaria durante nueve semanas, se encontró que a medida que se incrementaba la ración de ingesta incrementaba: su capacidad de sintetizar proteínas, el contenido en poliribosomas y el crecimiento del pez. Los cambios en el crecimiento y en la síntesis de proteínas dependientes de la ración del alimento, se acompañaban con cambios en la composición de la proteína muscular más cuantitativos que cualitativos. La relación proteína/energía en las diferentes dietas se mantuvo constante (Roselund et al. 1984).

Lied y Rosenlund (1984) en estudios con ribosomas aislados de músculo blanco de bacalao atlántico analizan la influencia de distintos niveles de la relación energía/energía total (PE/TE) sobre la actividad de síntesis proteica y sobre los niveles de RNAr y RNA/DNA. Encontrando que a medida que las concentraciones de proteína dietaria aumentaban hasta el 47,4 % PE/TE se incrementa la capacidad ribosómica para la síntesis de proteína por gramo de peso fresco y por mg de DNA, así como los contenidos de RNAr y RNA/DNA.

A medida que se incrementa la concentración de proteína dietaria del 10 al 47,4 % aumenta la capacidad de sintetizar proteínas y su relación con la concentración de RNAr y DNA, manteniéndose en niveles similares en condiciones dietarias mayores de 47,4 % hasta 74.1 %. Paralelamente a estos incrementos se encontró aumentos en la concentración de RNA. Los contenidos de DNA en el músculo no varían significativamente entre los distintos grupos experimentales.

El músculo cardiaco se le ha encontrado una K_s aproximadamente cuatro veces mayor que la del musculo blanco (Haschemeyer et al. 1979, Smith et al. 1980, Fauconneau 1985, Houlihan et al. 1986, McMillan y Houlihan 1988). En general, la K_s del músculo rojo es mayor que la del músculo blanco. Estos resultados coinciden con los encontrados en mamíferos (Goldspink et al. 1984).

Las fibras de baja tonicidad, predominantemente fibras oxidativas en la pata del cangrejo *Carcinus*, también tienen una mayor síntesis proteica que las fibras musculares predominantemente glucolíticas (El Haj y Houlihan 1987).

Estudiando la distribución de las velocidades fraccionarias de síntesis en las distintas fracciones subcelulares del músculo blanco y rojo de peces se observa (Houlihan 1990):

- Excepto para las miofibrillas del músculo blanco, se encuentra una buena correlación entre la K_s del organismo completo y la K_s de las distintas fracciones crudas: soluble, mitocondrial y miofibrilar.

- Al igual que lo encontrado en el músculo esquelético de mamíferos (Lobley y Lovie 1979), el orden de las fracciones según su valor de K_s es: mitocondrial > soluble > miofibrillas, tanto en el músculo rojo como en el blanco.

- La K_s de la fracciones mitocondriales varían según el tejido considerado,

siendo mayores la del hígado que la del músculo blanco. De la misma manera, la síntesis miofibrilar es mayor en el ventrículo que en el músculo blanco y rojo.

Al igual que el ayuno a corto plazo en la trucha arco iris produce una reducción en la velocidad de síntesis de músculos completos y fracciones individuales y una disminución en la actividad citocromo C oxidasa. De forma similar las velocidades de síntesis de miofibrillas de mamíferos se han encontrado marcadamente sensibles a la nutrición (Bates y Millward 1983). Existen algunos trabajos en que se correlaciona el estado nutricional del pez y los niveles de enzimas glucolíticos y oxidativos (Sullivan y Somero 1983, Goolish y Adelman 1987) y sería de interés correlacionar el plano de la nutrición con el músculo completo y síntesis de proteínas mitocondrial así como con la actividad enzimática.

El orden de los distintos tejidos en cuanto a valores de su K_s puede ser paralelo con el orden en cuanto a su consumo de O_2 así como con su contenido en RNA (Houlihan 1990?).

I.2.5.3.3. Ayuno y Realimentación.

Durante la vida de los peces existen períodos donde el aporte de alimento no es suficiente para mantener sus funciones vitales y el crecimiento normal de los diferentes tejidos, son p.e. períodos de escasa productividad bentónica, p.e. en invierno para el bacalao (Hawkins et al. 1985) o bien las fases reproductivas donde los tejidos específicos se encargan de absorber gran parte de las reservas energéticas. Sin embargo, estos animales son capaces de soportar extensos períodos de ayuno manteniéndose en circunstancias naturales. Deben existir pues, mecanismos de reserva energética que permitan el aporte nutritivo necesario a

los diferentes tejidos en estas situaciones.

Los efectos del ayuno sobre la movilización y utilización de combustibles celulares por parte de los diferentes tejidos depende de las especies y de la longitud del período.

I.2.5.3.3.1. Movilización de reservas energéticas.

En períodos iniciales de ayuno, en la anguila (Inui y Oshima 1966, Larsson y Lewander 1973, Dave et al. 1975), trucha arco iris (Robinson and Mead 1973) y en la platija (Jobling 1980, Moon and Johnston 1980) se utilizan las reservas lipídicas hepáticas y después las musculares. En *Dicentrarchus labrax* (Stirling 1976) y *Esox lucius* (Ince y Thorpe 1976) los depósitos lipídicos extrahepáticos (intestinales) se degradan antes que los del hígado. En el bacalao (Black and Love 1986) se movilizan lípidos hepáticos y glucógeno del hígado y músculo blanco simultáneamente, agotándose en primer lugar los lípidos hepáticos. En este tipo de ayuno, no existe una pérdida significativa de masa muscular, manteniéndose constante la concentraciones de ADN por gramo de tejido aunque disminuye el contenido en ARNr tras 8 días de ayuno (Lied et al. 1983). La concentración de aminoácidos plasmáticos en la carpa disminuye durante los primeros pocos días y después se mantiene estable (Créach y Serfaty 1974). Hay pocos cambios en las concentraciones de aminoácidos del músculo e hígado aunque la relación Aminoácidos esenciales/Aminoácidos no esenciales disminuye. Las pérdidas de nitrógeno fueron mayores en el intestino que en el riñón > hígado > bazo > músculo.

Los principales efectos de un ayuno prolongado son incrementos en las actividades proteolíticas musculares y movilización de aminoácidos derivados

de las proteínas musculares para la utilización de los tejidos mas vitales. Así durante un ayuno extenso (8 meses), se inicia el catabolismo de proteínas musculares y los aminoácidos resultantes son las principales fuentes de energía del pez. Las pérdidas de nitrógeno fueron mayores en el músculo > bazo > riñón > hígado > intestino. Las concentracion de aminoácidos cambian poco en el hígado, bazo y riñón, pero disminuyeron diez veces en el músculo blanco y dos veces en el intestino comparadas con las concentraciones iniciales. Comportamiento similar ha sido descrito además de la carpa, para otras especies p.e. anguila (Dave et al. 1975), anguila americana (Moon 1983), platija (Moon y Johnston 1981) y besugo (Woo y Fung 1981). En el bacalao, Black y Love (1986) encuentran que tras 20 semanas de ayuno a 9°C el glucógeno del músculo rojo está virtualmente acabado, quedando unicamente las proteínas musculares como fuente energética única. El ayuno produce una caída significativa en la glucosa, lípidos, y acidos grasos no esterificados de la sangre. Esta caída significativa puede ser el resultado de que los lípidos son almacenados casi exclusivamente en el hígado del bacalao. En mamíferos y teleósteos con almacenes lipídicos extrahepáticos, el ayuno produce un aumento en los acidos grasos no esterificados y glicerol, así como los triglicéridos almacenados son movilizados para el metabolismo por el hígado (Zammit y Newsholme 1979). En el bacalao, sin embargo, como la mayoría de los triglicéridos están en el hígado no necesitan sus productos entrar en la circulación sanguínea. Según Takama et al. (1985) parece que existen diferencias en las prioridades de movilización de algunos acidos grasos individuales según el ayuno del animal coincida o no con el desarrollo de las gónadas. A diferencia de eslamobranquios y mamíferos, los cuerpos cetónicos no parecen tener importancia como fuente energética en bacalaos ayunados.

Un buen ejemplo de este tipo de ayuno se da durante la migración para el desobe del Sockeye Salmon, el catabolismo de las proteínas musculares es precedido de incrementos de 3 a 7 veces en las actividades musculares de enzimas proteolíticas, catepsina D y carboxipeptidasa A (Mommsen et al. 1980). Debido a esto, existe un cambio en la composición total de las proteínas musculares, que se enriquecen en glicocola e hidroxiprolina pero disminuyen su concentración de cisteína y metionina. La razón es que las proteínas contractiles son movilizadas más rápidamente que las fibras conectivas ricas en colágeno (Cowey et al. 1962, Créach 1972). Todos los aminoácidos pueden producirse por la actividad catabólica pero en estudios con músculo de la cola del pez perro, solo la alanina es liberada en cantidades significativas durante el ayuno (Leech et al. 1979). También durante la migración del desobe del salmón (Mommsen et al. 1980) encuentran que la alanina fué el principal aminoácido liberado del músculo blanco para el transporte a otros tejidos.

En estos animales, los niveles de glucógeno hepático y muscular en esta situación disminuyen poco, si acaso (French et al. 1983) muestra que sobre el curso de una migración de más de 1000 kms las concentraciones de glucógeno muscular y hepático del salmón pacífico (*Oncorhynchus nerka*) cambian poco; las concentraciones en ambos tejidos aumentan gracias a la gluconeogénesis antes del desobe. En experimentos de laboratorio con anguila europea (*Anguilla anguilla*) de peso medio aproximado de 130 g, las concentraciones de glucógeno hepático no cambian hasta los 96 días de ayuno y el muscular hasta los 164 días (Dave et al. 1975). Este tipo de comportamiento no parece ser una adaptación específica al desobe, pues en estudios en la carpa, tras veintidos días sin alimentación, el nivel de glucógeno en el hepatopáncreas pasó de 8.51 % al 10.65 % incluso tras cien diez de ayuno el 1.55 % se mantenía en el

hepatopáncreas (Nagai e Ikeda 1971a).

I.2.5.3.3.2. Cambios en las actividades enzimáticas.

Los efectos sobre las actividades enzimáticas son variables. Se han descrito incrementos en las actividades hepáticas de la alanina y aspartato amino transferasas en el besugo (Woo y Fung 1981), carpa (Créach y Serfaty 1974), anguila (Larsson y Lewander 1973) y platija (Moon y Johnston 1980, 1981) después de ayunos prolongados. Incrementos en la actividad de la PEPCK soluble fueron detectados en hígado de platija. En general, hay disminución en los niveles enzimáticos y metabolismo tisular del músculo esquelético durante el ayuno, pero la integridad metabólica hepática parece mantenerse (Moon y Johnston 1980, 1981).

I.2.5.3.3.3. Velocidades de crecimiento y turnover proteico en peces durante el ayuno.

El patrón general que define el comportamiento de las velocidades de recambio proteico en los diferentes tejidos de peces ayunados se caracteriza por la existencia de unos niveles basales de síntesis de proteínas y elevadas velocidades de degradación capaces además de suplir de sustratos energéticos a las necesidades celulares, suministrar los aminoácidos esenciales imprescindibles para el correcto funcionamiento celular. El resultado en general es un exceso de la degradación sobre la síntesis que como resultado final ocasiona una pérdida de peso.

Una disminución en las velocidades de síntesis de proteínas con el ayuno se

ha descrito en muchas especies (Jackim y LaRoche 1973, Smith y Haschemeyer 1980, Smith 1981, Haschemeyer 1983, Lied et al. 1983, Pocrnjic et al. 1983, Loughna y Goldspink 1984, Houlihan et al. 1988b, Watt et al. 1988). Algunos autores han sugerido que la reducción en el consumo de oxígeno que acompaña al ayuno es en parte debida a una reducción en las velocidades de síntesis proteica (Smith y Haschemeyer 1980, Smith 1981, Lied et al. 1982).

En el hígado, existen resultados en cierta medida contradictorios, mientras que en estudios iniciales (Smith y Haschemeyer 1980, Haschemeyer 1983, Pocrnjic et al. 1983, Smith 1981, Loughna y Goldspink 1984) no se observan cambios significativos en las velocidades de síntesis de proteínas durante el ayuno, lo que ha hecho que algunos autores lo califiquen como tejido regulador (Fauconneau 1985) y que este tejido se considere con poca o nula capacidad de respuesta ante esta situación fisiológica. McMillan y Houlihan (1992) encuentran que la velocidad fraccionaria de síntesis proteica (K_s) disminuye progresivamente con el ayuno hasta alcanzar un nivel basal a los cuatro días de ayuno de solo el 20 % del valor obtenido a las 3 horas de alimentación. El peso del hígado, el ARN total y las proteínas totales disminuyen gradualmente. Entre los cuatro días y los seis días de ayuno, tanto la cantidad de proteína sintetizada por unidad de ARN (C_s) como la K_s aumentan significativamente (11 y 74 %). En este tiempo existe también una gran pérdida de peso de proteínas hepáticas lo cual sugiere un aumento en la degradación proteica. Aunque en ayunos a corto plazo exista una disminución en la velocidad de síntesis coincidente con altas concentraciones de aminoácidos dietarios en plasma, estómago casi lleno, K_s del estómago estimulada, tras un ayuno más prolongado, en el que empieza a existir pérdida de proteínas hepáticas se produce un aumento tanto en la K_s como de la velocidad de degradación (K_D); estos cambios coinciden con una situación en la

que el intestino está vacío. Los autores sugieren que posiblemente sean los glucocorticoides plasmáticos los responsables principales de esta respuesta a largo plazo, teniendo en cuenta que los niveles de estos están aumentados y los de la insulina y T_3 disminuidos en periodos de ayuno (Matty y Love 1985). Parece también que la respuesta de la K_S al ayuno depende del nivel de la ración dado a los peces antes de ayunar. Al prealimentar a las truchas con bajas raciones (0.6 % día), el índice hepatosomático, la cantidad total de ARN y proteína no se afectaron por los seis días de ayuno, siendo la K_S a las 3 horas significativamente mayor que las alimentadas con altas raciones (1.5 % día). Además, a los seis días de ayuno, la K_S había recuperado niveles iniciales de animales alimentados solo en el grupo de las alimentadas con bajas raciones. Este tipo de respuesta, parece apoyar el hecho de que no sean los aminoácidos dietarios los que regulan la K_S hepática.

El comportamiento del músculo blanco es diferente al del hígado, parece ser que es el tejido más sensible al ayuno, observándose fuertes disminuciones en la síntesis y paralelos incrementos en la velocidad de degradación en animales mantenidos 15 días en ayuno (Smith 1981). Resultados similares fueron encontrados por Loughna y Goldspink (1984), que observan además disminuciones en las velocidades de síntesis del músculo rojo (Jackim y LaRoche 1973, Bouche y Vellas 1975, Smith y Haschemeyer 1980, Haschemeyer 1983, Pocrnjic et al. 1983, Loughna y Goldspink 1984, Fauconneau 1985). En estudios de ayuno a corto plazo llevados a cabo por el grupo de Von der Decken con ribosomas aislados de músculo de bacalao atlántico ayunado 3,5 ó 8 días (Lied et al. 1982 y 1983) encuentran que la actividad de incorporación de aminoácidos a estos ribosomas se reducía del 12 al 18 % respecto a animales controles después de 8 días de ayuno. Esta actividad volvía

a su nivel normal después de 12 horas de realimentación. Agregados de poliribosomas disminuían en su concentración durante el ayuno y volvían a incrementarse de nuevo a las cuatro horas de realimentación. En este ayuno a corto plazo, en el que no existe una pérdida significativa de masa muscular, se mantiene constante la concentración de ADN/gr tejido, disminuyendo sin embargo el contenido de ARNr durante los 8 días de ayuno volviendo a los niveles normales tras 8 horas de realimentación.

Los mecanismos de degradación de proteínas intracelulares son en gran medida desconocidos. Existen evidencias de que hay distintas velocidades de pérdida de peso entre tejidos individuales durante el ayuno (Love 1980). También parece que la historia nutricional previa de cada individuo puede determinar los costes de mantenimiento durante los periodos iniciales de ayuno (Hilton 1982). Uno de los más destacados ejemplos de ayuno a largo plazo ocurre durante la maduración sexual del salmón atlántico (Salmon salar), que puede soportar varios meses sin comer antes de su vuelta al río, tiempo durante el cual los animales consiguen la madurez sexual. Los cambios en el turnover de proteínas de salmones que están madurando sexualmente mantenidos sin comer durante 4 meses (Julio a Octubre) han sido estudiados recientemente por Martin (1990). Durante este período la pérdida del 15 % de peso corporal en las hembras, fue debida a una mezcla de respuestas en tejidos individuales. El músculo blanco, estómago y el intestino disminuyen en proporción al peso corporal total, mientras que el hígado, en las hembras, gónadas, branquias y músculo rojo en los machos, exhiben un incremento en la proporción relativa corporal. Solo el ventrículo permanece en proporción constante con el peso corporal. Los valores de K_s están elevados después de cuatro meses de ayuno en hígado, ovarios, estómago y ventrículo. Músculo blanco y las bránquias no

cambian y solo el músculo rojo disminuye. Las velocidades de degradación exceden a las de síntesis en las bránquias, ventrículos, músculo rojo, músculo blanco y estómago. Mientras en el ovario, la síntesis excede a la degradación. El diseño total es de una gran pérdida de proteínas del músculo blanco que es acompañada por un continuo turnover de proteínas incluso mayor que el que podría esperarse con los bajos niveles de síntesis. El hígado, branquias ventrículo y músculo rojo continúan recambiando proteínas. El estómago aparentemente no tiene misión digestiva, y sin embargo presenta un recambio proteico elevado. (Martin 1990, Houlihan 1991).

Los distintos tipos de músculos locomotores de los peces, rojo y blanco, presentan una gran capacidad de alterar sus propiedades fisiológicas y bioquímicas en respuesta al ayuno. Los cambios que se producen en la concentración y composición de proteínas en ambos músculos son diferentes. En *Pleuronectes platessa*, mientras el músculo blanco pierde una significativa proporción de proteínas miofibrilares, en el músculo rojo, donde esta porción se conserva, se pierden proteínas mitocondriales y sarcoplasmáticas dando lugar a una relativa conservación de la masa de músculo rojo (Patterson y Goldspink 1973, Patterson et al. 1974). En trucha arco iris se produce una disminución rápida en la síntesis de proteínas del músculo blanco en los primeros días de ayuno, mientras que en el músculo rojo no se afecta (Loughna y Goldspink 1984). Durante ayunos intensos, la síntesis de proteínas en músculo rojo se mantiene mayor que en el músculo blanco poseyendo un mecanismo para la economía del músculo rojo en ayunos a largo plazo. Lowery y Somero (1990) encuentran que en el ayuno de *Paralabrax nebulifer* en el músculo blanco se produce una rápida disminución de las proteínas fibrilares mientras que las sarcoplasmáticas permanecían constantes. Aunque se observa una disminución

inmediata de la incorporación de la leu* a la actina y aldolasa aproximadamente del 10 %, LDH y creatina fosfoquinasa muestran una disminución inicial menor. Frente a una clara pérdida de la capacidad glucolítica se conservaron las actividades relativas de los enzimas glucolíticos. Según estos autores, el control de velocidades de síntesis específicas puede ser importante en el mantenimiento de un balance total de proteínas con diferentes vida media. En el músculo rojo, el ayuno no produce reducción en ninguna de las proteínas examinadas. Cambios en la síntesis de proteína muscular se refleja en una gran disminución en la relación RNA/DNA mayor en el músculo blanco que en el rojo.

I.2.5.3.4. Realimentación.

I.2.5.3.4.1. Respuesta metabólica postpandrial y restauración de las reservas energéticas.

En muchas especies de peces está descrito un importante incremento en las rutas anabólicas tras el suministro de una comida. Se han descrito:

- Fuertes incrementos en el consumo de oxígeno, llegando a alcanzar un pico y volviendo a las pocas horas a valores normales.
- Aumento en la velocidad metabólica con el incremento de la ración en el bacalao (Soofiani y Hawkins 1985) y en la trucha arco iris (From y Rasmussen 1984).
- Estrecha relación entre la velocidad de asimilación y la velocidad respiratoria en *Daphnia magna* (Bohrer y Lampert 1988).

El responsable de todos estos efectos posiblemente sea una acción dinámica del alimento (SDA) potenciadora de la velocidad metabólica (Beamish 1974).

Para algunos autores esta acción dinámica del alimento debe reflejar un incremento en la síntesis de proteínas y en el crecimiento (Jobling 1985).

Además de esta acción genérica del alimento, durante la realimentación de animales ayunados se desencadenan una serie de mecanismos bioquímicos encargados restaurar las reservas energéticas casi agotadas por el ayuno. Tras un ayuno largo, 107 días, en el bacalao atlántico, Black y Love (1986) describen una respuesta múltiple según el compuesto considerado. Así observan que los niveles de algunos metabolitos alcanzan un valor mayor que el encontrado en animales completamente alimentados, sobrecompensación (overshoot). Este es el caso del glucógeno hepático y muscular, tanto en el músculo blanco como en el rojo, ácidos grasos plasmáticos no esterificados y en la razón RNA/DNA, actividad de síntesis proteica tisular, en hígado y músculo blanco y rojo. Otros, como la glucosa, recuperan sus valores normales tras 200 días de realimentación. Los lípidos hepáticos no inician la recuperación hasta que el contenido en agua del músculo blanco disminuye por debajo del 82 %; no se reemplazan hasta que las proteínas del músculo blanco se han regenerado. Tras un ayuno corto, cuando los peces se realimentaron con músculo de calamar, pobre en lípidos, se observó un aumento en la concentración de glucógeno muscular, mientras que en los realimentados con músculo de arenque (rico en lípidos) incrementaban al máximo sus lípidos hepáticos. Los diferentes períodos de realimentación que producen incrementos en los valores máximos del glucógeno en el músculo rojo y músculo blanco coinciden respectivamente con las relaciones máximas de RNA/DNA, sugiriendo que el propósito de estos inusualmente altos valores de glucógeno es aportar la energía necesaria para la regeneración muscular.

I.2.5.3.4.2. Velocidades de turnover proteico en diferentes tejidos de peces ayunados.

En el caso de la trucha arco iris, la realimentación tras seis días de ayuno produce un incremento postprandial en la síntesis de proteínas en todos los tejidos (McMillan y Houlihan 1988). Sin embargo, el tipo de respuesta a lo largo del tiempo varía según el tejido.

El ventrículo, músculo rojo y músculo blanco, muestran una respuesta lenta y gradual, alcanzando el músculo blanco los valores de animales continuamente alimentados tras doce horas de realimentación. También se han encontrado incrementos en el músculo blanco del salmón nueve horas después de la alimentación. Las branquias, el estómago y el intestino aumentan rápidamente sus niveles de síntesis a las tres horas de realimentación manteniéndose esta activación. El hígado muestra un incremento transitorio a las tres horas y un declive posterior. Posteriormente encontraron que este incremento puede producirse a la hora de realimentar (McMillan y Houlihan 1989). Los mismos autores recientemente (McMillan y Houlihan 1992) encuentran incrementos en la KS del hígado del 46, 123 y 72 % tras 1,5, 3 y 6 horas después de la realimentación. En general, la naturaleza de estos cambios tisulares no es el aumento en la capacidad de síntesis, pues no se encuentran cambios significativos en la relación RNA/proteína (McMillan y Houlihan 1988) durante la realimentación. No obstante cambios en la eficacia de traducción (K_{RNA}) pueden ser los responsables de estos comportamientos.

En estudios llevados a cabo con fraccionamientos subcelulares de hígados de trucha (McMillan y Houlihan 1989, 1990) se observa como en animales ayunados los valores más altos de síntesis proteica se encontraron en la fracción

mitocondrial. Tras la alimentación se encontraron incrementos en todas las fracciones hepáticas, siendo el mayor el de la fracción mitocondrial. La fracción de proteínas solubles postmitocondrial es la que, en términos absolutos, más contribuye a la síntesis hepática total tras la alimentación.

Según Padian (1987), después de una comida, el consumo de oxígeno tarda de dos a seis horas en alcanzar los niveles máximos en muchas especies de peces. Si en la trucha arco iris se repite este comportamiento, posiblemente sea la respuesta hepática, la mejor candidata para explicar este rápido incremento en el consumo de oxígeno.

Se han encontrado resultados similares en el bacalao, aumentando la síntesis proteica en el hígado con la alimentación. Los incrementos en el consumo de oxígeno son paralelos con incrementos en la síntesis proteica del animal completo (Lyndon et al. 1989 y Houlihan 1990). En el pez gato se han descrito incrementos en las velocidades de síntesis proteica del músculo blanco e hígado paralelos a incrementos en el consumo de oxígeno tras la infusión de aminoácidos esenciales (Brown y Cammeron 1986, Brown 1988). Incluso se ha eliminado el incremento en el consumo de oxígeno al inhibir con cicloheximida la síntesis proteica (Brown 1988).

Estos resultados revelan que el incremento postpandrial en el consumo de oxígeno en peces puede estar acompañado por una respuesta en la síntesis proteica del animal completo. La respuesta en el animal completo a la comida parece ser una mezcla de la de los tejidos individuales.

Otros estudios han demostrado una respuesta muy similar en el cangrejo, *Carcinus maenas*, llegando incluso a ser mayor el incremento observado en la velocidad de síntesis tras la alimentación que en la trucha arco iris (Houlihan et al. 1990b).

METODOS

II.1. ANIMALES.

II.1.1. Selección y transporte.

Los animales utilizados fueron suministrados por una piscifactoria local (Riofrío, Granada), en la cual truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de pesos correspondientes para cada experimento, eran seleccionadas de entre las poblaciones disponibles en ese momento. De entre las poblaciones se elegían en los estanques, las que presentaban un mejor crecimiento ("cabezas de población") índice de un estado fisiológico óptimo, eliminándose todas aquellas que presentaban síntomas de estar sufriendo alguna infección bacteriana o parasitosis. Estos animales se mantenían 24 horas de ayuno antes de la separación y selección.

El transporte hasta los acuarios ubicados en la Facultad Ciencias, duraba aproximadamente 1 hora, y se realizaba en un tanque de fibra de vidrio de 110x65x50 cm, (350 l), perfectamente cerrado y de paredes lisas, para evitar heridas. Se le suministraba un aporte continuo de oxígeno y se controlaba la temperatura periódicamente durante el trayecto. El estrés al que se sometía a los animales durante el transporte era el mínimo, pues siempre se cuidaba de que la carga fuese la idónea, que la temperatura del agua y el aporte de oxígeno fuese el adecuado y que el transporte se hiciese lo menos brusco posible.

El trasvase de los animales del tanque de transporte hasta los acuarios se cuidaba en exceso, evitándose cambios bruscos de temperatura y golpes entre animales y con los utensilios de manipulación.

II.1.2. Adaptación y desinfección.

Los animales se disponían en cubas de polietileno (HDP) de 160 l (45x70x52 cm) independientes unas de otras, con un aporte continuo de agua fresca con un flujo de 1,5 l/min., suministrada por la red municipal que era tratada previamente para dechloración y desodorización haciendola pasar por un filtro Permo-Fac-50. La renovación continua permitió además de mantener unas condiciones de oxígeno y temperatura adecuadas, la no acumulación de desechos y sustancias tóxicas, especialmente amoniaco. La oxigenación de los tanques a niveles de saturación (8-9 % de O₂) se realizó mediante difusores conectados a un soplante (Siemens) de 1 HP de potencia. La temperatura del agua se mantuvo a 16.01.5 °C gracias a un sistema automático de calefacción y refrigeración. La desinfección de las cubas con lejía y amonio cuaternario y posterior desague durante 48 horas, se realizaba siempre al acabar un bloque experimental e iniciar el siguiente. Las retiradas de heces por sifonado así como la desinfección del material de limpieza se hacía diariamente, cuidandose además de la limpieza de zonas anexas a los acuarios y limitándose el acceso a los mismos durante el período experimental.

En todos los casos, los animales se mantuvieron al menos quince días de adaptación a las nuevas condiciones ambientales, hasta que comían con avidez y no presentaban signos de infecciones, que latentes en la piscifactoria a veces se llegaron a manifestar en los acuarios. La cloramita T a una concentración de 35 gr/m³/30 minutos se utilizó para controlar septicemias bacterianas. En otra ocasión, el amonio cuaternario (2 mg/l/15 minutos) se utilizó para atajar una infección de mixobacterias.

Durante el periodo de adaptación, se les suministró a los animales la

misma dieta comercial utilizada en la piscifactoria "ad libitum".

II.1.3. Selección y clasificación inicial.

Una vez los animales adaptados a las condiciones del acuario para el inicio de cualquiera de los experimentos posteriores se realizaba una selección de pesos lo más estricta posible. El objetivo era iniciar el experimento con poblaciones de truchas lo más homogéneas posible en peso. Para ello se pesaban individualmente cada animal previamente anestesiado con etilenglicol monofenil éter (1-1,5 ml/10 l de agua) y cada animal se clasificaba en un lote de peso; oscilando el intervalo de pesos de cada lote en unos 10-15 gramos. Una vez controlada toda la población los lotes se repartían equitativamente para conseguir que la media del peso de cada población de partida fuese casi idéntica. El día anterior y posterior a la pesada se mantenía a los animales en ayuno.

A partir del segundo día tras la pesada, se iniciaba la administración del alimento dos veces al día (09.00 y 17.00 hrs), que según Cowey (1981) y Fauconneau y Luquet (1984) permiten obtener las mejores tasas de crecimiento.

La comida se suministraba "ad libitum", controlándose de forma precisa las cantidades ingeridas, que se expresaban además de en cantidades absolutas, referidas por gramo de pez.

II.1.4. Índices de conversión del alimento y la proteína.

La eficacia de utilización de la dieta (Food efficiency, FE) y de la proteína (Protein Efficiency Ratio, PER) se calcularon según las relaciones siguientes:

FE= Incremento peso (g)/Peso de dieta ingerida (g).

PER= Incremento peso (g)/Peso de proteína ingerida (g).

II.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

II.2.1. Experimento de Desarrollo.

Para estudiar el efecto del desarrollo sobre las capacidades de turnover proteico se diseña un bloque experimental caracterizado por el estudio de dichas velocidades en animales en diferentes estadios de crecimiento. Así se escogen poblaciones de 7, 45, 65, 170 y 420 g. Cada grupo de pesos se mantuvo durante 25 días con una alimentación a base de dietas comerciales de alta calidad cuya composición se recoge en la tabla II.1.

Tabla 1.1. Composición global de las dietas comerciales utilizadas para cada peso.

	7 g	45 g	65 g	170 g	420 g
Proteína	46.5	47.8	46.4	43.9	44.0
Lípidos	10.6	10.6	10.6	12.0	12.0
HC Digestibles	8.0	14.9	8.0	8.0	8.0
Energía Bruta (KJ/g)	14.68	18.05	14.69	14.69	14.7

Se asumió que el valor energético de la proteína, lípidos y carbohidratos fué 19.6, 39.5 y 17.2 KJ/g respectivamente.

El número de peces utilizado de partida para cada peso fué de 50 salvo para la población de 420 g que fué de 25. Periódicamente, cada 7 días se realizaba un control de peso de cada población, tanto para el animal completo, hígado y músculo como para la determinación de la concentración de proteínas de estos órganos.

II.2.2. Regulación Nutricional.

II.2.2.1. Formulación y elaboración de las dietas.

Para estudiar la influencia de los cambios en el contenido de macronutrientes dietarios sobre las capacidades de recambio proteico del hígado y del músculo blanco de la trucha arco iris se formularon cuatro tipos de dietas que diferían principalmente en su contenido en dichos macronutrientes y cuya composición se recoge en la tabla II.2.

Las fuentes proteicas empleadas fueron harina de pescado y proteínas solubles cuya composición se recoge en la tabla II.2. Como fuente de lípidos se utilizaron mezcla de aceite de pescado, rico en ácidos grasos W^3 , y aceite de maiz, rico en linoleico y linolénico. Como fuente hidrocarbonada se usó el almidón cocido de maiz. Carboximetilcelulosa fué utilizada como aglutinante. La composición y proporción de suplemento mineral y vitamínico, se recoge en la tabla II.2. Celulosa micronizada fué utilizada como diluyente hasta completar el 100 % de la dieta.

El cálculo de la energía bruta de las dietas se realizó según los índices propuestos por Brafield (1985). Tres de ellas eran isocalóricas (Dieta B,C y D) y una hipercalórica (Dieta A). El valor de la relación proteína/energía, fué el mayor para las dietas C y D, intermedio para la dieta A y el menor para la B. La relación energía proteica/energía no proteica muestra un patrón idéntico al de la relación P/E.

Los ingredientes de la dieta, excepto los aceites, se mezclaron siempre las cantidades de menor a mayor. Tras añadir la grasa se tamizó la mezcla 3-4 veces para conseguir la total homogenización de los aceites con el resto de

ingredientes. La pasta obtenida al añadir el agua correspondiente se granuló utilizando una matriz perforada de 5 mm. Una vez obtenidos los gránulos, se secaron sobre hojas de papel de filtro hasta reducir su humedad a un 10 %, empaquetándose en bolsas opacas y herméticas y conservándose en la cámara fría a 4°C hasta su uso.

Tabla II.2. Composición general de las dietas experimentales (g/Kg dieta).

	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/00)
Harina de pescado ¹	508.7	254.3	508.7	508.7
Proteínas solubles ²	47.8	23.9	47.8	47.8
Aceite de pescado	54.2	72.1	4.2	54.2
Aceite de maíz	90.0	90.0	40.0	90.0
Almidón cocido	230.0	230.0	230.0	--
Suplemento vitamínico ³	20.0	20.0	20.0	20.0
Suplemento mineral ⁴	50.0	50.0	50.0	50.0
Carboximetilcelulosa	--	--	--	20.0
α-Celulosa	--	259.7	99.3	209.3
Composición aproximada (% materia seca)				
Proteínas	40.0	20.0	40.0	40.0
Lípidos	18.0	18.0	8.0	18.0
HC digestibles	23.0	23.0	23.0	--
Energía bruta (KJ/g) ⁵	18.91	14.99	14.96	14.95
P/E [(g/KJ)x100] ⁶	2.11	1.33	2.67	2.67
EP/ENP ⁷	0.71	0.35	1.10	1.10

¹ La harina de pescado estaba compuesta de 6.53 % de grasa, 70.77 % de proteína y 8.72 % de agua. ² Las proteínas solubles estaban compuestas de 5.36 % de grasa, 83.55 % de proteína y 9.65 % de agua. ³ El suplemento vitamínico contenía (g/300 g) tiamina 0.6, riboflavina 0.9, piridoxina 0.45, pantotenato cálcico 2.25, ácido nicotínico 3.75, ácido fólico 0.225, inositol 15, colina 75, biotina 0.045, cianocobalamina 0.10, ácido ascórbico 15, vitamina A 0.00225, vitamina D 0.001125, vitamina E 3.75, vitamina K 0.375 y sacarosa hasta 300 g de mezcla. ⁴ El suplemento mineral contenía (g/800 g mezcla): fosfato monobásico de calcio 480, carbonato cálcico 104, cloruro potásico 40, cloruro sódico 64, sulfato magnésico 3.2, sulfato férrico 24, cloruro magnésico 73.6, ioduro potásico 0.32, sulfato cúprico 0.8, sulfato de zinc 3.2, sulfato de cobalto 0.8, selenito sódico 0.0348, sulfato cúprico 0.8, sulfato de zinc 3.2, sulfato de cobalto 0.8, selenito sódico 0.0348, sulfato aluminico 0.16 y sacarosa hasta 800 g de mezcla. ⁵ Se asumió que el valor energético de la proteína, lípidos y carbohidratos fue 19.6, 39.5 y 17.2 KJ/g respectivamente. ⁶ P/E=Proteína/Energía. ⁷ EP/ENP=Energía Proteica/Energía No Proteica.

Mediante los correspondientes análisis se determinó la composición definitiva de cada una de las dietas experimentales.

II.2.2.2. Diseño experimental.

Para estudiar el efecto de estos cuatro tipos de dietas se utilizaron lotes de 55 animales de un peso aproximado de 110 g. Cada dieta se le suministró a los animales durante 55 días, dos veces al día. Periódicamente cada 15 días se realizaban controles de peso y contenido proteico tisular.

II.2.3. Ayuno y Realimentación.

El efecto del ayuno se estudió en una población de 75 animales, a la que se les mantuvo en esta situación durante 70 días, el turnover proteico se estudió a los 55 días de ayuno, lapso de tiempo necesario para el procesamiento experimental de las muestras antes de empezar con la realimentación posterior, que fué de 9 días. Se realizaron controles de peso y contenido proteico cada quince días.

II.3. CURVAS DE CRECIMIENTO.

Para cada grupo experimental, se determinaron velocidades de crecimiento del animal completo, hígado y músculo, a lo largo del período experimental.

El mismo día de la pesada inicial en cada experimento, se sacrificaban cinco animales para determinar el peso del animal y órganos, así como el contenido proteico de estos últimos. Esta operación se repetía cada 7-15 días.

La velocidad específica de crecimiento (K_G) durante cada periodo experimental se calculaba como el % de incremento de peso por día:

$$K_G (\%/día) = (W_2 - W_1) / W_1 \times 100 / t$$

donde W_1 y W_2 son el peso al principio y al final del período ensayado (t, días).

Las velocidades de crecimiento de los tejidos individuales se calculan como el porcentaje diario de ganancia de proteína tisular. El contenido proteico total de cada tejido se determinó al principio y al final de cada período según el método de Lowry et al. (1951) y las velocidades específicas de crecimiento se calcularon como se describió anteriormente para el animal completo.

Tomando como base los valores de pesos y de K_G obtenidos a lo largo de todo el trascurso del experimento, se generan las curvas de crecimiento teóricas, reflejo de la evolución de estos parámetros a lo largo de todo el tiempo, y que para cada caso se recoge en el apartado correspondiente de resultados.

II.4. VELOCIDADES DE TURNOVER PROTEICO.

La velocidad fraccionaria de síntesis proteica para el hígado y el músculo blanco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), fué determinada por el método descrito por Garlick et al. (1980) y aplicado a los peces por Haschemeyer (1983), Pocrnjick et al. (1983), Houlihan et al. (1986), (1988), basado en la determinación de la velocidad de incorporación de L-[2-⁴H]fenilalanina tras la administración de una dosis masiva de dicho compuesto.

Inmediatamente antes de inyectar la dosis en la vena caudal, el animal se anestesiaba con etilenglicol monofenil éter, para evitar el stress y facilitar la administración de la solución.

La solución inyectable contenía 135 mM de L-Phe y L-[2-⁶H]Phe (Amersham International) a 37.0 MBq/ml a una concentración de 100 µCi/ml en agua (radioactividad específica 1640 dpm/nmol). La dosis fué de 50 µCi y 0.5 ml/100 g de peso corporal que en un volumen sanguíneo entre el 4 y el 10 % (Jones y Randall 1978) representa del 5 al 12.5 % del volumen sanguíneo.

Después de la inyección, el pez se devolvía al agua aireada y rápidamente se recuperaba del efecto de anestésico.

Para la puesta a punto de la técnica, los animales se sacrificaban con un golpe seco en la cabeza a los 2, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección. En el resto de experimentos los animales se sacrificaron a los 2 y 45 minutos tras la inyección. Inmediatamente tras la pesada del animal, se realizaba una incisión abdominal, se extraía el hígado y se tomaba la muestra de músculo; este último siempre se tomaba de la parte dorsolateral por debajo de la aleta dorsal. Después de pesar los órganos, se tomaban muestras que se mantenían congeladas, para una posterior determinación del contenido proteico.

II.4.1. Precipitación de las proteínas. Separación de las fracciones ácido soluble e insoluble.

Las muestras que se utilizaban para la determinación del turnover se congelaban entre dos bloques de aluminio previamente enfriados a -70°C en N_2 líquido. Del polvo obtenido tras la posterior disgregación mecánica, se tomaban 1 g de muestra de hígado y músculo, que se homogeneizaba y precipitaba en 10 ml de HClO_4 al 2 % (w/v). Esta operación se realizaba utilizando homogenizadores manuales de vidrio con pistilo de vidrio, que se lavaban posteriormente para evitar pérdidas en las paredes. Las muestras se separaban en dos mitades. Una de ellas la que se utilizará para determinar la velocidad de síntesis proteica, se centrifugaba a 2,800 g durante 15 minutos.

Tras parar todas las reacciones celulares con la congelación a -70°C , manteniéndose las concentraciones de metabolitos y demás componentes, el HClO_4 al 2 % se utiliza para precipitar la fracción proteica y separar la fracción ácido soluble de la fracción proteica ácido insoluble.

II.4.2. Preparación de una solución de aminoácidos procedentes de las dos fracciones.

A los sobrenadantes se le añadía 2.5 ml de citrato potásico saturado, produciéndose la precipitación del KClO_4 y un pH muy cercano a 6. Estas muestras se centrifugaban a 2,800 g durante 10 minutos, utilizándose los sobrenadantes para medir la radioactividad de la Phe libre.

Los precipitados que contenían las proteínas, se lavaron una vez con HClO_4 al 2 % (5 ml), dos veces con alcohol 95 % (5 ml) y una vez con éter etílico (5

ml). Para obtener la fenilalanina unida a la proteína, el precipitado obtenido se sometió posteriormente a una hidrólisis en 5 ml de HCl 6 N durante 24 horas a 110 °C. El HCl fue retirado por evaporación a sequedad y los aminoácidos se resuspendieron en 3 ml de citrato sódico 2 M, pH 6.3. El conseguir el pH 6.3 en cada una de las muestras es de extrema importancia para que la fenilalanina se separe de los aniones Cl⁻ y la decarboxilación posterior pueda llevarse a efecto con efectividad.

II.4.3. Aislamiento y determinación de la radioactividad específica de la fenilalanina libre y unida a las proteínas.

II.4.3.1. Transformación de la fenilalanina en β-feniletilamina.

La determinación de la radioactividad específica de la [³H]fenilalanina implicaba su conversión enzimática en β-feniletilamina (PEA). A 1 ml de la fracción sobrenadante y 1.5 ml del hidrolizado fueron incubados con 0.5 ml de una suspensión de L-tirosin decarboxilasa (pulverizado secado con acetona de *Streptococcus faecalis* tipo 1. Sigma Biochemical. Co) durante toda la noche a 50 °C. El enzima se resuspendió en citrato sódico 0.5 M, pH 6.3; conteniendo 0.5 mg de piridoxal fosfato/ml (0.5-1 U/ml para las muestras procedentes de los sobrenadantes y precipitados respectivamente, 1 Unidad produce 1 μmol/minuto a 37 °C y pH 5.5).

Como consecuencia de la inyección con [³H]fenilalanina, otros aminoácidos como la tirosina podían aparecer marcados, de ahí que se utilizó la fase de decarboxilación de la fenilalanina como un medio de aislar de estos contaminantes. Altas actividades de fenilalanina decarboxilasa estaban presentes

en preparaciones de tirosina decarboxilasa cuando se incubaban a 50 °C y a pH 6.3 (Garlick et al. 1980). La tyramina producida por la actividad tirosin decarboxilasa no se extrae con cloroformo/n-heptano.

II.4.3.2. Separación y extracción de la β -feniletilamina.

Tras la incubación, y según el protocolo de Garlick et al. (1980), la β -feniletilamina se extrajo añadiendo 1 ml de NaOH 3M y agitación. Después se añadió 10 ml de cloroformo:n-heptano (1:3 v/v). Tras una agitación posterior, la capa orgánica fué retirada y añadida a 5 ml de cloroformo + 4 ml de SO_4H_2 0.01M y nueva agitación. En ambas extracciones todas y cada una de las muestras se agitaron durante 1 minuto.

II.4.3.3. Determinación de la radioactividad de la β -feniletilamina.

Tras la segunda extracción, 1 ml de la capa acuosa superior de las muestras procedentes de los sobrenadantes y 2 ml de las muestras procedentes del hidrolizado se mezclan con 9 y 10 ml respectivamente de líquido de centelleo (Biogreen 3, Scharlau) especial para muestras acuosas y se midió la radioactividad en un contador de centelleo Beckman LS 600 TA, con una eficacia entre el 30-40%.

La velocidad de contage variaba dependiendo del tipo de muestra y del tejido, oscilando entre:

- i) 7,000 y 13,000 dpm para sobrenadantes de hígado.
- ii) 1,500 y 2,500 dpm par sobrenandates de músculo.
- iii) 2,000 y 4,000 dpm ara hidrolizados hepáticos.

iv) 250 y 400 dpm para hidrolizados musculares.

II.4.3.4. Determinación de la concentración de β -feniletilamina total.

La determinación de la concentración total de la β -feniletilamina se realizó según una modificación del método de Suzuki y Yagi (1976). Se utilizó 1 ó 0.02 ml de la fase acuosa superior procedente de la última extracción según el origen de las muestras fuesen los sobrenadantes o los hidrolizados respectivamente. Paralelamente se prepara una curva patrón de β -feniletilamina en SO_4H_2 0.001M. A todas las muestras se le añadió 0.5 ml de 2 mM de leucilalanina, 1 ml de 50 mM de ninhidrina y 2,5 ml de 1 M de fosfato potásico, pH 8.0. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 60 °C, enfriándose rápidamente en hielo durante 15 minutos. La fluorescencia producida a 495 nm, tras la excitación a 390 nm, fué medida en un Perkin-Elmer LS-5 Luminiscence Spectrometer.

Debido a la inestabilidad del compuesto fluorimétricamente determinado al ponerse en contacto con la luz, las dos etapas posteriores a la incubación con los inhibidores, se hizo en la oscuridad.

Los resultados experimentales se expresaron como radioactividad específica de la L-fenilalanina libre (dpm/nmol), S_A ; y radioactividad específica de la fenilalanina unida a proteínas (dpm/nmol), S_B . La velocidad fraccionaria de síntesis proteica, K_S , (% día) se calcula como el porcentaje de la masa de proteínas sintetizada por día:

$$K_S = \frac{S_{B(t_2)} - S_{B(t_1)}}{S_{A(t_2-t_1)}} \times 100 / (t_2 - t_1)$$

donde $S_{B(t_2)}$ y $S_{B(t_1)}$ son la radioactividad específica unida a la proteína a los tiempos experimentales t_2 (45 minutos) y t_1 (2 minutos), $S_{A(t_2-t_1)}$ es la radioactividad específica media del pool libre sobre el período t_2-t_1 .

Para calcular la síntesis total por órgano y por día, se aplicó el porcentaje representado por la K_S al contenido proteico total del órgano ($K_S/100 \times [\text{proteína (mg/g órgano)}] \times \text{peso órgano}$).

Las velocidades de degradación proteica para cada tejido se calculó como la diferencia entre la velocidad de síntesis proteica del tejido (K_S % día) y la velocidad de crecimiento (K_G % día).

La eficacia tisular de retención de las proteínas sintetizadas en forma de crecimiento se calculó como ($K_G/K_S \times 100$).

II.5. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE DNA Y RNA TISULAR.

Para la separación, extracción y cuantificación de los contenidos de RNA y DNA se utilizó el procedimiento recomendado por Munro y Fleck (1966).

II.5.1. Precipitación de Acidos Nucleicos y proteínas. Eliminación de sustancias contaminantes.

De los tres principales procedimientos, el método de Schmidt-Thannhauser (1945) provee la mejor base teórica y práctica para una estimación precisa de los contenidos de DNA y RNA. De las varias formas posibles para este procedimiento, los autores recomiendan algunas modificaciones realizadas para tejidos animales (Fleck y Munro 1962). En nuestro caso, se ha introducido alguna pequeña modificación para poder compaginar y aplicar estas

determinaciones a las mismas muestras en que se determinará la velocidad de síntesis proteica.

El paso inicial es la homogenización y precipitación del tejido congelado en N₂ líquido en HClO₄ 2 %, posteriormente y tras una centrifugación durante 15 minutos a 2,800 g, el precipitado resultante se lava dos veces con HClO₄ 0.2 N. El sobrenadante correspondiente a la fracción soluble en ácido, se elimina.

El objetivo de estas primeras etapas, es el de eliminar pequeñas moléculas (nucleótidos libres, coenzimas, azúcares, fosfato inorgánico y compuestos de fósforo orgánico de bajo peso molecular) y lípidos que pueden interferir con las reacciones químicas para la estimación de ácidos nucleicos final. El método usual de eliminar estas sustancias es por precipitación de los ácidos nucleicos, proteínas y otras grandes moléculas con ácido en frío, usualmente tricloroacético (TCA) o HClO₄. El TCA tiene el inconveniente de que absorbe luz ultravioleta y puede interferir con las estimas posteriores de ácidos nucleicos por este método (Munro y Fleck 1966).

Los resultados de Hallinan et al. (1940), confirmaron los encontrados por Ogur y Rosen (1950), que demostraba que con el HClO₄ 0.2 N se produce una precipitación máxima de DNA y proteínas del hígado de ratas, sin extraer RNA del tejido. Es esencial mantener la temperatura entre 0 y 4 °C, si se mantiene a más temperatura, no solo el RNA se hace ácido soluble sino que la recuperación del DNA se reduce. Utilizando este procedimiento de separación, no es necesario emplear disolventes orgánicos para la extracción de los lípidos tisulares.

II.5.2. Separación y extracción de la fracción de RNA del DNA.

El procedimiento de separación de ambas fracciones según el método de Schmid-Thannhauser, se basa en el hecho de que mientras el DNA es resistente a la acción de una base, el RNA no lo es, hidrolizándose en sus nucleótidos correspondientes. El mecanismo de la diferencia en la resistencia a la base es aclarado por Fono (1947) y Brown y Todd (1952), y es debido al diferente comportamiento del enlace 3-5, fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes entre el RNA y DNA.

En el caso del RNA, la exposición al alcali produce un triéster cíclico formado con el grupo hidroxilo del C₂ de la ribosa, hidrolizándose espontáneamente en nucleótidos 2' y 3'. En el caso del DNA, la desoxiribosa al no poseer grupo hidroxilo en el C₂, no permite la formación del 2'3' fosfodiéster, resistiendo la digestión alcalina. Las condiciones más idóneas para hacer la hidrólisis básica son en KOH 0.3 N (4 ml) a 37 °C durante 1 hora. Inmediatamente pasada la hora, se enfría en hielo durante 10 minutos y se precipitan las proteínas y el DNA añadiendo 2.5 ml de HClO₄ 1.2 N. Después de mantener 10 minutos en hielo, tras una centrifugación a baja velocidad, se separa el precipitado y se decanta la fracción sobrenadante (RNA). Lavar el precipitado dos veces con 5 ml de HClO₄ 0.2N y añadir los lavados a la fracción de RNA.

El utilizar KOH tiene la ventaja de que se forma un perclorato insoluble a 0-4 °C que permite retirar el ión potasio de la fracción de RNA al final de la digestión, cuando se le añade HClO₄ al precipitado de DNA.

La forma más común de determinar el RNA en la fracción ácido-soluble de una digestión alcalina es midiendo la absorción UV a 260 nm, los principales

contaminantes que absorben la luz UV son los productos de degradación de proteínas tisulares, de ahí que sea aconsejable, un corto período de digestión en álcali (Munro y Fleck 1966), suficiente para completar la extracción del RNA y para obtener un efecto hipercrómico completo.

Para separar la fracción ácido-soluble (RNA) de la digestión, es preferible utilizar el ácido perclórico al tricloroacético por las ventajas antes expuestas. Munro y Fleck, recomiendan enfriar las muestras de la digestión alcalina a 0° C antes de acidificar para obtener una precipitación máxima. El procedimiento usado por estos autores, es acidificar la digestión a una concentración final de HClO₄ de 0.2 N, que produce una precipitación óptima de la proteína y el DNA, los lavados del precipitado con HClO₄ 0.2N permiten una completa separación del RNA y DNA.

II.5.3. Determinación de la concentración de RNA.

Al sobrenadante junto con los de los dos lavados de la fracción insoluble se le añade 10 ml de HClO₄ 0.6 N y se completa hasta 100 ml con H₂O dándonos una solución de ribonucleótidos en 0.1 N de HClO₄. En esta solución, se determina la absorción ultravioleta a 260 y 232 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70.

Se calculó la concentración de RNA según la expresión

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = 32.9 \times A_{260} - 6.11 \times A_{232}$$

La intensa y característica absorción de luz UV para las bases púricas y pirimidínicas en la región de los 260 nm se utiliza para estimar la cantidad de RNA en solución. Teniendo en cuenta, que la interferencia debida a la proteína es la principal y más frecuente causa de error en estas determinaciones, además

de acortar el tiempo de hidrólisis básica, se introduce un factor de corrección aprovechando que el espectro de absorción de la proteína es máximo a 232 nm y el del RNA mínimo a esta longitud de onda.

II.5.4. Determinación de la concentración de DNA.

Para estudiar el contenido en DNA, el precipitado obtenido de la acidificación de la digestión alcalina se disuelve en 5 ml de KOH 0.3N calentándolo suavemente hasta 37 °C. Si fuese necesario, la solución se lleva hasta 50 ml añadiéndole 12 ml de 0.3N de KOH para conseguir una solución de DNA en 0.1N de KOH; 2 ml de esta solución se usarán para estimar el DNA por el método de Ceriotti (1952).

Este método se basa en la estimación de la concentración de desoxiribosa. La técnica seguida es una modificación de la reacción inicial propuesta por Ceriotti (1952) (Webb y Ley, 1958). Depende de la formación de un compuesto amarillo-marrón cuando el DNA se calienta con indol en una solución de HCl. Este método es diez veces más sensible que la reacción de la difenilamina de Dische (1930) (Munro y Fleck 1966).

A 2 ml de muestra se le añadió 1 ml de indol al 0.04 % en agua destilada y 1 ml de HCl concentrado. La muestra se colocaba en un baño hirviendo durante 10 minutos y después se enfriaba en agua helada. La solución se extraía 3 veces con 4 ml de cloroformo, la capa acuosa se separaba de la fase orgánica por centrifugación. La intensidad del color amarillo en la fase acuosa se midió en un espectrofotómetro Beckman DU-70 a 490 nm frente a un blanco tratado de la misma forma y comparando con el valor obtenido para una curva patrón de DNA (2.5-15 µg DNA/ml).

Cantidades moderadas de RNA o ribosa u otros carbohidratos dan color de intensidad variable con el indol, pero los colores son completamente extraídos con el cloroformo.

Los contenidos de RNA y DNA se expresaron como mg/g tejido. La concentración de DNA total (mg) por órgano para el día de la determinación de la velocidad de turnover, se calcularon multiplicando el peso del órgano por la concentración de DNA correspondiente.

Bajo una situación fisiológica dada, los valores de K_S en varios tejidos de un organismo vivo son en gran medida proporcionales a las concentraciones de RNA. A la relación entre esta concentración de RNA y la concentración de proteína en el tejido se denomina C_S y se expresa como mg/mg. La C_S indica la capacidad del tejido para sintetizar proteínas.

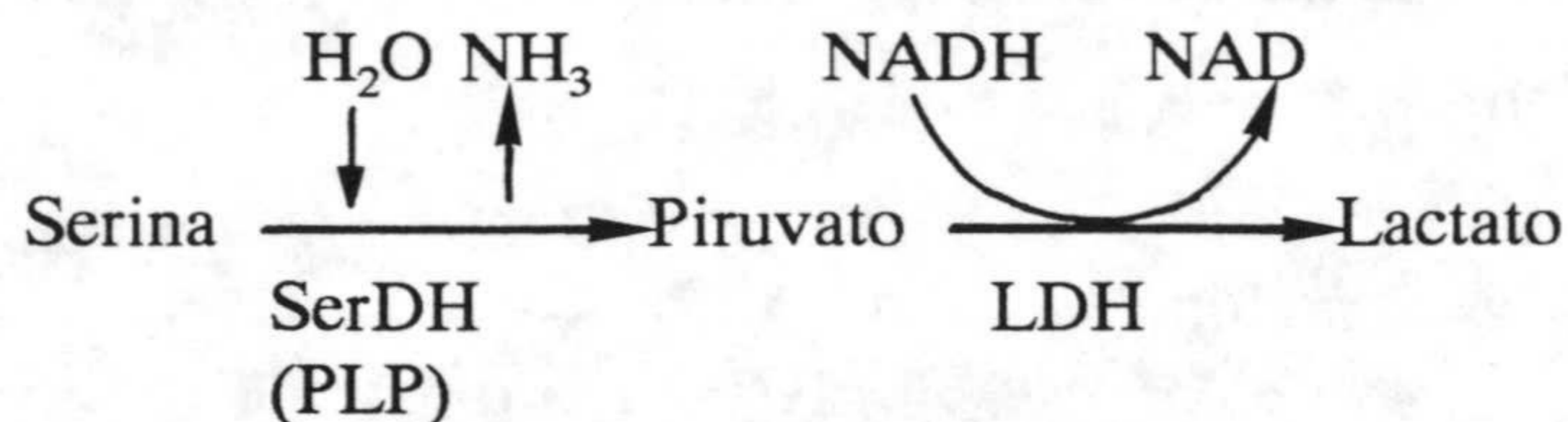
La eficacia de síntesis proteica se define como la cantidad (g) de proteína sintetizada por día y por g RNA, representada por K_{RNA} y se calculaba como el cociente $(K_S/C_S) \times 10$.

La cantidad (g) de proteína sintetizada por día y por unidad celular, la definimos como K_{DNA} y se calcula como los g de proteína sintetizados por día y por g de DNA.

II.6. Ensayo de la actividad serina deshidratasa en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss).

II.6.1. Fundamento.

Se determina la actividad de la serina deshidratasa [L-Serina hidrolasa (desaminante); EC 4.2.1.13; SerDH] en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris, midiendo la desaparición de NADH del medio de reacción a 340 nm gracias al acoplamiento del sistema lactado deshidrogenasa.



II.6.2. Preparación de los extractos.

Se prepararon homogenados de hígado y músculo en Tris (0.1M)-Sacarosa (0.25M)-EDTA (ácido etilendiaminotetracético) (1mM)-DTE (ditioeritritol) (1mM), pH 7.4 a una dilución 1:3 (w/v), que se centrifugaba a 105,000 g durante 1 hora. En el extracto obtenido se determinará la actividad SerDH.

II.6.3. Protocolo de ensayo.

La actividad SerDH fué ensayada con 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.25 M de L-Ser, 50 mM de tampón borato, pH7.6, 1mM de DTE, 0.1 mM de PLP, 0.4

mM NADH y 0.01 mg de lactato deshidrogenasa (LDH) (Boehringer Mannheim Co.) y 0.15 ml de extracto hepático o 0.5 ml de extracto muscular, en un volumen final de 1 ml a 25 °C siguiendo la desaparición en la absorbancia a 340 nm (Sandoval y Sols 1974).

II.6.4. Cálculos.

La actividad específica SerDH se expresa como miliUnidades (mU)/mg de proteína, definiéndose 1 mU como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 nmol de serina por minuto a 25 °C y pH 7.3. Se calculó según la expresión:

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

donde V= volumen total de reacción en ml.

ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH, $6.22 \times 10^6 \text{cm}^2/\text{mol}$.

d= diámetro de la cubeta, 1 cm.

v= volumen extracto añadido.

P= concentración de proteína en el extracto (mg/ml) calculada según el método de Lowry et al. (1951).

Para la determinación de los parámetros cinéticos, K_m y V_{max} , se utilizó dos tipos de ajustes, uno lineal, aplicando la representación de los dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk, y un segundo ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten. Ambos ajustes se realizaron mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03; Leatherbarrow, R.J.

1987.

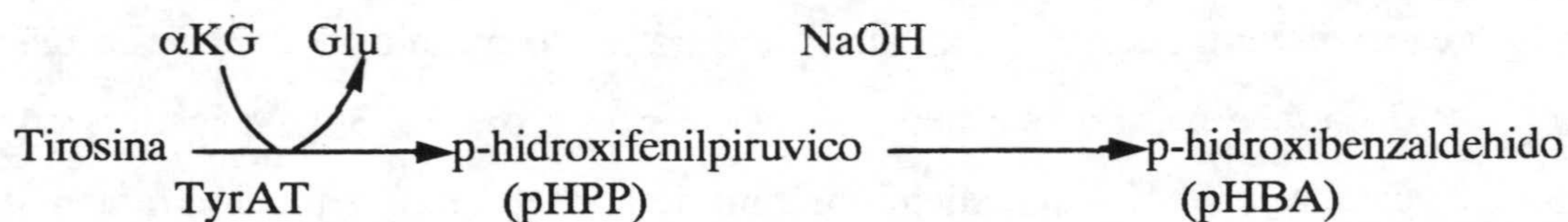
Para el cálculo del coeficiente de Hill (h) se aplicó un análisis de regresión lineal según la expresión:

$$\log (V/V_{\max}-V) = h \log [S] - \log K.$$

II.7. Ensayo de la actividad tirosina aminotransferasa en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris.

II.7.1. Fundamento.

La determinación de la actividad tirosina aminotransferasa (L-tirosina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.5) está basada en la técnica descrita por Diamondstone (1966) con algunas modificaciones.



El ensayo se realiza en dos etapas, en primer lugar, se produce la reacción y como consecuencia de la actividad TyrAT se forma el pHPP que en una segunda fase, una vez parada la reacción con NaOH, se convierte en pHBA por una oxidación catalizada por O_2 molecular.

La concentración de pHBA puede determinarse siguiendo el incremento de absorbancia a 331 nm, siendo esta función del tiempo y de la concentración de pHPP.

II.7.2. Preparación de los extractos.

Se prepararon homogenados de hígado y músculo de la trucha arco iris en Tris (0.1M)-Sacarosa (0.25M)-EDTA (1mM), 1:3 (w:v). Se centrifugaba posteriormente a 105,000 g durante 1 hora y en el extracto resultante se determinaba la actividad enzimática.

II.7.3. Protocolo de ensayo.

La mezcla de reacción contenía para los tubos problema: L-tyr en un rango de concentraciones entre 0.05 y 6.75 mM para las muestras de hígado y 0.1-6.25 mM para las muestras de músculo, en 2.7 ó 2.6 ml de tampón Hepes 60 mM, pH 7.3 para las muestras de hígado y músculo respectivamente; 0.05 ml de PLP 3.6 mM y 0.15 ó 0.25 ml de extracto de hígado o músculo. Antes de iniciar la reacción, se mantenía en incubación durante 20 minutos a 25 °C. La reacción se disparaba pasado este tiempo con 0.1 ml de α KG 0.3M. A los dos minutos se paraba la reacción añadiendo 0.2 ml de NaOH 10N y agitación inmediata. El volumen final era 3.2 ml. Tras pasar 30 minutos a temperatura ambiente, se media la absorbancia a 331 nm frente a los blancos correspondientes (uno para el hígado y otro para el músculo, preparados igual que la muestra problema, a los que se le añadió la NaOH 10N antes del α KG).

II.3.4. Cálculos.

La actividad específica TyrAT se expresa como miliUnidades (mU) de enzima/mg de proteína, definiendose 1 mU como la cantidad de enzima

necesaria para transformar 1 nmol de Tyr por minuto a 25 °C y pH 7.3 y se calculó según la expresión:

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

donde V= volumen total de reacción en litros.

ϵ = Coeficiente de extinción molar para el pHBA en las condiciones de reacción: 24,900 M⁻¹.

d= diámetro de la cubeta: 1 cm.

v= volumen extracto añadido.

P= concentración de proteína del extracto determinado según el método de Lowry et al. (1951).

Para la determinación de los parámetros cinéticos, Km y Vmax, se utilizó dos tipos de ajustes, uno lineal, aplicando la representación de los dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk, y un segundo ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten. Ambos ajustes se realizaron mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03; Leatherbarrow, R.J. 1987.

Para el cálculo del coeficiente de Hill (h) se aplicó un análisis de regresión lineal según la expresión:

$$\log (V/V_{\text{max}} - V) = h \log [S] - \log K$$

II.8. Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados se expresan como la media y el error estándar de la media (SEM). Para evaluar las diferencias entre las medias se utilizó el test de la *t* de Student.

Para estudiar el tipo de relación entre dos variables se utilizaron varios modelos de análisis de regresión basados en el método de los mínimos cuadrados.

Los cálculos de regresión lineal se realizaron según la fórmula:

$$y = A + bx$$

donde: el término de la constante de regresión, $A = \Sigma y - B \Sigma x / n$

el coeficiente de regresión, $B = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$

el coeficiente de correlación,

$$r = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{\{[n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2][n \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2]\}^{1/2}}$$

Los cálculos de regresión de potencia y exponencial se realizaron según las fórmulas:

$$y = Ax^b \quad (\ln y = \ln A + b \ln x)$$

$$y = A e^{bx} \quad (\ln y = \ln A + Bx)$$

Como se observa en las expresiones anteriores, ambas quedan convertidas en sendas regresiones lineales, de forma que el término independiente, los coeficientes de regresión y de correlación se calculan de la misma forma que para la regresión lineal.

El test de significación y los límites de confianza aplicados para los valores del coeficiente de correlación obtenidos se recogen en Young (1962).

RESULTADOS

III.0. VALIDEZ DEL METODO.

Para estudiar la velocidad de síntesis proteica y su regulación en los tejidos del animal completo es necesario disponer de técnicas de medida exactas y fiables. La principal dificultad de los métodos que se basan en la administración de aminoácidos marcados y posterior medida de la incorporación del marcage en la proteína es la determinación de la radioactividad específica del aminoácido precursor en el lugar donde está ocurriendo. Una dificultad adicional es que la radioactividad específica de los aminoácidos libres cambian muy rápidamente, necesitando para una definición exacta de la evolución a lo largo del tiempo muchos puntos de control (Peters y Peters, 1972). Una manera de evitar estos problemas es dar una gran dosis de aminoácido marcado, con la cual, todos los pools precursores alcanzan casi la misma radioactividad específica, que es mantenida casi constante durante el período de incorporación en la proteína (Henshaw et al. 1971, Dunlop et al. 1975). La radioactividad específica de los aminoácidos libres cambia de forma lineal, bastando con determinaciones a dos tiempos para tener una definición exacta. El corto período de tiempo necesario para la incorporación elimina los posibles errores debidos a la reutilización de aminoácidos marcados procedentes de la degradación de proteínas con un rápido recambio metabólico.

La utilización de [^{14}C]leucina (McNurlan et al. 1979) presenta algunos inconvenientes como es que la determinación de la radioactividad específica de la leucina es costosa y lenta, además de que se han descrito efectos de la leucina sobre el control de la síntesis proteica en el músculo (Buse y Reid, 1975, Fulks et al. 1975). La fenilalanina es preferible a la leucina por varias razones: i) es más soluble, pudiéndosele administrar una dosis mayor, ii) el pool de phe en tejidos es menor que el de leucina. De ahí que la radioactividad en los tejidos y en el plasma sea muy parecidas. iii) El

procedimiento de ensayo para la Phe es mucho más conveniente y seguro que el método de cromatografía en columna usado para la leucina; permitiendo además una mayor rapidez en la determinación de la radioactividad específica. Los resultados de Garlick et al. (1980), Fulks et al. (1975), Woodside y Mortimore (1972), Jefferson et al. (1974), Loughna y Goldspink (1985) ponen de manifiesto que la administración de una dosis alta de fenilalanina no tiene ningún efecto directo sobre la síntesis proteica.

Para determinar las velocidades de síntesis proteica se ha utilizado el método descrito por Garlick et al. (1980) y aplicado a los peces por Haschemeyer (1983), Pocrnjick et al. (1983) y Houlihan et al. 1986, 1988), aunque con algunas modificaciones. Todos estos estudios han demostrado la validez de esta técnica, de tal manera que los resultados que a continuación se describen son muy similares a los encontrados por ellos en sus trabajos iniciales.

La figura 1A muestra los niveles de L-fenilalanina total determinados por el ensayo de fluorescencia de la β -feniletilamina en el hígado y en el músculo blanco de trucha arco iris, a los 2, 30, 60 y 120 minutos de la inyección en la vena caudal. En ambos tejidos se alcanzan valores de saturación. El análisis en el pool precursor muestra que mientras en el hígado los niveles más altos se alcanzan rápidamente, en el músculo blanco la concentración de phe va aumentando al transcurrir el tiempo. Aproximadamente a los 45 minutos se alcanzan los niveles intermedios en ambos tejidos. La inyección de los aproximadamente 100 μ moles de phe a un animal de 150 g produce que los niveles de la concentración de phe tisular alcanzados a los 45 minutos de la inyección sean aproximadamente 8 veces en el hígado y 2,5 veces en el músculo blanco los niveles de phe tisular en condiciones controles, ya que las concentraciones libres en los tejidos es de aproximadamente 100 nmol/g peso fresco (Haschemeyer y Smith 1979).

La dependencia temporal de las radioactividades específicas en el pool de aminoácidos libres se ilustra en la figura 1B. Al igual que los resultados de otros autores (Garlick et al. 1980, Houlihan et al. 1986, Houlihan et al. 1988), se observa como el aminoácido marcado equilibra rápidamente con el pool intracelular en el hígado alcanzándose unos niveles muy semejantes a la radioactividad específica de la solución inyectada. En el músculo se observa un incremento hasta alcanzar un determinado nivel el cual se mantiene bastante estable posteriormente.

La radioactividad específica de la Phe unida a la proteína muestra incrementos lineales durante los primeros 45 minutos tras la inyección, lo cual nos permite calcular de forma exacta la velocidad de síntesis proteica utilizando para ello medidas entre dos tiempos comprendidos en ese intervalo. Se ha calculado la K_s utilizando la actividad específica a tres intervalos de tiempo diferentes (entre 0-30, 0-60 y , 0-120) no encontrando diferencias significativas entre las tres estimas.

Estos resultados nos permiten concluir que las velocidades de síntesis proteica pueden determinarse de forma precisa para el hígado y el músculo blanco de la trucha arco iris calculando las radioactividades específicas del pool libre y unido a proteína durante 45 minutos después de la inyección.

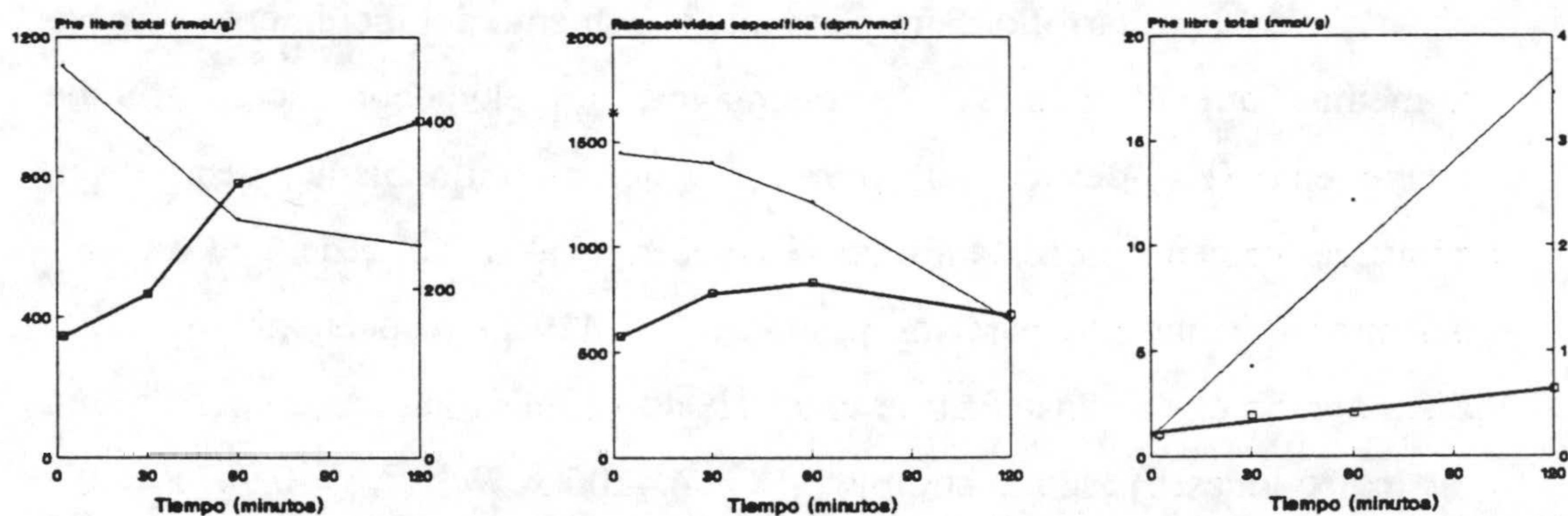


Figura 0.1. Cambios en la concentración tisular de phe total libre (A), [^3H]phe incorporada a la fracción soluble (B) y en la fracción proteica insoluble (C) en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*) después de una dosis masiva de [^3H]phe.

III.1. Influencia del estado de desarrollo sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico en hígado y músculo blanco de trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss).

1.1. Evolución de las velocidades de crecimiento en los diferentes estadios experimentales, su relación con el tiempo y el peso corporal.

En las figuras 1.1 y 1.2 se describe el comportamiento de las velocidades de crecimiento del animal completo, hígado y músculo blanco de truchas en diferentes estadios de desarrollo representados por diferentes tamaños y pesos corporales, a lo largo de todo el período experimental, así como su relación directa con el peso de cada uno de los tejidos estudiados.

En la figura 1.1, panel A, se representa la evolución del peso corporal y tisular a lo largo de todo el período experimental. Al comparar el valor de la pendiente de las rectas obtenidas para cada órgano, se observa como va aumentando la velocidad de depósito total tanto en el animal completo (de 0.22 a 3.34, 15.2 veces), cómo en el hígado (de 0.005 a 0.215, 43 veces) y músculo blanco (de 0.13 a 2.05, 15.8 veces) a medida que el animal aumenta en su estado de desarrollo. Paralelamente al aumento del incremento de peso a medida que el animal se hace mayor, la velocidad fraccionaria de crecimiento (K_G) del animal completo y del músculo blanco disminuyen significativamente, de 2.44 a 0.76 -3.2 veces- (Tabla 1.2) y de 2.51 a 0.68 -3.7 veces- (tabla 1.5) para los pesos de 7 y 420 gr respectivamente. Esta disminución en la capacidad de crecimiento se relaciona con el peso según las expresiones: i) animal completo, $K_G=4.4406 \times W^{-0.2735}$, $r=-0.94$, $P<0.02$. ii) músculo blanco, $K_G=3.7757 \times W_M^{-0.2968}$, $r=-0.96$, $P<0.01$. Sin embargo, la K_G del hígado no muestra variaciones importantes en los diferentes pesos y las que se observan son fruto de variabilidad experimental (tabla 1.3)

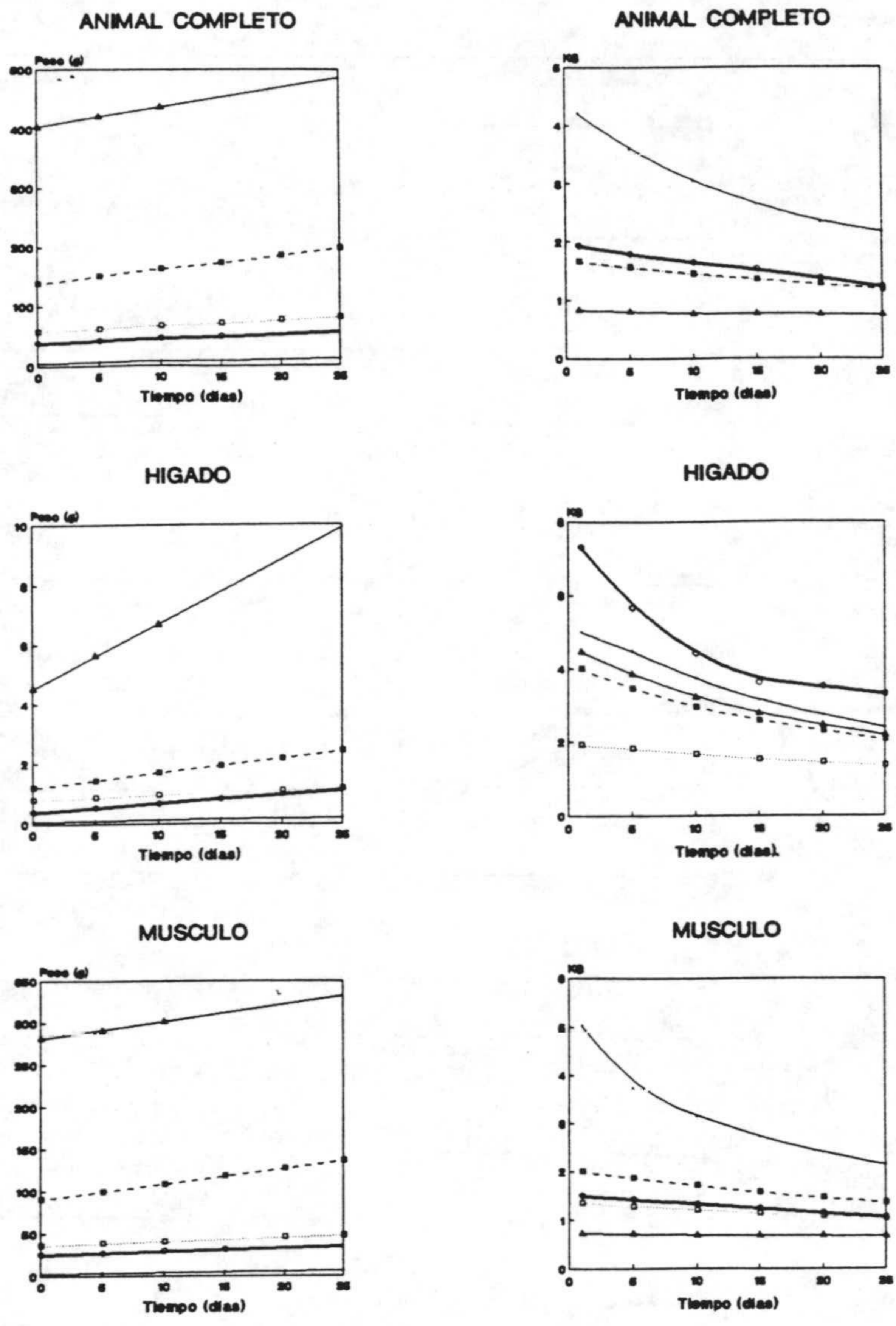
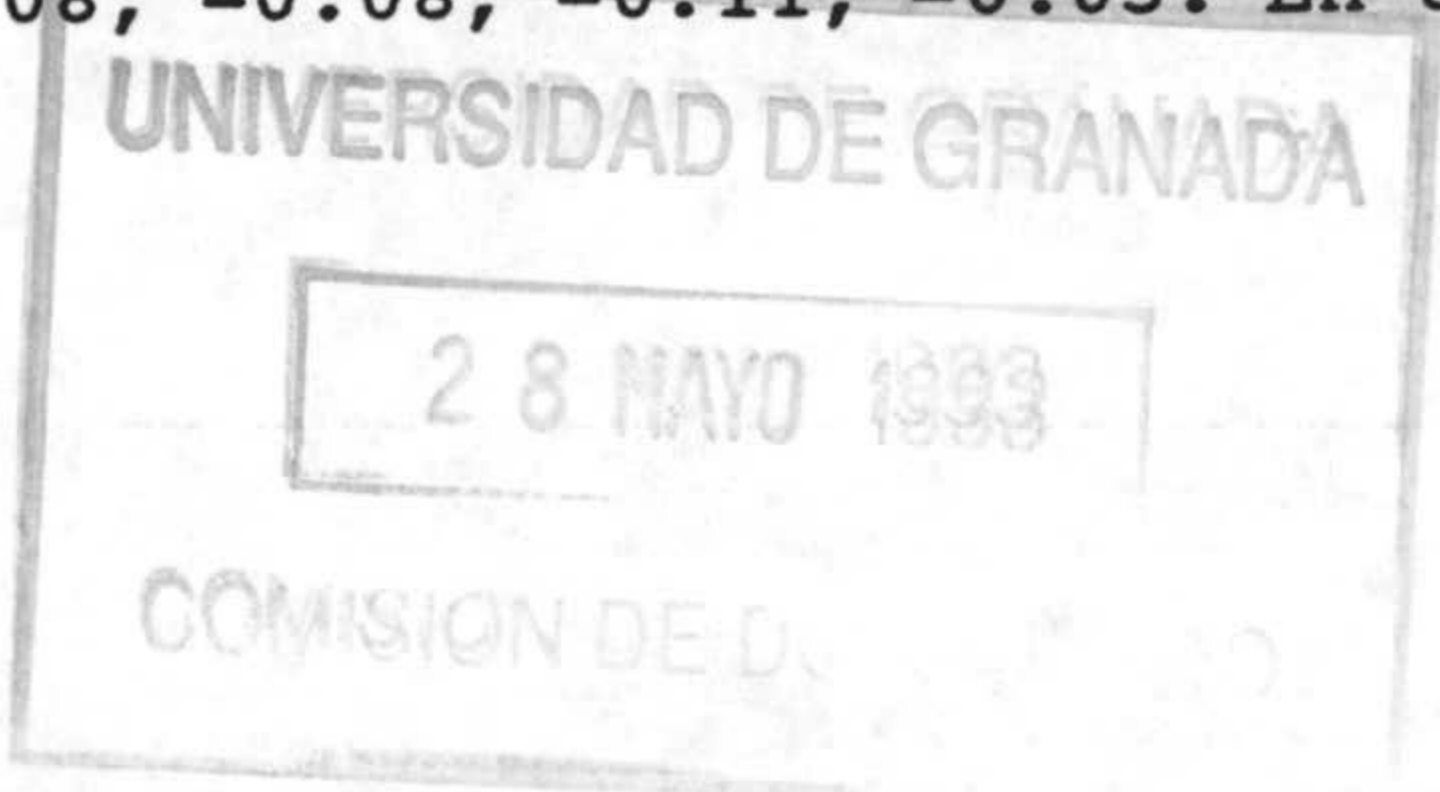


Figura 1.1. Influencia del peso corporal sobre la evolución del peso (A) y de la velocidad específica de crecimiento (K_G) del animal completo, hígado y músculo blanco a lo largo del período experimental. Panel A. Los valores de las pendientes de las rectas que relacionan el peso con el tiempo para animales de 7 (-), 45 (→), 65 (•), 170 (←) y 420 (—) gramos de peso son respectivamente 0.22, 0.74, 0.95, 2.33 y 3.34 para el animal completo; 0.005, 0.029, 0.015, 0.049, 0.215 para el hígado y 0.13, 0.38, 0.46, 1.83 y 2.05 para el músculo blanco. En todos los casos el valor de r es > 0.83 y $P < 0.01$. Panel B. La relación entre la K_G y el tiempo se refleja en la expresión $K_G = A \cdot T^b$. Los valores de los coeficientes A y b para animales de peso 7, 45, 65, 170 y 420 gramos son respectivamente: i) animal completo (A) 5.08, 2.04, 1.72, 1.83 y 0.83 (b) -0.25, -0.10, -0.10, -0.12, -0.03; ii) hígado (A) 6.58, 8.45, 2.02, 4.31, 4.76 (b) -0.28, -0.29, -0.11, -0.20, -0.15; iii) músculo blanco (A) 5.55, 1.57, 1.39, 2.10, 0.73 (b) -0.27, -0.08, -0.08, -0.11, -0.03. En todos los casos $r > 0.92$ y $P < 0.01$.



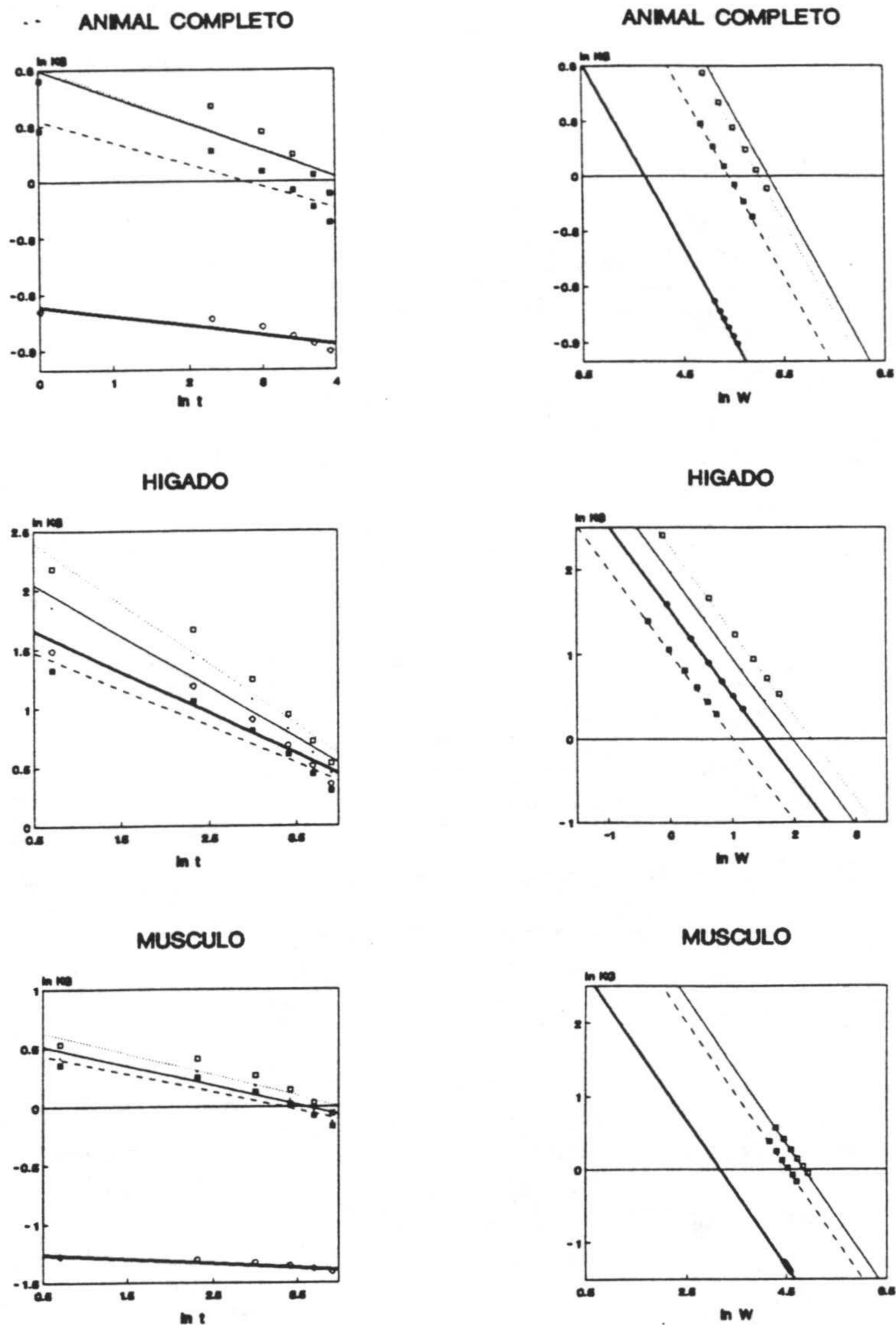


Figura 1.2. Influencia del peso corporal sobre la relación entre la velocidad de crecimiento específica (K_c) y el tiempo (A) o el peso (B) del animal, tejido u órgano. Panel A. Las pendientes de las rectas de regresión que relacionan el $\ln K_c$ y el $\ln T$ para animales de 7 (—), 45 (—), 65 (—), 170 (—) y 420 (—) gramos son respectivamente para el animal completo: -0.25, -0.10, -0.10, -0.12, -0.03; para el hígado -0.28, -0.29, -0.11, -0.20, -0.15 y para el músculo blanco -0.27, -0.08, -0.08, -0.12, -0.03. En todos los casos, el valor de $r > -0.92$ y $P < 0.01$. (B) La relación entre la K_c y el peso del sistema a lo largo del experimento se refleja en la expresión $K_c = AxW^b$ ($\ln K_c = b \ln W + \ln A$). Los valores de los coeficientes A y b para animales de peso 7 (), 45 (), 65 (), 170 () y 420 () gramos son respectivamente: i) animal completo (A) 21.98, 74.44, 95.58, 230.4 y 340.4; (b) -1.00, -1.00, -1.00, -1.00, -1.00; ii) hígado (A) 0.49, 2.91, 1.54, 4.90, 19.30; (b) -0.95, -1.00, -0.97, -0.99 y -0.94; iii) músculo (A) 13.46, 39.05, 48.91, 179.47, 242.26; (b) -1.05, -1.01, -1.00, -0.99 y -1.03. Siempre $r > -0.99$ y $P < 0.001$.

Parece como si la disminución de la K_G a medida que el animal incrementa de peso, compensara el incremento en el depósito total, evitando que se produzca un crecimiento excesivo.

A medida que avanza cada experimento, el valor de la K_G disminuye día a día para todos los pesos, ajustandose su representación frente al tiempo, a una curva definida por la expresión $K_G=AT^b$ (figura 1.1B y 1.2A). Queda reflejado como a medida que el animal aumenta de peso, la velocidad con que disminuye la K_G a lo largo del tiempo en el animal completo y en el músculo blanco, disminuye pasando la pendiente de las rectas de regresión logarítmicas ($\ln K_G=b\ln T+\ln A$) de -0.25 a -0.03 para el animal completo y de -0.27 a -0.03 para el músculo blanco.

Es decir, que en el animal completo y en el músculo blanco, velocidades altas de crecimiento características de estados iniciales de desarrollo, coinciden a su vez con una mayor rapidez en la pérdida de esta capacidad a lo largo del tiempo.

No obstante, si analizamos la relación entre la K_G y el peso tanto en el animal completo como en el hígado y músculo blanco encontramos: i) en todos los grupos de pesos, existe una estrecha relación entre el peso del órgano y el valor de la K_G descrita por la relación $K_G=AW^b$. El valor de A se va haciendo mayor a medida que el grupo de animales es de mayor peso. En la figura 1.2B se representa la rectas de regresión logarítmicas correspondientes a esos ajustes exponenciales ($\ln K_G=b\ln W+\ln A$). ii) La velocidad con que disminuye la K_G con respecto al peso representada por el coeficiente de regresión, b, no cambia a medida que el animal o el tejido aumentan de tamaño, tanto es así que para todos los pesos estudiados y en los tres compartimentos, todas las rectas de regresión que relacionan el $\ln K_G$ con el \ln del peso tienen la misma pendiente, -1.

Es decir, aunque animales y tejidos de peso menor, que puede correlacionarse con estadíos de desarrollo inferiores, presenten unas

Tabla 1.1. Influencia del estado de desarrollo sobre el comportamiento alimenticio, capacidad de crecimiento y aprovechamiento de la dieta por la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

	7 g	45 g	65 g	170 g	420 g
Peso inicial (g)	5.01±0.05	37.58±1.46	42.27±0.68	140.10±1.10	402.93±2.71
Peso final (g)	10.78±0.22	50.14±0.56	85.94±2.33	196.50±5.42	439.65±15.02
Peso medio experimento (g)	7.38±0.04	43.46±0.15	64.10±0.22	168.50±0.70	421.29±1.11
Incremento peso día (g)	0.22±0.01	0.71±0.01	0.95±0.01	2.34±0.01	3.34±0.01
K _c animal completo	2.44±0.03	1.52±0.02	1.18±0.06	1.37±0.03	0.76±0.03
mg ingesta/pez/día	207.00±10.0	710.0±10.0	1130.0±10.0	2970.00±50.0	6350.00±20.0
mg proteína/pez/día	96.20±1.48	337.52±1.57	524.30±4.20	1302.40±22.0	2790.00±30.0
mg lípidos/pez/día	22.06±0.34	75.04±0.37	120.20±1.00	355.20±6.00	760.00±10.0
mg carbohidratos/pez/día	16.59±0.26	105.37±0.49	90.40±0.70	236.80±4.00	510.00±10.00
KJ/pez/día	3.04±0.05	12.75±0.06	16.59±0.13	43.63±0.74	93.66±0.30
mg ingesta/g pez/día	25.90±0.30	16.20±0.10	18.20±0.12	17.70±0.30	15.00±0.10
mg proteína/g pez/día	12.03±0.13	7.78±0.03	8.46±0.06	7.73±0.13	6.61±0.01
mg lípidos/g pez/día	2.76±0.03	1.73±0.01	1.94±0.01	2.11±0.04	1.80±0.01
mg carbohidratos/g pez/día	2.07±0.02	2.43±0.01	1.44±0.01	1.41±0.02	1.21±0.01
J/g pez/día	380.50±4.14	294.00±1.17	267.60±2.10	258.90±4.40	221.41±0.15
FE	1.07±0.03	1.04±0.01	0.84±0.01	0.79±0.01	0.53±0.01
PER	2.31±0.02	2.19±0.01	1.81±0.01	1.79±0.02	1.20±0.01

Los resultados se expresan como la media ± SEM. Abreviaturas: FE, eficacia de conversión del alimento (g crecimiento/g ingesta); PER, eficacia de conversión de la proteína (g crecimiento/g proteína ingerida).

velocidades de crecimiento más elevadas que pesos mayores, existe un patrón de crecimiento tal que permite: i) una muy estrecha relación entre la K_G de cada compartimento y el peso de éste. ii) La velocidad de disminución de la K_G en relación con el peso del sistema sea la misma para todos los grupos de peces.

1.2. Comportamiento alimenticio de la trucha arco iris a lo largo de diferentes estadios de desarrollo.

En todos los grupos de pesos ensayados se utilizó una dieta comercial de alta calidad. La composición de cada una de ellas se recoge en la tabla correspondientes.

En la tabla 1.1. se refleja de forma detallada el comportamiento alimenticio de los cinco pesos (7, 42, 65, 170 y 420 gramos) utilizados. Los principales efectos del incremento en el peso corporal sobre la ingesta se pueden resumir en:

i) Existe una tendencia a la disminución en la ingesta relativa, tanto de la dieta completa como de todos y cada uno de los nutrientes. A medida que el animal incrementa su peso, tanto la cantidad total de dieta ingerida como la proteína, grasa, hidratos de carbono y energía ingerida por gramo de pez y día disminuyen. El caracter de esta disminución es tal que existe una correlación positiva entre el descenso en la ingesta relativa (mg/g pez/día) de la dieta, proteína y energía y el descenso en la velocidad de crecimiento del animal completo a medida que avanza el estado de desarrollo.

ii) Paralelamente a esta disminución se observa una correlación positiva entre el aprovechamiento del alimento (Feed efficiency, FE), la eficacia de utilización de la proteína (Protein Efficiency Ratio, PER) y el peso del animal. Dicha correlación se ajusta a sendas rectas de regresión

(figura 1.3, tabla 1.1.)

Estadios de desarrollo iniciales caracterizados por una elevada capacidad de crecimiento presentan ingestas y aprovechamiento del alimento y de la proteína significativamente mayores que pesos superiores, característicos de edades superiores.

1.3. Naturaleza del crecimiento de los tejidos.

El estudio de la naturaleza del crecimiento de los tejidos en términos de i) incrementos en el contenido de DNA total (hiperplasia) como una estima del número de núcleos o unidades celulares (Cheek et al. 1971) así como la ii) relación proteína/DNA (hipertrofia) como un indicador del tamaño celular es muy aceptado y utilizado desde hace mucho tiempo por prestigiosos investigadores (Campbell y Koslerlitz 1949, Jacob et al. 1954, Leblond 1972, Cheek et al. 1971, Waterlow et al. 1978), aunque puede presentar ciertos inconvenientes en tejidos como el músculo esquelético por la especial estructura de dicho tejido.

En este trabajo la determinación de los parámetros del turnover proteico se ha completado con las estimas anteriores para conseguir un enfoque lo mas completo posible de todos aquellos aspectos implicados en el crecimiento de un tejido u órgano.

1.3.1. Relación entre el turnover proteico y el crecimiento celular en el hígado.

En estas condiciones experimentales, el patrón de crecimiento del hígado a medida que el animal aumenta de tamaño, se caracteriza por:

Tabla 1.2. Influencia del peso corporal sobre la composición y crecimiento del hígado de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

	7 g	45 g	65 g	170 g	420 g
Peso inicial (g)	0.076±0.001	0.370±0.011	0.544±0.040	1.178±0.050	4.520±0.560
Peso final (g)	0.193±0.013	0.867±0.080	1.270±0.100	2.460±0.150	6.890±0.580
Peso día del turnover (g)	0.19±0.01	0.87±0.03	1.11±0.10	1.88±0.10	6.89±0.58
Incremento peso día (g)	0.005±0.001	0.029±0.004*	0.016±0.001*	0.049±0.003*	0.215±0.001*
[proteínas] mg/g hígado	161.13±12.03	169.49±11.05	162.25±13.05	169.06±6.46	150.10±15.75
[RNA] mg/g hígado	11.04±0.27	8.51±0.31*	6.50±0.35*	5.84±0.39*	4.09±0.75*
[DNA] mg/g hígado	1.49±0.42	1.27±0.07	1.09±0.13	1.08±0.08	0.72±0.08
Síntesis total (mg)	7.21±1.21	23.51±2.89*	17.58±3.08*	24.31±2.83*	78.08±0.16*
[DNA] _{total} ¹ (mg)	0.28±0.05	1.10±0.05*	1.21±0.13*	2.02±0.21*	4.93±0.48*
Proteínas/DNA ² (mg/mg)	108.14±19.30	133.46±8.04	148.85±15.06	156.54±8.92*	208.47±22.42*
RNA/DNA (mg/mg)	7.41±1.14	6.70±0.31	5.96±0.51	5.41±0.39	5.68±0.84

¹ La concentración de DNA total es un índice del número de núcleos existentes en el tejido, así como la relación ² proteína/DNA es un índice del tamaño celular. Los resultados se expresan como la media de al menos diez valores ± SEM. * P<0.05.

Tabla 1.3. Influencia del peso corporal sobre las velocidades de recambio proteico y eficacia de retención de proteínas en el hígado de la trucha arco iris.

	7 g	45 g	65 g	170 g	420 g
K _c	3.36±0.56	3.61±0.44	1.33±0.19*	2.64±0.31	3.13±0.49
K _s	23.55±3.95	15.94±1.96	9.76±1.71*	7.65±0.89*	7.55±1.18*
K _p	19.60±3.28	12.33±1.52	8.43±1.34*	5.01±0.58*	4.42±0.69*
C _s	68.52±8.84	50.21±2.55	40.05±2.69*	34.54±1.81*	27.27±3.22*
K _{RNA}	3.44±0.51	3.17±0.27	2.44±0.30	2.21±0.19*	2.77±0.38
K _{DNA}	25.48±4.27	21.29±2.62	12.90±2.26*	12.02±1.40*	15.83±2.47
ERP	12.19±2.05	22.65±2.79*	13.63±2.17	44.15±5.14*	41.46±6.48*

ABREVIATURAS: K_c, velocidad de acumulación de proteínas; K_s, velocidad de síntesis proteica; K_p, velocidad de degradación de proteínas. Estas tres velocidades se expresan como %/día. C_s, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_s/C_s)x10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA; ERP, eficacia de retención de proteínas: (K_c/K_s)x100. Los resultados son la media ± SEM de al menos seis peces. * P<0.05.

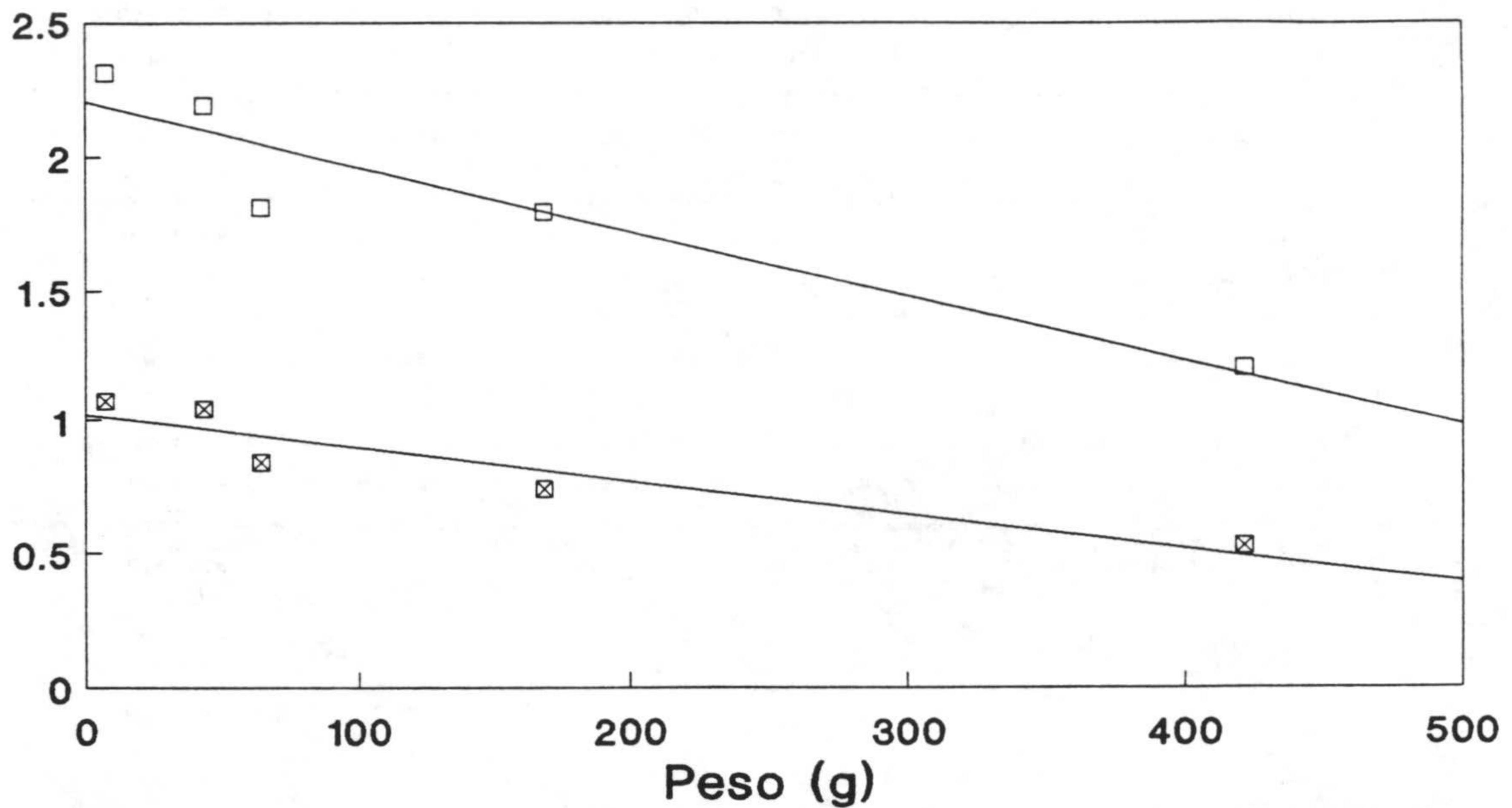


Figura 1.3. Relación entre el aprovechamiento en crecimiento de la dieta o de la proteína con el peso del animal. La eficacia de utilización del alimento (FE) se representa como (□) y se correlaciona con el peso del animal según la ecuación $y = -0.0012x + 1.0274$, $r = 0.95$, $P < 0.02$. El aprovechamiento de la proteína (PER) se representa como (⊗) y se correlaciona con el peso del animal según la ecuación $y = -0.0024x + 2.2047$, $r = -0.95$, $P < 0.02$.

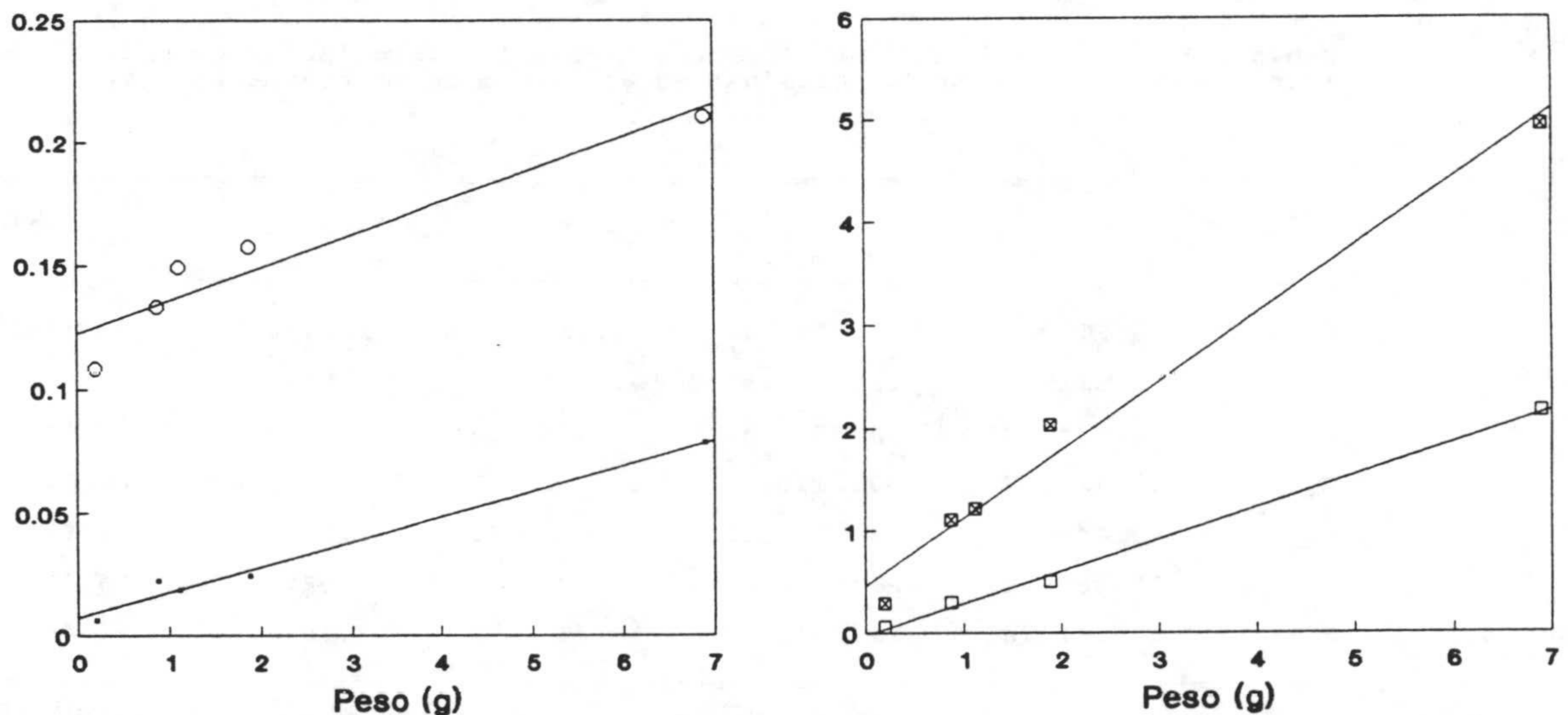


Figura 1.4. Naturaleza del crecimiento del hígado en truchas de diferentes pesos. Panel A. La síntesis de proteínas total ($K_s/100x[Proteínas]xPeso$ tejido) se representa como (—) y se relaciona con el peso del hígado según la ecuación $y = 0.0102x + 0.0075$, $r = 0.99$, $P < 0.01$. El tamaño celular (g proteína/mg DNA) se representa como (○) y se correlaciona con el peso del hígado según la ecuación $y = 0.0131x + 0.1230$, $r = 0.95$, $P < 0.02$. Panel B. El número total de núcleos (mgs DNA) se representa como (⊗) y se relaciona con el peso del órgano según la ecuación $y = 0.6583x + 0.48$, $r = 0.99$, $P < 0.001$. El incremento de peso/día (g) se representa como (⊕) y se correlaciona con el peso del órgano según la recta descrita por la ecuación $y = 0.3118x - 0.0133$, $r = 0.99$, $P < 0.01$.

i) el incremento de peso del órgano aumenta de forma lineal con el peso del órgano. Ambos parámetros se relacionan según la recta de regresión recogida en la figura 1.4. Panel B.

ii) existe un fuerte incremento en el número de núcleos y un aumento moderado del tamaño celular: mientras, que la concentración total del DNA pasa de 0.28 a 4.93, aumentando unas 17.6 veces, la relación proteína/DNA se incrementa solo 1.9 veces, de 108.2 a 209.6. Ambos índices se relacionan con el peso del órgano según un ajuste lineal. (figura 1.4.)

La relación proteína/DNA, a medida que el animal aumenta de peso describe una recta de regresión que presenta una pendiente similar a la descrita por la proteína total sintetizada (figura 1.4). Es decir, parece que en este órgano existe un incremento paralelamente similar entre el tamaño celular y la cantidad total de proteína sintetizada.

En estas condiciones, el comportamiento de las velocidades de recambio proteico en este tejido se recogen en la tabla 1.3 y figura 1.5. Aunque no se observan diferencias significativas en cuanto a cambios en la velocidad de crecimiento, la velocidad fraccionaria de síntesis proteica (K_S) varía con el peso del animal. Al representar la K_S frente al peso del hígado, se observa un comportamiento que se ajusta a la expresión $K_S=12.3320W_H^{-0.3447}$ ($r=-0.90$, $P<0.05$). Los estadios más pequeños se caracterizan por velocidades de síntesis elevadas, que van disminuyendo hasta alcanzar un determinado peso a partir del cual no varían de forma significativa. Los valores de K_S pasan desde 23.55 hasta 9.76 entre los 7 y 65 gramos, disminuyendo un 60 %.

La velocidad fraccionaria de degradación (K_D) presenta un patrón similar al de la K_S variando ambas de la misma manera (figura 1.5, tabla 1.3) y mostrando una curva similar cuando se representan estas velocidades frente al peso del órgano, $K_D=9.2184W_M^{-0.4494}$ ($r=0.95$, $P<0.05$). La K_D disminuye casi un 80 % a medida que el animal pasa de 7 gramos, 19.69 % día, hasta

los 420 gramos, 4.42 % día.

Tanta es la similitud que presentan las respuestas de la K_S y de la K_D , que entre los valores de ambas velocidades existe una estrecha correlación lineal positiva descrita por la expresión $K_D=0.9025K_S-1.6747$, $r= 0.99$, $P<0.001$ (figura 1.6).

En cuanto a la eficacia de retención de proteínas (ERP), estadíos iniciales coinciden con bajos valores de PRE que rápidamente suben hasta alcanzar su máximo valor en el peso a partir del cual la K_S no cambia significativamente, manteniéndose desde ese momento la eficacia de depósito sin variaciones significativamente apreciables. Desde 12.19 a los 7 gr. se pasa a 44.15 a los 170 gr, subiendo 3.6 veces; a los 420 gr. se mantienen los valores a una magnitud semejante (figura 1.5. tabla 1.3). La relación entre la ERP y el peso del hígado, es de naturaleza potencial y queda resumida en la expresión $ERP=24.855W_H^{0.3690}$ ($r=0.92$, $P<0.05$)

Existe una estrecha relación inversa entre la ERP y la K_S de naturaleza lineal descrita por la expresión $ERP=-1.9719K_S+57.0734$ (figura 1.6).

1.3.2. Síntesis proteica y su relación con los cambios en la concentración de ácidos nucleicos en el hígado de la trucha arco iris.

La velocidad de síntesis proteica en un tejido viene determinada por: i) la capacidad de síntesis (C_S , mgr RNA/gr proteína) índice de la concentración ribosómica en el tejido; y ii) la eficacia de síntesis proteica (K_{RNA} , mgr proteína sintetizada/mgr RNA) indicador de la eficacia de traducción.

A medida que aumenta el peso corporal, la concentración de RNA tisular (mgr/gr tejido) pasa de 11.04 a los 7 gr hasta 4.09 a los 420 gr, disminuyendo un 63 %. Aunque los valores no demuestren una significación

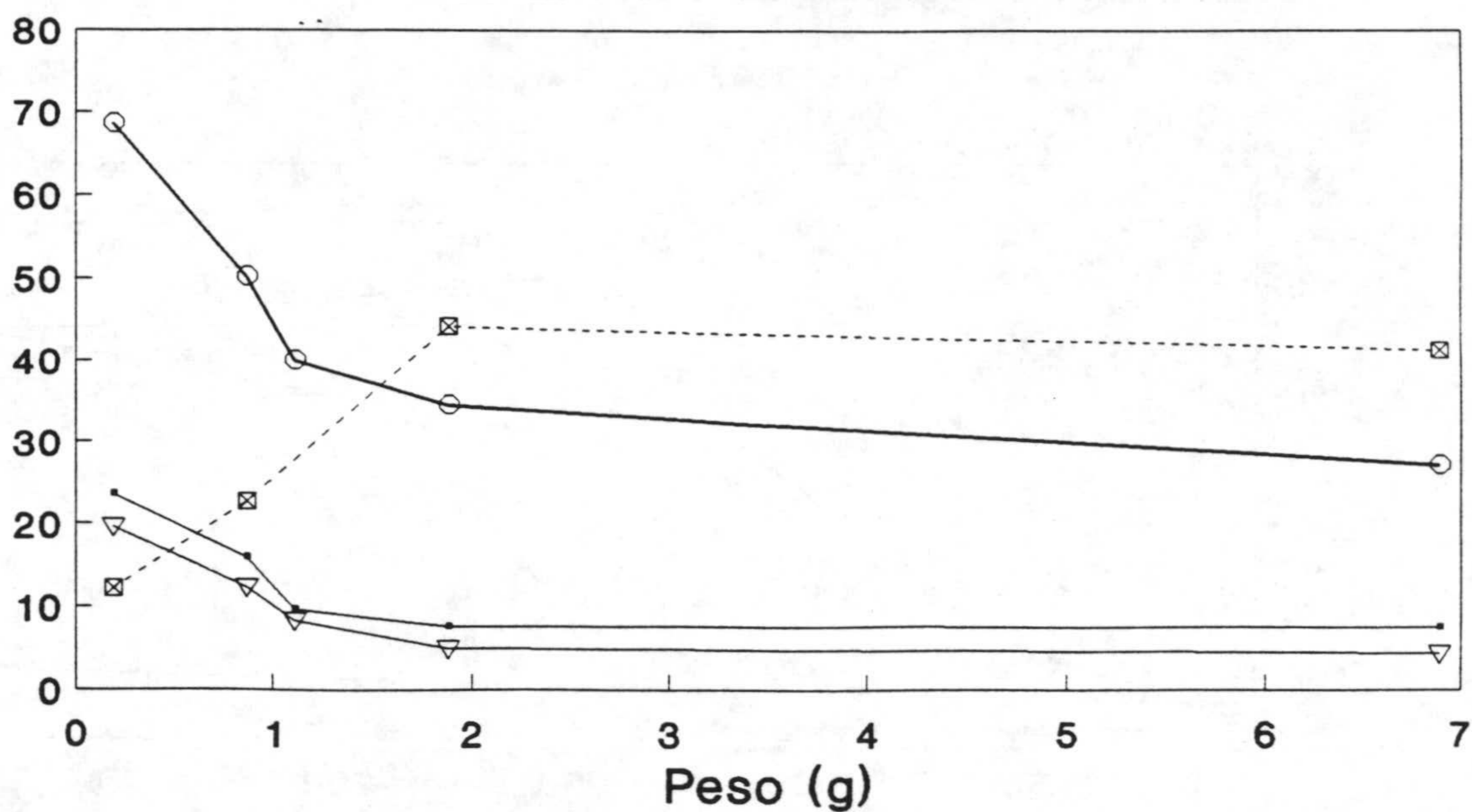


Figura 1.5. Relación entre el peso del órgano y comportamiento del turnover proteico en el hígado de la trucha arco iris. La K_s (○) se correlaciona con el peso del hígado según la ecuación $K_s=12.33W_H^{-0.35}$, $r=-0.90$, $P<0.05$; la K_p (△), $K_p=9.22W_H^{-0.45}$; la C_s (◻), $C_s=43.92W_H^{-0.27}$, $r=0.98$, $P<0.005$, la $ERP=24.85W_H^{0.37}$, $r=0.92$, $P<0.05$. ◇.

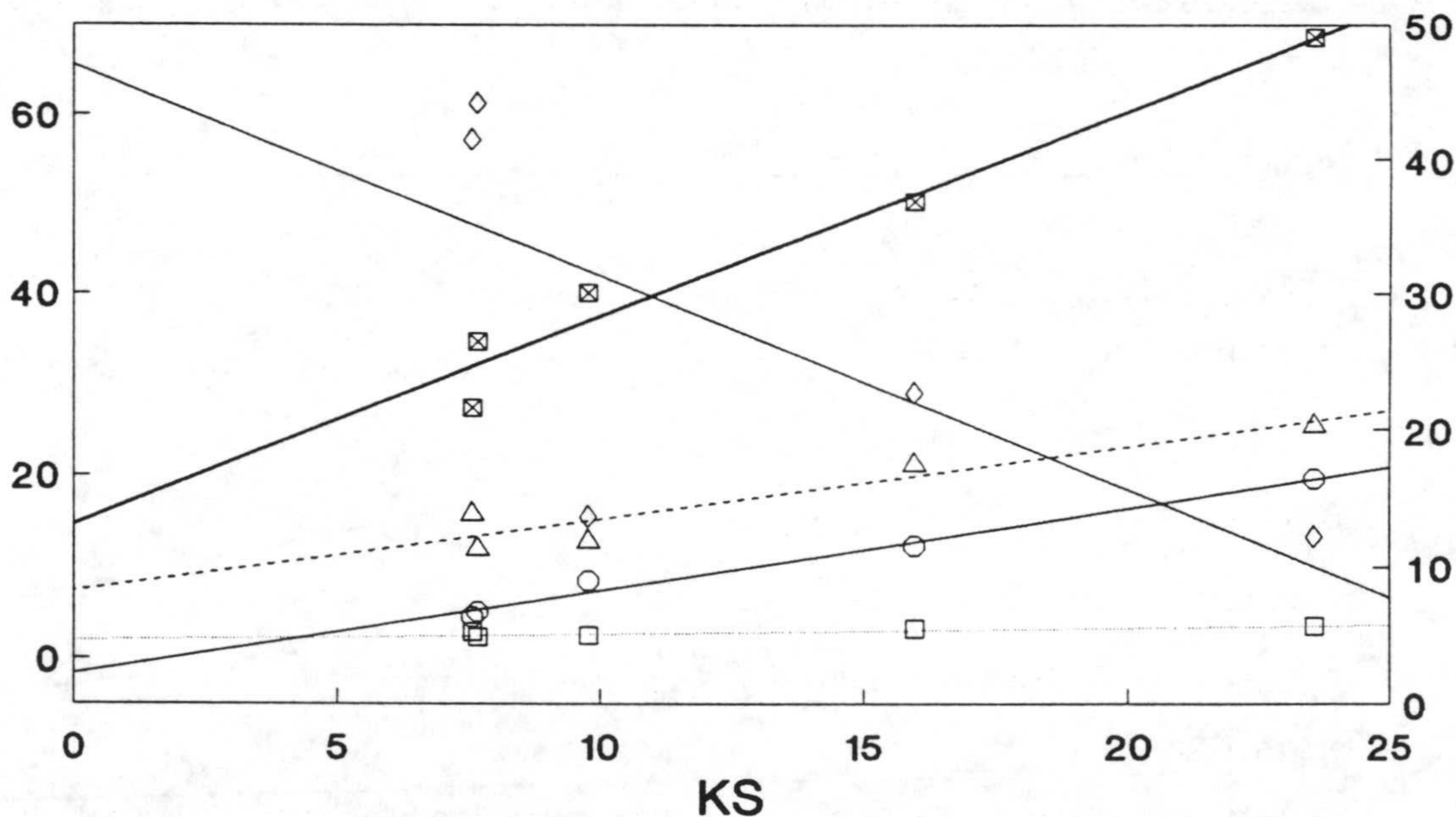


Figura 1.6. Relaciones entre la velocidad fraccionaria de síntesis proteica (K_s) del hígado de trucha arco iris y el resto de parámetros estudiados en animales en crecimiento. Las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas para cada uno de los parámetros relacionados son: (○) $K_p=0.9025K_s-1.6747$, $r=0.99$, $P<0.001$. (◻) $C_s=2.2871K_s+14.6372$, $r=0.98$, $P<0.01$. (△) $K_{RNA}=0.0653K_s+1.9638$, $r=0.89$, $P<0.05$. (◇) $K_{DNA}=0.7878K_s+7.3497$, $r=0.94$, $P<0.02$. (◇) $ERP=-1.9719K_s+57.0734$, $r=-0.99$, $P<0.01$.

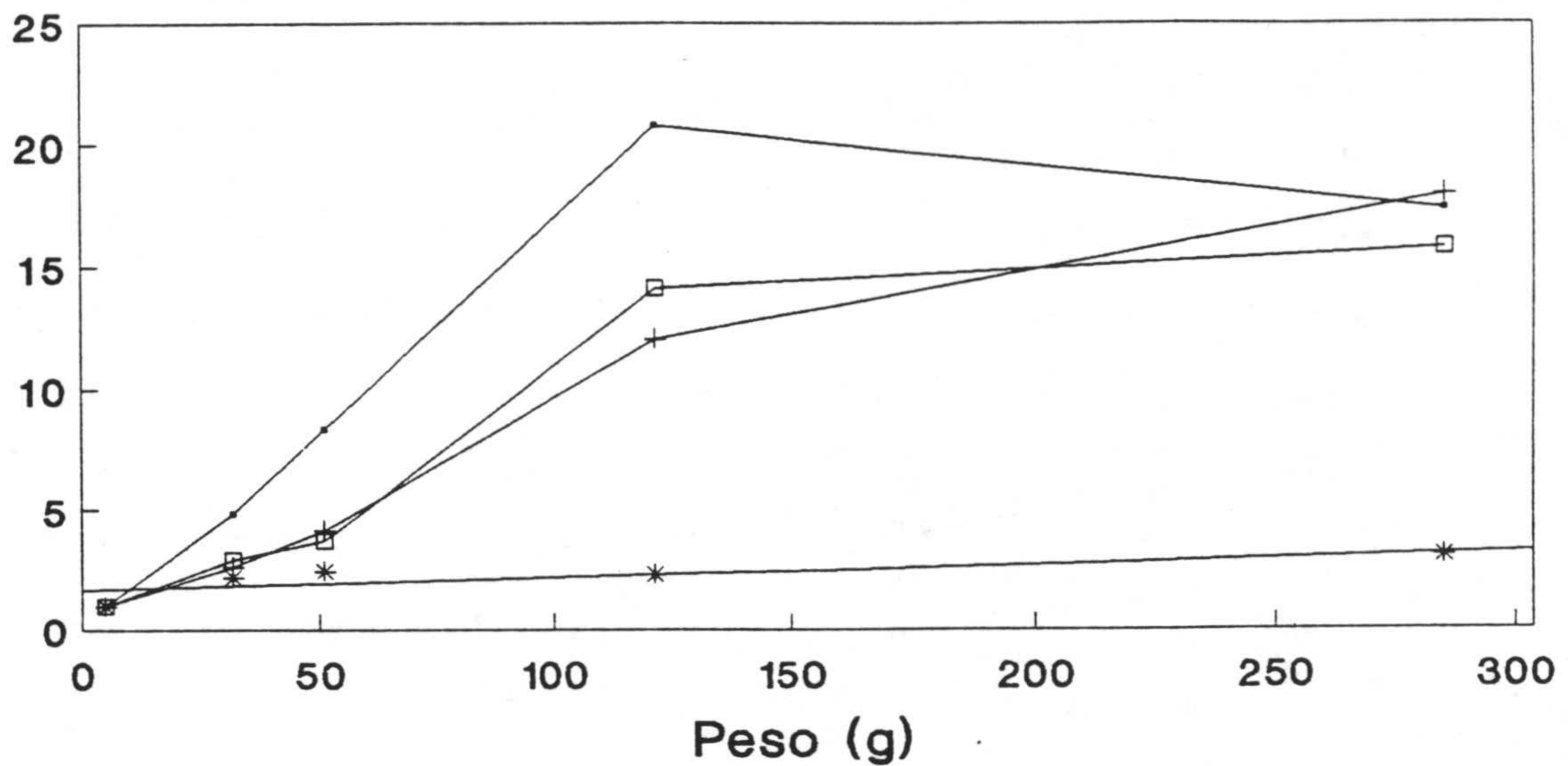


Figura 1.7. Naturaleza del crecimiento del músculo blanco en truchas de diferentes pesos. La síntesis de proteínas total (g proteínas sintetizadas/día por órgano completo) (□) se relaciona con el peso del músculo según la expresión $Y=0.0038W_M^{0.7691}$, $r=0.97$, $P<0.01$; el número total de núcleos (+) según $[DNA]_{TOTAL}=0.4980W_M^{0.7445}$, $r=0.98$, $P<0.01$; el incremento de peso/día (○), según $Y=0.0344W_M^{0.7408}$, $r=0.97$, $p<0.01$ y el tamaño de la unidad de DNA (mg proteína/mg DNA) según $Y=265.38W_M^{0.2802}$, $r=0.94$, $P<0.02$. En la figura se representa la evolución relativa de los parámetros descritos y su relación con el peso del músculo.

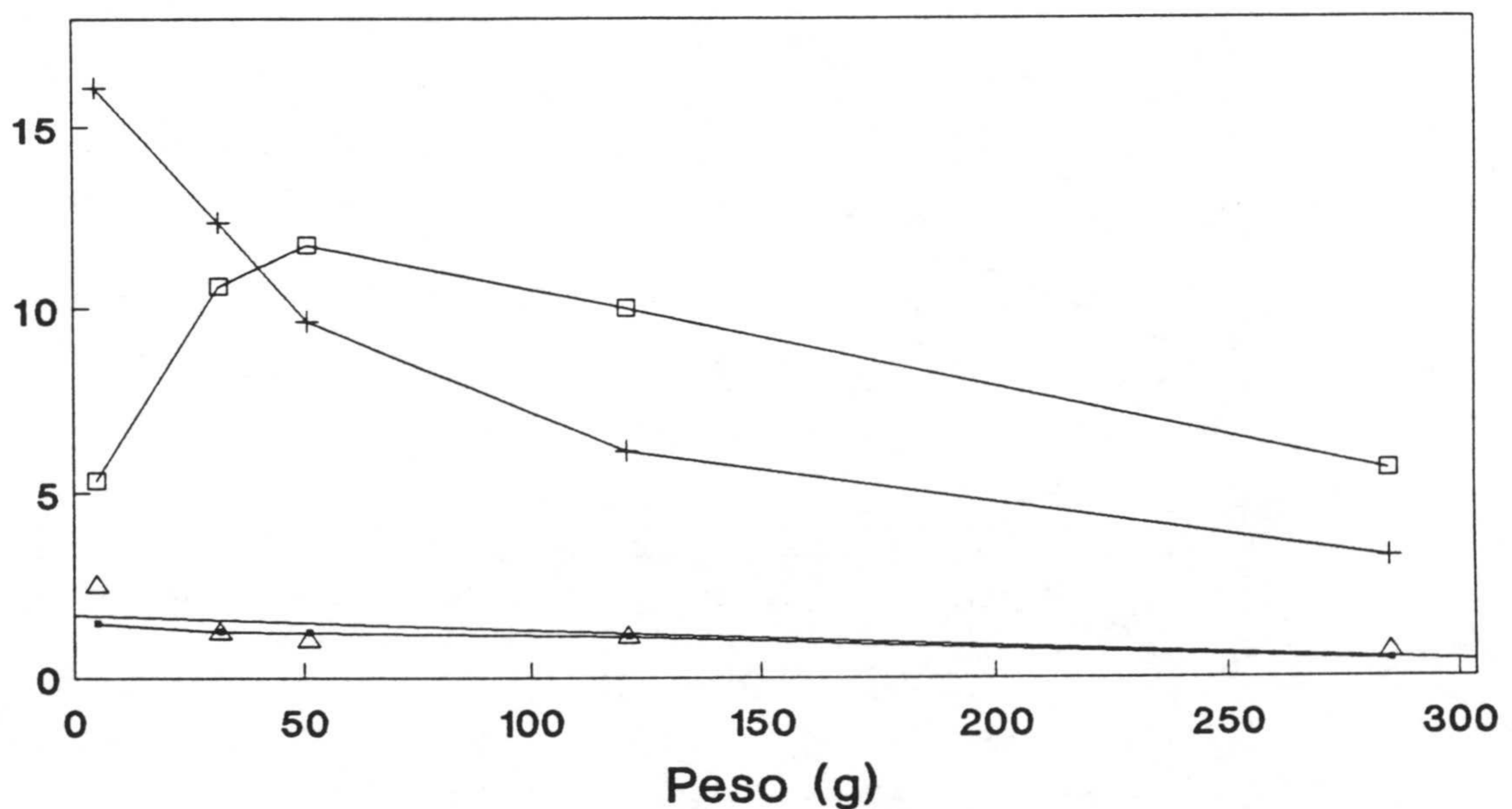


Figura 1.8. Crecimiento y turnover proteico en el músculo blanco de trucha arco iris. Influencia del peso muscular. La evolución de la K_s (□) con respecto al peso del músculo describe una línea recta según la ecuación $K_s=-0.0033W_M+1.4386$, $r=-0.98$, $P<0.01$. Mientras que la C_s (+) muestra un comportamiento potencial representado por $C_s=34.74W_M^{-0.3836}$, $r=-0.93$, $P<0.05$ y (\triangle) $K_c=3.7757W_M^{-0.2968}$, $r=-0.96$, $P<0.01$.

estadística, algo similar ocurre con la concentración de DNA que oscila desde 1.49 hasta 0.72, disminuyendo un 52 % del valor inicial. Como consecuencia de lo cual, la relación RNA/DNA disminuye ligeramente aunque no de forma significativamente apreciable (tabla 1.2).

La relación RNA/proteína o capacidad de síntesis (C_S) disminuye paralelamente a los cambios sufridos por la velocidad fraccionaria de síntesis proteica (tabla 1.3, figura 1.5) observándose al representar la C_S frente al peso del órgano (figura 1.5) una curva de carácter potencial, representada por la ecuación $C_S=43.9169W^{-0.2660}$ ($r=0.98$, $P<0.005$) y con un claro comportamiento bifásico, con un fuerte descenso en los estadios más tempranos, del orden del 40 %, hasta alcanzar aproximadamente los 65 gramos, y un suave descenso posterior hasta que el animal alcanza los 420 gramos.

La cantidad de proteína sintetizada por unidad celular (K_{DNA}) también se ve influenciada por el estado de desarrollo de los animales, oscilando entre valores de 25.48 para animales de 7 gramos y 15.83 para animales de 420 gramos, disminuyendo un 38 % del valor inicial (tabla 1.3) y el cambio se produce siguiendo un patrón muy similar a lo que le ocurre a la K_S y a la C_S (figura 1.5).

La relación existente entre la C_S , la K_{RNA} y la K_S se muestra en la figura 1.6:

i) Existe una correlación positiva entre la K_S y la C_S en el hígado de animales en crecimiento, siendo de destacar el alto valor de la pendiente.

ii) Sin embargo, el valor de la pendiente para la K_G y la K_{RNA} está muy próximo a cero, es decir que no existe una correlación positiva entre ambas variables no afectándose por los cambios que se producen en los valores de síntesis proteica a medida que el animal crece.

1.3.3. Turnover proteico y crecimiento celular en el músculo blanco.

El patrón de crecimiento de este tejido se caracteriza por coincidir altas velocidades específicas de crecimiento, características de estadios iniciales de desarrollo, con una mayor rapidez en la pérdida de esa capacidad de crecimiento (K_G) a lo largo del tiempo. A la vez que el valor de la K_G para el músculo está estrechamente relacionado con su peso, el patrón de crecimiento es tal que permite que la velocidad de disminución de la K_G respecto al peso del músculo no varíe sea cual sea el peso del animal.

En cuanto a la naturaleza del crecimiento de este tejido, existe una estrecha relación entre las curvas que definen el incremento total de proteína, el incremento de peso y el aumento total de núcleos (hiperplasia). En los tres casos, al representar los valores de los distintos parámetros frente al peso del órgano, se muestran unas relaciones que se ajustan a una correlación potencial descrita por la expresión $Y=AX^b$, siendo el valor de los coeficientes A y b el recogido en la figura 1.7, observándose un valor muy similar del coeficiente b tanto para el DNA total, incremento de peso y síntesis total. Se observa un claro comportamiento bifásico, con un fuerte incremento lineal de todos estos parámetros hasta que el animal tiene aproximadamente 170 gramos existiendo después una fase de meseta para la proteína y el peso mientras que en el caso del DNA aún sigue en ascenso. Entre los 7 y 170 gramos, la cantidad total de proteínas sintetizadas incrementa aproximadamente 21 veces, valores de 0.011 a 0.23 gr, la cantidad de núcleos 12.0 veces, desde 1.9 a 22.8, y el incremento de peso más de 14 veces (de 0.13 a 1.83). El tamaño celular aumenta unas tres veces, desde 390.5 hasta 1190, entre animales de 7 y 420 gramos (tabla 1.4).

El comportamiento de las velocidades de crecimiento y las velocidades de turnover proteico es diferente al del hígado. En la tabla 1.6 se muestra como existe una disminución en la K_G del músculo blanco a

Tabla 1.4. Influencia del peso corporal sobre la composición y crecimiento del músculo blanco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

	7 g	45 g	65 g	170 g	420 g
Peso inicial (g)	2.741±0.027	24.95±1.25	28.03±0.31	89.73±5.00	281.12±7.75
Peso final (g)	6.007±0.130	31.38±0.91	50.63±2.28	137.46±5.00	285.08±9.02
Peso día del turnover (g)	4.92±0.14	31.87±0.51	51.00±2.23	121.40±2.30	285.08±9.02
Incremento peso día (g)	0.126±0.005	0.378±0.06*	0.481±0.011*	1.835±0.062*	2.054±0.001*
[proteínas] mg/g hígado	139.03±13.97	133.42±15.11	146.98±7.77	167.82±6.53	142.41±7.04
[RNA] mg/g hígado	2.24±0.18	1.65±0.04*	1.42±0.20*	1.03±0.07*	0.47±0.016*
[DNA] mg/g hígado	0.39±0.04	0.16±0.01*	0.15±0.01*	0.19±0.05*	0.12±0.02*
Síntesis Total (mg)	10.1±2.38	53.1±2.54*	92.0±15.64*	228.2±73.29*	191.0±24.38*
[DNA] _{total} ¹ (mg)	1.92±0.14	5.10±0.22*	7.65±0.06*	23.07±2.95*	34.21±4.09*
Proteínas/DNA ² (mg/mg)	356.5±35.50	833.8±77.9*	979.9±62.4*	883.3±124.2*	1186.7±109.2*
RNA/DNA (mg/mg)	5.74±0.28	10.31±0.50*	9.47±0.90	5.42±0.88	3.92±0.33*

¹ La concentración de DNA total es un índice del número de núcleos existentes en el tejido, así como la relación ² proteína/DNA es un índice del tamaño celular. Los resultados se expresan como la media de al menos diez valores ± SEM. * P<0.05.

Tabla 1.5. Influencia del peso corporal sobre las velocidades de recambio proteico y eficacia de retención de proteínas en el músculo blanco de la trucha arco iris.

	7 g	45 g	65 g	170 g	420 g
K _c	2.51±0.61	1.24±0.06	1.02±0.18*	1.11±0.32	0.68±0.10*
K _s	1.48±0.32	1.25±0.06	1.23±0.21	1.12±0.36	0.47±0.06*
K _p	-1.03±0.22	0.01±0.005	0.21±0.04	0.01±0.003	-0.20±0.03
C _s	16.11±1.16	12.37±0.85*	9.66±0.85*	6.14±0.33*	3.27±0.14*
K _{RNA}	0.92±0.13	1.01±0.06	1.75±0.26*	1.82±0.57*	1.42±0.18*
K _{DNA}	5.28±1.14	10.42±0.51*	12.05±2.03*	9.89±3.21	5.58±0.71
ERP	169.6±36.2	99.20±4.76	82.93±14.36	99.11±31.86	144.7±18.2

ABREVIATURAS: K_c, velocidad de acumulación de proteínas; K_s, velocidad de síntesis proteica; K_p, velocidad de degradación de proteínas. Estas tres velocidades se expresan como %/día. C_s, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_s/C_s)x10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA; ERP, eficacia de retención de proteínas: (K_c/K_s)x100. Los resultados son la media ± SEM de al menos seis peces.* P<0.05.

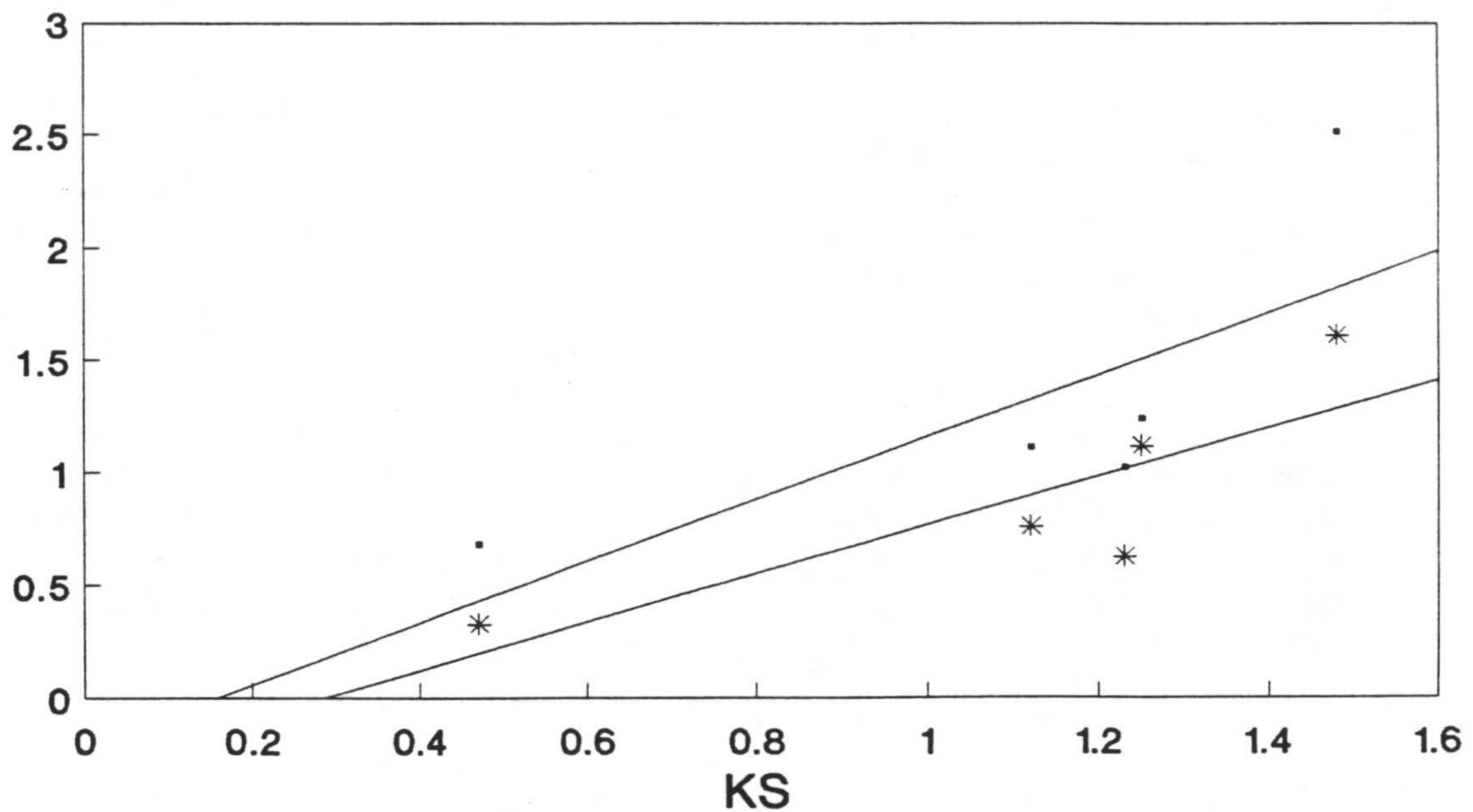


Figura 1.9. Relaciones entre la velocidad fraccionaria de síntesis proteica de músculo blanco de la trucha arco iris y la K_c (—) y la C_s (*) a lo largo de las distintas etapas del crecimiento. $K_c=1.3789K_s-0.2186$, $r=0.75$, y $C_s=11.2010K_s-3.4511$, $r=0.83$. Los valores de r se encuentran en el límite de la significancia estadística.

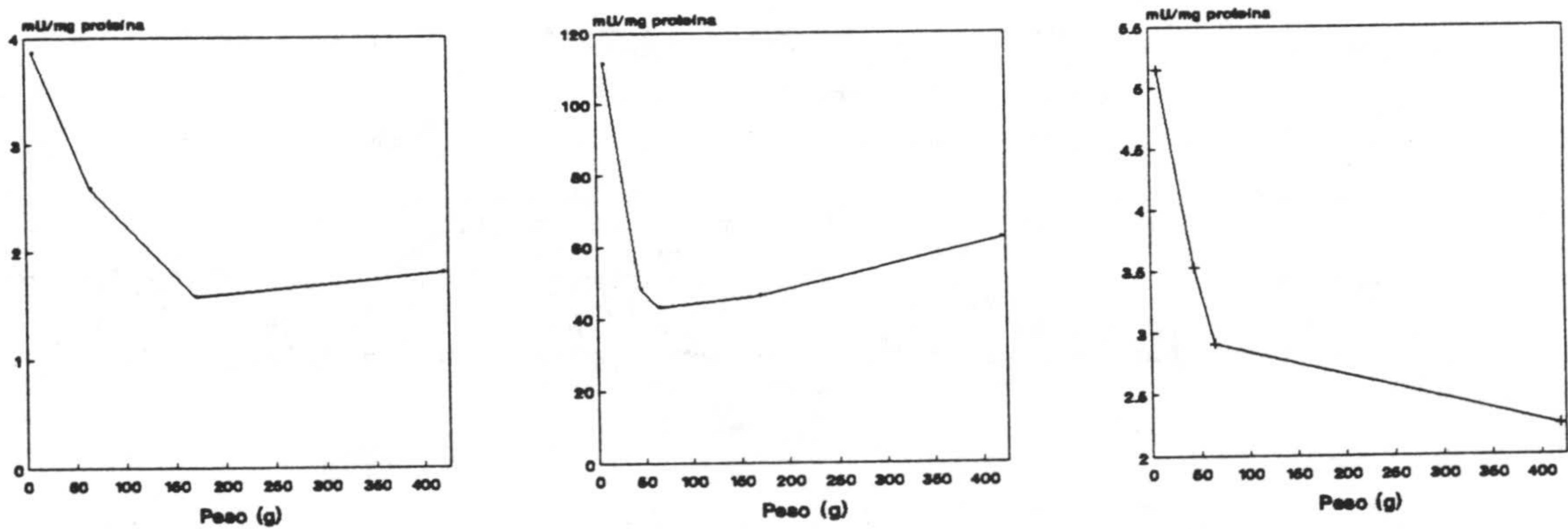


Figura 1.10. Comportamiento de la V_{max} de la SerDH hepática y TyrAT de hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*) en animales de diferentes estados de crecimiento representados por diferentes pesos.

medida que el animal aumenta de peso, disminuyendo a los 420 gramos hasta un 73 % del valor encontrado a los 7. De la misma manera, la K_S cae aproximadamente un 68 %, desde valores de 1.48, a los 7 gramos hasta 0.47, a los 420 gramos. La K_S disminuye de forma lineal respecto al peso del órgano, $K_S = -0.0033W + 1.4386$, $r = -0.98$, $P < 0.01$). Las dificultades metodológicas y los bajos valores de la K_D en este tejido nos hacen encontrar valores muy diversos para este parametro y para la ERP en este tejido (Tabla 1.5. Figura 1.7) fruto todos ellos de la inexistencia de unas variaciones claras y ostensibles entre los distintos pesos estudiados. Es decir, se cree que puede considerarse que el valor de la K_D en todos ellos es muy cercano a cero y en el caso de la EPR alrededor del 90 %. Las oscilaciones encontradas son fruto de errores y diversidad experimental de la que todas estas determinaciones no están exentas en este tejido.

1.3.4. Síntesis proteica y su relación con la concentración de ácidos nucleicos en el músculo blanco de la trucha arco iris.

A medida que el animal aumenta de tamaño, la concentración de RNA disminuye, pasando de 2.24 mgr/gr tejido, en animales de 7 gr, a 0.47 mg/gr en animales de 420 gramos; disminuyendo casi un 80 % del valor inicial. Existe una correlación negativa entre la concentración de RNA (mg/g tejido) y el peso del músculo expresada por la ecuación $[RNA] = -0.0055W_M + 1.9034$, $r = -0.93$, $P < 0.02$. La concentración de DNA también desciende casi un 70 %, desde 0.39 a 0.12 mgr/gr tejido (tabla 1.4). La relación RNA/DNA no cambia significativamente entre los pesos más alejados.

Mientras tanto, la capacidad de síntesis sufre también un fuerte descenso, ajustándose su comportamiento frente al peso a la siguiente expresión: $C_S = 34.7416W_H^{-0.3836}$ pasando de 16.11 mgr RNA/gr proteína a los 7 gr a 3.27 a los 420 gr, disminuye un 80 %. Según se observa en la figura

1.7 y tabla 1.5 este descenso es más acusado hasta que el animal alcanza aproximadamente 70 gr, siendo posteriormente mas suave hasta alcanzar pesos adultos.

La K_{RNA} no sufre cambios signifivamente apreciables, manteniendose durante todo el experimento alrededor de los mismos valores.

2. Comportamiento cinético de la serina deshidratasa (SerDH) y tirosina aminotransferasa (TyrAT) de hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss) en diferentes estadios de desarrollo.

2.1. Actividad SerDH en hígado de trucha arco iris.

En la tabla 1.6 se analiza la influencia del cambio en la concentración de sustrato (L-Ser) sobre la actividad SerDH en el hígado de truchas cuyos pesos oscilaban entre 7 y 420 gramos.

En todos los casos, el enzima tiene un comportamiento hiperbólico típico de una cinética michaeliana clásica. No existiendo en ningún caso evidencia alguna de sigmoicidad. El valor del coeficiente de Hill (h) para la SerDH de hígado de trucha de animales de 7 g, 65 g, 170 g y 420 g fué respectivamente 0.98, 0.92, 0.88 y 0.97, en todos los casos $r > 0.98$ y $p < 0.01$.

A medida que el animal aumenta de peso, observamos como existe un descenso significativo en la V_{max} , que se mantiene a lo largo de toda la curva de saturación del enzima, pasando la V_{max} de 3.86 mU/mg a los 7 gr hasta 1.58 a los 170 gr, disminuyendo casi un 60 % del valor inicial. Esta disminución cesa al alcanzar el animal un peso determinado a partir del cual se mantiene una cinética semejante (Tabla 1.6).

Como consecuencia de este comportamiento la razón $V_{subsaturante} (V_{0.025})/V_{max}$ se mantiene en unos valores muy semejantes.

Este comportamiento es muy similar al observado para la proteína ingerida y para la K_S y la K_D hepáticas, de ahí que encontremos un perfecto ajuste de regresión lineal entre estos parámetros definidos por las ecuaciones:

$$y = 0.4171x_1 - 1.1745, r = 0.95, P < 0.05, y = 0.1276x_2 + 0.9122, r = 0.95, P < 0.05,$$

$$y = 0.1426x_3 + 1.1242, r = 0.98, P < 0.02$$

siendo $y = V_{max}$ de la SerDH, $x_1 = \text{mg proteína ingerida/g pez/día}$, $x_2 = K_S$ y $x_3 = K_D$.

2.2. Actividad SerDH en el músculo blanco de la trucha arco iris.

La actividad de este enzima en el músculo blanco es muy escasa. Aunque se ha podido determinar e incluso calcular la cinética para peces de 7 y 420 gramos (tabla 1.7), la actividad específica obtenida en todos los casos es muy pequeña. En el resto de pesos, los valores obtenidos han hecho imposible determinar el comportamiento cinético. Sin embargo, como se observa en la tabla 1.8 se ha puesto de manifiesto la existencia de una cinética hiperbólica. El valor del coeficiente de Hill es de 0.75 y 0.93 para los 7 y 420 gramos respectivamente.

No se observan diferencias significativas entre los distintos pesos ensayados, ni en la actividad específica, K_m , ni en la razón $V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{max}}$.

2.3. Actividad TyrAT de hígado de trucha arco iris en diferentes etapas del desarrollo del animal.

En la tabla 1.8, se describe el comportamiento de la actividad TyrAT de hígado de trucha arco iris en animales de 7, 45, 65, 170 y 420 gramos. Para estudiar el efecto de la concentración de sustrato sobre dicha actividad, se han ensayado las siguientes concentraciones de Tyr: 0.50, 1.25, 2.50, 3.75, 6.75 y 67.5 mM. El comportamiento cinético de este enzima en el hígado de trucha arco iris en crecimiento es un comportamiento michaeliano clásico, describiendo una perfecta hipérbola la representación directa de Velocidad frente a Sustrato (figura 1.13). Los valores del coeficiente de Hill son respectivamente 1.63, 1.60, 1.36, 1.33 y 1.84; $r > 0.97$ y $P < 0.01$, demostrando la inexistencia de efecto de cooperatividad alguno.

En el estadio de desarrollo inicial, 7 gramos, la actividad TyrAT es

Tabla 1.6. Efecto del tamaño corporal o estado de desarrollo sobre el comportamiento cinético de la serina deshidratasa de hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

[SERINA] (M)	7 gr	65 gr	170 gr	420 gr
0.01	0.417±0.022	0.486±0.102	0.153±0.013	0.108±0.001
0.025	0.580±0.026	0.696±0.096	0.236±0.027	0.260±0.044
0.05	1.130±0.043	1.062±0.120	0.435±0.053	0.463±0.045
0.1	1.563±0.072	1.450±0.142	0.790±0.053	0.668±0.039
0.25	2.291±0.096	2.001±0.179	1.088±0.084	1.092±0.041
0.5	3.043±0.112	2.257±0.144	1.112±0.022	1.446±0.033
5	3.783±0.166	2.549±0.302	1.593±0.129	1.732±0.133
$K_m^{1,2}$	143.86±6.31	74.21±8.86*	122.04±9.87	154.92±11.93
$V_{max}^{1,2}$	3.86±0.17	2.59±0.31*	1.58±0.13*	1.80±0.14*
$V_{0.025}/V_{max}$	0.15±0.01	0.27±0.03	0.15±0.08	0.14±0.01
h^3	0.98±0.04	0.92±0.11	0.88±0.07	0.97±0.08

¹ La actividad específica y la V_{max} se expresan en mU/mg proteína, la K_m en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos. Las diferencias significativas entre el control y la dieta en cuestión se expresan como * $P < 0.05$.

³ h = Coeficiente de Hill.

Tabla 1.7. Efecto del tamaño corporal o estado de desarrollo sobre el comportamiento cinético de la serina deshidratasa de músculo blanco de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

[SERINA] (M)	7 g	420 g
0.025	0.058±0.007 ¹	0.067±0.012
0.05	0.062±0.009	0.097±0.020
0.10	0.104±0.011	0.117±0.027
0.25	0.118±0.016	0.154±0.029
2.5	0.123±0.016	0.170±0.034
$K_m^{1,2}$	34.39±4.36	40.94±8.23
$V_{max}^{1,2}$	0.129±0.02	0.174±0.04
$V_{0.025}/V_{max}$	0.45±0.06	0.39±0.08
h	0.75±0.09	0.93±0.20

¹ La actividad específica y la V_{max} se expresan en mU/mg proteína, la K_m en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos.

Tabla 1.8. Efecto del tamaño corporal o del estado de desarrollo sobre el comportamiento cinético de la tirosina aminotransferasa de hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

[Tyr] (mM)	7 g	45 g	65 g	170 g	420 g
0.50	16.68±0.80 ¹	8.36±0.22	6.83±0.51	9.67±3.13	9.33±0.31
1.25	37.77±1.77	16.51±0.27	14.67±1.58	21.04±6.29	21.50±1.32
2.50	54.92±3.87	25.29±0.39	21.51±2.27	29.03±8.45	33.78±1.38
3.75	65.14±3.44	29.78±0.15	26.16±2.39	32.90±9.55	36.05±1.58
6.75	75.83±3.99	34.61±0.23	31.94±2.47	37.80±9.36	44.64±1.37
67.5	111.51±6.04	48.19±0.67	42.88±3.91	46.19±13.41	62.25±2.59
$K_m^{1,2}$	2.32±0.12	2.52±0.03	2.65±0.23	1.62±0.45	2.38±0.10
$V_{max}^{1,2}$	114.70±6.03	49.73±0.67*	44.54±3.94*	47.25±13.48*	62.20±2.58*
$V_{0.5}/V_{max}$	0.15±0.01	0.17±0.01	0.16±0.02	0.21±0.06	0.15±0.01
h	1.63±0.09	1.60±0.02	1.36±0.09	1.33±0.39	1.84±0.08

¹ La actividad específica y la V_{max} se expresan en mU/mg proteína, la K_m en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos. Las diferencias significativas entre el control y la dieta en cuestión se expresan como * $P < 0.05$.

Tabla 1.9. Efecto del tamaño corporal o del estado de desarrollo sobre el comportamiento cinético de la tirosina aminotransferasa de músculo blanco de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

[Tyr] (mM)	7 g	45 g	65 g	420 g
0.50	0.45±0.10 ¹	0.75±0.11	0.32±0.17	0.33±0.09
1.25	1.00±0.24	1.35±0.12	0.65±0.07	0.43±0.15
2.50	1.70±0.19	1.99±0.10	1.13±0.15	0.96±0.31
3.75	1.73±0.35	2.31±0.18	1.39±0.30	1.09±0.32
6.25	3.14±0.28	2.74±0.22	1.76±0.18	1.39±0.42
62.5	4.72±0.76	3.41±0.30	2.73±0.60	1.59±0.52
$K_m^{1,2}$	5.21±0.84	1.94±0.17*	4.05±0.88	2.13±0.73
$V_{max}^{1,2}$	5.15±0.83	3.53±0.31	2.91±0.64	1.71±0.56*
$V_{1.25}/V_{max}$	0.19±0.03	0.38±0.03	0.22±0.05	0.19±0.06
h	0.99±0.16	0.97±0.09	1.00±0.22	0.86±0.32

¹ La actividad específica y la V_{max} se expresan en mU/mg proteína, la K_m en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos. Las diferencias significativas entre el control y la dieta en cuestión se expresan como * $P < 0.05$.

la más elevada a lo largo de todas las concentraciones ensayadas. La V_{max} pasa desde 114.7 a los 7 gramos hasta 49.73 a los 45 gramos, disminuyendo casi un 57 % (tabla 1.8). Los valores de la V_{max} del resto de estadios de pesos superiores se mantienen en niveles semejantes (tabla 1.8). Los valores de la K_m y de la razón $V_{0.05}/V_{max}$ se mantienen sin cambios significativos a medida que el animal aumenta de peso.

2.4. Actividad TyrAT de músculo blanco de trucha arco iris en diferentes etapas del desarrollo del animal.

En la tabla 1.9 se recoge el comportamiento de la actividad TyrAT de músculo blanco de truchas cuyos pesos oscilan entre 7 y 420 gramos. La actividad específica es bastante inferior a la encontrada en el hígado, aunque perfectamente detectable y determinable. El comportamiento hiperbólico típico se confirma por los valores del coeficiente de Hill (h) para cada etapa estudiada: 0.99 (7 gr), 0.97 (45 gr), 1.00 (65 gr) y 0.86 (420 gr); $r > 0.96$ y $P < 0.01$.

Aunque se observa una tendencia al descenso en los valores de la V_{max} a medida que el animal incrementa de peso, solo esa diferencia se hace significativa numéricamente cuando el animal alcanza los 420 gramos pasando desde 5.15 a 1.73, descendiendo un 67 % del valor inicial.

Los valores de la K_m y $V_{1.25}/V_{max}$ se mantienen sin cambios significativamente importantes a lo largo de todos los pesos ensayados, indicándonos que las diferencias observadas en la V_{max} se refleja a lo largo de toda la curva de saturación del enzima por el sustrato.

III.3. REGULACION NUTRICIONAL DE LAS VELOCIDADES DE CRECIMIENTO Y TURNOVER PROTEICO. EFECTOS NUTRICIONALES.

Para estudiar la regulación nutricional del turnover de proteínas hepáticas y musculares, además de analizar los efectos de un ayuno prolongado y posterior realimentación a largo plazo, se han diseñado un amplio grupo de experimentos basados en la utilización de cuatro tipos de dietas cuya composición se resume en la tabla 2.1. Tres de ellas (B,C,D) son isocalóricas y una, la A, es hipercalórica. Además se ha procurado jugar con los valores de la relación proteína/energía (P/E) y energía proteica/energía no proteica (EP/ENP) como índices colaboradores para explicar la naturaleza de los posibles efectos combinados de cada una de ellas. El conjunto de resultados se dividen en tres grandes bloques, donde se analizan el efecto del cambio en la concentración de cada uno de los macronutrientes, proteína, grasa y carbohidratos, sobre el comportamiento del crecimiento y turnover proteico del hígado y músculo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

2.1. Efecto del cambio en el aporte de proteínas dietarias sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico del hígado y músculo blanco en la trucha arco iris.

2.1.1. Disminución en el aporte de proteínas y recambio de proteínas tisular.

Para estudiar el efecto de la disminución en la concentración de proteínas dietarias sobre las velocidades de crecimiento y turnover proteico del hígado y músculo blanco de la trucha arco iris, se preparan dos dietas que difieren en un 20 % de proteínas totales: Dieta A: 40:18:23; Dieta B:

Tabla 2.1. Crecimiento, comportamiento alimenticio y aprovechamiento del alimento en truchas tratadas con diferentes tipos de dietas.

	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
Peso inicial (g)	112.12±0.60	121.70±0.60	108.80±0.84	106.23±2.00
Peso final (g)	211.10±14.2	152.80±5.29	207.90±8.34	168.26±6.37
Peso medio (g)	151.62±0.91	134.21±0.19	149.40±0.62	131.43±0.34
Incremento peso día (g)	2.02±0.11	0.61±0.03 ^a	1.90±0.04 ^b	1.41±0.17 ^{acd}
K _c animal completo	1.12±0.06	0.43±0.02 ^a	1.11±0.02 ^b	0.94±0.12 ^c
mg dieta/pez/día	2110.0±30.0	1630.0±10.0	2110.0±20.0	1860.0±20.0
mg proteína/pez/día	844.2±13.9	325.7±2.9	844.4±7.1	744.1±8.4
mg lípidos/pez/día	379.9±5.9	293.1±2.6	168.9±1.4	334.9±3.8
mg carbohidratos/pez/día	485.4±7.6	374.5±3.3	485.5±4.1	0.00
KJ/pez/día	39.9±0.6	24.4±0.2	31.6±0.3	27.8±0.3
mg dieta/g pez/día	13.8±0.2	12.1±0.1	14.1±0.1	13.9±0.1
mg proteína/g pez/día	5.5±0.1	2.4±0.1	5.7±0.1	5.5±0.1
mg lípidos/g pez/día	2.5±0.1	2.2±0.1	1.1±0.1	2.5±0.1
mg HC/g pez/día	3.2±0.1	2.8±0.1	3.3±0.1	0.00
J/g pez/día	261.5±3.8	181.8±1.5	211.3±1.8	207.3±2.1
FE	0.96±0.02	0.38±0.01 ^a	0.90±0.01 ^{ab}	0.76±0.01 ^{acd}
PER	2.39±0.04	1.88±0.07 ^a	2.25±0.02 ^{ab}	1.89±0.01 ^{ad}

Los resultados se expresan como la media ± SEM. Abreviaturas: FE, eficacia de conversión del alimento (g crecimiento/g ingesta); PER, eficacia de conversión de la proteína (g crecimiento/g proteína ingerida). Las diferencias significativas, P<0.05, se expresan como: ^a Dieta A vs B, C o D, ^b Dieta B vs C, ^c Dieta B vs D, ^d Dieta C vs D.

20:18:23. Además de modificarse el contenido energético, las relaciones P/E y EP/ENP; es de interés el mencionar que el contenido proteico de la dieta B (20:18:23) no supe las necesidades proteicas mínimas necesarias para el crecimiento óptimo del pez.

2.1.1.1. Comportamiento alimenticio y evolución de las velocidades de crecimiento animales alimentados con dietas de diferente contenido proteico.

La administración de una dieta baja en proteínas (Dieta B, 20:18:23) produce una significativa disminución (casi un 70 %) tanto en el incremento medio de peso/pez/día que pasa desde 2.09 a 0.61 gr, como en el valor de la K_G la cual disminuye casi un 40 % como consecuencia de una escasez de aminoácidos y energía metabólica de 1.12 a 0.43 (tabla 2.1). Esta reducción en la asimilación energética y proteica está relacionada con una disminución del 12 % día en la ración alimentaria considerada como porcentaje del peso corporal, de 1.38 a 1.21 mg/g pez/día. La ingesta de los diferentes nutrientes considerados en relación al peso corporal (mg nutrientes/g pez/día) disminuyen un 56 % para la proteína, 12 % para la grasa, carbohidratos y un 30.5 % para la energía. La reducción en la ingesta de proteínas dietarias provoca una significativa disminución en la pendiente de la curva de crecimiento del animal completo, donde llegó a disminuir un 70 %, (2.1 a 0.61), (figura 2.1. panel A).

De acuerdo con esto, se observa una caída muy fuerte, más de un 60 %, en la eficacia de conversión del alimento (FE), mientras que la utilización de las proteínas (PER) es solo un 20 % menor para la dieta B, posiblemente debido a que en situaciones de escasez de proteína existe una alta eficacia de utilización de esta para el crecimiento. De hecho, el incremento de peso disminuye en proporción similar a la ingesta proteica total (2,5 veces) y los

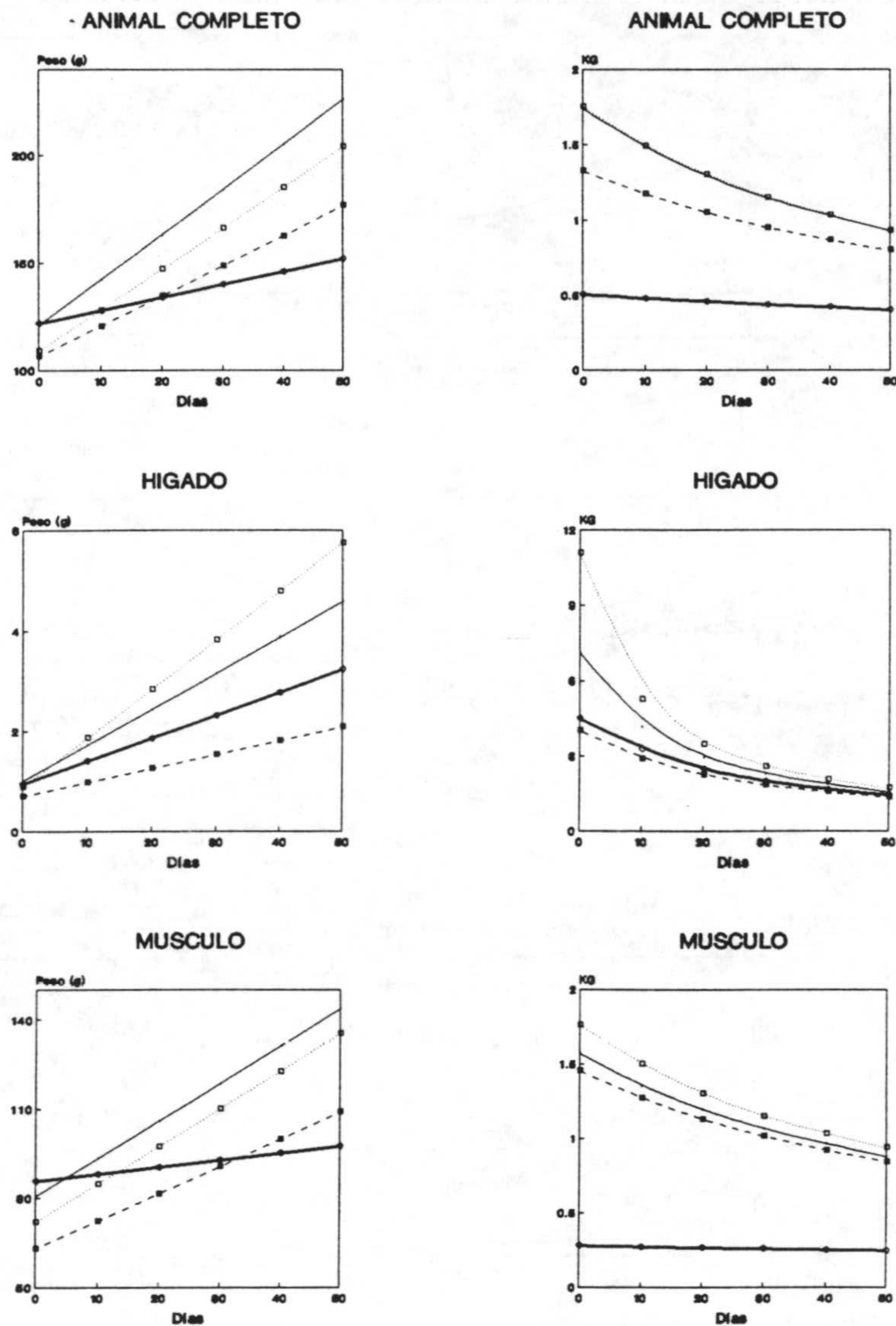


Figura 2.1. Influencia del cambio en el aporte de macronutrientes dietarios sobre la evolución del peso (Panel A) y de la velocidad específica de crecimiento (K_c) (Panel B) del animal completo, hígado y músculo, a lo largo del periodo experimental. Las pendientes de las rectas de regresión que relacionan el peso del sistema y el tiempo (Izquierda) para animales alimentados con la dieta A (—), B (---), C (···) o D (-.-) son respectivamente para: i) el animal completo: 2.10, 0.61, 1.90, 1.41; $r > 0.90$, $P < 0.02$. ii) el hígado: 0.072, 0.046, 0.097, 0.028, $r > 0.94$, $P < 0.01$. iii) músculo blanco: 1.26, 0.24, 1.27, 0.92, $r > 0.88$, $P < 0.01$. La representación de la K_c frente al tiempo experimental (Derecha) se ajusta a una regresión de potencia ($K_c = AT^b$) en la que los valores de los coeficientes A y b para los animales alimentados con las dietas A (—), B (---), C (···) y D (-.-) son respectivamente para: i) el animal completo, A: 1.81, 0.51, 1.85, 1.39; b: -0.142, -0.050, -0.146, -0.117. ii) hígado, A: 7.27, 6.25, 11.56, 4.06; b: -0.35, -0.35, -0.45, -0.27. iii) músculo, A: 1.62, 0.29, 1.86, 1.52; b: -0.13, -0.04, -0.15, -0.13; $r > 0.90$, $P < 0.02$.

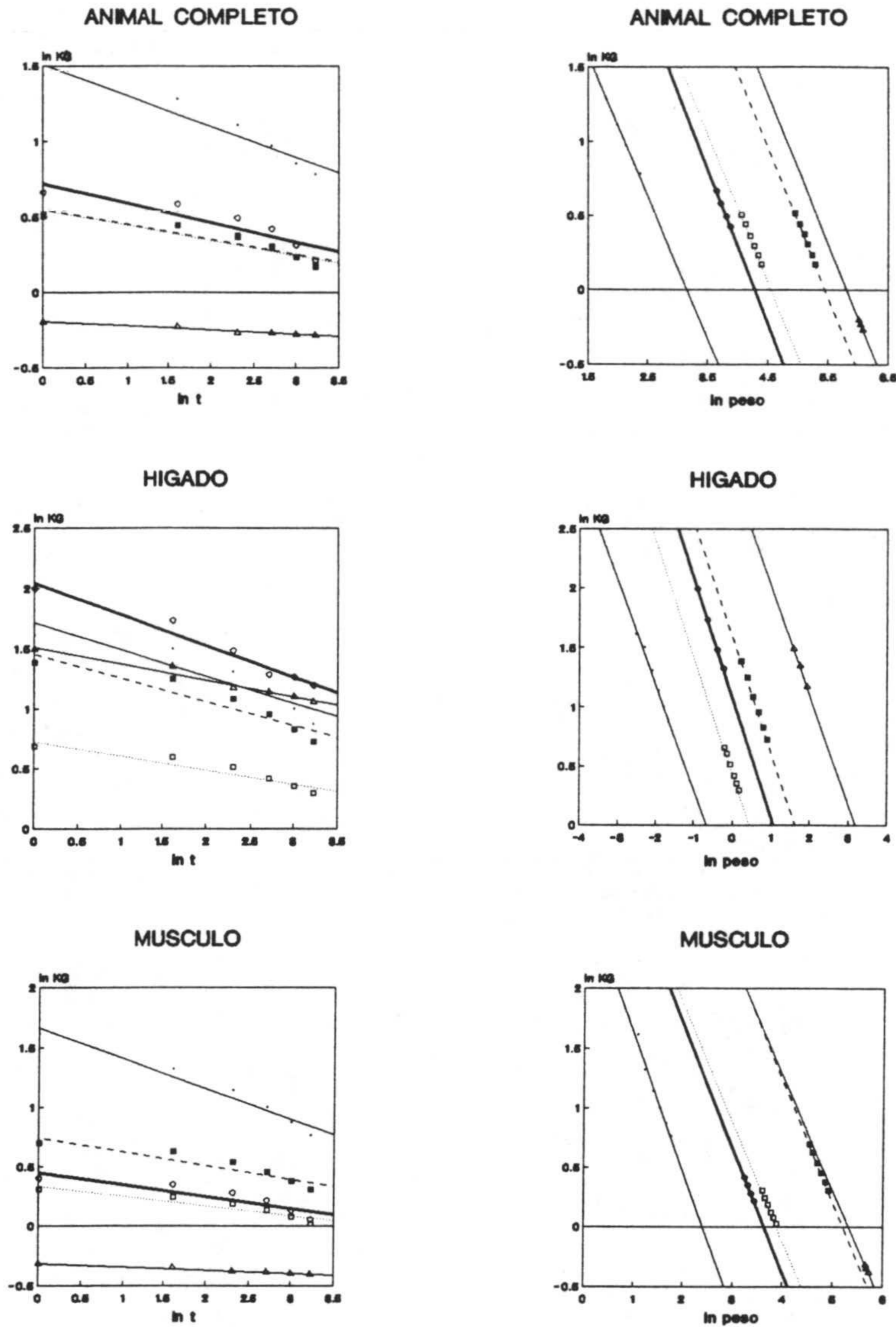


Figura 2.2. Influencia de los cambios en el aporte de macronutrientes dietarios sobre la evolución de la velocidad específica de crecimiento (K_c) frente al tiempo (Panel A) o el peso (Panel B) del animal completo, hígado y músculo, a lo largo del periodo experimental. Las pendientes de las rectas de regresión que relacionan el $\ln K_c$ y el \ln del tiempo (Panel A) para animales alimentados con la dieta A (—), B (—), C (○) o D (—) son respectivamente para: i) el animal completo: -0.14, -0.05, -0.15, -0.12; $r > 0.90$, $P < 0.02$. ii) para el hígado: -0.35, -0.35, -0.45, -0.27, $r > 0.90$, $P < 0.02$. iii) para el músculo: -0.13, -0.04, -0.15, -0.13 $r > 0.90$, $P < 0.02$. La representación de la K_c frente al peso del animal, tejido u órgano se ajusta a una regresión de potencia ($K_c = AW^b$). El valor de los coeficientes A y b de las rectas de regresión que relacionan el \ln del peso del sistema y el \ln de la K_c ($\ln K_c = b \ln W + \ln A$) (Panel B) para los animales alimentados con las dietas A (—), B (—), C (○) y D (—) son respectivamente para: i) el animal completo, A: 195.4, 56.0, 193.7, 141.2; b: -0.99, -0.98, -1.00, -1.00. ii) hígado, A: 7.29, 4.56, 9.92, 2.78; b: -1.01, -1.00, -1.01, -1.00. iii) músculo, A: 126.4, 25.39, 130.28, 91.92; b: -1.00, -1.01, -1.01, -1.00; $r = 1$, $P < 0.001$.

valores de PER son en cierta medida semejantes.

La evolución de la velocidad fraccionaria de crecimiento en relación al peso y al tiempo durante el desarrollo del experimento independientemente para cada dieta, en el animal completo, se ilustran en la figura 2.1 y 2.2. Para cada grupo de animales, se observa como los valores de la K_G van disminuyendo a medida que transcurre el experimento y en relación con su peso, ajustándose en sendos casos a una curva de naturaleza potencial ($K_G=AX^b$). La pendiente de la recta de regresión que relaciona el ln de la K_G con el ln del tiempo, es muy diferente según el tipo de dieta administrada, aproximadamente 3 veces mayor para la dieta A, índice evidente de la diferencia en la pérdida de capacidad de crecimiento entre las dos situaciones experimentales, a medida que transcurre el tiempo. Velocidades de crecimiento elevadas se correlacionan con una pérdida de la capacidad de crecimiento rápida y viceversa, una situación de estrés nutricional como la provocada por la administración de la dieta B produce una baja velocidad de acumulación de proteínas en el animal completo, velocidad que a su vez disminuye muy lentamente a medida que el sistema envejece, posiblemente como un mecanismo adaptativo para asegurar unos niveles mínimos de crecimiento.

Parece como si el peso del animal o del tejido determinase el valor de la K_G en cada momento del experimento. Sin embargo al comparar el ln de la K_G con el ln del peso tanto para el animal completo como para el músculo, la pendiente de las rectas de regresión siempre están en torno a -1, no viéndose afectada la velocidad de pérdida de la capacidad de crecimiento en relación al peso por los diferentes tratamientos nutricionales.

2.1.1.2. Efectos de la administración de una dieta baja en proteínas sobre la naturaleza del crecimiento hepático y su relación con el turnover proteico.

En el hígado aunque el incremento medio de peso día disminuya un 43% en la dieta B (tabla 2.2), la disminución de la K_G durante el tiempo experimental sigue un comportamiento similar en ambas situaciones dietarias encontrandonos unas pendientes muy similares (figura 2.2).

La administración de una dieta pobre en proteínas, produce una disminución significativa en el valor de la K_G hepática del orden de un 20 %, y en la eficacia de retención de proteínas (ERP) de un 32 % (tabla 2.4).

Aunque las velocidades fraccionarias de síntesis (K_S) y degradación (K_D) se mantengan sin cambios significativos (tabla 2.3), la síntesis total (tabla 2.2) disminuye un 36 %, pasando de 45.3 hasta 28.84 mgs/día. Esta disminución es acompañada por un descenso de un 35 % en el número de núcleos, de 9.09 a 5.90 mgs. El tamaño de la unidad celular no obstante, se mantiene sin cambios apreciables.

2.1.1.3. Síntesis proteica y su relación con la concentración de ácidos nucleicos en el hígado de trucha arco iris alimentadas con diferentes concentraciones de proteínas.

Aunque se observe un descenso significativo en la concentración de RNA de un 17 % en los animales alimentados con la dieta deficiente en proteínas (tabla 2.2), esto no se refleja en alteraciones en la capacidad de síntesis proteica (C_S) (tabla 2.3).

Tanto la C_S , como la K_{RNA} se mantiene en unos valores muy similares. La cantidad de proteína sintetizada por unidad celular (K_{DNA}) tampoco varía entre ambas situaciones.

Tabla 2.2. Efectos de la administración de dietas con diferente concentración de macronutrientes sobre el crecimiento y el contenido de proteínas y ácidos nucleos en el hígado de trucha arco iris.

	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
Peso inicial (g)	0.91±0.05	0.94±0.03	0.88±0.01	0.69±0.06
Peso final (g)	4.80±0.31	3.41±0.09	6.05±1.04	1.92±0.12
Peso día turnover (g)	4.33±0.48	2.65±0.28	5.86±0.62	1.67±0.09
Incremento peso día (g)	0.08±0.01	0.05±0.01 ^a	0.10±0.01 ^b	0.03±0.01 ^{ad}
mg proteínas/g tejido	134.29±5.21	121.19±6.70	108.83±16.00	164.72±16.00 ^{cd}
mg RNA/g tejido	6.56±0.19	5.43±0.28 ^a	5.84±0.39	11.80±0.21 ^{acd}
mg DNA/g tejido	2.10±0.25	2.23±0.31	1.48±0.15 ^{ab}	5.37±0.57 ^{acd}
Síntesis total (mgs/día)	45.30±2.91	28.84±4.50 ^a	39.03±0.70 ^b	31.11±5.75 ^a
[DNA] _{total} ¹	9.09±1.08	5.91±0.72 ^a	8.67±0.10 ^b	8.97±0.11 ^c
mg proteína/mg DNA ²	63.95±5.05	54.34±5.28	73.53±5.75 ^b	30.67±3.12 ^{acd}
mg RNA/mg DNA	3.12±0.23	2.43±0.25 ^a	3.95±0.08 ^{ab}	2.20±0.14 ^{ad}

¹ La concentración de DNA total es un índice del número de núcleos existentes en el tejido, así como la relación ² proteína/DNA es un índice del tamaño celular. Los resultados se expresan como la media de al menos diez valores ± SEM. Las diferencias significativas, P<0.05, se expresan como: ^a Dieta A vs B,C o D, ^b Dieta B vs C, ^c Dieta B vs D, ^d Dieta C vs D.

Tabla 2.3. Influencia del contenido de macronutrientes dietarios sobre las velocidades de recambio proteico y eficacia de retención de proteínas en el hígado de la trucha arco iris.

	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
K _c	2.25±0.12	1.77±0.07 ^a	2.38±0.24 ^b	1.79±0.60
K _s	7.79±0.50	8.98±1.40	6.12±0.11 ^a	11.31±2.09 ^d
K _p	5.54±0.38	7.21±0.70	3.74±0.22 ^{ab}	9.52±2.47 ^d
C _s	48.85±1.40	44.81±2.39	53.66±2.27 ^b	71.64±7.26 ^{acd}
K _{RNA}	1.59±0.12	2.00±0.21	1.14±0.03 ^{ab}	1.58±0.23
K _{DNA}	4.98±0.62	4.88±0.72	4.50±0.27	3.47±0.51
ERP	28.89±0.47	19.68±1.92 ^a	38.85±2.31 ^{ab}	15.81±4.11 ^{ad}

ABREVIATURAS: K_c, velocidad de acumulación de proteínas; K_s, velocidad de síntesis proteica; K_p, velocidad de degradación de proteínas. Estas tres velocidades se expresan como %/día. C_s, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_s/C_s)x10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA; ERP, eficacia de retención de proteínas: (K_c/K_s)x100. Los resultados son la media ± SEM de al menos seis peces. Las diferencias significativas, P<0.05, se expresan como: ^a Dieta A vs B,C o D, ^b Dieta B vs C, ^c Dieta B vs D, ^d Dieta C vs D.

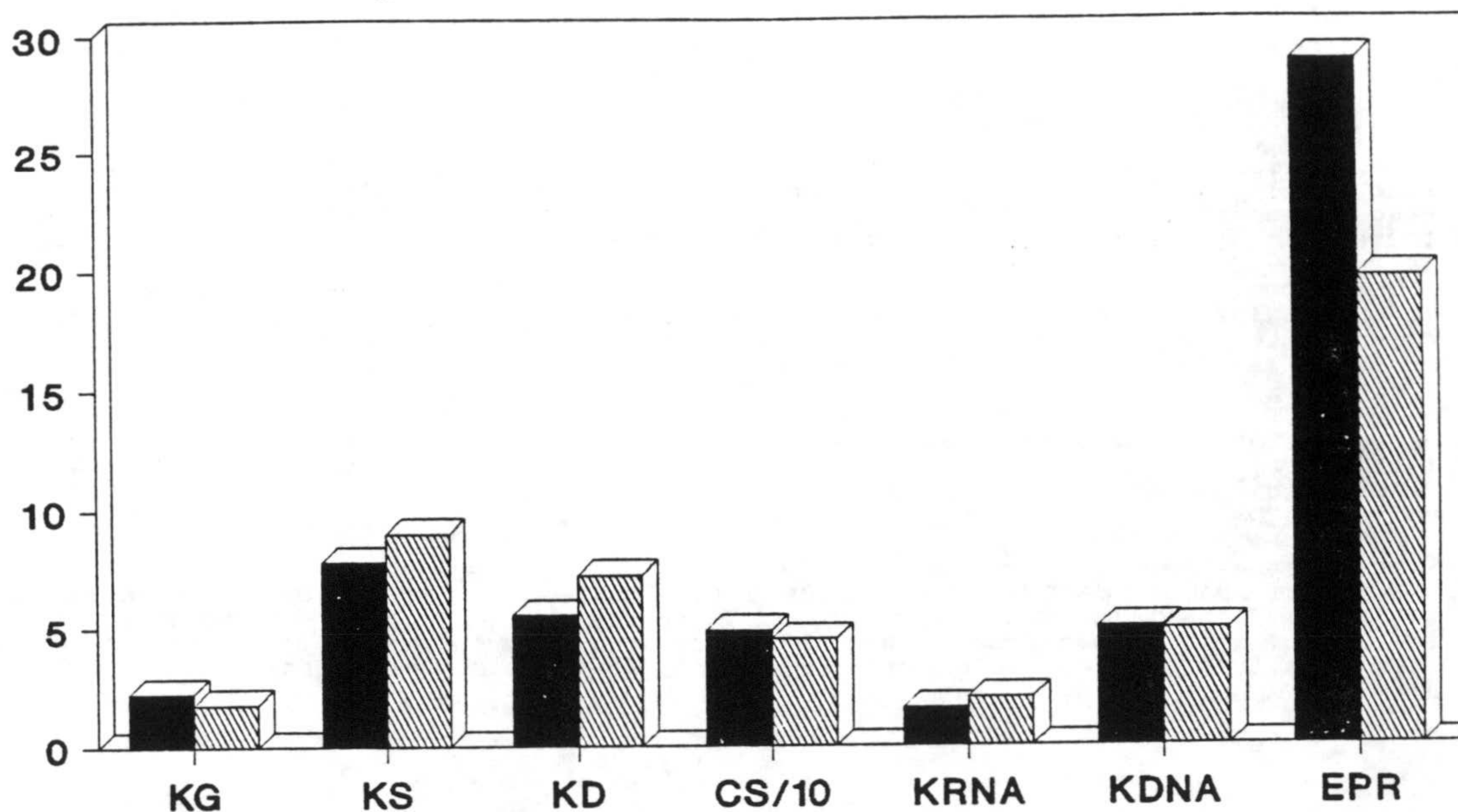


Figura 2.3. Efectos de la disminución en el aporte de proteínas dietarias sobre las velocidades de turnover proteico en el hígado de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta A (40:18:23), (▨) Dieta B (20:18:23).

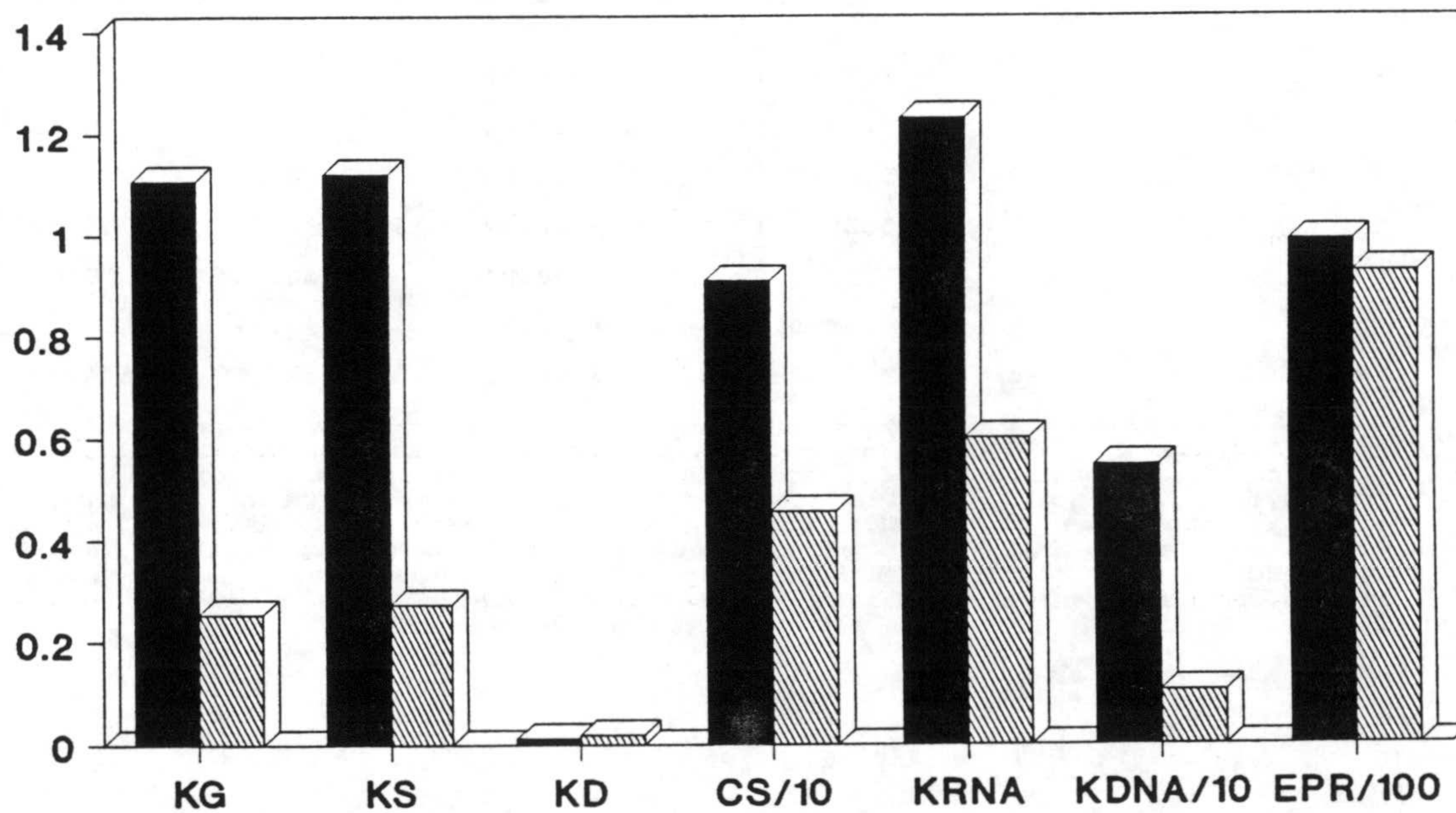


Figura 2.4. Efectos de la disminución en el aporte de proteínas dietarias sobre las velocidades de turnover proteico en el músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta A (40:18:23), (▨) Dieta B (20:18:23).

Existe un descenso significativo de un 22 % en la relación RNA/DNA para los animales alimentados con la dieta B.

2.1.1.4. Efectos de la administración de una dieta pobre en proteínas sobre la naturaleza del crecimiento del músculo blanco y su relación con el turnover proteico.

El crecimiento del músculo muestra un patrón muy similar al del animal completo (figura 2.1 y 2.2). Animales alimentados con la dieta A se caracteriza por: i) elevadas velocidades de crecimiento, 78 % mayores que la de los animales alimentados con la dieta B (tabla 2.5), reflejado en altos valores en el incremento de peso/día 80 % mayores que los obtenidos con la dieta B. ii) Una velocidad de pérdida de esta capacidad de crecimiento a lo largo del tiempo y en relación al peso del órgano superior aproximadamente en el mismo grado que los cambios descritos anteriormente para los animales alimentados con la dieta A.

Es decir, altas velocidades de crecimiento y de incremento de peso (dieta A) en el músculo coinciden con una velocidad de disminución en la K_G respecto al tiempo y respecto al peso del tejido, bastante mayor que en animales con bajas velocidades de incremento de peso (dieta B).

En estas condiciones de crecimiento, aunque existe un descenso muy importante en la síntesis total de proteínas por órgano completo, disminuyendo casi un 80 %, de 237.28 a 48.32 mgs/día, no se observan cambios significativos ni en el número de núcleos, ni en el tamaño celular (tabla 2.4) aunque los valores obtenidos en animales alimentados con la dieta B sean un 20% inferior a los de la dieta A.

La escasez de proteínas provoca un fuerte descenso en la velocidad específica de crecimiento, del orden del 78 %, y una caída del 76 % en la K_S . No obstante, la eficacia de retención de proteínas sintetizadas (ERP) se

mantiene sin cambios significativos (tabla 2.5).

2.1.1.5. Síntesis proteica y su relación con la concentración de ácidos nucleicos en el músculo blanco de la trucha arco iris alimentadas con diferentes concentraciones de proteína.

Coincidiendo con la caída en los valores de la K_S , encontramos un descenso de un 56 % en los niveles de RNA en el músculo blanco y del 60 % en la razón RNA/DNA (tabla 2.4). La capacidad de síntesis (C_S) del tejido disminuye un 50 %, prácticamente lo mismo que la eficacia de traducción (K_{RNA}). La K_{DNA} desciende más de un 80 %.

2.1.1.6. Efectos de la disminución en el aporte de proteínas dietarias sobre el comportamiento cinético de la SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha.

La disminución en el contenido en proteínas de la dieta, no altera el comportamiento micaeliano de estos enzimas, obteniéndose valores para el coeficiente de Hill muy similares y cercanos a la unidad (tablas 2.5-2.9).

Aunque la actividad TyrAT no se modifica, la SerDH hepática sufre un importante aumento de un 65 % en su V_{max} (tabla 2.6)

2.1.2. Sustitución de proteínas por grasas y recambio proteico tisular.

Para completar el estudio de la influencia de la concentración de proteínas dietarias sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico, a continuación se describe los efectos de la sustitución de parte de esta proteína por grasa o por carbohidratos, obteniéndose en ambos casos diferentes comportamientos.

Tabla 2.4. Efectos de la administración de dietas con diferente concentración de macronutrientes sobre el crecimiento y el contenido de proteínas y ácidos nucleicos en el músculo blanco de trucha arco iris.

	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
Peso inicial (g)	72.10±4.84	85.55±6.42	71.86±0.55	63.04±9.49
Peso final (g)	132.81±8.44	98.40±2.60	138.96±9.89	103.41±4.40
Peso día turnover (g)	121.77±5.31	94.50±2.80	114.80±4.60	92.50±3.60
Incremento peso día (g)	1.25±0.03	0.24±0.03 ^a	1.27±0.01 ^b	0.92±0.05 ^{cd}
mg proteínas/g tejido	173.98±14.70	189.40±11.41	172.24±6.40	148.96±13.96 ^c
mg RNA/g tejido	1.58±0.27	0.86±0.02 ^a	2.28±0.04 ^{ab}	1.25±0.04 ^{cd}
mg DNA/g tejido	0.36±0.04	0.49±0.07	0.35±0.01	0.56±0.14
Síntesis Total (mgs/día)	237.28±63.56	48.32±10.74 ^a	227.39±61.30 ^b	150.19±59.25
[DNA] _{total} ¹	43.84±3.36	46.31±4.01	40.18±1.36	51.80±7.78
mg proteína/mg DNA ²	483.28±0.10	386.53±39.09	492.11±16.36 ^b	266.00±46.01 ^{ad}
mg RNA/mg DNA	4.39±0.14	1.75±0.14 ^a	6.51±0.16 ^{ab}	2.23±0.32 ^{ad}

¹ La concentración de DNA total es un índice del número de núcleos existentes en el tejido, así como la relación ² proteína/DNA es un índice del tamaño celular. Los resultados se expresan como la media de al menos diez valores ± SEM. Las diferencias significativas, P<0.05, se expresan como: ^a Dieta A vs B, C o D, ^b Dieta B vs C, ^c Dieta B vs D, ^d Dieta C vs D.

Tabla 2.5. Influencia del contenido de macronutrientes dietarios sobre las velocidades de recambio proteico y eficacia de retención de proteínas en el músculo blanco de la trucha arco iris.

	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
K _g	1.11±0.05	0.25±0.03 ^a	1.11±0.01 ^b	1.00±0.05 ^c
K _s	1.12±0.30	0.27±0.06 ^a	1.15±0.31 ^b	1.09±0.13 ^c
K _p	0.01±0.002	0.02±0.003 ^a	0.04±0.006 ^{ab}	0.08±0.02 ^{ac}
C _s	9.08±1.15	4.54±0.19 ^a	13.24±0.36 ^{ab}	8.39±0.51 ^{cd}
K _{RNA}	1.23±0.24	0.60±0.08 ^a	0.87±0.13	1.30±0.23 ^c
K _{DNA}	5.46±1.04	1.05±0.19 ^a	5.66±1.08 ^b	2.87±0.93
ERP	98.84±15.46	92.67±15.86	96.79±13.48	92.27±20.51

ABREVIATURAS: K_g, velocidad de acumulación de proteínas; K_s, velocidad de síntesis proteica; K_p, velocidad de degradación de proteínas. Estas tres velocidades se expresan como %/día. C_s, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_s/C_s)x10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA; ERP, eficacia de retención de proteínas: (K_g/K_s)x100. Los resultados son la media ± SEM de al menos seis peces. Las diferencias significativas, P<0.05, se expresan como: ^a Dieta A vs B, C o D, ^b Dieta B vs C, ^c Dieta B vs D, ^d Dieta C vs D.

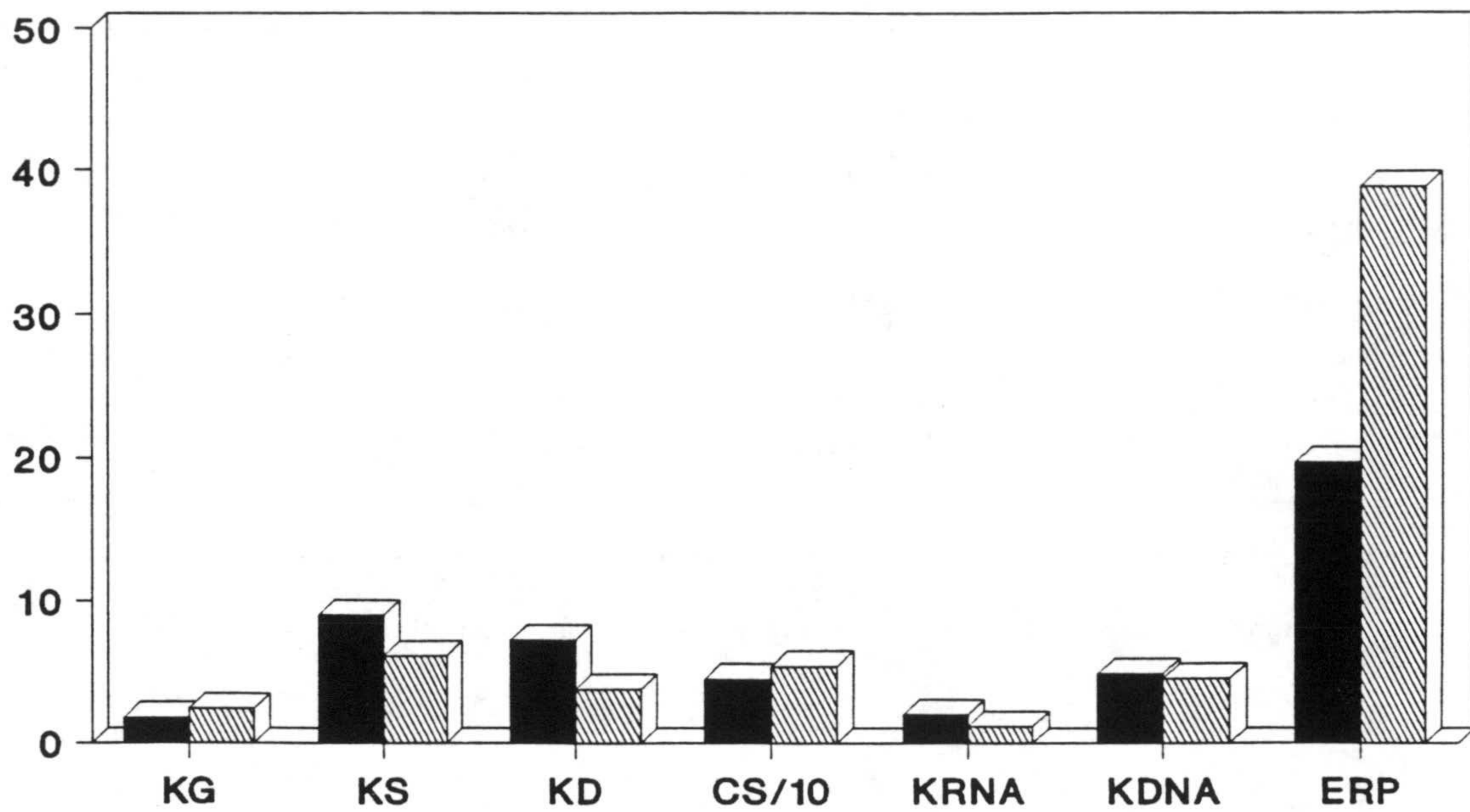


Figura 2.5. Influencia de la sustitución en la dieta de un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas sobre las velocidades de recambio proteico en el hígado de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta B (20:18:23), (▨) Dieta C (40:08:23).

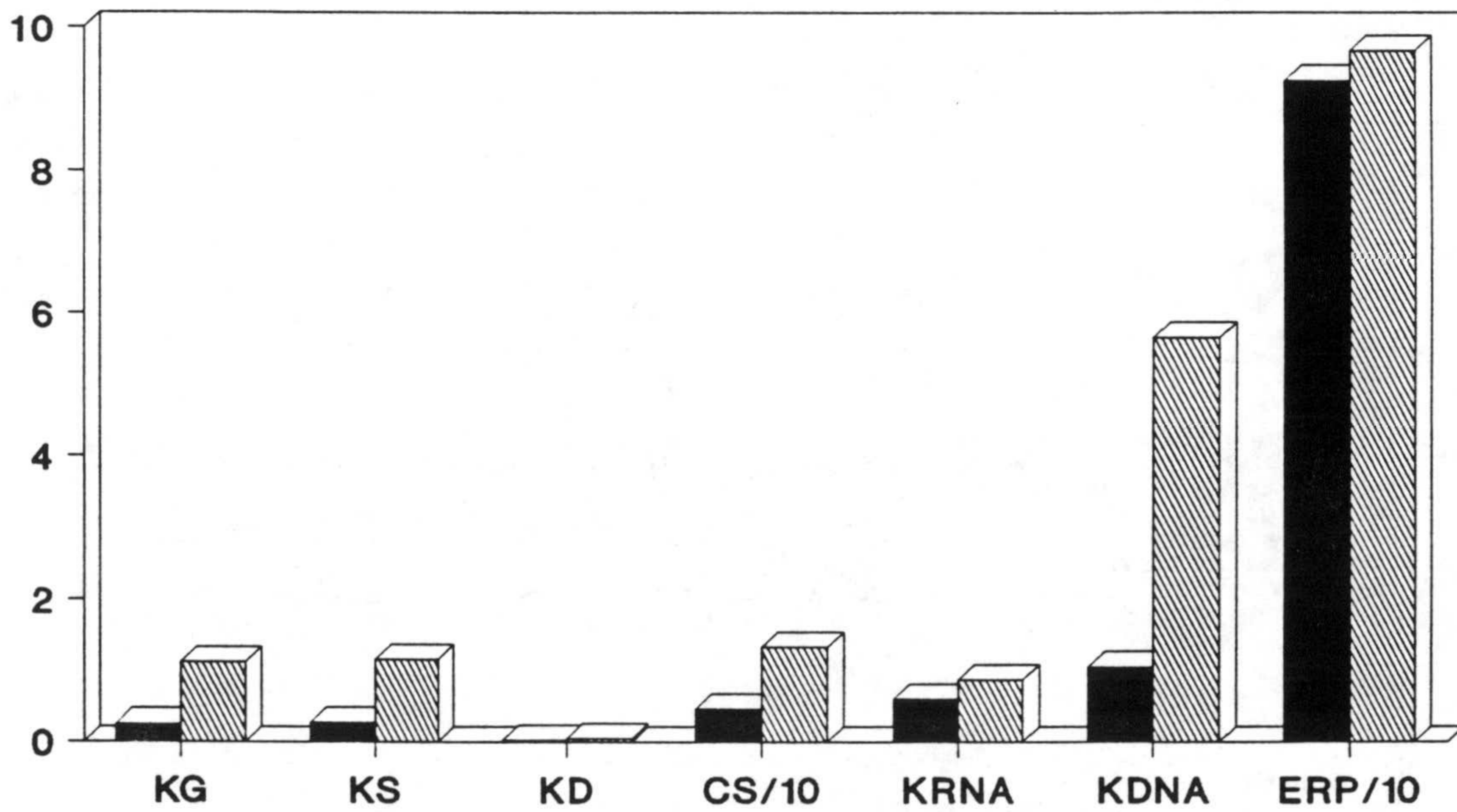


Figura 2.6. Influencia de la sustitución de un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas sobre las velocidades de recambio proteico en el músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta B (20:18:23), (▨) Dieta C (40:08:23).

2.1.2.1. Comportamiento alimenticio y evolución de la velocidad de crecimiento del animal completo, en animales alimentados con dietas en las que se sustituye un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas.

El efecto de la sustitución de un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas se estudia al comparar los resultados obtenidos al administrar las dietas B (20:18:23) y C (40:8:23) a animales de 100 g (tabla 2.1).

Se observa una disminución en el tamaño de la ración ingerida por los animales alimentados con la dieta B de un 14 %, que va a reflejarse en una disminución proporcional en la ingesta de carbohidratos y de energía. Los animales alimentados con la dieta C ingieren un 57 % más de proteínas y un 48 % menos de grasa que los alimentados con la dieta B. Estos últimos presentan un retraso en el crecimiento muy considerable, la K_G del animal completo disminuye un 61 % (tabla 2.1). Existe diferencias significativas en el incremento de peso/día en el animal completo entre animales alimentados con las dos dietas (figura 2.1a), descendiendo un 68 %, desde 1.9 a 0.61 g. Estas diferencias se reflejan cuando se representa la K_G frente al tiempo y frente al peso (figura 2.1.b) coincidiendo nuevamente con altas velocidades de disminución de la K_G al transcurrir el tiempo y a medida que aumenta el peso.

Estas diferencias tan importantes en el crecimiento, se reflejan en un aprovechamiento del alimento muy bajo, casi un 58 % menor para la dieta B. Sin embargo, el de la proteína solo disminuye un 16 %. Es decir que aunque la ingesta de proteínas sea baja, ésta se utiliza bastante eficazmente para crecimiento neto.

2.1.2.2. Turnover proteico y naturaleza del crecimiento hepático.

La sustitución de un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas, se

traduce en una disminución de aproximadamente un 50 % en el incremento medio de peso/día del hígado, lo cual se refleja en la pendiente de las curvas de crecimiento (figura 2.1.a). Paralelamente existe un importante descenso de un 46 % en las pendientes de las rectas de regresión que relacionan el \ln de la K_G y el \ln del tiempo entre las dos situaciones nutricionales. Una disminución de la misma magnitud existe entre el valor del coeficiente A de la relación entre la K_G y el peso (figura 2.2). Paralelamente se encuentra un descenso de un 26 % en la velocidad específica de crecimiento y un descenso casi a la mitad en la eficacia de retención de proteínas por parte de este tejido (tabla 2.3). En esta situación aunque no exista diferencias entre las K_S de animales tratados con ambos tipos de dietas, sí que existe un descenso de un 26 % en la síntesis total (tabla 2.2).

La velocidad fraccionaria de degradación proteica (K_D) aumenta un 48% en los animales alimentados con la dieta B.

Esta situación de degradación en el crecimiento hepático se caracteriza por un fuerte descenso en el número de núcleos del tejido, 32 %, y en el tamaño celular, 26 % (tabla 2.2).

2.1.2.3. Influencia de la sustitución de un 20 % de proteínas por un 10 % de grasas sobre la relación entre la síntesis proteica y el contenido de ácidos nucleicos en el hígado de trucha.

En los animales alimentados con la dieta B, se observa una significativa disminución de un 16 % en la capacidad de síntesis y un considerable incremento de un 75 % en la K_{RNA} siendo el resultado final, una velocidad de síntesis similar a la de animales alimentados con la dieta C (tabla 2.3). Al comparar los contenidos de ácidos nucleicos y proteínas entre las dos situaciones, solo se observa una caída en la concentración de DNA de un 34 % para la dieta C y por consiguiente, un importante descenso en el

Tabla 2.6. Comportamiento cinético de la serina deshidratasa de hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometida a diferentes condiciones dietarias.

[Serina] (M)	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
0.005	0.174±0.018 ¹	0.119±0.005	0.106±0.017	0.232±0.024
0.01	0.258±0.045	0.178±0.013	0.198±0.039	0.313±0.016
0.025	0.397±0.084	0.398±0.035	0.483±0.053	0.405±0.031
0.05	0.581±0.068	0.702±0.048	0.632±0.019	0.633±0.068
0.1	0.900±0.118	1.131±0.122	0.826±0.084	0.833±0.068
0.25	1.204±0.092	1.697±0.208	1.145±0.069	1.114±0.147
0.5	1.366±0.097	2.118±0.277	1.308±0.172	1.379±0.178
5	1.532±0.109	2.446±0.131	1.425±0.187	1.427±0.184
Km ^{1,2}	73.57±8.69	125.03±10.65 ^a	64.03±7.71 ^b	63.15±6.39 ^c
Vmax ^{1,2}	1.557±0.19	2.538±0.219 ^a	1.447±0.179 ^b	1.455±0.14 ^c
V _{0.025} /Vmax	0.255±0.03	0.157±0.013 ^a	0.334±0.042 ^b	0.278±0.03 ^c
h ⁴	0.934±0.111	0.937±0.080	1.058±0.125	0.880±0.10

¹ La actividad específica y la Vmax se expresan en mU/mg proteína, la Km en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos. Las diferencias significativas se representan como ^a P<0.05 cuando se compara entre la Dieta A y B, A y C o A y D; ^b P<0.05 al comparar entre la Dieta B y C; ^c P<0.05 al comparar entre la Dieta B y D.

⁴ h=Coficiente de Hill.

Tabla 2.7. Comportamiento cinético de la serina deshidratasa de músculo blanco de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometida a diferentes condiciones dietarias.

[Serina] (M)	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
0.0001	0.042±0.005 ¹	0.027±0.005	0.022±0.004	0.012±0.007
0.0005	0.068±0.030	0.070±0.005	0.063±0.009	0.022±0.005
0.001	0.073±0.014	0.093±0.019	0.079±0.011	0.030±0.003
0.01	0.099±0.016	0.119±0.018	0.090±0.008	0.035±0.007
0.25	0.140±0.003	0.122±0.012	0.125±0.023	0.048±0.008
Km ^{1,2}	0.459±0.086	0.357±0.051	0.413±0.061	0.407±0.104
Vmax ^{1,2}	0.120±0.022	0.123±0.017	0.111±0.016	0.043±0.011 ^{abcd}
V _{0.001} /Vmax	0.350±0.065	0.219±0.031	0.198±0.029	0.279±0.071
h ⁴	0.464±0.087	0.786±0.112	0.601±0.089	0.529±0.135

¹ La actividad específica y la Vmax se expresan en mU/mg proteína, la Km en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos. Las diferencias significativas se representan como ^a P<0.05 cuando se compara entre la Dieta A y B, A y C o A y D; ^b P<0.05 al comparar entre la Dieta B y C; ^c P<0.05 al comparar entre la Dieta B y D.

⁴ h=Coficiente de Hill.

Tabla 2.8. Comportamiento cinético de la tirosina aminotransferasa de hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometida a diferentes condiciones dietarias.

[Tyrosina] (mM)	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
0.05	0.60±0.16 ¹	0.97±0.28	0.55±0.24	1.49±0.22
0.50	4.98±0.39	5.10±0.99	6.12±1.02	14.90±1.50
1.25	10.11±0.16	10.91±0.42	12.33±1.49	29.25±2.32
2.50	14.43±0.48	16.83±0.77	18.95±1.80	40.14±3.83
3.75	16.88±0.48	19.81±0.58	22.65±2.34	45.59±4.70
6.75	19.63±0.70	24.08±0.91	26.86±2.24	51.46±5.01
67.5	24.58±0.88	32.20±1.22	36.83±3.07	67.50±6.57
Km ^{1,2}	1.891±0.147	2.566±0.247 ^a	2.600±0.404	1.793±0.185 ^c
Vmax ^{1,2}	25.26±1.96	33.41±3.21	38.16±5.94 ^a	68.26±7.03 ^{ac}
V _{0.5} /Vmax	0.20±0.01	0.15±0.01 ^a	0.16±0.02	0.22±0.02 ^c
h ⁴	1.01±0.08	0.95±0.91	1.04±0.16	1.12±0.10

¹ La actividad específica y la Vmax se expresan en mU/mg proteína, la Km en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos. Las diferencias significativas se representan como ^a P<0.05 cuando se compara entre la Dieta A y B, A y C o A y D; ^b P<0.05 al comparar entre la Dieta B y C; ^c P<0.05 al comparar entre la Dieta B y D.

⁴ h=Coficiente de Hill.

Tabla 2.9. Comportamiento cinético de la tirosina aminotransferasa de músculo blanco de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometida a diferentes condiciones dietarias.

[Tyrosina] (mM)	Dieta A (40/18/23)	Dieta B (20/18/23)	Dieta C (40/8/23)	Dieta D (40/18/0)
0.10	0.13±0.02 ¹	0.07±0.01	0.57±0.21	0.46±0.12
1.25	1.06±0.19	0.52±0.11	0.88±0.31	0.69±0.13
2.50	1.56±0.22	0.73±0.22	1.83±0.60	1.10±0.19
3.75	1.72±0.14	0.82±0.17	2.46±0.63	1.29±0.22
6.25	2.05±0.26	0.96±0.21	2.51±0.82	1.54±0.10
25	2.50±0.32	1.13±0.25	3.00±0.98	1.80±0.31
Km ^{1,2}	1.91±0.26	1.64±0.22	2.14±0.66	2.01±0.34
Vmax ^{1,2}	2.68±0.36	1.20±0.26	3.34±1.08	1.97±0.34
V _{1.25} /Vmax	0.39±0.05	0.43±0.09	0.26±0.09	0.35±0.06
h ⁴	1.01±0.14	1.01±0.13	0.73±0.32	0.66±0.17

¹ La actividad específica y la Vmax se expresan en U/mg proteína, la Km en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM, de al menos seis experimentos. Las diferencias significativas se representan como ^a P<0.05 cuando se compara entre la Dieta A y B, A y C o A y D; ^b P<0.05 al comparar entre la Dieta B y C; ^c P<0.05 al comparar entre la Dieta B y D.

⁴ h=Coficiente de Hill.

cociente RNA/DNA de un 63 % respecto al de la dieta B. El crecimiento del tejido y el incremento en el tamaño celular elevado, puede ser el responsable de estos bajos valores en la concentración de DNA en estos animales.

La cantidad de proteína sintetizada por unidad celular permanece constante en las dos situaciones.

2.1.2.4. Turnover proteico y naturaleza del crecimiento muscular.

Al igual que para el crecimiento hepático, en este apartado nos encontramos con las diferencias más extremas entre dietas en cuanto a los valores del crecimiento obtenido en todos los experimentos. Es decir, la dieta C, se caracteriza por i) el mayor incremento de peso muscular a lo largo del experimento, 1.27 g, ii) el mayor valor para el coeficiente A cuando se compara la K_G frente al peso del músculo, 130,3, iii) la mayor pendiente y el valor más alto del coeficiente A cuando se compara la K_G frente al tiempo, -0.15 y 0.62 (figuras 2.1 y 2.2).

Es decir, estamos en una situación de un crecimiento óptimamente estimulado.

El crecimiento en los animales alimentados con la dieta B se caracteriza justamente por lo contrario: i) incremento de peso casi nulo, 0.24, ii) coeficiente A en la relación KG/W muy pequeño, 25.39, iii) como consecuencia disminuye en la K_G frente al tiempo también muy pequeño, -0.04.

En esta situación antagónica, la velocidad de crecimiento (K_G) desciende un 77 %, la K_S un 75 % (tabla 2.5) mientras que la eficacia de retención de proteínas sintetizada se mantiene en unos niveles muy semejantes. El descenso en la síntesis proteica total de un 79 %, se correlaciona con una disminución de un 23 % en el tamaño celular, mientras que el número de núcleos no cambia significativamente (tabla 2.5).

2.1.2.4. Síntesis proteica y su relación con el contenido de ácidos nucleicos.

El descenso en la velocidad fraccionaria de síntesis (K_s) y en la síntesis total observado para la dieta B, se correlaciona con un importante caída en la concentración de RNA tisular (62 %), responsable de una disminución de un 66% en el valor de la capacidad de síntesis. La eficacia de traducción no sufre modificaciones importantes. Sin embargo, la relación RNA/DNA desciende también casi un 74 %. La cantidad de proteínas sintetizada por unidad celular en los animales alimentados con la dieta B es el 14 % de la sintetizada en animales alimentados con la dieta C (tabla 2.5).

2.1.2.5. Actividad SerDH y TyrAT de hígado y músculo blanco de trucha arco iris.

Los tratamientos ensayados solo afectan a la actividad SerDH hepática, que se ve potenciada en los animales alimentados con la dieta B, incrementando esta un 78 % del valor obtenido en la dieta C (tabla 2.6).

El valor del coeficiente de Hill (h) para las dos actividades enzimáticas en los dos tejidos se mantiene muy próximo a 1.

2.1.3. Sustitución de proteínas por carbohidratos.

2.1.3.1. Crecimiento y alimentación.

Para estudiar el efecto de la sustitución de proteínas por carbohidratos dietarios, se compararon los efectos que producen dos dietas, una 20:18:23 (B) y otra 40:18:0 (D) sobre la capacidad de crecimiento y turnover proteico. Se ha incrementado un 20 % la proteína y se ha eliminado los carbohidratos digestibles. Aunque ambas dietas sean isocalóricas, difieren en cuanto a la

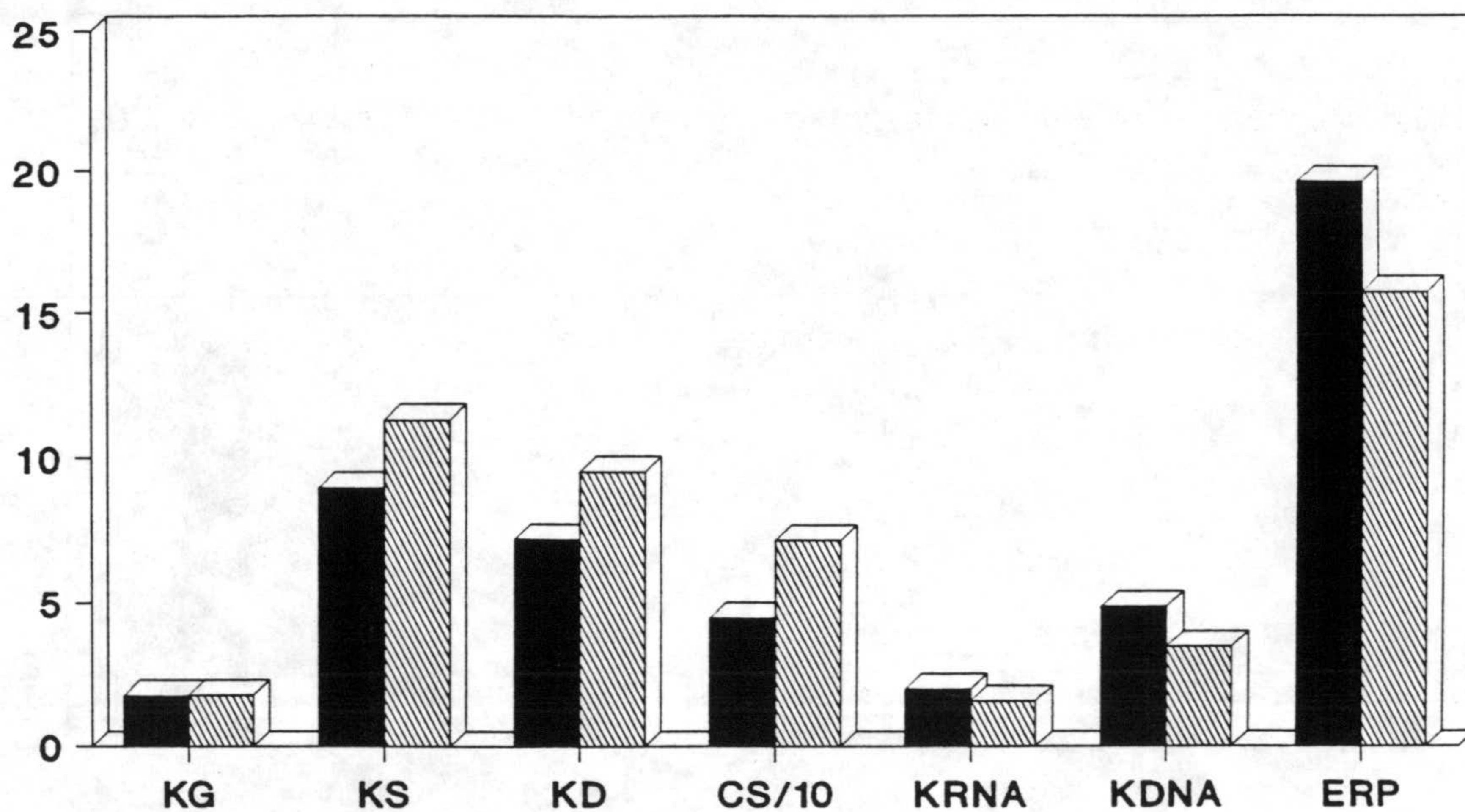


Figura 2.7. Influencia de la sustitución en la dieta de un 20 % de proteínas por un 23 % de carbohidratos sobre las velocidades de recambio proteico en el hígado de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta B (20:18:23), (▨) Dieta D (40:18:00).

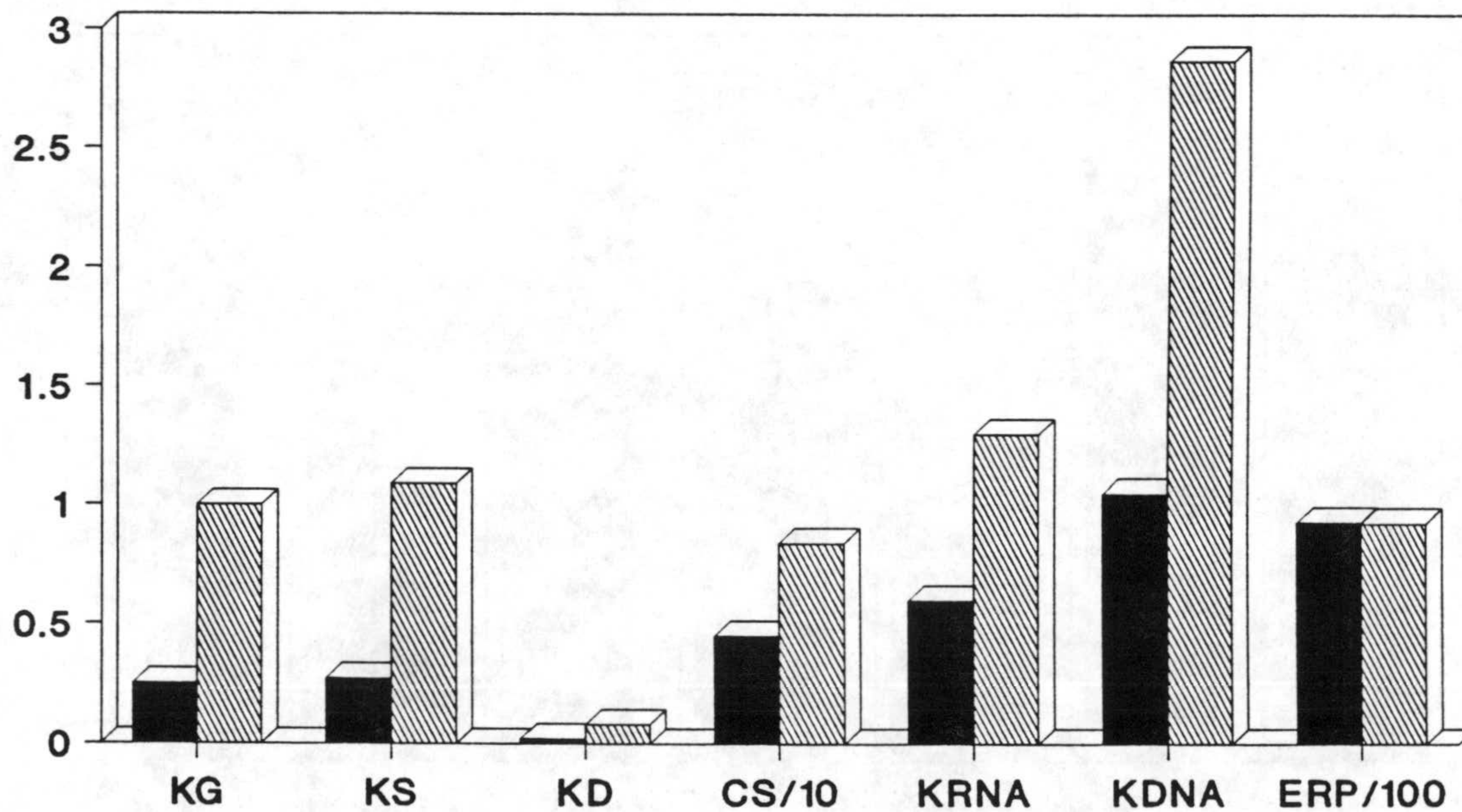


Figura 2.8. Influencia de la sustitución en la dieta de un 20 % de proteínas por un 23 % de carbohidratos sobre las velocidades de recambio proteico en el músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta B (20:18:23), (▨) Dieta D (40:18:00).

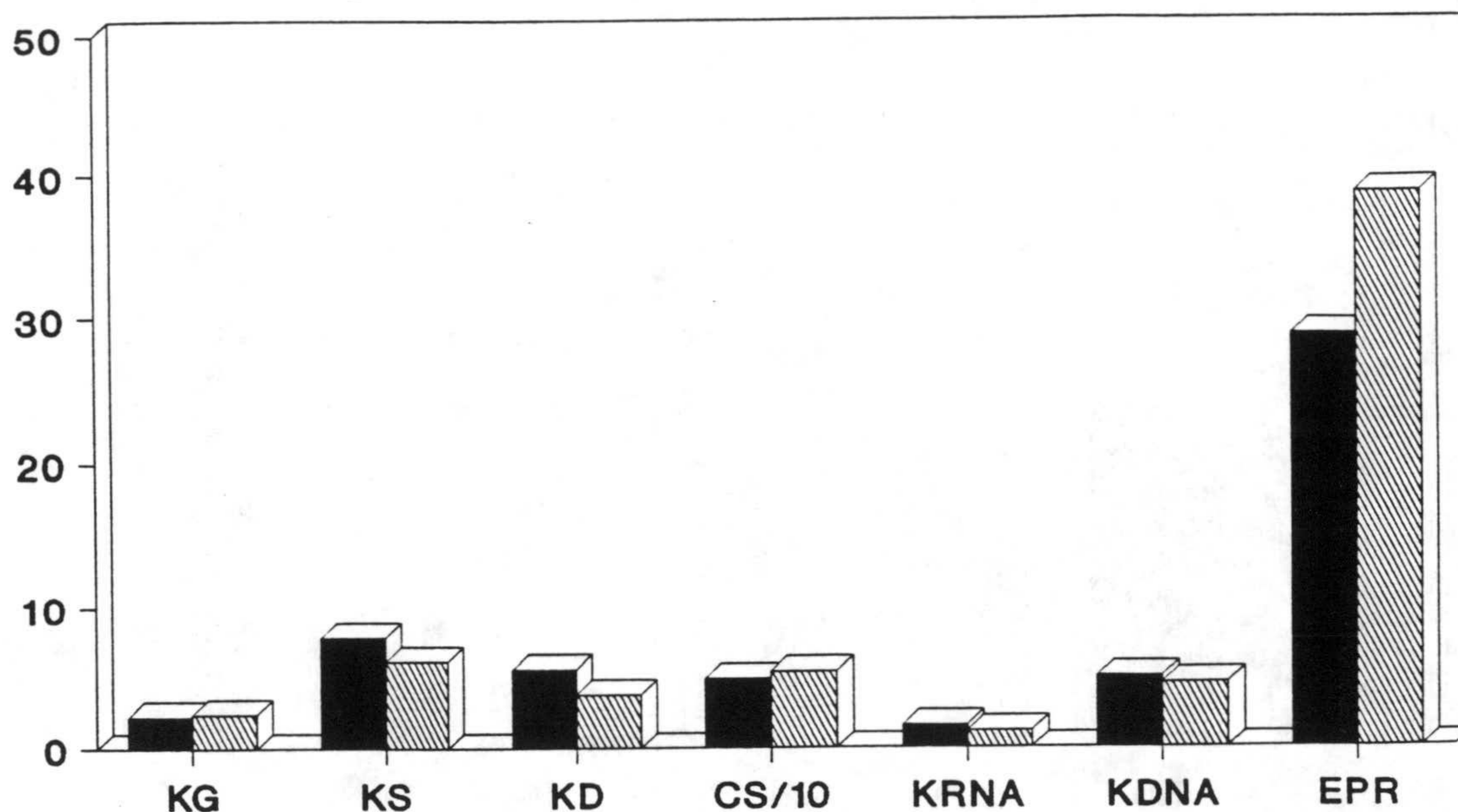


Figura 2.9. Efectos de la disminución en el aporte de grasas dietarias sobre las velocidades de turnover proteico en el hígado de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta A (40:18:23), (▨) Dieta C (40:08:23).

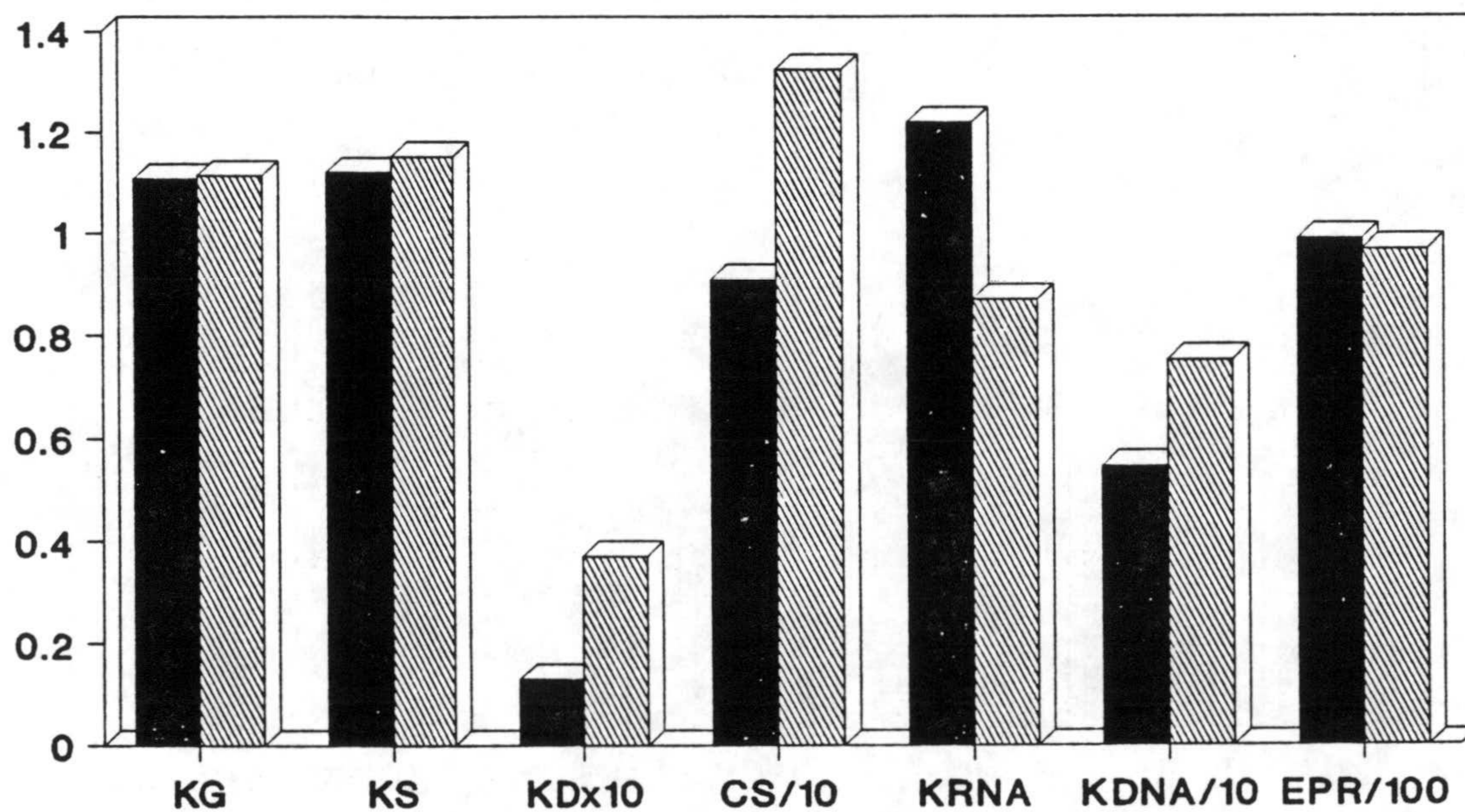


Figura 2.10. Efectos de la disminución en el aporte de grasas dietarias sobre las velocidades de turnover proteico en el músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta A (40:18:23), (▨) Dieta C (40:08:23).

relación proteína/energía y energía proteica/energía no proteica. El comportamiento alimenticio de los animales sometidos a ambos tratamientos se caracteriza por:

i) Una disminución de un trece por ciento en la ingesta de los animales alimentados con la dieta B que se traduce lógicamente en un descenso en la ingesta energética de aproximadamente el mismo orden.

ii) Aunque la ingesta proteica disminuye un 56 % en los animales alimentados con la dieta B, los que comieron la dieta D no ingirieron carbohidratos alguno.

iii) Mientras que el índice de aprovechamiento del alimento es 0.76 para la dieta D, para la B es 0.38, un 50 % menor.

iv) La eficacia de aprovechamiento de la proteína es muy similar para ambas situaciones (tabla 2.1).

La K_G del animal completo es más de dos veces mayor que la de los animales alimentados con la dieta B.

Tanto en el animal completo como en el músculo, la dieta con un 40 % de proteína es la responsable de i) un importante incremento de peso/día un 57 % mayor en el animal entero y un 74 % en el músculo. ii) Las pendientes negativas de la relación entre la K_G y el tiempo son mayores para los animales de la dieta D. iii) De la misma forma que el valor del coeficiente A es tres veces mayor en los animales que se alimentan con la dieta D, cuando se comparan la K_G y el peso del órgano (figura 2.1 y 2.2).

2.1.3.2. Naturaleza del crecimiento hepático y turnover proteico.

Ambas situaciones nutritivas se caracterizan por ser claramente deficientes en algun macronutriente necesario para producir un crecimiento óptimo. Mientras que para los animales alimentados con la dieta B es la carencia de proteínas, para los alimentados con la dieta D la carencia de

carbohidratos parece ser la responsable de que en el hígado, el incremento de peso sea mínimo (0.028 g/día), incluso menor que el obtenido para animales con una deficiencia proteica (0.046 g/día). Las velocidades de disminución de la K_G respecto al tiempo y al peso son las más pequeñas (figura 2.2).

Es de particular interés que al comparar ambas situaciones nutricionales, se observa que mientras desciende el número de núcleos en los animales alimentados con la dieta B un 33 %, el tamaño celular desciende en las alimentadas con la dieta D un 43 % (tabla 2.2). Aunque entre ambas no existen diferencias significativas en cuanto a los valores de K_G y ERP. Se observa una tendencia al incremento en los valores de la K_S de un 20 %, y de la de la K_D , un 24 %, que la variabilidad experimental se encarga de no hacerlos significativamente distintos.

2.1.3.3. Turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.

Coincidiendo con la situación nutricional en la que se observa un menor crecimiento hepático, junto a las velocidades de síntesis y degradación mas elevadas se muestra que además de sufrir un significativo incremento, de un 26 %, la concentración de proteínas del hígado de animales alimentados con la dieta D igualmente incrementa la concentración de RNA un 54 %, la de DNA, un 58 %, manteniendose sin cambios la relación RNA/DNA (tabla 2.2).

La C_S es un 38 % mayor en estos animales mientras que la K_{RNA} y la K_{DNA} se mantiene sin variaciones importantes.

2.1.3.4. Crecimiento muscular y turnover proteico.

El comportamiento en el músculo blanco es radicalmente distinto,

mientras que el incremento de peso es muy superior en animales alimentados con la dieta D, casi cuatro veces, estas importantes diferencias se mantienen en las pendientes de las rectas que relacionan la K_G con el tiempo y en el valor del coeficiente A de la relación entre la K_G y el peso (figura 2.1 y 2.2). Coincidiendo con este comportamiento, encontramos diferencias significativamente importantes en cuanto a la K_S y la K_G , que disminuye un 75 % en animales alimentados con la dieta B, aunque la eficacia de retención de proteínas no sufra cambios importantes. Tampoco existen variaciones ni en el número de núcleos ni en el tamaño celular (tabla 2.4).

2.1.3.5. Turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.

Este importante descenso en la velocidad fraccionaria de síntesis coincide con una disminución casi a la mitad en el valor de la C_S que pasa desde 8.42 para la dieta D hasta 4.52 para la B. También podemos encontrar un significativo descenso (31 %) en la concentración de RNA en el tejido (tabla 2.4). La eficacia de traducción (K_{RNA}) disminuye un 53 % para animales alimentados con la dieta B.

2.1.3.6. Actividad SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha arco iris alimentadas con las dietas B y D.

Además del efecto ya descrito para los animales alimentados con la dieta B en la actividad SerDH hepática que se encuentra claramente potenciada en el mismo tejido es de destacar el importante incremento, más del doble, observado en la actividad TyrAT de animales alimentados con la dieta D (tabla 2.8).

El valor del coeficiente de Hill se mantiene en torno a 1.

En el músculo blanco no se observan cambios en la actividad TyrAT

y los cambios observados en la SerDH son fruto quizás del bajo valor de actividad enzimática encontrado en este tejido.

2.2. Efectos de la modificación del contenido dietario de grasa sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico en diferentes tejidos de trucha arco iris.

2.2.1. Efectos de la disminución en un 10 % de la concentración de grasa en la dieta sobre la capacidad de crecimiento y turnover proteico.

2.2.1.1. Ingesta y crecimiento en el animal completo.

Para analizar estos efectos se preparan las dietas A y C cuya composición fué 40:18:23 y 40:8:23 respectivamente.

En los animales alimentados con la dieta C existe además de las diferencias en la ingesta energética, una importante disminución en la cantidad de grasa ingerida, del orden del 55 % con respecto a los alimentados con la dieta A. Sin embargo, se mantiene sin variaciones apreciables las ingestas de los carbohidratos y proteínas nutrientes ya que el porcentaje de dieta ingerida no varía para ambas situaciones experimentales. Mientras que no se observan diferencias significativas en los valores de K_G para el animal completo, el incremento medio de peso/día, disminuye solo un 6 % (tabla 2.1) para los animales alimentados con la dieta C.

La evolución del peso, a lo largo del experimento, para el animal completo muestra un patrón muy similar en las dos dietas siendo en ambos casos las pendientes de las curvas muy similares entre sí (figura 2.1).

Esta equidad en la ingesta total y proteica, así como en el incremento del peso es la responsable de que tanto el aprovechamiento del alimento como el de las proteínas en ambas condiciones dietarias sean idénticas (tabla

2.1).

Paralelamente, pocos son los cambios observados en el valor de las pendientes de la curva de regresión logarítmica que relacionan la K_G con el tiempo y el peso de cada sistema, mostrando valores muy semejantes al comparar las dos situaciones. No obstante es de destacar que en todos los casos aunque no sean significativamente demostrable, los valores más altos son para la dieta C.

2.2.1.2. Naturaleza del crecimiento hepático y turnover proteico.

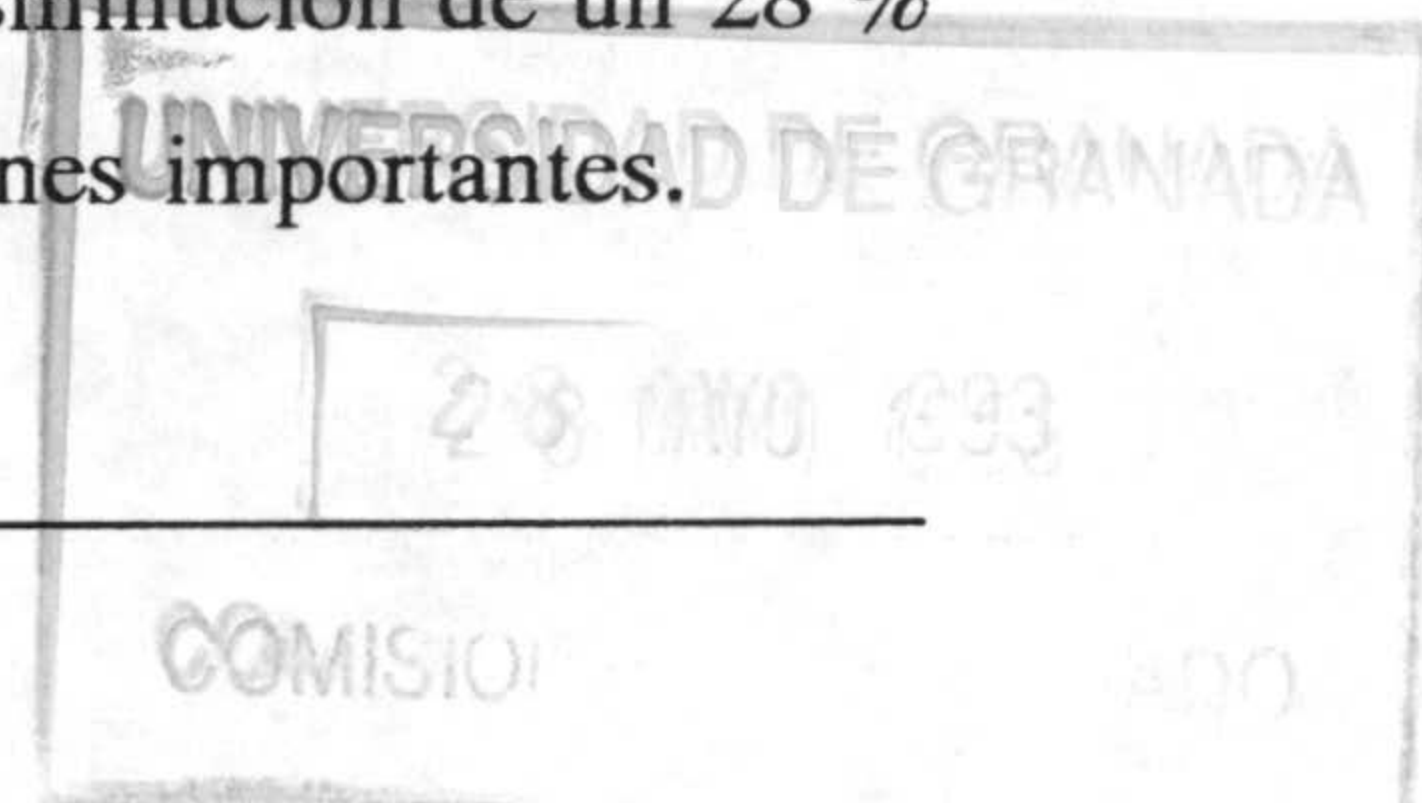
En resumen, la disminución de un 10 % en la concentración de grasa dietaria no se traduce en una pérdida o disminución de la capacidad de crecimiento de ninguno de los sistemas estudiados, más bien en el hígado es al contrario, incluso una elevación en el incremento medio peso/día con respecto a la dieta A (tabla 2.2, figura 2.2).

En el hígado de animales alimentados con una dieta con un 10 % menos de grasa, se observa que ni el número de núcleos, ni el tamaño celular sufren alteraciones importantes (tabla 2.3).

En el hígado, las velocidades de turnover proteico (K_S, K_D) disminuyen ambas, dando como resultado una K_G sin modificaciones importantes. Hay una mayor eficacia de retención de proteínas hepáticas en animales alimentados con dieta C incrementando la ERP aproximadamente un 30 % respecto a la dieta A, que está de acuerdo con el comportamiento descrito para el incremento medio de peso/día en este órgano (Figura 5a).

2.2.1.3. Concentración de ácidos nucleicos y turnover proteico.

El responsable de esta caída en la K_S , es la disminución de un 28 % en la K_{RNA} , ya que la C_S se mantiene sin modificaciones importantes.



Aunque se observa un incremento de un 26 % en la concentración de RNA por unidad celular para la dieta C (tabla 2.2), la cantidad de proteínas sintetizadas por unidad celular (K_{DNA}) (tabla 2.3) no sufre cambio alguno.

2.2.1.4. Naturaleza del crecimiento muscular y recambio de proteínas.

El crecimiento en el músculo sigue un patrón muy similar a lo que le ocurre al animal entero. Prácticamente no se observan diferencias entre ambos tratamientos, ni en cuanto al incremento de peso, K_G , ni evolución de esta frente al tiempo y peso (figura 2.1 y 2.2).

En el músculo blanco, tanto el tamaño como el número de unidades celulares se mantienen sin cambios significativos,

De la misma manera, en el músculo, no se observan alteraciones importantes en ninguna de las velocidades de turnover determinadas siendo la mínima diferencia numérica encontradas posiblemente producto de la variabilidad experimental.

2.2.1.5. Turnover proteico y relación con la concentración de ácidos nucleicos.

En animales alimentados con la dieta C, la cantidad de RNA aumenta tanto por unidad de DNA como por unidad de proteína (C_S) un 33 y un 31 % respectivamente (tabla 2.4 y 2.5).

La K_{RNA} y la K_{DNA} no sufre cambios importantes al comparar los resultados para ambos tratamientos (tabla 2.5).

2.2.1.6. Actividades SerDH y TyrAT de hígado y músculo.

Igualmente se determinó el efecto de la variación en la concentración de sustrato sobre la actividad específica de la serina deshidratasa y la tirosina amino transferasa de hígado y músculo de animales tratados con dieta A y C (tablas 2.6-2.9).

2.2.2. Sustitución de grasas por carbohidratos.

Se ha estudiado la influencia de la sustitución de un 10 % de grasa por un 23 % de carbohidratos de la dieta sobre las capacidades de crecimiento y turnover proteico de la trucha arco iris. Para ello, se ha utilizado las dietas C (40:18:23) y D (40:18:0), entre las que solo varía la proporción relativa de grasas y carbohidratos, ya que además de ser isocalóricas, tienen la misma concentración de proteína y la misma relación P/E y EP/ENP.

2.2.2.1. Comportamiento alimenticio y crecimiento en el animal completo.

Los animales alimentados con la dieta D presentan un crecimiento menor que los de la dieta C. El incremento de peso por día es aproximadamente un 25 % menor para el animal completo.

Mientras que la ingesta proteica y energética se mantiene sin cambios importantes, los animales alimentados con la dieta D ingieren un 55 % más de grasa que los de la dieta C, aunque su ingesta de carbohidratos sea totalmente nula.

El aprovechamiento en crecimiento de la dieta y de la proteína es un 16 % mayor para los animales alimentados con la dieta C.

2.2.2.2. Crecimiento hepático y turnover proteico.

El principal efecto de la sustitución de los carbohidratos por grasas sobre el crecimiento, se observa en el hígado, donde la carencia de ingesta de carbohidratos es la responsable de que el incremento de peso/día descienda un 70 %, de 0.097 hasta 0.028 para la dieta D. Paralelamente al comparar los resultados entre ambas situaciones, tanto la disminución en la K_G respecto al tiempo como respecto al peso, muestra los valores más extremos; coincidiendo para la dieta C, los mayores incrementos de peso/día con los descensos más rápidos en la K_G . Los animales alimentados con la dieta D se comportan justamente al contrario que éstos.

En esta situación, aunque no se observa cambios significativos entre las K_G , si que disminuye más de la mitad la ERP (tabla 2.3). Mientras que el número de núcleos no sufre cambios importantes, el tamaño celular desciende un 58 % para animales alimentados con la dieta D.

La situación nutricional caracterizada por un crecimiento menor (dieta D) se caracteriza por un incremento de 2.5 veces en la velocidad de degradación y un 55 % en la K_S (tabla 2.3), índice todo ello de un elevado metabolismo proteico encauzado hacia la degradación de las proteínas tisulares para la formación de la glucosa no ingerida.

2.2.2.3. Concentración de ácidos nucleicos y turnover proteico.

Coincidiendo con este incremento en la K_S para la dieta D, se observa una importante subida en la C_S de un 25 %, resultado del incremento de un 50 % en la concentración de RNA tisular (tabla 2.2). Mientras tanto, la K_{RNA} y la K_{DNA} no sufren ningún cambio.

La concentración de DNA es 3.6 veces mayor en los animales alimentados con la dieta D. La relación RNA/DNA desciende un 45 % para

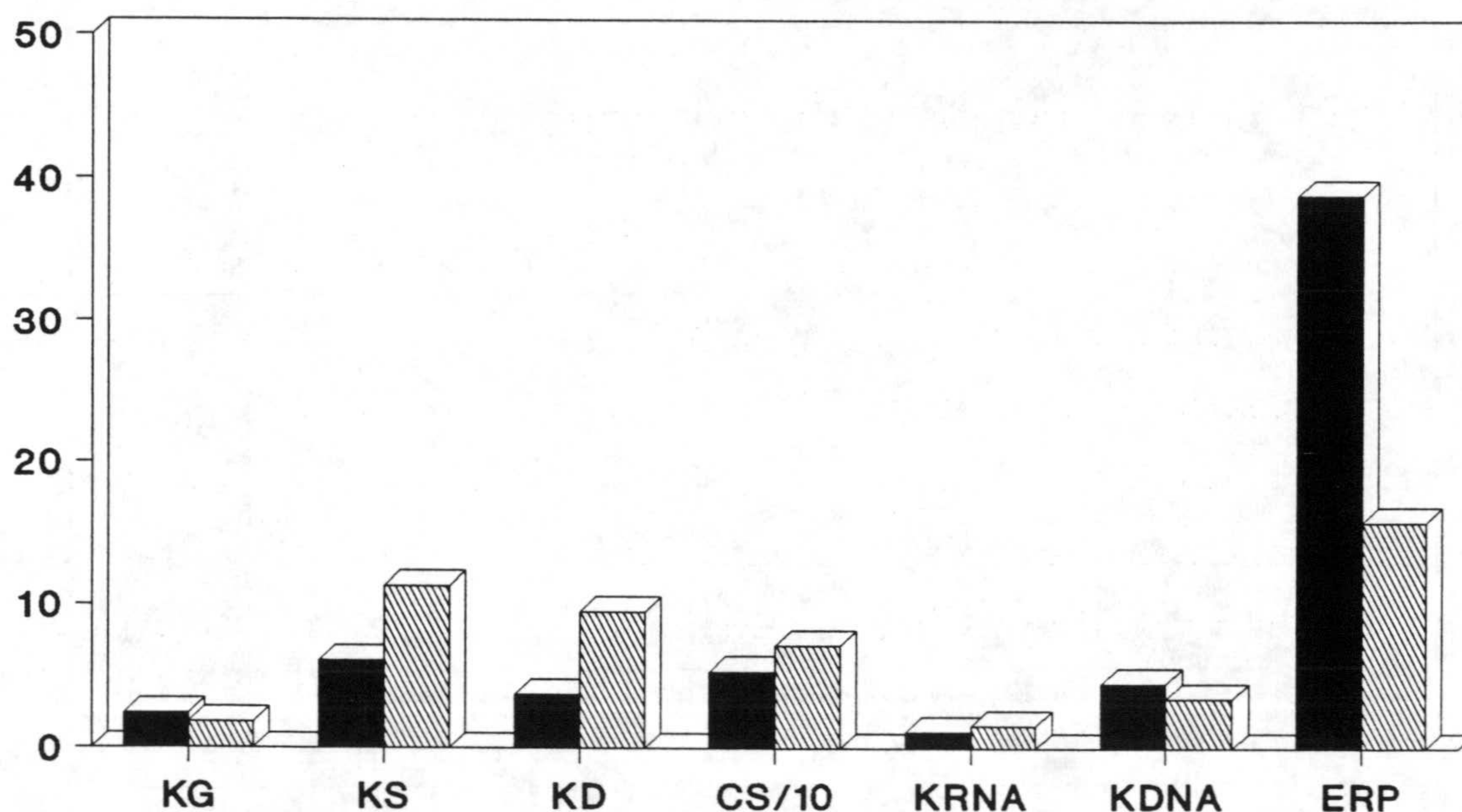


Figura 2.11. Influencia de la sustitución en la dieta de un 10 % de grasas por un 23 % de carbohidratos sobre las velocidades de recambio proteico en el hígado de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta C (40:08:23), (▨) Dieta D (40:18:00).

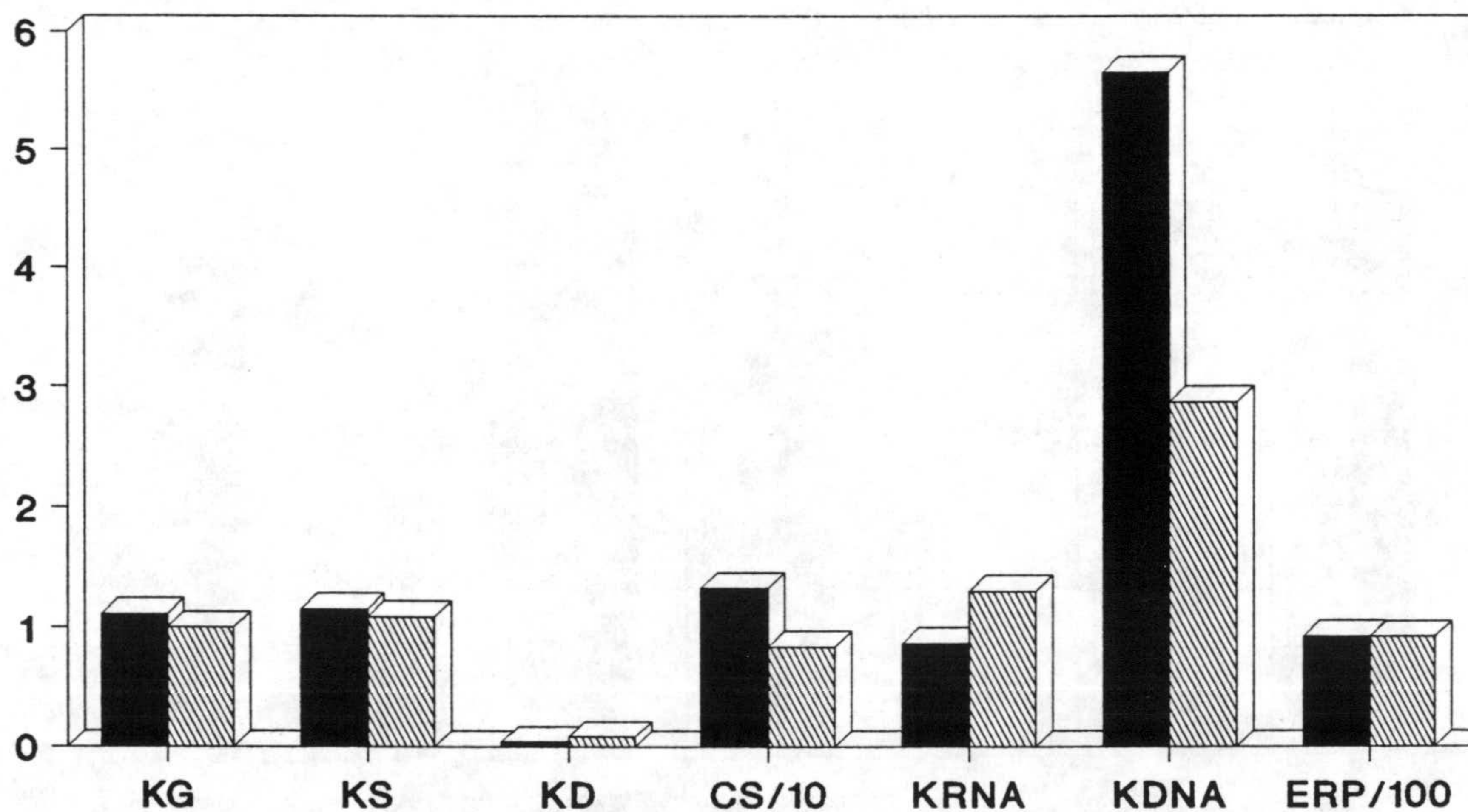


Figura 2.12. Influencia de la sustitución en la dieta de un 10 % de grasas por un 23 % de carbohidratos sobre las velocidades de recambio proteico en el músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta C (40:08:23), (▨) Dieta D (40:18:00).

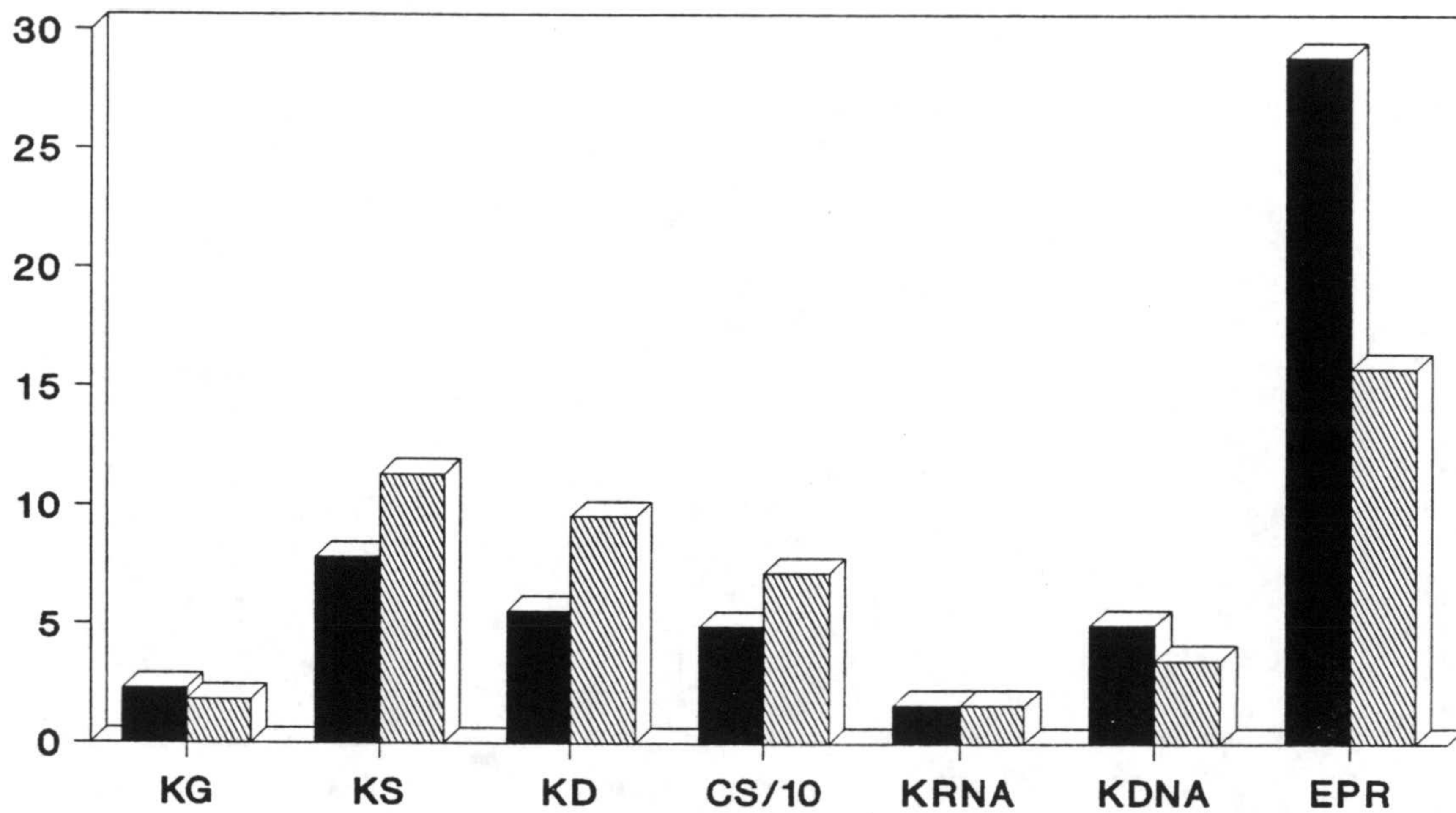


Figura 2.13. Efectos de la disminución en el aporte de carbohidratos dietarios sobre las velocidades de turnover proteico en el hígado de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta A (40:18:23), (▨) Dieta D (40:18:00).

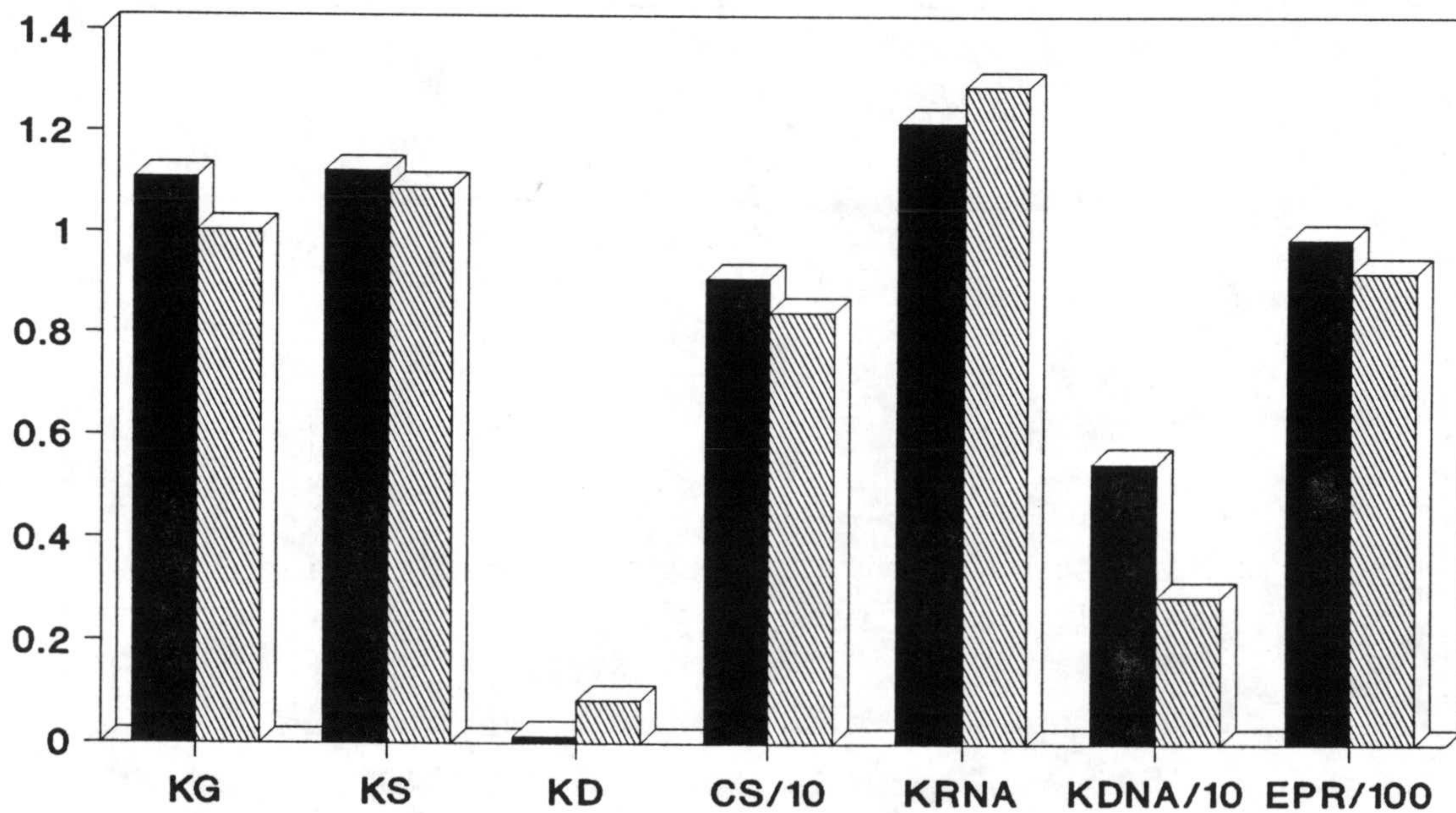


Figura 2.14. Efectos de la disminución en el aporte de carbohidratos dietarios sobre las velocidades de turnover proteico en el músculo blanco de la trucha arco iris (*O. mykiss*). (■) Dieta A (40:18:23), (▨) Dieta D (40:18:00).

los animales alimentados con la dieta D.

2.2.2.4. Crecimiento muscular y turnover proteico.

Los cambios en la proporción relativa de carbohidratos y grasas afectan en menor medida al turnover de proteínas musculares, no encontrando cambios significativos ni en la K_G ni en la K_S entre ambos tratamientos. El descenso en los incrementos de peso se correlaciona con una caída en el tamaño celular de un 47 %, manteniéndose sin cambios el número de células y la cantidad total de proteínas sintetizadas.

Aunque no existen cambios en la K_S , la C_S desciende un 36 %. La concentración de RNA y la relación RNA/DNA igualmente desciende significativamente en los animales alimentados con la dieta D. La cantidad de proteína sintetizada por unidad celular así como la eficacia de traducción no varían al comparar entre las dos dietas.

2.2.2.5. Actividades SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha arco iris (*O. mykiss*).

En estas condiciones experimentales, solo la actividad SerDfH de músculo blanco se modula por cambios en la concentración de grasas y carbohidratos, disminuyendo la V_{max} un 61 % para los animales alimentados con la dieta D. Esta disminución se produce a lo largo de toda la curva de saturación del enzima por el sustrato, de ahí que ni la K_m ni la relación $V_{subsaturante}/V_{max}$ no sufre cambios importantes.

2.3. Efecto de la eliminación de los carbohidratos dietarios sobre las capacidades de crecimiento y turnover proteico en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris.

2.3.1. Crecimiento del animal completo y comportamiento alimenticio.

El comportamiento alimenticio de los animales tratados con una dieta 40:18:0 frente a los tratados con una dieta 40:18:23, se caracteriza además de la nula ingestión de carbohidratos, la disminución en un 21 % de la energía ingerida por pez/día (tabla 2.1). El tamaño de las ingestas de dieta, proteína y grasa no sufre variaciones significativamente apreciables (tabla 2.1).

Como consecuencia de esto, el incremento medio de peso/día, sufre un descenso considerable (32 %) que no se traduce en diferencias significativas en los valores de la K_G del animal completo (tabla 2.1). No obstante el incremento de peso/día a lo largo del experimento comparando las dos situaciones, muestra diferencias muy importantes. La eliminación total de los carbohidratos en la dieta se traduce en un descenso del 33 % en la capacidad de crecimiento del animal completo. Como consecuencia de la estrecha relación entre K_G y peso, se entiende que paralelamente velocidades altas de crecimiento coincidan con velocidades mayores de pérdida de esta capacidad de crecimiento a través del tiempo y viceversa (figura 2.1b y 2.2).

Como consecuencia de esto, la eficacia de aprovechamiento de esta dieta es un 21 % menor que la de la dieta A. De la misma forma, el aprovechamiento de la proteína como crecimiento (PER) disminuye aunque se mantiene en valores elevados.

2.3.2. Naturaleza del crecimiento hepático y turnover proteico.

El hígado es el órgano más afectado por la eliminación de los carbohidratos de la dieta, donde los animales alimentados con la dieta D son los que menos crecen de todas las situaciones dietarias ensayadas, disminuyendo el incremento medio peso/día más de un 60 %. Paralelamente son en los que disminuye a menor velocidad su capacidad de crecimiento a lo largo del tiempo. Este comportamiento es fruto, más que por una disminución en el número de núcleos por un descenso en el tamaño celular (tabla 2.2).

En esta situación aunque los valores de la velocidad fraccionaria de degradación de proteínas pase de 5.54 en la dieta A a 9.52 % en la dieta D, la velocidad de síntesis también aumenta de 7.79 a 11.3, un 45 % del valor original y la K_G disminuye un 20 %. Ninguno de estos cambios son significativamente demostrables.

Mientras, la síntesis total disminuye un 31 % y la ERP disminuye un 45 % para animales alimentados con la dieta D.

2.3.3. Turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.

Paralelamente a estos cambios, incrementa la concentración de RNA (1.8 veces) y DNA (2.6 veces) en el tejido de animales alimentados con la dieta D (tabla 2.3). Así, mientras la cantidad de RNA por unidad celular disminuye un 30 %, la C_S incrementa un 47 %. La K_{RNA} y la K_{DNA} no varían significativamente.

2.3.4. Naturaleza del crecimiento muscular y turnover proteico.

El crecimiento muscular a lo largo del tiempo experimental y en relación con su peso se comporta de forma muy semejante al animal completo, aunque en el músculo blanco, la carencia de la ingestión de carbohidratos provoca un descenso del 27 % en el incremento medio de peso/día. Sin embargo la evolución de la K_G es muy similar para ambas situaciones (figura 2.1 y 2.2). Aunque el número de núcleos no sufre cambios significativos, entre las dos dietas, el tamaño celular desciende un 46 % (tabla 2.4). La no ingestión de carohidratos a diferencia de lo que ocurre en el hígado, no afecta a la velocidad específica de crecimiento, ni a la K_S , ni a la cantidad total de proteína sintetizada. La ERP de este tejido se mantiene sin variaciones significativamente importantes (tabla 2.5).

2.3.5. Relación entre turnover proteico y concentración de ácidos nucleicos.

En cuanto a los contenidos de DNA y RNA muscular, sufren variaciones importantes por estos tratamientos.

C_S , K_{RNA} y K_{DNA} también se mantienen en unos valores muy semejantes.

También disminuye la relación RNA/DNA un 50 %, y la cantidad de proteína sintetizada por unidad celular.

2.3.4. Actividades SerDH y TyrAT.

De las actividades enzimáticas ensayadas solo la tirosina amino transferasa hepática se induce en la dieta sin carbohidratos, subiendo la V_{max} de 29.45 a 68.26, casi 2.5 veces. Esta subida coincide con un incremento en

la velocidad fraccionaria de degradación de proteínas hepáticas. La K_m se mantiene sin cambios significativos.

III.3. REGULACION NUTRICIONAL DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TURNOVER PROTEICO. AYUNO A LARGO PLAZO Y REALIMENTACION.

3.1. Comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico en hígado y músculo de la trucha arco iris sometida a un ayuno prolongado.

El ayuno prolongado es una situación fisiológica a la que los salmónidos se ven sometidos en determinadas etapas de su ciclo vital. Durante esos largos períodos de tiempo, el animal adapta su metabolismo global para sobrevivir consumiendo nutrientes y energía endógenos. Para estudiar los efectos de esta situación sobre el metabolismo proteico en el hígado y en el músculo, se han mantenido a los animales 70 días de ayuno total. Las velocidades de turnover proteico se determinaron a los 55 días de ayuno. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

3.1.1. Pérdida de peso durante un ayuno prolongado en la trucha arco iris.

La nula ingesta de alimento durante 70 días, provoca una pérdida media diaria de 0.42 gr de peso. La velocidad fraccionaria de pérdida de peso diario o velocidad de decrecimiento ($K_{GD} = -K_G$) es de un 0.28 % (tabla 3.1). Esta pérdida de peso a lo largo de todo el experimento evoluciona en el animal completo de manera lineal, existiendo una disminución uniforme del peso corporal que se traduce en un ligerísimo incremento lineal de la K_{GD} (figura 3.1) durante el transcurso del experimento.

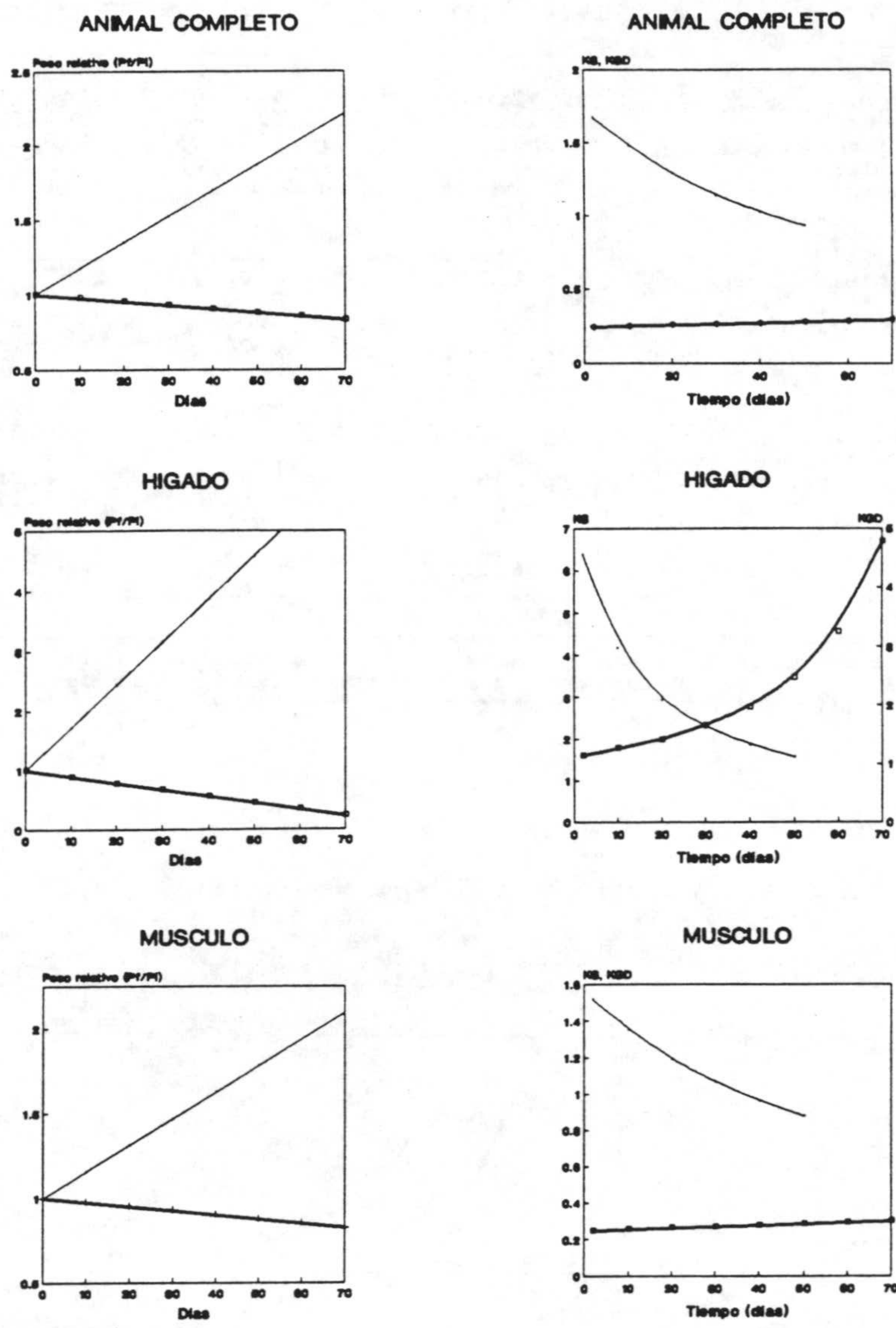


Figura 3.1. Evolución del peso relativo (Panel A) y de la velocidad específica de crecimiento (K_c) y de decrecimiento (K_{cp}) del animal completo, hígado y músculo durante un ayuno prolongado (70 días).

Las pendientes de las rectas de regresión que relacionan el peso del sistema y el tiempo (Panel A) para animales alimentados con la dieta A (—) y ayunados (---) son respectivamente: i) animal completo: 2.1 y -0.47, $r > 0.74$, $P < 0.01$. Los valores de los coeficientes A y b de la relación entre la K_c y el tiempo para animales alimentados ($K_c = AT^b$) son respectivamente para: i) animal completo, $A = 1.81$, $b = -0.142$. ii) hígado $A = 7.27$, $b = -0.35$; iii) músculo: $A = 1.62$, $b = -0.13$. En todos los casos $r > -0.90$, $P < 0.02$. La velocidad específica de decrecimiento ($K_{cp} = -K_c$) a que se ve sometido el animal completo, hígado y músculo durante el período de ayuno se relaciona con el tiempo según las expresiones: i) animal completo: $K_{cp} = 0.0007T + 0.2409$, $r = 0.99$, $P < 0.001$. ii) hígado: $K_{cp} = 0.9811e^{0.0202T}$, $r = 0.98$, $P < 0.001$. iii) $K_{cp} = 0.0008T + 0.2456$, $r = 0.99$, $P < 0.001$.

Tabla 3.1. Comportamiento alimentario, crecimiento y aprovechamiento del alimento en truchas ayunadas y realimentadas con una dieta rica en proteínas.

	Control (40:18:23)	Ayuno (70 días)	Realimentación (9 días)
Peso inicial (g)	112.12±0.6	171.99±2.43	144.91±2.43
Peso final (g)	211.10±14.2	142.72±2.41	162.22±3.32
Peso medio experimento (g)	151.62±0.91	158.00±0.25	152.34±0.38
Incremento peso día (g)	2.02±0.11	-0.42±0.01 ^a	1.57±0.06 ^a
K _c animal completo	1.12±0.06	-0.28±0.01 ^a	0.99±0.04
mg ingesta/pez/día	2110.0±30.0	0.00	3210.0±30.0 ^a
mg proteína/pez/día	844.2±13.9	0.00	1283.2±13.7 ^a
mg lípidos/pez/día	379.9±5.9	0.00	577.4±6.2 ^a
mg carbohidratos/pez/día	485.4±7.6	0.00	737.8±7.9 ^a
KJ/pez/día	39.9±0.6	0.00	60.7±0.7 ^a
mg ingesta/g pez/día	13.8±0.2	0.00	20.8±0.2 ^a
mg proteína/g pez/día	5.5±0.1	0.00	8.3±0.1 ^a
mg lípidos/g pez/día	2.5±0.1	0.00	3.7±0.1 ^a
mg carbohidratos/g pez/día	3.2±0.1	0.00	4.8±0.1 ^a
J/g pez/día	261.5±3.8	0.00	393.1±3.6 ^a
FE	0.96±0.02	0.00	0.49±0.01 ^a
PER	2.39±0.04	0.00	1.23±0.03 ^a

Los resultados se expresan como la media ± SEM. Abreviaturas: FE, eficacia de conversión del alimento (g crecimiento/g ingesta); PER, eficacia de conversión de la proteína (g crecimiento/g proteína ingerida). ^a P<0.05.

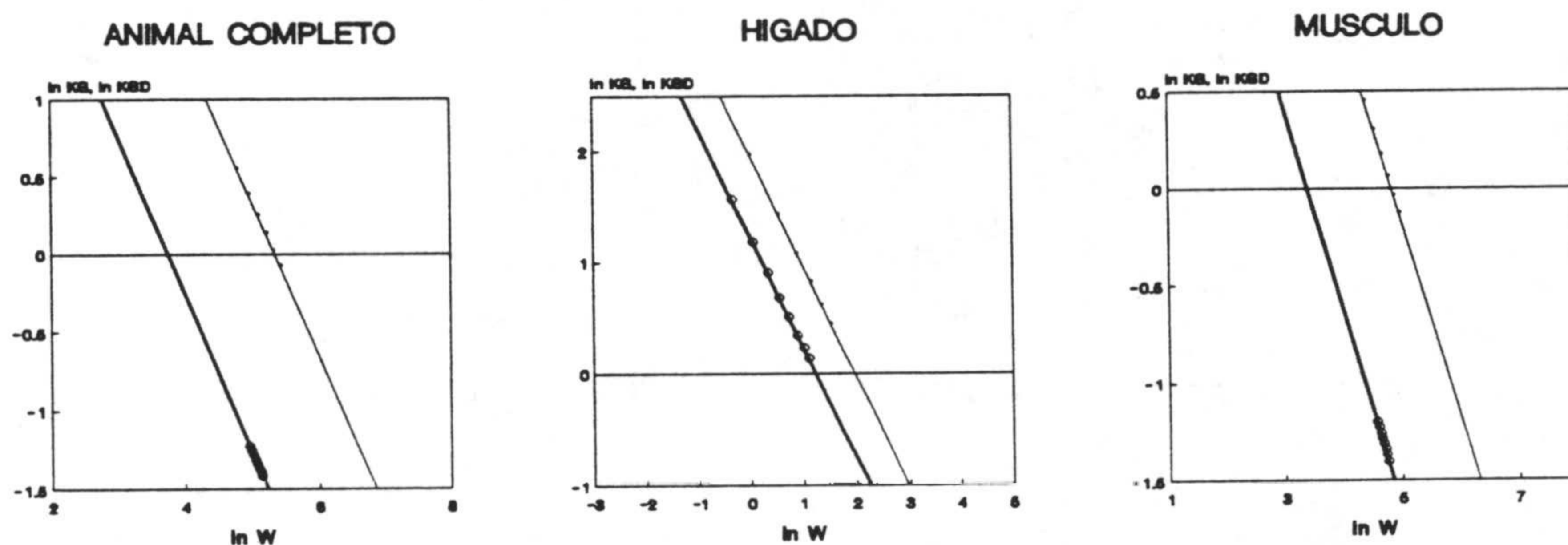


Figura 3.2. Relación entre la K_c (K_{cp}) y el peso del animal, hígado o músculo en animales alimentados y ayunados durante 70 días.

La K_c y la K_{cp} se relacionan con el peso del sistema según una expresión de naturaleza potencial ($K_{c(D)} = AW^b$, $\ln K_{c(D)} = b \ln W + \ln A$). Los valores de A y b para animales alimentados (—) y ayunados (---) son respectivamente: i) animal completo, A:195.41 y 47.19, b:-0.99 y -1.02, r=-1, P<0.001. ii) hígado, A:7.29 y 3.44, b:-1.01 y -0.99, r=-1, P<0.001. iii) músculo, A:126,4 y 34.99, b:-1.00 y -1.05, r=-1, P<0.001.

3.1.2. Naturaleza de la pérdida de capacidad de crecimiento hepática y turnover proteico.

A diferencia de lo que ocurre para el animal completo, el hígado se comporta de manera distinta. Aunque el peso disminuye de manera lineal a medida que avanza el ayuno, la K_{GD} aumenta de manera exponencial, es decir, a medida que progresa el tiempo de ayuno los incrementos en la K_{GD} son mayores. Las ecuaciones que relacionan todas estas variables se recogen en la figura 3.1. La relación entre la K_{GD} y el peso del órgano es del mismo tipo que para animales alimentados ($K_{GD}=AW^b$, $b=1$; $K_{GD}A/W$) (figura 3.2).

La pérdida media de peso diario es de 30 mgs (tabla 3.2) y la K_G desciende casi un 3 % (tabla 3.3). Paralelamente existe un importante descenso en el número de núcleos (67 %), mientras que el tamaño celular disminuye un 25%.

Aunque existe una importante pérdida de masa tisular, la velocidad fraccionaria de síntesis (K_S) se mantiene en niveles altos (tabla 3.3). Sin embargo, la síntesis absoluta (órgano completo) es solo un 33 % de la de animales alimentados (tabla 3.2). Además del incremento en más del doble de la velocidad de degradación de proteínas hepáticas, la eficacia de retención de proteínas sintetizadas pasa de aproximadamente un 30 % en animales alimentados a ser un 30 % de pérdida.

3.1.3. Turnover proteico y niveles de ácidos nucleicos tisulares.

La concentración de RNA por gramo de tejido aumenta en animales ayunados un 57 %, de ahí que la capacidad de síntesis también incremente en un orden parecido (54 %). Al incrementar un 40 % la concentración de DNA, la relación RNA/DNA se mantiene sin cambios.

La eficacia de traducción (K_{RNA}) y la cantidad de proteína sintetizada por unidad celular (K_{DNA}) no varían respecto a animales alimentados.

3.1.4. Pérdida de capacidad de crecimiento y turnover proteico en el músculo blanco.

La pérdida de peso, el aumento en la velocidad de decrecimiento y la relación de este con el peso del órgano durante el ayuno en el músculo, presentan un comportamiento muy similar al del animal completo (figuras 3.1 y 3.2). La pérdida lineal de peso, se correlaciona con un ligerísimo incremento lineal en el valor de la K_{GD} . La pérdida de casi 0.3 g diarios, se correlaciona con una K_G del orden de -0.3.

En estas condiciones en el músculo, el número de núcleos desciende casi un 68 %, de manera que el volumen celular controlado por un núcleo incrementa casi al triple (tabla 3.4).

Mientras que la K_S disminuye un 88 % del valor para animales alimentados, al igual que la cantidad total de proteína sintetizada por el órgano completo; la K_D aumenta considerablemente. Más del doble de la proteína que se sintetiza en este órgano se está movilizando (tabla 3.5).

3.1.5. Turnover proteico y niveles de ácidos nucleicos.

Como refleja la caída en el número de núcleos y el incremento en la cantidad de fibra controlada por un solo núcleo, encontramos un descenso muy considerable en la concentración de RNA (52 %) y DNA (61 %) por gramo de tejido. La relación RNA/DNA incrementa ligeramente (22 %) (tabla 3.4).

El descenso tan importante en la K_S coincide con una caída del 57% en la C_S y del 72% en la K_{RNA} . La cantidad de proteína sintetizada por

Tabla 3.2. Efectos del ayuno prolongado y la realimentación sobre el crecimiento del y el contenido de proteínas y ácidos nucleicos en el hígado de trucha arco iris.

	Control	Ayuno	Realimentación
Peso inicial (g)	0.91±0.05	3.13±0.28	1.10±0.25
Peso final (g)	4.80±0.31	0.72±0.16	2.66±0.15
Peso real día turnover (g)	4.33±0.48	1.14±0.08	2.54±0.31
Incremento peso día (g)	0.08±0.01	-0.03±0.01 ^a	0.14±0.01 ^{ab}
mg proteínas/g tejido	134.29±5.21	144.51±8.94	133.66±14.05
mg RNA/g tejido	6.56±0.19	10.32±0.71 ^a	7.74±0.51 ^{ab}
mg DNA/g tejido	2.10±0.25	2.95±0.23 ^a	1.56±0.20 ^b
Síntesis total (mgs día)	45.30±2.91	15.02±2.59 ^a	76.15±6.73 ^{ab}
[DNA] _{total} ¹	9.09±1.08	3.36±0.25 ^a	3.96±0.49 ^a
mg proteína/mg DNA ²	63.95±5.05	48.99±3.38 ^a	85.68±9.99 ^b
mg RNA/mg DNA	3.12±0.23	3.50±0.26	4.96±0.48 ^{ab}

¹ La concentración de DNA total es un índice del número de núcleos existentes en el tejido, así como la relación ² proteína/DNA es un índice del tamaño celular. Los resultados se expresan como la media de al menos diez valores ± SEM. ^a P<0.05 al comparar ayuno o realimentación frente al control. ^b P<0.05 al comparar realimentación frente al ayuno.

Tabla 3.3. Comportamiento de las velocidades de recambio proteico en el hígado de la trucha arco iris en animales sometidos a un ayuno a largo plazo y posterior realimentación.

	Control	Ayuno	Realimentación
K _g	2.25±0.12	-2.81±0.20 ^a	5.98±0.73 ^{ab}
K _s	7.79±0.50	9.12±1.38	22.43±1.23 ^{ab}
K _p	5.54±0.38	11.93±1.33 ^a	16.45±1.45 ^{ab}
C _s	48.85±1.40	75.29±4.89 ^a	57.91±4.95
K _{RNA}	1.59±0.12	1.21±0.15	3.87±0.27 ^{ab}
K _{DNA}	4.98±0.59	4.47±0.50	19.22±1.85 ^{ab}
ERP	28.89±0.47	-30.81±3.43 ^a	26.66±2.36 ^b

ABREVIATURAS: K_g, velocidad de acumulación de proteínas; K_s, velocidad de síntesis proteica; K_p, velocidad de degradación de proteínas. Estas tres velocidades se expresan como %/día. C_s, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_s/C_s)x10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA; ERP, eficacia de retención de proteínas: (K_g/K_s)x100. Los resultados son la media ± SEM de al menos seis peces. ^a P<0.05 al comparar los valores de ayuno o realimentación con los controles. ^b P<0.05 al comparar los valores de ayuno y realimentación.

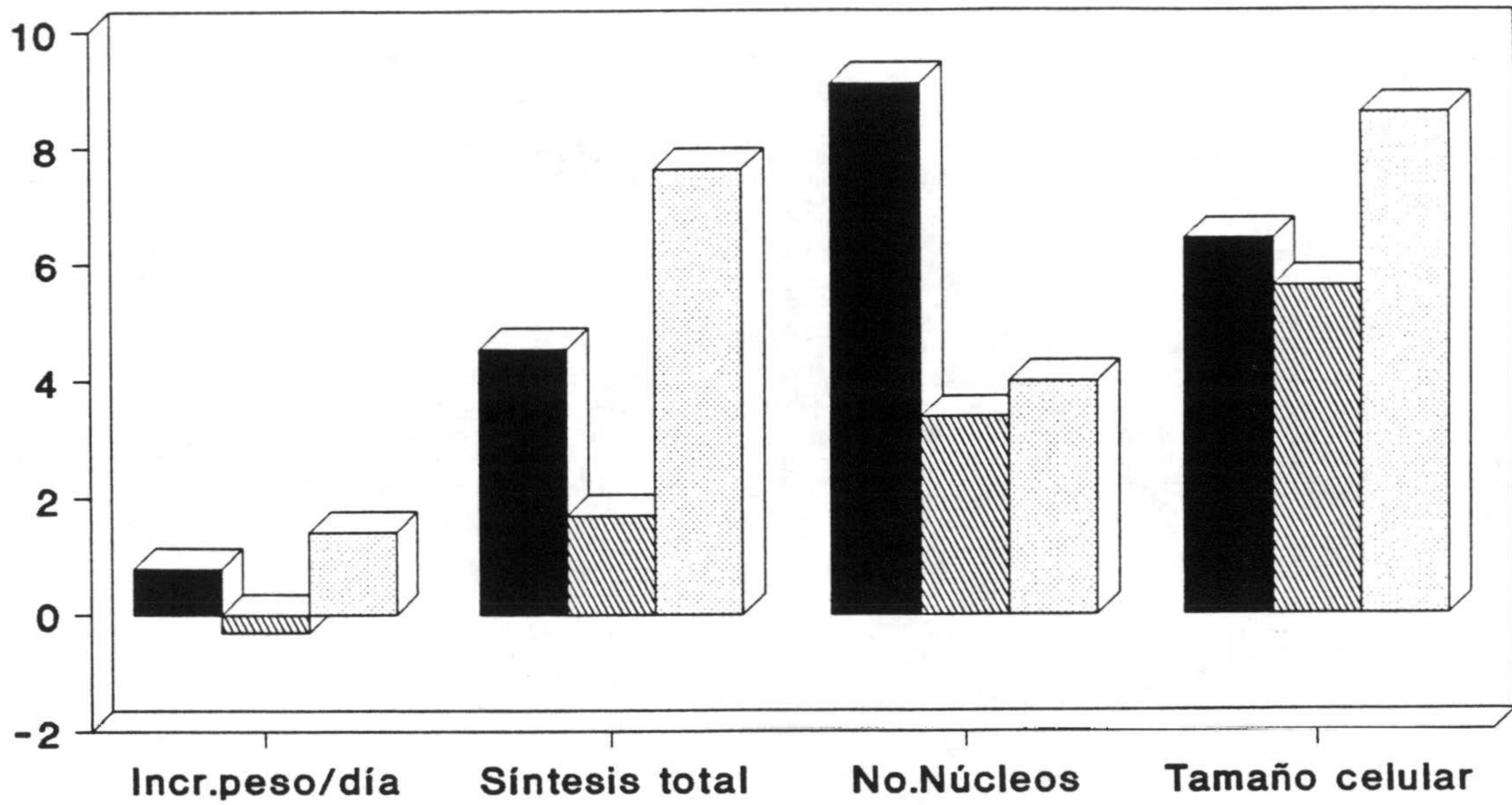


Figura 3.3. Efectos del ayuno y la realimentación a largo plazo sobre la naturaleza del crecimiento hepático de la trucha arco iris. Paralelamente a la administración de una dieta 40:18:23 (■), otro grupo de animales se han sometido a 70 días de ayuno (▨) y posterior realimentación con el mismo tipo de dieta durante 9 días (▩). El incremento de peso/día se expresa en gramos, la síntesis total en miligramos de proteínas sintetizados por órgano completo, el número de núcleos como miligramos totales de DNA y el tamaño celular como el cociente entre miligramos de proteína/miligramos de DNA.

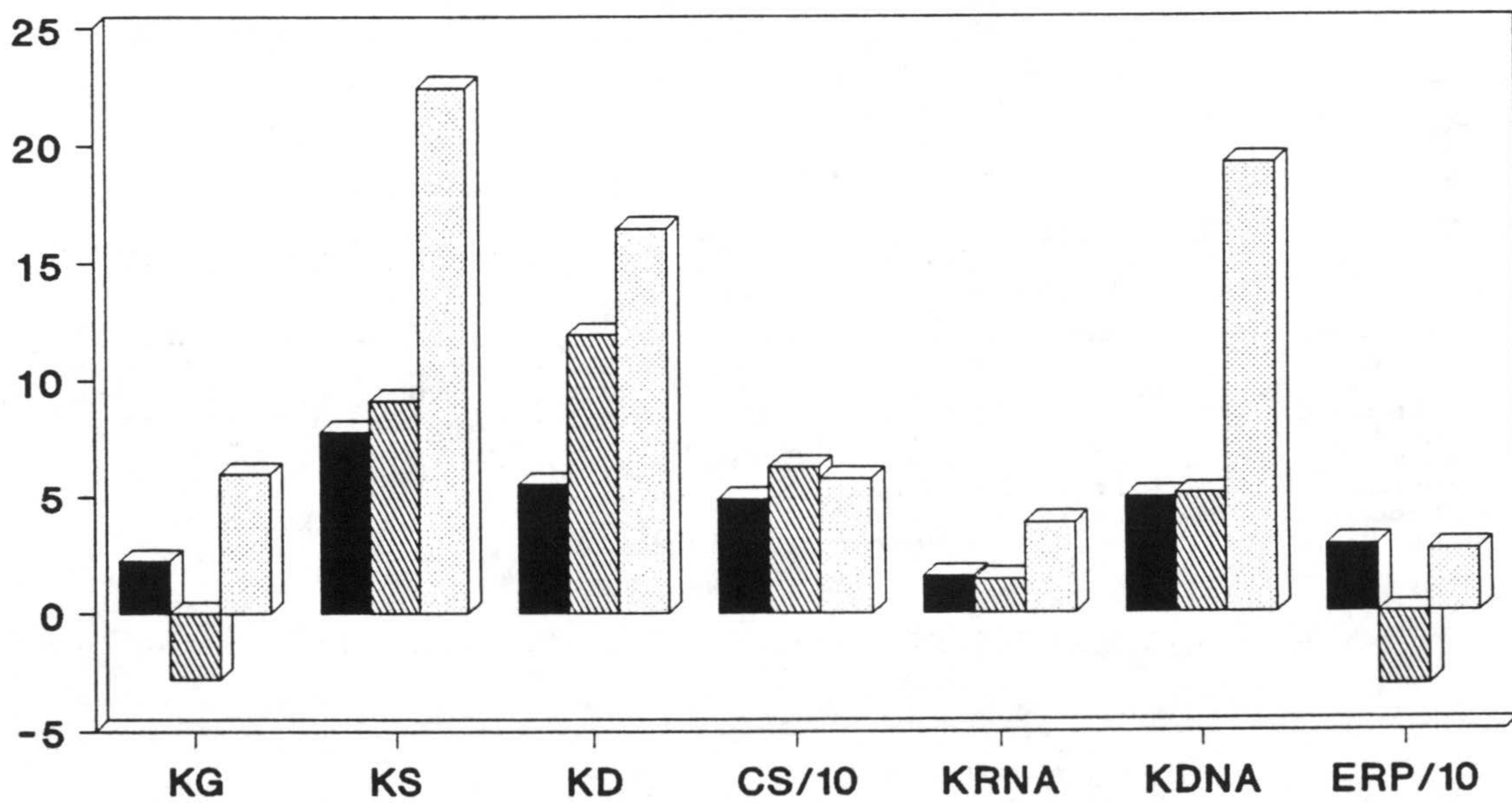


Figura 3.4. Cambios en las velocidades de crecimiento y turnover proteico del hígado de trucha arco iris (*O. mykiss*) tras un ayuno prolongado y posterior realimentación. Paralelamente a la administración de una dieta 40:18:23 (■), otro grupo de animales se han sometido a 70 días de ayuno (▨) y posterior realimentación con el mismo tipo de dieta durante 9 días (▩).

unidad nuclear desciende un 66 % (tabla 3.5).

3.1.6. Actividades SerDH y TyrAT en hígado y músculo blanco de animales ayunados durante 70 días.

Coincidiendo con esta situación en la que la actividad catabólica está claramente potenciada, el ayuno a largo plazo tanto en la SerDH hepática (tabla 3.6, figura 3.7) como en la TAT hepática (tabla 3.7, figura 3.8) y muscular (tabla 3.8, figura 3.9) provoca un importante aumento en la V_{max} del orden del 100, 64 y 367 % respectivamente. En ningún caso se modificó significativamente la K_m , la relación V_{subs}/V_{max} , ni el comportamiento hiperbólico típico de estas cinéticas (h1) resultado de la existencia de incrementos simultáneos y proporcionales a lo largo de toda la curva de saturación del enzima por su sustrato.

3.2. Efectos de la realimentación durante 9 días con una dieta 40:18:23 sobre el comportamiento de las velocidades de crecimiento y turnover proteico del hígado y músculo de la trucha arco iris tras haberselas sometido a un ayuno prolongado.

Tras un ayuno prolongado en el que se moviliza gran parte de las proteínas hepáticas y musculares, a continuación se estudia como se produce la restauración de estas reservas deprimidas tras una realimentación durante nueve días con una dieta rica en macronutrientes y energía.

3.2.1. Comportamiento alimenticio y crecimiento del animal completo.

El comportamiento alimenticio de estos animales durante los nueve días de realimentación se caracteriza por el incremento en un 52 % en la

ración ingerida que redundará en un aumento proporcional en la ingesta relativa de los restantes nutrientes.

Como consecuencia de este período de realimentación, el animal alcanza una K_G muy similar a la de animales alimentados, siendo el incremento medio de peso/día un 78 % del valor control.

La eficacia de utilización del alimento (FE) y de la proteína (PER) es significativamente menor (49 %) que en animales alimentados (3.1).

3.2.2. Crecimiento hepático y turnover proteico.

La respuesta del hígado al alimento es inmediata e importante, produciéndose un incremento de peso/día del 75 % mayor que el de animales controles, a la vez que la K_G aumenta más de 2,5 veces.

Mientras el tamaño celular rápidamente supera el de animales alimentados, el número de núcleos empieza ligeramente el ascenso, aunque aún no de forma significativa.

La respuesta de la K_S es también inmediata, siendo 2,5 veces mayor que la del ayuno y casi 3 veces mayor que la de animales controles. Coincidiendo con este comportamiento, la cantidad total de proteína sintetizada es cinco veces mayor que en el ayuno y un 68 % más que en animales controles. La K_D también incrementa aunque solo un 38 %. La ERP alcanza los valores de animales controles (tablas 3.2 y 3.3).

3.2.3. Niveles de ácidos nucleicos y turnover proteico.

Este fuerte incremento en la K_S es producido gracias a que la K_{RNA} aumenta 3 veces el valor de animales ayunados y 2,5 respecto a los controles. La C_S no sufre cambios importantes, mientras que la K_{DNA} incrementa más de 4 veces respecto a los animales ayunados y controles. La

Tabla 3.4. Efectos de un ayuno prolongado y la realimentación a largo plazo sobre el crecimiento y el contenido de proteínas y ácidos nucleicos en el músculo blanco de la trucha arco iris.

	Control	Ayuno (70 d)	Realimentación
Peso inicial (g)	72.10±4.84	114.25±0.28	99.42±6.00
Peso final (g)	132.81±8.44	94.35±5.76	106.40±1.90
Peso real día turnover (g)	121.77±5.31	101.57±3.37	109.11±3.00
Incremento peso día (g)	1.25±0.03	-0.28±0.01 ^a	0.63±0.17 ^{ab}
mg proteínas/g tejido	173.98±14.70	195.45±10.28	144.24±9.73 ^b
mg RNA/g tejido	1.58±0.26	0.75±0.03 ^a	0.43±0.02 ^{ab}
mg DNA/g tejido	0.36±0.04	0.14±0.01 ^a	0.21±0.05 ^a
Síntesis total (mgs/día)	237.28±63.56	25.81±2.66 ^a	103.87±10.87 ^b
[DNA] _{total} ¹	43.84±3.39	14.22±0.80 ^a	22.91±3.05 ^{ab}
mg proteína/mg DNA ²	483.28±0.10	1396.07±86.58 ^a	686.86±91.57 ^{ab}
mg RNA/mg DNA	4.39±0.14	5.36±0.29 ^a	2.05±0.29 ^{ab}

¹ La concentración de DNA total es un índice del número de núcleos existentes en el tejido, así como la relación ² proteína/DNA es un índice del tamaño celular. Los resultados se expresan como la media de al menos diez valores ± SEM. ^a P<0.05 al comparar los valores de ayuno o realimentación con los controles. ^b P<0.05 al comparar los valores de ayuno y realimentación.

Tabla 3.5. Comportamiento de las velocidades de recambio proteico en el músculo blanco de la trucha arco iris en animales sometidos a un ayuno a largo plazo y posterior realimentación.

	Control	Ayuno	Realimentación
K _G	1.11±0.05	-0.29±0.01 ^a	0.60±0.02 ^{ab}
K _S	1.12±0.30	0.13±0.02 ^a	0.66±0.12 ^b
K _D	0.01±0.002	0.42±0.04 ^a	0.05±0.005 ^{ab}
C _S	9.08±1.15	3.84±0.19 ^a	2.98±0.20 ^{ab}
K _{RNA}	1.23±0.24	0.34±0.03 ^a	2.21±0.26 ^{ab}
K _{DNA}	5.46±1.04	1.84±0.17 ^a	4.51±0.69 ^b
ERP	98.84±15.46	-214.92±20.23 ^a	91.92±9.89 ^b

ABREVIATURAS: K_G, velocidad de acumulación de proteínas; K_S, velocidad de síntesis proteica; K_D, velocidad de degradación de proteínas. Estas tres velocidades se expresan como %/día. C_S, capacidad de síntesis proteica: mg RNA/g proteína; K_{RNA}, eficacia de síntesis proteica: (K_S/C_S)x10, g proteína sintetizada/día/g RNA; K_{DNA}, g proteína sintetizada/día/g DNA; ERP, eficacia de retención de proteínas: (K_G/K_S)x100. Los resultados son la media ± SEM de al menos seis peces. ^a P<0.05 al comparar los valores de ayuno o realimentación con los controles. ^b P<0.05 al comparar los valores de ayuno y realimentación.

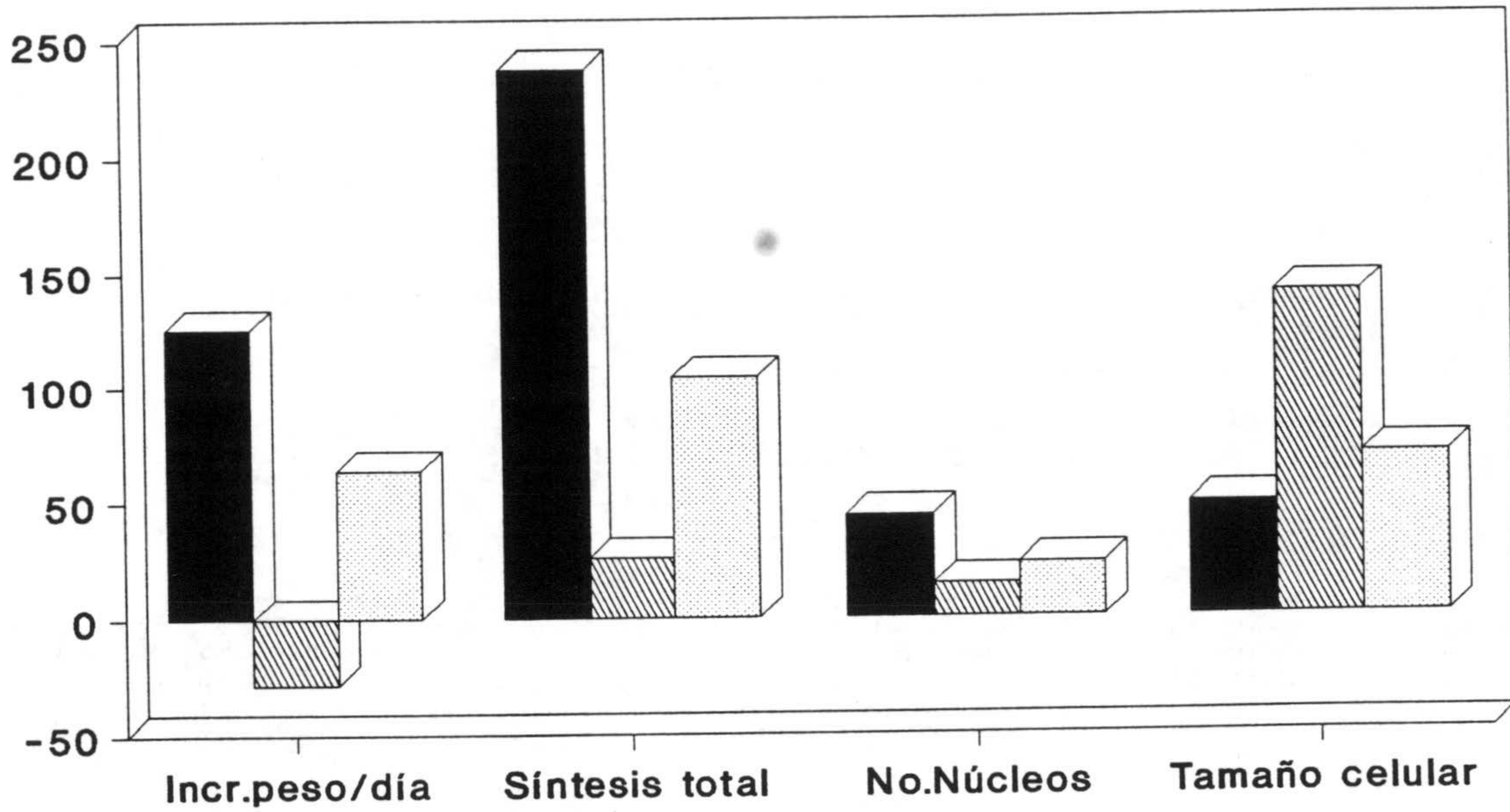


Figura 3.5. Efectos del ayuno y la realimentación a largo plazo sobre la naturaleza del crecimiento muscular de la trucha arco iris. Paralelamente a la administración de una dieta 40:18:23 (■), otro grupo de animales se han sometido a 70 días de ayuno (▨) y posterior realimentación con el mismo tipo de dieta durante 9 días (▩). El incremento de peso/día se expresa en gramos, la síntesis total en miligramos de proteínas sintetizados por órgano completo, el número de núcleos como miligramos totales de DNA y el tamaño celular como el cociente entre miligramos de proteína/miligramos de DNA.

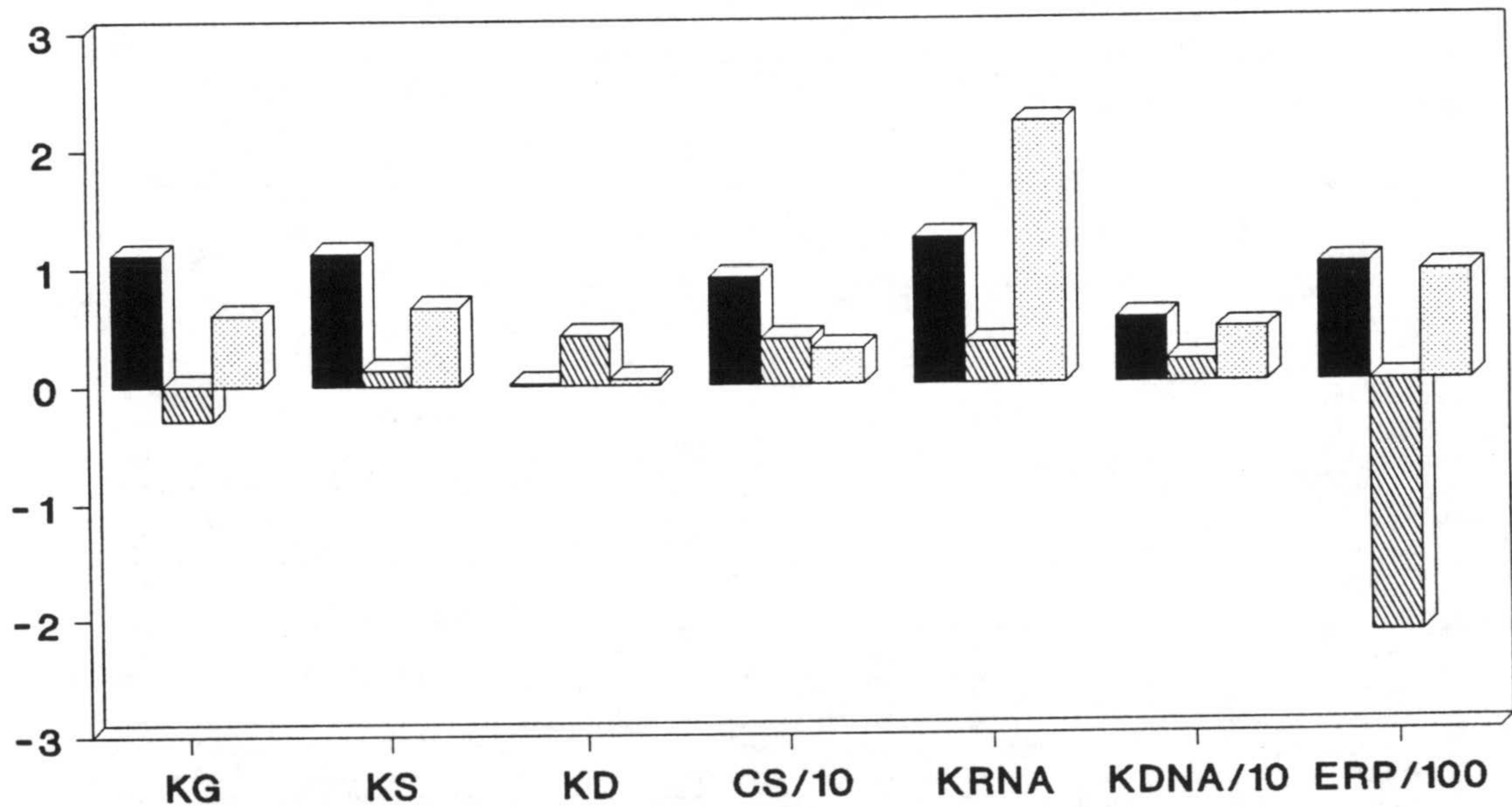


Figura 3.6. Cambios en las velocidades de crecimiento y turnover proteico del hígado de trucha arco iris (*O. mykiss*) tras un ayuno prolongado y posterior realimentación. Paralelamente a la administración de una dieta 40:18:23 (■), otro grupo de animales se han sometido a 70 días de ayuno (▨) y posterior realimentación con el mismo tipo de dieta durante 9 días (▩).

relación RNA/DNA aumenta un 42 % respecto al ayuno.

3.2.4. Crecimiento muscular y recambio proteico.

El comportamiento del músculo es diferente al del hígado. La realimentación desencadena una respuesta gradual no observándose fenómenos de sobrecompensación ("overshoot") para casi ninguno de los parámetros analizados.

Tanto el incremento de peso/día como la K_G sufren importantes incrementos significativos respecto a los valores del ayuno aunque en ambos casos estos valores superan ligeramente la mitad de los alcanzados para animales alimentados (tabla 3.4).

Un comportamiento muy similar se observa para el número de núcleos y el tamaño unidad celular.

En estas condiciones, la velocidad de síntesis incrementa cinco veces, mientras que la K_D desciende un 88 % aunque aún sigue superando los valores controles. La cantidad de proteína sintetizada es cuatro veces superior a la de animales ayunados (tabla 3.4). La ERP, alcanza los niveles de animales continuamente alimentados (tabla 3.5).

3.2.5. Turnover proteico y niveles de ácidos nucleicos en el músculo.

Al igual que en el hígado, parece que es el incremento en la K_{RNA} (6.5 veces) el desencadenante de la estimulación de la velocidad de síntesis. La C_S disminuye ligeramente (23 %). La K_{DNA} aumenta 2.5 veces hasta alcanzar los valores controles (tabla 3.5).

3.2.6. Actividades SerDH y TyrAT de hígado y músculo de trucha arco iris realimentadas con una dieta 40:18:23.

Durante el período de realimentación, las actividades SerDH y TyrAT que durante el ayuno se encontraban muy estimuladas vuelven progresivamente a alcanzar los valores controles (tablas 3.6-3.8 y figuras 3.7-3.9). No se observan cambios significativos ni en la Km, ni en la relación $V_{\text{subsaturante}}/V_{\text{max}}$ ni en el coeficiente de Hill en las distintas etapas estudiadas.

Tabla 3.6. Efecto del ayuno y la realimentación a largo plazo sobre el comportamiento cinético de la serina deshidratasa de hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

[Ser](M)	Controles	Realimentación				
		Ayuno	6 horas	32 horas	4 días	9 días
0.01	0.43±0.05 ¹	0.37±0.04	0.31±0.06	0.28±0.03	0.36±0.05	0.19±0.01
0.025	0.52±0.06	0.81±0.04	0.68±0.09	0.71±0.07	0.58±0.07	0.35±0.07
0.05	0.71±0.09	1.36±0.08	1.13±0.09	1.00±0.10	0.81±0.12	0.66±0.08
0.10	0.94±0.11	1.88±0.08	1.68±0.10	1.40±0.12	1.04±0.11	0.89±0.01
0.25	1.31±0.14	2.74±0.18	2.20±0.19	2.03±0.20	1.43±0.19	1.39±0.11
0.5	1.68±0.17	3.12±0.22	3.02±0.14	2.36±0.22	1.92±0.17	1.74±0.03
5	1.81±0.21	3.60±0.24	3.19±0.32	2.70±0.26	2.03±0.25	1.84±0.15
Km ^{1,2}	77.07±8.78	88.57±5.83	94.71±9.44	87.33±8.31	80.31±9.84	88.76±7.07
Vmax ^{1,2}	1.83±0.21	3.67±0.24 [*]	3.26±0.32 [*]	2.75±0.26 [*]	2.06±0.26	1.89±0.15
V _{0.025} /Vmax	0.28±0.03	0.22±0.01	0.21±0.02	0.26±0.03	0.28±0.03	0.22±0.02
h	0.97±0.11	0.99±0.07	1.02±0.10	0.98±0.09	0.98±0.12	0.98±0.08

¹ La actividad específica y la Vmax se expresan en mU/mg proteína, la Km en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM de al menos cinco repeticiones. Las diferencias significativas entre el control y la dieta en cuestión se expresan como ^{*}, P<0.05.

Tabla 3.7. Efecto del ayuno y realimentación a largo plazo sobre el comportamiento cinético de la tirosina aminotransferasa de hígado de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

[Tyr] (mM)	Controles	Ayuno	Realimentación			
			6 horas	32 horas	4 días	9 días
0.50	8.37±0.73 ¹	18.07±2.53	16.69±0.33	16.25±1.03	7.39±1.80	5.23±0.75
1.25	17.22±1.35	31.83±2.70	35.74±0.82	30.34±0.94	19.18±3.90	13.36±2.25
2.50	25.17±1.36	43.89±3.00	54.35±2.35	40.67±2.94	29.33±5.29	20.93±1.94
6.75	32.58±1.14	56.53±3.24	68.77±1.07	51.93±4.49	40.62±6.22	31.23±2.95
67.5	41.54±2.64	68.37±5.99	88.93±2.25	62.55±3.95	56.56±11.03	43.72±3.00
Km ^{1,2}	1.86±0.12	1.47±0.13	1.94±0.05	1.42±0.09	2.73±0.53	3.08±0.38 ^a
Vmax ^{1,2}	42.49±2.70	69.54±6.09 ^a	91.05±2.31 ^a	63.58±4.02 ^a	58.61±11.44	45.71±5.70
V _{0.5} /Vmax	0.20±0.01	0.26±0.02	0.18±0.01	0.26±0.02 ^a	0.13±0.03	0.11±0.01 ^a
h	1.04±0.07	1.04±0.09	1.05±0.02	1.05±0.07	1.05±0.20	1.03±0.13

¹ La actividad específica y la Vmax se expresan en mU/mg proteína, la Km en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM de al menos cinco repeticiones. Las diferencias significativas entre el control y la dieta en cuestión se expresan como ^a, P<0.05.

Tabla 3.8. Efecto del ayuno y realimentación a largo plazo sobre el comportamiento cinético de la tirosina aminotransferasa de músculo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

[Tir] (mM)	Controles	Ayuno	Realimentación		
			6 horas	4 días	9 días
0.5	0.18±0.04	0.77±0.16	0.97±0.22	0.19±0.02	0.19±0.08
1.25	0.26±0.08	1.65±0.28	1.07±0.62	0.82±0.08	0.25±0.13
2.50	0.68±0.13	2.90±0.25	1.21±0.05	1.23±0.21	1.01±0.54
6.25	1.07±0.19	3.64±0.35	2.78±0.14	2.00±0.16	1.50±0.05
62.5	1.17±0.26	4.52±0.63	3.04±0.68	2.29±0.27	1.55±0.58
Km ^{1,2}	2.55±0.57	2.01±0.28	2.34±0.52	2.55±0.29	2.51±0.95
Vmax ^{1,2}	1.29±0.29	4.74±0.66 ^a	3.24±0.72 ^a	2.49±0.29 ^a	1.77±0.67
V _{1.25} /Vmax	0.20±0.05	0.35±0.05	0.33±0.07	0.33±0.04	0.14±0.07
h	0.91±0.20	0.96±0.13	0.84±0.19	0.99±0.11	0.92±0.35

¹ La actividad específica y la Vmax se expresan en mU/mg proteína, la Km en mM.

² Los parámetros cinéticos fueron calculados utilizando un ajuste hiperbólico no lineal descrito por la ecuación de Michaelis-Menten, mediante el programa de análisis de datos Enzfitter vs 1.03 Leatherbarrow, R.J. 1987.

³ Los resultados se expresan como la media ± SEM de al menos cinco repeticiones. Las diferencias significativas entre el control y la dieta en cuestión se expresan como ^a, P<0.05.

DISCUSSION

IV.1. DESARROLLO Y TURNOVER PROTEICO EN EL HIGADO Y MUSCULO BLANCO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (Oncorhynchus mykiss).

IV.1.1. Crecimiento y estado de desarrollo.

En el crecimiento de un animal, tejido u órgano coinciden varios mecanismos íntimamente relacionados entre sí, además del incremento en la masa de proteínas depositadas, la expresión diferencial de un patrón genético determinado que se refleja en el cambio en la composición y tamaño de los pools de proteínas específicos, deben ponerse en marcha los mecanismos reguladores que controlen todos los procesos citados anteriormente. De ahí que tanto la síntesis-degradación de proteínas, capacidad y eficacia de síntesis, eficacia de retención de proteínas, cantidad de proteínas sintetizadas por unidad celular y resto de parámetros estudiados se encuentran íntimamente relacionados y responden al unísono a los cambios desencadenados durante el crecimiento y desarrollo de un animal como la trucha arco iris.

Algunos autores distinguen la velocidad de recambio proteico compuesta por dos fracciones, una de ellas asociada con el crecimiento y responsable de los niveles de acumulación y depósito de proteínas y una segunda fracción asociada con los mecanismos de recambio de constituyentes celulares imprescindibles para el correcto funcionamiento y respuesta de la maquinaria celular ante cualquier fluctuación del medio externo. La importancia de cada una de estas fracciones, así como su relación con la magnitud y capacidad de regulación de las velocidades de síntesis y degradación de proteínas depende de la importancia que cada una de estas funciones juegue en la función principal de cada tejido.

El crecimiento de los peces se caracteriza por dos conceptos diferentes, i) la plasticidad, propiedad por la cual puede existir mucha variabilidad intraespe-cífica en cuanto a la magnitud de la velocidad de crecimiento específica entre poblaciones, magnitud que vendrá determinada tanto por factores externos como las condiciones ambientales de temperatura, fotoperiodo, etc como por factores internos como características genéticas, concentraciones hormonales, etc. ii) una extremada constancia en los diseños o patrones de crecimiento tanto del animal completo como de los tejidos (Weatherley 1990).

En el animal completo, nuestros resultados ponen de manifiesto ambas peculiaridades, por un lado las importantes diferencias observadas tanto en el incremento de peso/día, en la K_G , en la velocidad de disminución esa K_G a lo largo del tiempo, según el peso de la población considerada evidencia la alta plasticidad del crecimiento en esta especie. Sin embargo, al comparar la velocidad de crecimiento con el peso se observa un patrón muy similar tanto para el animal completo como para el hígado o el músculo, en el que existen una estrecha relación entre el valor de la K_G y el peso del sistema, de tal manera que la proporción de disminución de la K_G respecto al peso es siempre la misma sea cual sea la etapa de desarrollo considerada.

En este sentido, Elliot (1975a) y Brett (1979), hacen notar que la velocidad de disminución en el crecimiento específico, era gradual y se relacionaba con el pesocorporal según la ecuación:

$$\ln G_w = a + b \ln W \quad (1)$$

donde la velocidad de crecimiento, se consideraba como

$$G_w = (\ln W_t - \ln W_0 / t - t_0) \times 100 \quad (2)$$

Jobling (1983a) confirma esta relación y sugiere que el exponente b es común para todas los peces en general y salmones en particular (Brett 1978)

puede considerarse como -0.4. También sugirió que se podría utilizar el coeficiente a como índice para comparar el crecimiento de los peces en diferentes condiciones ambientales.

En nuestros estudios, al analizar la evolución de la K_G a lo largo del experimento, se pone de manifiesto que cuando la velocidad específica de crecimiento, K_G se calcula como $(W_2 - W_1 / W_2) \times 100 / (t_2 - t_1)$ entonces el valor del coeficiente b de la expresión (1) es siempre prácticamente igual a -1 para todos los pesos estudiados tanto para el animal completo como para el hígado y para el músculo cuando se relacionan con su propio peso, de manera que la expresión quedaría reducida a:

$$\ln K_G = - \ln W + \ln a$$

$$K_G = AW^{-1}, K_G = A/W$$

en la que el valor del coeficiente A puede tomarse como un índice directo de la relación entre la K_G y el peso del animal.

Se determinó el valor del coeficiente b calculando la K_G según la expresión (2) y se obtuvo un valor de -0.5, muy semejante al descrito por Jobling y Brett.

No obstante, cuando se relaciona la K_G y el peso, entre los diferentes grupos experimentales se observa una clara alometría negativa entre ambas variables para el animal completo y el músculo, obteniendo en ambos casos un exponente muy similar a -0.32 propuesto por Brett (1979).

Es muy significativa la correlación lineal encontrada entre el descenso en la ingesta relativa de proteína y de energía y la disminución en la velocidad de crecimiento del animal completo, estos resultados están de acuerdo con los encontrados por McCarthy et al. (1992), los cuales usando una radiografía de rayos X para medir la ingesta de alimento individual para tres tamaños de

truchas (30-40 g, 40-80 g, 200-300 g) observan una significativamente alta relación entre la ingesta media de alimento ($\text{mgxg}^{-1}\text{xd}^{-1}$) y la velocidad de crecimiento total (% día) para cada tamaño de pez.

En este sentido, Bastrop et al. (1992) confirmaron la existencia de una fuerte correlación lineal entre la velocidad de alimentación considerada como porcentaje de peso corporal y la velocidad específica de crecimiento individual de la trucha arco iris.

A medida que el animal aumenta de peso y coincidiendo con la disminución en las cantidades relativas de ingesta (mg/g pez) de nutrientes y proteína, se observa una correlación negativa entre la eficacia de utilización de la dieta (FE) y la proteína (PER) y el peso del animal entero. Estos resultados coinciden con los de Mironova (1976) con Oreochromis niloticun en los que el porcentaje de energía bruta utilizada para crecimiento variaba desde 27 % para animales de 3-6 g hasta 13.5 % para pesos de 13-40 g. A diferencia de los trabajos de Huisman (1976) y Huisman et al. (1979), en los que se pone de manifiesto que la eficacia de utilización de la energía para el crecimiento, disminuye a medida que aumenta el nivel alimenticio en la carpa común y en la trucha. Sin embargo, en nuestros resultados, se observa una correspondencia entre ingestas y pesos de tal manera que a medida que el animal aumenta de peso descende la cantidad de ingesta, coincidiendo los valores más elevados con los pesos más pequeños y con las eficacias de utilización del alimento mayores. Es decir en animales en crecimiento deben existir otros factores diferentes meramente a la cantidad de dieta ingerida que determinen el aprovechamiento nutritivo y metabólico de estas.

Se puede concluir, que a medida que el animal va aumentando su grado de desarrollo, los requerimientos nutritivos y energéticos de la trucha arco iris

disminuyen proporcionalmente a la disminución en la velocidad de crecimiento del animal completo. De manera que estados iniciales de desarrollo además de caracterizarse por ingestas más elevadas presentan aprovechamiento del alimento y de la proteína mayores; ambos parámetros van descendiendo a medida que el animal aumenta de peso.

IV.1.2. Crecimiento hepático y recambio proteico en la trucha arco iris durante el desarrollo tisular.

En los vertebrados, el hígado juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis bioquímica, su principal función es la regulación del metabolismo energético y de los constituyentes plasmáticos (Shoemaker y Elwyn 1969), puede no obstante, estar implicado en la regulación del crecimiento a través de su función reguladora del metabolismo energético (Jürs y Bittorf 1990).

En salmónidos, el hígado es el lugar principal donde se lleva a cabo la amoniogénesis (Walton y Cowey 1977), la síntesis de ácidos grasos (Henderson y Sargent 1981) y la gluconeogénesis (Knox et al. 1980; Mommsen et al. 1985; Mommsen 1986). Estas rutas metabólicas están todas ellas implicadas en el papel jugado por el hígado en el metabolismo energético del pez. Las intensidades de las correspondientes reacciones pueden diferir según la trucha sea de crecimiento rápido o lento, lo cual se reflejará en diferencias bioquímicas, limitadas además de por los niveles enzimáticos por la constitución genética del órgano (Jürs y Bittorf 1990). En comparación con otros órganos, el hígado se caracteriza por presentar unas altas velocidades cercanas al 10 % diario, coincidiendo con elevados valores de C_s . A diferencia de lo que ocurre en el

músculo, el hígado mantiene una alta capacidad regenerativa (o de proliferación) (Ballard 1982) en etapas avanzadas de desarrollo, posiblemente esto está relacionado con los altos valores alcanzados por las velocidades de turnover proteico en este tejido. Trabajos realizados en mamíferos demuestran como la capacidad de crecimiento de este órgano puede estimularse suprimiendo la degradación de proteínas (Hutson y Mortimore 1982, Botbol y Scornik 1985, Conde y Scornik 1976, Bur y Conde 1982, Scornik y Botbol 1976).

Los valores de K_G obtenidos el día del turnover para cada grupo de pesos ponen de manifiesto que no existía una correlación entre la velocidad de crecimiento hepático y el estado de desarrollo del animal, aunque también parece que el descenso en la K_G al avanzar el experimento es más elevado para etapas iniciales que para etapas finales.

A medida que el animal aumenta en su estado de desarrollo y coincidiendo con una ingesta de nutrientes progresivamente menor, se encontró un fuerte incremento lineal en el número de núcleos. El aumento en el tamaño celular presentó una pendiente muy similar a la de la curva que representa la síntesis de proteínas total del tejido. Es decir, aunque se observe un importante aumento en el tamaño celular (hipertrofia), el principal responsable del crecimiento del órgano es el fuerte incremento en el número de núcleos. Paralelamente se observa una disminución significativa en la concentración de RNA/g hígado, y aunque no sea significativamente apreciable se observa también un descenso en la concentración de DNA, lo cual redundaría en que se mantenga sin cambios significativos la cantidad de RNA por unidad celular (RNA/DNA).

Estos resultados coinciden plenamente con los descritos por Waterlow et al. (1978) en ratas de diferentes edades, desde su nacimiento (63 g) hasta que

cumplen un año (770 g). En este estudio se concluyó que el incremento en la síntesis total observado en un órgano o tejido durante el crecimiento depende principalmente del incremento en el número de células o unidades de DNA. Los cambios observados en las velocidades de síntesis coinciden con una extensa hiperplasia, un incremento en el tamaño de los niveles de DNA, una tendencia a la disminución en la concentración de RNA y una constancia en la relación RNA/DNA.

Este comportamiento difirió del observado en truchas de un mismo estado de desarrollo, 100 g, alimentadas con diferentes raciones (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 % de peso fresco inicial) y utilizando las mismas técnicas de separación y cuantificación de las concentraciones de ácidos nucleicos que las empleadas en este trabajo. Se encontró la disminución de la concentración relativa de RNA y DNA, así como el aumento en la relación RNA/DNA a medida que aumenta el tamaño de la ración suministrada.

Estos resultados ponen de manifiesto el comportamiento diferente de este tejido ante estímulos de diferente naturaleza. Para un mismo estado de crecimiento, estímulos externos como són el mayor o menor aporte de nutrientes pueden regular la respuesta hepática en un sentido, el crecimiento celular en tamaño. Estímulos internos como el diferente patrón de expresión genética característico de cada etapa de desarrollo tisular o el diferente patrón hormonal, regulan la respuesta tisular en otro sentido, la hiperplasia.

Con este patrón de desarrollo tisular, a medida que el animal aumenta de peso, los parámetros que definen la velocidad de turnover proteico en el órgano, presentan también un comportamiento característico. El descenso hiperbólico observado en la K_S , K_D , y C_S , coincide con un incremento también de carácter hiperbólico en la ERP, mientras que la eficacia de síntesis (K_{RNA}) no muestra

alteraciones importantes a medida que el animal crece. Los niveles de síntesis y degradación covarían paralelamente, encontrándose entre ellos una relación lineal con una pendiente muy cercana a 1. Pequeños cambios en la velocidad de síntesis (K_S) coinciden con variaciones mayores en la capacidad de síntesis (C_S), mientras que la K_{RNA} prácticamente no se modifica. A medida que aumenta la velocidad de síntesis, la K_{DNA} (cantidad de proteína sintetizada por unidad celular) incrementa linealmente mientras que la eficacia de retención de proteínas (ERP) disminuye de forma importante, con una pendiente aproximadamente igual a -2.

En mamíferos, aunque existen trabajos que describen una regulación del turnover de proteínas hepáticas principalmente función de alteraciones en la velocidad de degradación, Goldspink y Kelly (1984), estudiando el comportamiento de todos estos parámetros entre los 16 días de vida uterina y las 105 semanas tras el parto en el hígado de la rata, utilizando una técnica basada en una dosis masiva de fenilalanina marcada, encuentran que las velocidades de síntesis más elevadas aparecen en las etapas iniciales del desarrollo fetal, que existe un descenso entre los 18 y 20 días de vida uterina y que las diferencias después del parto en la K_S són pequeñas. Describen un comportamiento muy similar para la relación RNA/ proteína (C_S), mientras que aunque la K_{RNA} desciende entre los días 18 y 20 de vida uterina, tras el parto, no muestra cambios significativos.

En la trucha arco iris, los resultados de Fauconneau et al. (1981) y Smith (1981) mostraron que la velocidad de síntesis en el hígado de animales de 100 g són mayores que la de 200-300 g.

El comportamiento encontrado en el hígado de la trucha arco iris coincide cualitativamente con el descrito por Goldspink y Kelly (1984) para el

desarrollo de las ratas.

Para explicar el comortamiento del turnover proteico en el hígado debe tenerse en cuenta que se trata de un órgano en el que la síntesis, además de cubrir las necesidades propias del crecimiento y mantenimiento de los niveles metabólicos basales del tejido, debe suplir de todas aquellas proteínas exportables que serán utilizadas en otros lugares del organismo. Así en etapas iniciales de desarrollo, aunque se mantiene la velocidad específica de crecimiento del órgano, el hígado se ve inmerso en estado global del organismo caracterizado por un crecimiento estimulado, viendose sometido a una "presión metabólica" mayor. En estas circunstancias el incremento de los niveles de síntesis y degradación de proteínas tienen el objetivo principal, no de incrementar el depósito de proteínas propias del tejido (los valores de la eficacia de retención de proteínas són los mas pequeños que se encuentran y el comportamiento de esta frente al peso y a la K_s es totalmente contrario al del resto de parámetros), sino el de abastecer a los tejidos periféricos de proteínas exportables. A medida que el animal va creciendo y disminuyendo su capacidad de crecimiento y sus requerimientos nutritivos, las velocidades de turnover proteico van disminuyendo hasta alcanzar un nivel en el que practicamente se estabilizan. Posiblemente, sea en esta etapa del desarrollo, donde la regulación del crecimiento hepático se deba principalmente a los cambios en la velocidad de degradación, como algunos autores han sugerido.

IV.1.3. Crecimiento muscular y recambio proteico en la trucha arco iris durante el desarrollo tisular.

El músculo axial del pez, es el mayor de todos los tejidos y el principal lugar de acumulación de proteínas en la trucha (Houlihan y Laurent 1987), su velocidad de crecimiento es muy parecida a la del animal completo, e incluso la dinámica de crecimiento muscular puede determinar el crecimiento y tamaño del pez completo (Weatherley y Gill 1989, 1983, 1987a). En todas las especies, el crecimiento del músculo axial se produce por una combinación del incremento en el diámetro de fibras ya existentes y reclutamiento de nuevas fibras de pequeño diámetro.

En mamíferos, el crecimiento post-embrionario del músculo se caracteriza porque el reclutamiento de fibras cesa muy pronto, y el crecimiento posterior del músculo se produce solo por aumento en el diámetro de las fibras ya existentes (Goldspink 1972, 1980). Sin embargo, en la trucha arco iris se produce un reclutamiento sostenido de nuevas fibras hasta que eventualmente cesa, continuando el crecimiento posterior por aumento del diámetro de la fibra hasta que esa especie alcanza el tamaño final. En la trucha arco iris, diferencias en el crecimiento somático inducidas experimentalmente, se relacionan estrechamente con ajustes proporcionales entre el reclutamiento de fibras y la hipertrofia de éstas, tal que para un tamaño determinado de pez, se conserva el diseño de distribución de frecuencias de diámetros de fibras (Weatherley y Gill 1984, Weatherley et al. 1979, 1980a, Kiessling et al. 1991) encuentran en truchas grandes, reclutamiento fibrilar en todos los músculos estudiados, asociando la hipertrofia con crecimiento rápido y reclutamiento con crecimiento lento, según los autores, en estos peces el reclutamiento incrementa en importancia, pues

cuando muchas fibras han alcanzado un tamaño determinado el crecimiento posterior podría impedir el desarrollo óptimo de sus funciones metabólicas. Tanto es así que encuentran en animales de 1.4 años, de aproximadamente 800 g un fuerte aumento en el número de fibras de pequeño tamaño.

En el presente trabajo se pone de manifiesto la existencia de una alometría negativa entre la velocidad de crecimiento del músculo y el peso de este. Aunque la capacidad de crecimiento sea diferente en cada grupo de peso, en los que también difiere la velocidad de descenso de la K_G a lo largo del tiempo del experimento, en todos los grupos se mantiene el tipo de relación entre la K_G y el peso del músculo.

En el músculo, la especial naturaleza de su crecimiento hace que los cambios en el DNA total y en la relación proteína/DNA no puedan ser interpretados fácilmente en términos de incremento en el número de células y tamaño celular, sin embargo Cheek et al. (1971) definen en términos operativos la unidad de DNA como el volumen citoplasmático controlado por un solo núcleo, y así la hipertrofia e hiperplasia pueden usarse para describir incrementos en el número y tamaño de las unidades de DNA en el músculo.

A medida que el animal va creciendo y perdiendo capacidad de crecimiento (K_G) de manera lineal con respecto al peso del músculo, se encuentra un incremento hiperbólico en el número de núcleos y en el tamaño celular que coincide con un descenso en la concentración de RNA y DNA, que en el caso del RNA está linealmente relacionada con el peso del músculo.

El incremento en el tamaño de la unidad de DNA presenta dos fases, una primera comprendida entre animales con un peso entre 7 y 65 g en la que se produce un fuerte incremento de casi tres veces los valores iniciales, mientras que posteriormente, hasta los 420 g, el tamaño celular crece más lentamente.

Mientras tanto coincidiendo con este pequeño incremento en el tamaño de la unidad citoplasmática controlada por un solo núcleo, el número de núcleos entre animales de 65 y 420 g aumenta casi 4.5 veces. Es decir, a partir de los 65 g el crecimiento va a producirse principalmente por incremento en el número de núcleos.

Bastrop et al. (1992), utilizando la misma metodología que la empleada en este trabajo, encuentran que la concentración de RNA muscular (mg/g) aumenta desde 0.95 hasta 1.97 mg/g, en animales a los que se les incrementa la ración de alimento desde 0.4 a 2.0 % del peso corporal, encontrando una correlación positiva entre la velocidad de crecimiento específica y la concentración de RNA en este tejido.

La concentración de RNA y DNA en el músculo blanco de truchas inmaduras es significativamente mayor que en truchas maduras, a 395 días de la fertilización (Fergusson 1992).

Waterlow et al. (1978) estudiando el desarrollo del músculo esquelético en ratas en crecimiento coincidiendo con un aumento en la masa total de proteínas, encontraron un incremento en el tamaño de la unidad de DNA y una tendencia a la disminución en la concentración de RNA. Resultados todos ellos concordantes con los encontrados en este estudio.

A medida que la trucha va aumentando de peso, la K_S desciende de manera lineal mientras que la C_S cae según una curva potencial, en relación al peso del animal.

Mientras que se estimula la eficacia de síntesis proteica (K_{RNA}) al pasar el animal de los 7 a los 65 g manteniéndose posteriormente, la K_{DNA} muestra un comportamiento especial, subiendo hasta que el animal pasa los 65 g y descendió posteriormente. El incremento en la cantidad de proteínas sintetizadas

por unidad de DNA se produce hasta que la unidad de DNA alcanza casi su máximo tamaño, de manera que el posterior incremento en el número de núcleos es el responsable de que disminuya la K_{DNA} .

Además de los estudios de Waterlow et al. (1978), varias veces mencionada en mamíferos en los que se describe una tendencia a la disminución de la K_S y en la concentración de RNA con la edad, mientras la K_{RNA} y K_{DNA} permanecen constantes. Davis et al. (1989) en estudios in vivo con músculo de rata en crecimiento encuentran elevados incrementos en la cantidad total de proteína sintetizada por día con importantes descensos (2 a 3 veces) en la K_S resultado de una disminución progresiva en la C_S , mientras que la K_{RNA} aumenta. Estos últimos resultados coinciden con los encontrados en trabajos iniciales (Kelly et al. 1984, Lewis et al. 1984, Millward et al. 1975).

En la trucha arco iris, estudios anteriores (Houlihan et al. 1986, Fauconneau 1984, 1985, Dabrowski 1986, Fauconneau 1986) han puesto de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre el aumento del tamaño corporal y la disminución en la velocidad de síntesis proteica. Mientras que Houlihan et al. (1986) describieron una relación alométrica entre la K_S y el peso corporal, en este trabajo se demuestra la existencia de una relación lineal entre la K_S y el peso del músculo.

En la regulación hormonal del crecimiento del músculo participan un grupo importante de hormonas. La administración exógena de hormona del crecimiento (GH) de otras especies en salmones, producen un importante incremento en la velocidad de crecimiento (Donaldson et al. 1975), aumento del apetito y aumento de la eficacia de conversión del alimento (Gill et al. 1985). Todas estas circunstancias coinciden con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Foster et al. (1991) en truchas arcoiris el estímulo provocado por la implantación de GH, sobre la velocidad de crecimiento del animal completo estaba mediado por estimulación de la velocidad de síntesis, que en el hígado era el resultado de un aumento en la concentración RNA/proteína.

Sin embargo, existen pocas evidencias que aclaren el papel de la GH endógena en el control del crecimiento. Así, estudiando los niveles de GH en poblaciones de truchas arco iris con distintas velocidades de crecimiento, Sumpter (1992) encuentran que paradójicamente las mayores concentraciones de hormonas se encontraban en las razas que crecían más lentamente y viceversa. Además en otros experimentos encontraron cómo altas concentraciones de esta hormona se asociaban con condiciones ambientales pobres que producían velocidades de crecimiento lentas.

Parece que la acción de esta hormona en los peces puede estar mediatizada por otros factores como son la familia de factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) (Sumpter 1992) actuando a nivel de la regulación de los niveles de RNA específico (Cao et al. 1989) e incluso las hormonas tiroideas (McLatchy y Eales 1990) ya que se ha llegado a demostrar que la ingestión intraperitoneal de hormona de crecimiento provoca en la trucha arco iris aumentos plasmáticos en los niveles de T_3 y activación de la conversión de T_4 en T_3 activando la V_{max} de la 5' monodeiodinasa de microsomas hepáticos. Paralelamente, (Reddy y Lam 1992 y Reddy et al. 1992) han implicado directamente a las hormonas tiroideas en el crecimiento larvario y el desarrollo de tilapia (*Oreochromis mossambicus*), demostrando una activación de la 5' monodeionidasa durante el desarrollo larvario. Las hormonas tiroideas estimulan la síntesis proteica, estimulando principalmente la C_s del tejido (Brown y Millward 1983, Brown et al. 1981, Flain et al. 1978, Jepson et al.

1981).

El grupo de Plisetskaya (Sundby et al. 1991) analizan la evolución de los niveles plasmáticos circulantes de insulina, glucagón y péptidos similares al glucagón en la trucha arco iris, salmón atlántico y salmón pacífico, en animales con diferentes pesos. Los niveles plasmáticos de insulina se correlacionaban significativamente con el peso corporal en las tres especies de salmónidos, además familias de truchas arco iris con crecimiento rápido poseían unos mayores niveles de insulina plasmática que las familias de crecimiento lento. Los niveles de glucagón y péptidos similares al glucagón fueron siempre menores que los de insulina y no se correlacionaron con el peso corporal.

Teniendo en cuenta que la insulina puede considerarse como un factor promotor del crecimiento en los peces (Mommensen y Plisetskaya 1991, Duronio y Jacobs, 1988), que se ha demostrado puede estimular los procesos de síntesis proteica (Jefferson y Kimball 1989, Fuller y Sugden 1986, Sugden y Smith 1982) y que se relaciona a la insulina con la movilización de los aminoácidos desde los órganos periféricos y espacios extracelulares hacia el músculo donde el influjo preferencial de estos aminoácidos es el de servir de material precursor para la síntesis y el depósito proteico (Matty and Lone 1985, Ablett et al. 1981a,b); aunque la demostración directa de la relación entre los cambios observados en el crecimiento y en el turnover proteico asociado con el tamaño del animal necesite posteriores demostraciones experimentales, puede ser una buena hipótesis de partida.

IV.1.4. Influencia del peso corporal sobre las actividades serina deshidratasa y tirosina aminotransferasa en el hígado y músculo blanco de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

La evolución de las actividades SerDH y TyrAT hepáticas y TyrAT muscular a medida que el animal va aumentando de peso, es muy similar a la observada para la ingesta relativa de proteína (mg/g/día) así como para las velocidades de recambio proteico. Etapas caracterizadas por una mayor disponibilidad de aminoácidos y elevadas velocidades de síntesis y degradación, se corresponden con altos valores de V_{max} . El posterior descenso en el recambio metabólico así como en la ingesta es paralelo al descenso en la V_{max} de estas enzimas. Estos cambios en la V_{max} se producen sin afectar prácticamente a los valores de K_m , ni a los de la relación $V_{subsaturante}/V_{max}$. Esto hace suponer que sean debidos a la inducción de la síntesis de nuevas moléculas de enzimas más que a la activación de moléculas preexistentes.

En la rata, el gen de la TyrAT hepática durante el desarrollo fetal y en los primeras etapas de vida, está sometido a diferentes niveles de regulación. La expresión de la TyrAT está virtualmente ausente en el feto, la actividad enzimática (Sereni et al. 1959) y el RNAm (Perry et al. 1983, Rothrock et al. 1987) se acumulan después del nacimiento, cuando la transcripción del gen está activada (Rothrock et al. 1987). En la trucha arco iris se observa una respuesta paralela, a lo largo de los distintos pesos, de la actividad TyrAT y la capacidad de síntesis proteica (C_s), tanto del hígado como en el músculo coincidiendo altos valores de C_s , índice evidente de una transcripción general estimulada, en las primeras etapas con altas actividades enzimáticas. La transcripción de la TyrAT

puede también estimularse por los glucocorticoides (Granner y Bale 1985, Schmid et al. 1987) y glucagón (Hashimoto et al. 1984, Schmid et al. 1987), parece que ambos estímulos están implicados en el desarrollo de la activación del gén (Ruiz-Bravo y Ernest 1982).

Estudiando los procesos de inducción enzimática y genética a la que se ve sometida la SerDH de hígado de rata al cambiar la administración de una dieta con una alta concentración de proteínas y otra sin ellas, se encuentra que en este último caso existe una pérdida inmediata del RNAm específico y un descenso más lento de la actividad.

Las etapas iniciales de desarrollo, caracterizadas por un elevado aporte de aminoácidos a los tejidos procedentes en el caso del hígado además de la dieta, de la elevada degradación endógena de proteínas, la actividad SerDH y TyrAT se encuentran estimuladas. Esta activación de enzimas que catabolizan aminoácidos debe contemplarse inmersa en un estado metabólico activado. Tanto procesos de síntesis como de degradación se encuentran potenciados, unos para sintetizar proteínas y demás compuestos celulares demandados por la formación de nuevas células y otros para suplir de la energía necesaria a todos estos procesos de síntesis.

IV.2. REGULACION NUTRICIONAL DEL TURNOVER PROTEICO EN EL HIGADO Y MUSCULO BLANCO DE LA TRUCHA ARCO IRIS (Oncorhynchus mykiss).

IV.2.1. Efecto de la proteína.

IV.2.1.1. Crecimiento y recambio proteico.

Las proteínas ingeridas se utilizan por los peces como fuentes de energía y masa corporal, de manera que para una alimentación y crecimiento óptimo es un requisito importante la existencia de un aporte apropiado de proteína dietaria. A diferencia de otros vertebrados, los peces requieren entre un 30 y un 50 % de proteína dietaria para alcanzar velocidades de crecimiento máximas (Cowey y Luquet 1983, Tacon y Cowey 1985, Wilson y Halver 1986, Cowey 1992), aunque su utilización neta sea mucho menor que la de muchos mamíferos (Rumsey 1981, Bowen 1987) ya que una gran porción de la proteína ingerida se cataboliza rápidamente. De acuerdo con el concepto de "anabolic drive" (Millward 1989), los componentes nutritivos de la dieta deben satisfacer no solo los requerimientos básicos para el mantenimiento y crecimiento del animal, sino también proveer a los procesos reguladores, particularmente los asociados con el metabolismo muscular.

Una segunda vía de aporte de aminoácidos, además de los procedentes de la dieta, es la degradación de proteínas intracelulares. En los peces, menos de la mitad del pool total disponible de aminoácidos para la síntesis proteica se deriva de la degradación intracelular (Cowey y Luquet 1983), mientras que en mamíferos, esta cantidad es casi el 80 %. Por esto la contribución de los

aminoácidos procedentes de la dieta al pool intracelular total es mayor en peces que en mamíferos y así, las variaciones en el contenido de proteínas dietarias pueden tener una influencia directa sobre el pool intracelular de aminoácidos y así sobre la velocidad de síntesis proteica (Lied y Braaten 1984).

La administración de una dieta baja en proteínas produce una significativa disminución en la disponibilidad de precursores proteicos debido a una caída en la disponibilidad de precursores proteicos producida por el descenso en la conversión del alimento (FE) y así una disminución paralela en la capacidad de crecimiento del animal completo, hígado y músculo blanco, a lo largo del período experimental. En el hígado, la reducción del aporte de proteínas dietarias provoca un descenso significativo en el valor de K_G como consecuencia de una disminución en la eficacia de retención de proteínas (ERP). En el músculo blanco, sin embargo, una considerable caída en el valor de K_G fue paralela a una disminución en la K_S , C_S , K_{DNA} , y K_{RNA} . La ERP no varió significativamente.

Las significativas diferencias en las curvas de crecimiento del animal completo, músculo blanco e hígado de acuerdo con la dieta, indican una caída suficiente en el contenido de sustratos dietarios para interferir con la respuesta anabólica del pez e impide su crecimiento.

El menor aporte de aminoácidos exógenos al hígado, produce un ligero descenso en los valores de la K_G y de la ERP. Cowey (1975) mostró que la incorporación de aminoácidos marcados al hígado y a las proteínas de la carcasa no se afecta por el contenido proteico de la dieta. Este comportamiento hepático probablemente refleja el hecho de que la fracción del turnover proteico dedicado al mantenimiento de las funciones orgánicas en este tejido es más importante que la asociada con la retención de proteínas o crecimiento. De hecho, el

turnover proteico en el hígado es mayor que en el músculo y la K_S y la K_D tienden a incrementar con una dieta baja en proteínas, mientras que la K_G y la ERP significativamente disminuye. El metabolismo de las proteínas hepáticas se comporta de forma distinta al muscular, especialmente en aquellas situaciones que implican stress nutricional, en las que algunas hormonas pueden mediar una respuesta directa hacia el mantenimiento del metabolismo proteico, especialmente la síntesis de proteínas exportables (Matty y Lone 1985) en detrimento del crecimiento muscular.

En el músculo blanco, no se observaron cambios significativos bajo condiciones dietarias restringidas, manteniéndose los altos niveles de depósito proteico implicados en el crecimiento muscular y reflejados en los valores de ERP. La significativa caída en la capacidad de crecimiento coincide con una igualmente significativa disminución en la velocidad (K_S), capacidad (C_S) y eficacia (K_{RNA}) de síntesis así como en los valores de la K_{DNA} . Bajo estas condiciones proteicas, la síntesis en el músculo está muy deprimida pero la eficacia de retención de proteínas y el diseño del crecimiento de este tejido fue similar a las obtenidas con una dieta alta en proteínas, de acuerdo con el papel principal de este tejido, que consiste en el mantenimiento de altos depósitos proteicos. De acuerdo con Fauconneau (1985), la síntesis de proteínas muscular en la trucha arco iris es alterada por cambios cualitativos en los componentes de la dieta, tal que un desequilibrio en el contenido de aminoácidos producirá una modulación en el valor de K_S .

Los resultados de este tejido están de acuerdo con los recogidos por Jeptson et al. (1988), que sugieren que en el músculo esquelético un incremento en la proteína dietaria estimula el depósito de proteínas incrementando la C_S , probablemente mediada por el efecto de la T_3 y por la familia de factores

semejantes a la insulina. Además, un aumento de la proteína dietaria, incrementa la concentración plasmática de insulina, que causa una aguda estimulación de la K_{RNA} .

Es evidente que una alta velocidad de crecimiento depende de una alta velocidad de turnover proteico, y que un incremento en la velocidad de síntesis (K_S) se asocia con altas velocidades de degradación (K_D), como demuestran Houlihan et al. (1988, 1989) para peces. Estas observaciones no son aplicables al hígado, el cual se comporta de forma diferente debido a su papel central en el metabolismo del animal completo; presentando una alta velocidad de turnover proteico, con solo una pequeña fracción de la síntesis proteica dedicada hacia el crecimiento. La adaptación a una baja ingesta de alimento y/o de proteínas implica la adaptación del eje hígado/músculo blanco, donde las proteínas almacenadas en el músculo blanco se usan por el hígado para adaptar el organismo al mantenimiento de las funciones básicas, probablemente los glucocorticoides sean las principales hormonas responsables de esta respuesta adaptativa (Matty y Lone 1985).

En mamíferos se ha observado (Millward et al. 1975, 1976) la disminución en la síntesis de proteínas muscular en respuesta a un bajo contenido energético y proteico de la dieta. En los peces, se ha encontrado una correlación entre la capacidad de síntesis proteica y la ingesta energética en términos de ración de ingesta (Roselund et al. 1984, Bastrop et al. 1992). De hecho, por encima de ciertos niveles, la velocidad de depósito proteico incrementa con incrementos en la ingesta energética y proteica (Lied y Braaten 1984, Reeds 1989).

IV.2.1.2. Actividad SerDH del hígado de la trucha

arco iris.

En mamíferos, la alanina y la serina son cuantitativamente los aminoácidos glucogénicos más importantes. La velocidad de desaminación de los aminoácidos es uno de los factores que determinan la extensión de su utilización para la producción de glucosa.

La alanina, la serina y la glicocola pueden transformarse en glucosa o glucógeno en la trucha arco iris, la anguila y la tenca (Cowey et al. 1977a, Walton y Cowey, 1970a,b, Hayashi y Ooshiro 1977, 1970, Renand y Moon 1980, Demaël-Suard et al. 1974, Mosse et al. 1980).

El valor relativamente alto de las Km de los enzimas que degradan aminoácidos permite la respuesta de estos a un rango de concentraciones variable en el aporte de sustratos.

La alimentación con una dieta pobre en proteínas provoca un importante aumento en la velocidad de degradación de las proteínas hepáticas. Paralelamente se muestra una activación importante de la actividad SerDH.

Parece que el incremento en el catabolismo de la serina es paralelo a la existencia de una degradación proteica estimulada, más que a un menor aporte de aminoácidos plasmáticos ocasionado por el descenso de la ingesta proteica. En relación con este comportamiento, Morris y Peraino (1976) estudiando la actividad serina deshidratasa y ornitín aminotransferasa en el hígado de rata in vivo, encuentran una asociación funcional de la SerDH con procesos catabólicos en general, encontrando una estrecha relación entre respuesta catabólica del órgano y las fluctuaciones de los niveles de síntesis de SerDH en respuesta a los glucocorticoides, sugiriendo que los cambios producidos en este enzima son

parte del proceso por el cual se produce el balance negativo de nitrógeno típico de esta situación.

IV.2.2. Efecto de la grasa sobre las velocidades de síntesis y degradación de proteínas.

La disminución de un 10 % en la concentración de grasa dietaria, que se tradujo en una diferencia de un 55 % de la ingesta total y sin producir modificaciones en el aprovechamiento de la dieta y la proteína se tradujo en diferentes efectos sobre el comportamiento de la velocidad de recambio proteico según se trate del hígado o del músculo.

En el hígado, manteniéndose los niveles proteicos (40 %), la disminución en la ingesta lipídica provoca un descenso en la K_S , K_D y K_{RNA} , mientras que la eficacia de retención de proteínas propias aumenta. Es decir, con una concentración de grasa en la dieta menor, el hígado encauza el metabolismo proteico hacia un mayor depósito propio, reduciendo tanto la síntesis de proteínas exportables como la degradación de proteínas fijas. La menor síntesis de proteínas exportables y por lo tanto de albúmina puede entenderse relacionado con la menor concentración de ácidos grasos libres esperada en una situación de ingesta lipídica deprimida.

En el músculo blanco, el descenso en la ingesta lipídica solo se traduce en un incremento en los niveles de RNA tanto por unidad de proteínas (C_S) como por unidad de DNA (RNA/DNA), manteniéndose el resto de parámetros sin modificaciones aparentes.

En muchos peces, especialmente especies marinas, la composición de ácidos grasos de los tejidos y particularmente e los depósitos de grasa, mantiene

un importante parecido con la del alimento (Kelly et al. 1958; Lovern 1965; Owen et al. 1972). En ambientes naturales, la ingesta de carbohidratos de muchas especies es baja, pero comparativamente la ingesta de grasas es alta. La limitada ingesta de carbohidratos como precursores de la lipogénesis, junto con una abundancia de lípidos, implica solo una moderada capacidad para la lipogénesis (Walton y Cowey 1982).

La adición de grasas a dietas basadas en fuentes proteicas pobres, promueve el crecimiento (Phillips et al. 1950, 1953, 1956 y 1964, Atherton y Aitken 1970), contribuyendo a la economía de la proteína incrementando la energía digestible de las dietas (Watanabe et al. 1979, Cho y Kaushik 1985). En el hígado, existen evidencias que demuestran que el incremento en el nivel de grasa dietaria es proporcional a la cantidad de grasa ingerida (De la Higuera et al. 1977) pudiendo llegar a producir efectos no deseables la acumulación excesiva de lípidos.

Existen evidencias experimentales que indican la existencia de una correlación recíproca entre la disponibilidad de ácidos grasos y las velocidades de síntesis proteicas (Martín-Requero et al. 1979, 1986). En células aisladas de rata, la concentración de ácido oléico provocó una significativa inhibición de la síntesis proteica (Gonzalez-Manchón et al. 1990).

Nuestros resultados demuestran que no siempre las combinaciones mayores de carbohidratos y grasas son las que producen los mejores efectos sobre la capacidad de crecimiento en los peces. Se pone de manifiesto que una menor concentración de grasas combinadas con adecuadas cantidades de carbohidratos y proteínas fué capaz de provocar los mejores crecimientos hepáticos.

IV.2.3. Efecto de los carbohidratos sobre las velocidades de síntesis y degradación de proteínas.

Entre las sustancias que sirven de combustibles metabólicos de la mayoría de los tejidos, los carbohidratos revisten especial importancia. En salmónidos, al igual que en muchos peces, los carbohidratos son relativamente poco utilizados por el animal, y las evidencias sugieren que las proteínas y los lípidos son las principales fuentes de energía (Atleston y Aitken 1970, Pieper y Pfeffer 1978, Créach y Serfaty 1974, Mommsen et al. 1980). Phillips (1969) sugirió que el 70 % de las calorías dietarias en la alimentación de la trucha proceden de la proteína, movilizándose un alto porcentaje de proteína utilizada para la síntesis proteica corporal. La principal función del metabolismo de los carbohidratos es proveer de energía y precursores a las reacciones de síntesis y los mecanismos de oxidación/reducción. Los peces controlan mal los niveles plasmáticos de glucosa. Cowey et al. (1977a) calculan en un 19 % el reciclaje de la glucosa, siendo las necesidades diarias de 50 mg/100 g de pez. Así, los peces tienen bajas necesidades de glucosa y la utilizan mucho menos que los mamíferos. El exceso de carbohidratos ingeridos tienden a acumularse en forma de glucógeno (Walton y Cowey 1982). La gluconeogénesis en los peces es importante como medio de producción de glucosa, llegando incluso a exceder las necesidades de este compuesto en el salmón (Walton y Cowey 1982).

La eliminación de los carbohidratos de la dieta provoca un importante y significativo descenso en la eficacia de utilización de la dieta y de la proteína para el crecimiento. Como consecuencia de un fuerte descenso en el tamaño celular, el incremento de peso es muy pequeño, el menor de todas las situaciones ensayadas, aunque la K_G del día en que se calculó la velocidad de síntesis no

muestra diferencias significativamente apreciables. Aunque fruto de este descenso en el tamaño celular la concentración de RNA y DNA aumenta, la cantidad de RNA por célula, disminuye con respecto a los valores obtenidos para la dieta A y C.

En esta situación, los valores de las velocidades de degradación y síntesis, así como los de la C_s están muy altos, mientras que la eficacia de retención de proteínas alcanza los valores más bajos de todos los encontrados. Posiblemente el tejido aumentando la velocidad y capacidad de síntesis intenta contrarrestar el importante efecto degradativo a que se está viendo sometido como consecuencia de las demandas externas de glucosa.

Los aminoácidos, procedentes bien de la dieta o bien de la degradación de las propias proteínas corporales son importantes fuentes de glucosa. Esta importancia queda patente en el presente trabajo. La carencia de la ingestión de carbohidratos provoca además de un pobre aprovechamiento de la dieta y de la proteína por parte del animal completo, importantísimos cambios metabólicos en el hígado, paralelamente al descenso en el tamaño celular, responsable de la existencia de un incremento de peso/día muy bajo, se estimula la degradación y la síntesis de proteínas, aunque la eficacia de retención proteica estuvo significativamente disminuida en este tejido. El objetivo principal del incremento en el aporte de aminoácidos será la síntesis de moléculas de glucosa imprescindibles como combustibles metabólicos en otros tejidos. Es de destacar la fuerte inducción que sufre la actividad TyrAT hepática, aumentando sus niveles más de un 100 % al alimentar al animal con este tipo de dieta.

En el músculo blanco, coincidiendo con el comportamiento hepático se encontró un incremento en el valor de las velocidades de degradación, que coincidió con un descenso en el tamaño de la unidad de DNA y en la relación

RNA/DNA.

Aunque los carbohidratos dietarios no se utilicen con la eficacia que en otras especies, queda demostrada la necesidad de su presencia en una cantidad suficiente en cualquier dieta que pretenda cubrir los requerimientos mínimos necesarios para alcanzar un crecimiento óptimo.

IV.2.4. Ayuno y Realimentación.

IV.2.4.1. Velocidades de turnover proteico.

El principal efecto del ayuno a largo plazo sobre las velocidades de crecimiento se tradujo en una importante pérdida de masa corporal. En el hígado, aunque existió una fuerte pérdida de masa tisular, la K_S se mantuvo en niveles altos. Sin embargo, la síntesis total es solo un 33 % a la de animales alimentados, mientras tanto, la K_D se estimuló de forma importante. La concentración de RNA y DNA por gramo de tejido aumentó, disminuyendo el número total de núcleos y el tamaño celular. La realimentación produjo que los niveles de la K_S , K_{RNA} , y K_{DNA} subiesen incluso por encima del encontrado para animales continuamente alimentados. Aunque la velocidad de crecimiento del hígado se estimula en gran medida, la ERP no supera los valores de animales continuamente alimentados.

La respuesta del músculo es diferente a la del hígado, de manera que la importante pérdida de masa muscular coincidió con un descenso muy fuerte en la K_S , C_S , K_{RNA} y K_{DNA} y un aumento en la K_D . La realimentación durante nueve días con la misma dieta utilizada para los animales continuamente alimentados se tradujo en el inicio del restablecimiento de los niveles encontrados en

animales controles. El incremento moderado en la K_S fruto de una estimulación de la K_{RNA} y el mantenimiento de la ERP tisular permitió un crecimiento moderado, aún no en los mismos niveles que los encontrados en animales continuamente alimentados.

El mantenimiento de los valores de K_S coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Smith y Haschemeyer 1980, Haschemeyer 1983, Pocrnjic et al. 1983, Smith 1981, Loughna y Goldspink 1984) que tampoco encuentran cambios significativos de la síntesis proteica durante el ayuno. McMillan y Houlihan (1992) en ayunos prolongados (4-6 días) encontraron que la K_S aumentó compensando el descenso observado en ayunos iniciales, paralelamente se produjo un incremento en la velocidad de degradación.

La reserva de proteínas que supone el hígado es muy limitada. En mamíferos sometidos a un ayuno a largo plazo, se demostró que existía una tendencia a estabilizar la masa de proteínas hepáticas, de manera que aunque la velocidad de síntesis de albúmina pareciese protegida durante un corto tiempo, después caía progresivamente (Waterlow et al. 1978). Durante el ayuno o en situaciones de largos periodos de ingestas energéticas restringidas, la K_S de las proteínas hepáticas fijas se mantuvieron a un buen nivel, alrededor del normal, mientras que la K_D podía ser alta. Kirsch et al. (1968) al realimentar a ratas deplecionadas en proteínas observaron como la velocidad de síntesis de albúmina, inmediatamente alcanzaba un valor superior al normal, la degradación se elevaba más lentamente, produciéndose una síntesis neta de albúmina.

Aunque McMillan y Houlihan (1988) encontraron una respuesta transitoria de las velocidades de síntesis proteica a la realimentación tras seis días de ayuno, en trabajos posteriores (McMillan y Houlihan 1992) observaron incrementos en la K_S tras 1.5, 3 y 6 horas de realimentación, no encontrando

cambios significativos en la C_s durante este periodo, concluye que la alteración en la K_{RNA} puede ser la responsable de este comportamiento.

Los resultados de este trabajo están de acuerdo con los encontrados por Martin (1990) estudiando los cambios en el turnover proteico que se produjeron durante la maduración sexual del salmón atlántico, encontrándose valores elevados de K_s en el hígado, después de cuatro meses de ayuno. Las proteínas hepáticas continuaron su recambio aunque la pérdida proteica global fuese muy elevada. En el músculo blanco, se observaron altos valores de la velocidad de degradación, siendo el diseño global del comportamiento de este tejido el de una gran pérdida de proteína acompañada por un continuo turnover.

El comportamiento del músculo blanco fué diferente al del hígado, demostrando ser un tejido más sensible al ayuno, observándose fuertes descensos en la síntesis y paralelos incrementos en la degradación tras quince días de ayuno (Smith 1981, Loughna y Goldspink 1984). Lied et al. (1982) (1983), encontraron que en el músculo del bacalao ayunado 3, 5 u 8 días el descenso en la velocidad de incorporación de aminoácidos a los ribosomas, volviendo a su nivel normal tras la realimentación.

Paralelamente a estos cambios, se han encontrado alteraciones en los niveles hormonales y de metabolitos en teleósteos durante la alimentación y el ayuno.

Los cambios a corto plazo en la síntesis proteica después de la alimentación están seguidos muy estrechamente con cambios conocidos en los niveles de insulina plasmática (Ince 1983). Se ha encontrado que la insulina es un potente activador de la síntesis de proteínas en peces (Ablett et al. 1981a,b).

Otro factor regulador importante de la síntesis de proteínas hepática es el aporte de aminoácidos dietarios (Preedy y Garlick 1986). En los peces, en este sentido los resultados son contradictorios. En general, se ha sugerido que el pico

de aminoácidos esenciales ocurre algunas horas después de las comidas (Walton y Wilson 1986) cuando la síntesis proteica está disminuyendo. Esto podría sugerir que el aporte de aminoácidos esenciales no es un regulador primario de la síntesis de proteínas en la trucha, además el incremento en la síntesis proteica con el ayuno prolongado también argumenta en contra de esta posible dependencia.

El status de hormonas tiroideas en teleósteos también exhibe un ciclo alimentación/ayuno. Sin embargo, aunque los niveles de T_3 son mayores en truchas alimentadas que ayunadas, existen contradicciones en la literatura sobre la aparición de incrementos asociados con la alimentación de la T_3 plasmática (Matty y Love 1985) aunque un rápido incremento de esta (menos de tres horas) se ha identificado en truchas realimentadas (Cook y Eales 1987).

Bajo la realimentación parece existir una hiperestimulación de la síntesis proteica del hígado sobre los valores de animales continuamente alimentados. Aunque tanto los niveles de T_3 e insulina pueden incrementarse en escalas de tiempos similares, las razones para esta hiperestimulación permanecen por investigar.

Otro posible elemento implicado en esta respuesta a la realimentación son las prostaglandinas, encontrándose que bloqueando la síntesis de estas hormonas con indometacina en branquias de trucha arco iris (McMillan y Houlihan 1988) se inhibía la estimulación provocada por la realimentación. El no encontrar el mismo efecto en otros tejidos, según estos autores, puede ser debido a que son las branquias el sitio más activo de síntesis de estas hormonas (Henderson et al. 1985).

IV.2.4.2. Actividades SerDH y TyrAT.

El ayuno en los mamíferos tiende a incrementar los niveles de las enzimas que degradan aminoácidos. De manera similar, alanina aminotransferasa (Storer 1967, Mann 1972, Créach y Serfaty 1974) y aspartato aminotransferasa (Larsson y Lewander 1973, Créach y Serfaty 1974) incrementaron cuando los peces ayunan. Whiting y Whiggs (1977) encontraron que los niveles de tirosina aminotransferasa incrementaban en truchas ayunadas.

Una situación de ayuno prolongado, provocó importantes incrementos en las actividades SerDH y TyrAT hepáticas y TyrAT muscular, que revierten a sus valores controles tras nueve días de realimentación.

En todos los casos, la naturaleza de los cambios observados en las actividades SerDH y TyrAT hepáticas y TyrAT muscular parecen ser la síntesis de nuevas moléculas de enzima más que la activación de las preexistentes.

En esta situación tisular en la que se está perdiendo una alta cantidad de proteínas y la velocidad de degradación está muy elevada, puede entenderse que el incremento observado en las actividades de estas enzimas sea parte de la respuesta de estos tejidos ante un largo periodo de carencia de aminoácidos.

CONCLUSIONES

1. Teniendo en cuenta el problema que supone la utilización de una metodología experimental que intenta relacionar varios parámetros del recambio proteico obtenidos a diferentes unidades de tiempo, se han introducido, bajo nuestras condiciones experimentales, modificaciones en las medidas de las velocidades fraccionarias de síntesis y degradación proteicas permitiendo minimizar los problemas relacionados con la incorporación de la radiactividad específica a los diferentes tejidos y logrando que ésta sea lineal a lo largo del tiempo. Con ello se ha conseguido un método de alto rendimiento y precisión y gran reproducibilidad siendo esta la primera vez que, además del resto de parámetros, se ofrecen valores fiables de las velocidades de degradación de proteínas.

2. En el hígado de la trucha, las velocidades de síntesis y degradación de proteínas y la capacidad de síntesis disminuyeron con la edad del animal sin que se aprecien variaciones en la eficacia de síntesis proteica y por tanto en la tasa de crecimiento del tejido hepático. A pesar de este comportamiento, la eficacia de retención proteica presentó un perfil opuesto, siendo pequeña en los animales menores y aumentando con el peso hasta estabilizarse posteriormente como consecuencia de una mayor síntesis hepática de proteínas dedicadas a la exportación característica de los animales de menor edad.

3. El comportamiento del recambio proteico en el músculo blanco de la trucha con la edad fué en determinados aspectos diferente al del hígado. **Primero**, los valores absolutos de la velocidad y capacidad de síntesis de proteínas fueron extraordinariamente menores que los del hígado, aunque también disminuyen a lo largo de la edad del animal, siendo prácticamente cero los valores de las velocidades de degradación proteicas en todos los casos. **Segundo**, la tasa de crecimiento muscular, reflejo del animal complejo, disminuyó en todo el rango de peso estudiados. **Tercero**, los valores de eficacia de retención proteica en el músculo fueron extraordinariamente mayores que los del hígado y semejantes en todos los animales sin que se aprecien cambios con la edad. **Cuarto**, los valores de eficiencia de síntesis proteica aumentaron a lo largo del rango de pesos, siendo más altos en los animales de mayor peso donde la velocidad de síntesis era menor con objeto de mantener elevados los valores de retención proteica.
4. Como cabría esperar, la disminución de los niveles de proteína dietaria alteró significativamente los principales parámetros del recambio proteico en hígado y músculo blanco de la trucha aunque ambos tejidos presentan un comportamiento diferencial. En el hígado, la disminución de la proteína en la dieta produjo una inhibición de la tasa de crecimiento y de la eficacia de retención proteica provocando una importante reducción en el incremento diario de peso. Todo ello sin que variasen los valores del resto de los parámetros relacionados con el recambio proteico. Por el contrario, en el músculo blanco y de acuerdo con su comportamiento se mantuvo constante y alto el valor de eficacia de retención de proteica,

a pesar de la disminución de la tasa de crecimiento muscular, velocidad, capacidad y eficacia de síntesis y cantidad de proteína sintetizada por unidad celular responsables, por otra parte, de la reducción del 80 % en el incremento diario de peso muscular.

5. Cambios en los niveles dietarios de grasas provocaron variaciones en el comportamiento del recambio proteico de hígado y músculo de la trucha. En el hígado, esta situación nutricional no modificó la tasa de crecimiento ni el incremento diario de peso, aunque debido a la menor disponibilidad de energía en la dieta se redujeron significativamente la velocidad de síntesis y degradación de proteínas reflejándose en una disminución de la eficacia de síntesis proteica. En el músculo blanco, a pesar de la disminución de la grasa de la dieta, se mantuvo la eficacia de retención proteica gracias a un aumento significativo en la capacidad de síntesis, manteniéndose la tasa de crecimiento y el incremento diario de peso muscular.
6. La ausencia de carbohidratos produjo en el hígado de la trucha una disminución en la eficacia de retención de proteínas probablemente debido a la forzada desviación de parte de los aminoácidos de la proteína de la dieta para la síntesis de carbohidratos. Este comportamiento fue el responsable de la disminución en el incremento diario de peso. En el músculo blanco, la ausencia de carbohidratos provocó un aumento significativo de la velocidad de degradación proteica permitiendo una ligera disminución en la tasa de crecimiento y una reducción significativa del incremento diario de peso muscular.

BIBLIOGRAFIA

-
- Ablett, R.F.; Sinnhuber, R.O.; Holmes, R.M y Selivonchick, D.P. (1981a).**
Gen.Comp. Endocrinol., **43**:211-217
- Ablett, R.F.; Sinnhuber, R.O. y Selivonchick, D.P. (1981b).** *Gen. Comp. Endocrinol.*, **44**:418-427.
- Adeola, O.; Young, L.G.; McBride, B.W. y Ball, R.O. (1989).** *Br.J.Nutr.*, **61**:453-465.
- Addis, T.; Poo, L.J. y Lew, W. (1936).** *J.Biol.Chem.*, **115**:111-116.
- Adibi, S.A. (1971).** *Am.J.Physiol.*, **221**:829-838.
- Adibi, S.A. y Drash, A.L. (1970).** *J.Lab.Clin.Med.*, **76**:722-732.
- Adibi, S.A.; Modesto, T.A.; Morse, E.L. y Amin, P.M. (1973).** *Am.J.Physiol.*, **225**:408-414.
- Alexis, S.D. y Young, V.R. (1973).** *Biochem.J.*, **136**:773-780.
- Alexis, S.D.; Basta, S. y Young, V.R. (1972).** *Biochem.J.*, **128**: 521-530.
- Alexis, S.D.; Young, V.R. y Gill, D.M. (1974).** *Biochem.J.*, **142**: 185-188.
- Alleyne, G.A.O.; Hay, R.W.; Picou, D.L.; Stanfield, J.P. y Whitehead, R.G. (1977).** Protein energy malnutrition. Edward Arnold, London.
- Amils, R.; Conde, R.D. y Scornick, O.A. (1977).** *Biochem.J.*, **164**:363-369.
- Anasuya, A. y Narasinga Rao, B.S. (1970).** *Br.J.Nutr.* **24**:97-107. **Aoki, T.T.; Brennan, M.F.; Muller, W.A. y Cahill, G.F. (1974).** *Adv.Enzyme Reg.*, **12**: 3-10.
- Aoyagi, Y.; Muramatsu, T. y Okumura, J. (1990).** **10**:627-634.
- Arnal, M. (1977).** *Proc. 2nd Int. Symp. EAAP Publ N°22*, pp 35-37. The Netherlands.
- Arnal, M.; Ferrara, M. y Fauconneau, G. (1976).** *Proc. IAEA Symp.* pp 393-

401. Viena, Austria.
- Arnal, M.; Ferrara, M. y Fauconneau, G.** (1978). *Proc. 29th EAAP Annual Meeting*, pp 1-6.
- Arnal, M.; Obled, C. y Attaix, D.** (1983). In: *Protein metabolism and nutrition*. M. Arnal, R. Pion y D. Bonin (Eds). **Vol.I**, pp 117-136. INRA, París, Francia.
- Ashworth, A.** (1969). *Br.J.Nutr.*, **23**:835-845.
- Ashworth, A.; Bell, R.; James, W.P.T. y Waterlow, J.C.** (1968). *Lancet* **ii**:600-603.
- Augustine, S.L. y Swick, R.W.** (1977). *Fed.Proc.*, **36**:3416.
- Ayuso, M.S.; Vega, P.; Manchon, C.G. y Parrilla, R.** (1986). *Biochim. Biophys.Acta*, **883**:33-40.
- Ayuso-Parrilla, M.S.; Martín-Requero, A.; Pérez-Díaz, J. y Parrilla, R.** (1979). *J.Biol.Chem.*, **251**:7785-7790.
- Ballard, F.J.** (1982). *Biochem.J.*, **208**:275-
- Barka, T.** (1970). *Exp.Cell.Res.*, **62**:50-55.
- Barka, T.** (1972). *Exp.Cell.Res.*, **74**:439-449.
- Bates, P.C. y Millward, D.J.** (1983). *Biochem.J.*, **214**:587-592.
- Beamish, F.W.H.** (1974). *J.Fish.Res.Board. Can.*, **31**:1763-1769.
- Benevenga, N.J.; Harper, A.E. y Rogers, Q.R.** (1968). *J.Nutr.* **95**:434-444.
- Bergen, W.G.** (1974). *J.Anim.Sci.*, **38**:1079-1082.
- Biggs, R.B. y Booth, F.W.** (1990). *Am.J.Physiol.*, **258**:H207-H211.
- Black, D. y Love, M.** (1986). *J.Comp.Physiol.*, **156**:469-479.
- Blodel, G. y Potter, V.R.** (1968). *Biochim.Biophys.Acta*, **166**:48-57.

-
- Bohrer, R.N. y Lampert, W.** (1988). *Functional Ecol.* **2**:463-471.
- Botbol, V. y Scornik, O.A.** (1985). In: *Intracellular protein catabolism*, Khairallah, E.A.; Boud, J.S. y Bird, J.W.C. (Eds). pp 573-583. Alan R. Liss. Nueva York. EEUU.
- Bouche, G. y Vellas, F.** (1975). *Comp. Biochem. Physiol.* **51A**:185-193.
- Brett, J.R.** (1978).
- Brett, J.R.** (1979). In: *Fish Physiology*, Vol. **8** pp 599-677. Randall, D.J. y Brett, J.R. Eds). Academic Press. Nueva York. EEUU.
- Brooke, O.G. y Ashworth, A.** (1972). *Br.J.Nutr.*, **27**:407-415.
- Brown, C.R.** (1988). *Tesis Doctoral*. Universidad de Texas. Austin. EEUU.
- Brown, C.R. y Cameron, J.N.** (1986). *Am.Zool.*, **26**:124A-
- Bucher, N.L.R. y Malt, R.A.** (1971). Regeneration of liver and kidney. Little, Brown y col. (Eds). Boston, Massachusetts. EEUU.
- Bur, J.A. y Conde, R.D.** (1982). *Amer.J.Phys.*, **243**:E4360-
- Cahill, G.F.Jr.** (1970). *N.Engl.J.Med.* **282**: 668-675.
- Cahill, G.F.Jr.** (1971). *Diabetes*, **20**:785-799.
- Cahill, G.F.; Herrera, A.; Morgan, A.P.; Soeldner, J.S.; Steinke, J.; Levy, P.L.; Reichard, G.A. y Kipnis, D.M.** (1966). *J.Clin.Inv.*, **45**:1751-1769.
- Cake, M.H.** (1986). *Biochem.J.*, **238**:927-929.
- Calow, P.** (1987). In: Boyle, P.R. (Ed).
- Campbell, R.M.; Fell, B.F. y Mackie, W.S.** (1974). *J.Physiol. (Londres)*, **241**:699-713.
- Campbell, J.W.; Aster, P.L. y Vorhaben, J.E.** (1983). *Am.J.Physiol.* **244**:R709-
- Canick, J.A. y Villee, D.B.** (1974). *Biochem.J.* **144**:397-403.

- Carter, W.J.; Benjamin, W.S.W. y Faas, F.H. (1984). *Biochem.J.*, **217**:471-476.
- Casey, C.A.; Perlman, D.F.; Verhaben, J.E. y Campbell, J.W. (1983). *Mol.Phys.*, **3**:107-
- Ceriotti, G. (1952) *J.Biol.Chem.* **198**:297-301.
- Chang, V.M. e Idler, D.R. (1960). *Can.J.Biochem.Phys.*
- Chatwin, A.L.; Linzell, J.L. y Setchell, B.P. (1969). *J. Endocrinol.*, **44**:247-254.
- Chee, P.Y. y Swick, R.W. (1976). *J.Biol.Chem.*, **251**:1029-1034.
- Cheek, D.B. y Hill, D.E. (1970). *Fed.Proc.*, **29**:1503-1504.
- Chen, S.C. y Young, V.R. (1968). *Biochem.J.* **106**:61-67.
- Clemens, M.J. y Pain. V.M. (1974). *Biochim.Biophys.Acta*, **361**:345-357.
- Clifford, A.; Rimallo, J.; Baliga, B.; Munro, H.N. y Brown, P. (1972). *Biochim.Biophys.Acta*, **277**:443-458.
- Cohen, J. (1974) *Circ.Res.(Supp II)*, **34**:49-57.
- Coleman, P.S.; Parmacek, M.S.; Lesch, M. y Samarel, A. (1989). *J.Mol.Cell. Cardiol.*, **21**:911-925.
- Cook, R.F. y Eales, J.G. (1987). *J.Exp.Zool.*, **242**:161-169.
- Conde, R.D. y Scornick, O.A. (1976). *Biochem.J.* **158**:385-390.
- Coward, W.A.; Whitehead, R.G. y Lunn, P.G. (1977). *Br.J.Nutr.*, **38**:115-126.
- Cowey, C.B. (1975). *Proc. Nutr. Soc.* **34**:57-61.
- Cowey, C.B. (1979b). In: *Finfish nutrition and fishfeed technology*, Halver, J.E. y Tiens, K. (Eds). Vol.1 pp 3-16. Heeneman. Berlín. Alemania.
- Cowey, C.B.; Daisley, K.W. y Perry, G. (1962) *Comp.Biochem.Physiol.*, **7**:29-
- Cowey, C.B. y Luquet, P. (1983). In: *Protein metabolism and nutrition*, Pion,

-
- R.; Arnal, M. y Bonin, D. (Eds). **Vol.1**, pp 365-384. INRA. París.
Francia.
- Crèach, Y.** (1972). *Tesis Doctoral*. Universidad de Toulouse. Francia.
- Crèach, Y. y Serfaty, A.** (1974). *J.Physiol. (París)*. **68**:245-
- Csanyl, V.; Greengard, O. y Knox, W.E.** (1967). *J.Biol.Chem.*, **242**:2688-2692.
- Dabrowsky, K.R.** (1986). *Comp.Biochem.Physiol.* **85A**:639-655.
- Danfaer, A.** (1980). *Tesis Doctoral*, Royal Vet. Agric. Univ. 160 pp.
Copenhagen.
- Das, A.B. y Krishnamoorthy, R.V.** (1968). *Experientia*, **25**:594-595.
- Dave, G.; Johansson-Sjöbeck, M.L.; Larsson, A.; Lewander, K. y Lidman, V.** (1975). *Comp.Biochem. Physiol.* **52A**:423-430.
- Davie, P.S.; Wells, R.M.G. y Tetens, V.** (1986). *J.Exp.Zool.*, **237**:159-171.
- Davis, T.A.; Fiorotto, M.L.; Nonyen, H.W. y Reeds, P.J.** (1989). *Am.J.Physiol.*, **257**:R1141-R1146.
- Davis, T.A.; Fiorotto, M.L.; Nguyen, H.V. Burrin, D.G. y Reeds, P.J.** (1991). *Am.J.Physiol.* **261**:R1373-R1380.
- Davison, W.A. y Goldspink, G.** (1977). *J.Exp.Biol.* **70**:1-12.
- Deitrick, J.E.; Whedon, G.D. y Shorr, E.** (1948). *Am.J.Physiol.*, **4**:3-36.
- Diamondstone, T.I.** (1966). *Anal.Biochem.* **16**:395-401.
- Dickerson, J.W.T. y McCance, R.A.** (1960). *Br.J.Nutr.*, **14**:331-338.
- Duronio, V. y Jacobs, S.** (1988). In: *Receptors biochemistry and methodology*, Kahn, C.R. y Harrison, L.C. (Eds) **Vol.12B**, pp 3-18. Alan R. Liss, Inc. Nueva York. EEUU.
- Earl, D.C.N. y Morgan, H.E.** (1968). *Arch.Biochem.Biophys.*, **128**:460-467.

- Ekren, T.; Jerwell, K.J. y Seglen, P.O. (1971). *Nature (London) New Biol.*, **229**:244-245.
- El Haj, A.J. y Houlihan, D.F. (1987). *J.Exp.Biol.* **127**:413-426.
- Elwyn, H. (1970). In: *Mammalian protein metabolism.*, Munro, H.N. (Ed). Vol.IV, pp 523-557.
- Enwonwu, C.O. y Munro, H.N. (1970). *Arch.Biochem.Phys.* **138**: 532-538.
- Enwonwu, C.O.; Stambough, R. y Sreebny, L. (1970). *J.Nutr.* **101**:337-342.
- Fauconneau, B. (1980). *Tesis Doctoral Ing.*, pp 110, INA, París. Francia.
- Fauconneau, B. (1983). *Ichthyophysiological Acta*, **7**:34-75.
- Fauconneau, B. (1984). *Comp. Biochem.Physiol.* **78B**:845-850.
- Fauconneau, B. (1985). In: *Nutrition and feeding in fish*, Cowey, C.B.; Mackie, A.M. y Bell, J.C. (Ed). pp 17-45. Londres. Reino Unido.
- Fauconneau, B. y Arnal, M. (1985). *Comp.Biochem.Physiol.* **82A**:179-187.
- Fauconneau, B.; Arnal, M. y Luquet, P. (1981). *Reprod.Nutr. Develop.* **21**:293-301.
- Fauconneau, B.; Breque, J. y Bieller, C. (1989). *Aquaculture*, **79**:29-36.
- Fauconneau, B.; Aguirre, P. y Blanc, J.M. (1990). *Comp. Biochem.Phys.C.Comp.Pharmacol.Toxicol.*, **97**:345-352.
- Fishman, B.; Wurtman, R.J. y Munro, H.N. (1969). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **64**:677-682.
- Flatt, J.P. (1978). In: *Recent advances in obesity research*, Bray, G (Ed). Vol.2, pp 211-228.
- French, C.J.; Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (1983). *Am.J.Physiol.*, **245**:R827-
- From, J. y Rasmussen, G. (1984). *Dana*, **3**:61-139.

-
- Fulks, R.M.; Li, J.B. y Goldberg, A.L. (1975). *J.Biol.Chem.* **250**:290-298.
- Fuller, S.J. y Sugden, P.H. (1986). *FEBS Lett.*, **201**:246-250.
- Funabiki, R.; Watanabe, Y.; Nishizawa, N. y Hareyama, S. (1976). *Biochim.Biophys.Acta*, **451**:143-150.
- Gaetani, S.; Paolucci, A.M.; Spadoni, M.A. y Tomassi, G. (1964). *J.Nutr.* **84**:173-178.
- Gaetani, S.; Massotti, D. y Spadoni, M.A. (1969). *J.Nutr.* **99**: 307-314.
- Garlick, P.J. (1986). *Internat.J.Vit.Nutr.Res.* **56**:197- 200.
- Garlick, P.J.; Millward, D.J. y James, W.P.T. (1973). *Biochem.J.* **136**:935-945.
- Garlick, P.J.; Millward, D.J.; James, W.P.T. y Waterlow, J.C. (1975). *Biochim.Biophys.Acta*, **414**:71-84.
- Garlick, P.J.; Burk, T.L. y Swick, R.W. (1976). *Amer.J.Physiol.* **23**:1108-1112.
- Garlick, P.J.; McNurlan, M.A. y Preedy, V.R. (1980). *Biochem.J.*, **192**:719-723.
- Garlick, P.J.; Clugston, G.A. y Waterlow, J.C. (1980b). *Am.J.Physiol.* **238**:E235-E244.
- Garlick, P.J.; Fern, M. y Preedy, V.R. (1983). *Biochem.J.* **210**:669-
- Giovanetti, P.M. y Stothers, S.C. (1975). *Growth*, **39**:1-16.
- Girbés, T.; Susin, A.; Ayuso, M.S. y Parrilla, R. (1984). In: *Recent advances in obesity and diabetes research*, Melchionda, N.; Horwitz, D.L. y Schade, D.S. (Eds). **Vol.8**, pp 261-267. Raven Press.
- Goldberg, A.L. (1968). *J.Cell.Biol.*, **36**:653-658.
- Goldberg, A.L. (1969). *J.Biol.Chem.*, **244**:3217-3222.

- Goldberg, A.L.** (1972). In: *Muscle biology*, Cassens, R.G. (Ed). **VolI**, pp 89-118. Marcel Dekker, Nueva York. EEUU.
- Goldberg, A.L. y StJohn, A.C.** (1976). *Annu.Rev.Biochem.*, **43**:835-869.
- Goldberg, A.L.; Ethinger, J.D.; Goldspink, D.F. y Sablecki** (1975). *Med.Sci.Sports*, **7**:185-198.
- Golden, M.H.N.; Waterlow, J.C. y Picou, D.** (1977a) *Am.J.Clin. Nutr.*, **30**:1333-1339.
- Golden, M.H.N. y Waterlow, J.C.** (1977b). *Clin.Sci.Mol.Med.* **53**: 277-288.
- Golden, M.H.N.; Waterlow, J.C. y Picou, D.** (1977b). *Am.J.Cli.Nutr.*, **30**:1345-1348.
- Goldspink, D.F.** (1976). *Biochem.J.*, **156**:71-80.
- Goldspink, D.F.** (1977a). *J.Physiol.*, **264**:267-282.
- Goldspink, D.F.** (1977b). *J.Physiol.*, **264**:283-296.
- Goldspink, D.F. y Kelly, F.J.** (1984). *Biochem.J.*, **217**:507-516.
- Goldspink, D.F.; Garlick, P.J. y McNurlan, M.A.** (1983). *Biochem.J.*, **210**:89-98.
- Goldspink, G.; Marshall, P.A. y Watt, P.W.** (1984). *J.Physiol.*, **361**:42-
- Goolish, E.M. y Adelman, I.R.** (1987). *Physiol.Zool.*, **60**:454- 464.
- Goto, A. y Kametaka, M.** (1974). *J.Agric.Chem.Soc.Jpn.*, **49**:11- 17.
- Grace, E.; Jesus, T. y Hirano, T.** (1992). *Gen.Comp.Endocr.* **85**:55-61.
- Granner, D.K. y Hargrove, J.L.** (1983). *Mol.Cell.Biochem.*, **53/54**:113-128.
- Granner, D.K. y Beale, E.G.** (1985). In: *Biochemical action of hormones*, Litwack, G. (Ed), pp 89-138. Academic Press Inc. Nueva York. EEUU.
- Gras, J.; Gudefin, Y. y Chagny, F.**(1978).*Comp.Biochem.Physiol.*, **60B**:369-372.

-
- Gras et al. (1982).
- Greengard, O. (1970). In: *Mechanism of hormon action*, Litwack, G (Ed). Vol.I, pp 3-85. Academic Press. Nueva York. EEUU.
- Greengard, O. y Dewey, H.K. (1967). *J.Biol.Chem.* **242**:2986-2991.
- Greer-Walker, M. y Emerson, L. (1978). *J.Fish Biol.*, **13**:475- 481.
- Haider, M. y Tarver, H. (1969). *J.Nutr.*, **99**:433-445.
- Hansen, P.E.; Lied, E. y Borresen, T. (1989) *Aquaculture*, **79**:85-89.
- Hardeland, R.; Hohmann, D. y Rensing, L. (1973). *J.Interdiscipl.Cycle.Res.*, **4**:89-118.
- Harmon, C.S.; Proud, C.G. y Pain, V.M. (1984). *Biochem.J.*, **223**:687-696.
- Haschemeyer, A.E.V. (1983). *Comp.Biochem.Physiol.*, **76B**:541-543.
- Haschemeyer, A.E.V.; Persell, R. y Smith M.A.K. (1979). *Comp.Biochem.Physiol.*, **64B**:91-95.
- Hashimoto, S.; Schmid, W. y Schiitz, G. (1984). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **81**:6637-6641.
- Haverberg, L.N.; Decklbaum, L.; Bilmazes, C.; Munro, H.N. y Young, V.R. (1975). *Biochem.J.*, **152**:503-510.
- Hawkins, A.D. (1985). *Oecologia*, **66**:42-49.
- Hawkins, A.D.; Soofiani, N.M. y Smith, G.W. (1985). *J.Cons.Int. Explor.Mer.*, **42**:11-32.
- Hawkins, A.J.S.; Bayne, B.L. y Day, A.J. (1986). *Proc.R.Soc.(Lond)B.*, **229**:161-176.
- Hawkins, A.J.S.; Widdows, J. y Bayne, B.L. (1989). *Physiol.Zool.*, **62**:745-763.
- Heard, C.R.C.; Frangi, S.M. y Wright, P.M. (1977). *Br.J.Nutr.*, **37**:1-
-

21.

Henderson, R.J.; Bell, M.V. y Sargent, J.R. (1985). *J.Expr.Mar.Biol.Ecol.*, **85**:93-99.

Henshaw, E.C.; Hirsh, C.A.; Morton, B.E. y Hiatt, H.H. (1971). *J.Biol.Chem.*, **246**:436-440.

Heywood, S.M.; Dowben, R.M. y Rich, A. (1967). *Proc.Natl. Acad.Sci.USA*, **57**:1002-1012.

Heywood, S.M.; Dowben, R.M. y Rich, A. (1968). *Biochemistry*, **7**:3289-3295.

Hill, J.M. y Malamud, D. (1974). *FEBS Lett.*, **46**:308-311.

Hilton, J.W. (1982). *J.Fish.Biol.*, **20**: 69-78.

Hirsch, C.A. y Hiatt, H.H. (1966). *J.Biol.Chem.*, **241**:5936-5940.

Ho, K.K.W.; Cake, M.H.; Yeoh, G.C.T. y Oliver, I.T. (1981). *Eur.J.Biochem.* **118**:137-142.

Holt, P.G. y Oliver, I.T. (1968). *Biochem.J.*, **106**:333-338.

Holt, L.E.; Snyderman, S.E.; Norton, P.M.; Roitman, E. y Finch, J. (1963). *Lancet*, **2**:1343-1345.

Houlihan, D.F. (1990 ó 1991).

Houlihan, D.F. y Laurent, P. (1987). *Can.J.Fish. Aquatic.Sci.*, **44**:1614-1621.

Houlihan, D.F.; McMillan, D.N. y Laurent, P. (1986). *Physiol.Zool.*, **59**:482-493.

Houlihan, D.F.; Agnisola, C.; Lyndon, A.R.; Gray, C. y Hamilton, N.M. (1988a). *J.Exp.Biol.*, **137**:565-587.

Hochackka, P.W. (1961). *Can.J.Zool.*, **39**:593-766

Houlihan, D.F.; Hall, S.J.; Gray, C. y Noble, B.S. (1988b).

-
- Can.J.Fish.Aquatic Sci.*, **43**:951-964.
- Houlihan, D.F.; Hall, S.J. y Gray, C.** (1989). *Aquaculture*, **79**:103-110.
- Houlihan, D.F.; McMillan, D.M.; Agnisola, C.; Trara Genoio, T. y Foti, L.** (1990a). *Mar.Biol.*, **106**:251-259.
- Houlihan, D.F.; Waring, C.P.; Mathers E. y Gray, C.** (1990b). *Physiol.Zool.*, **63**:735-756.
- Howarth, R.E.** (1972). *J.Nutr.*, **102**:37-43.
- Howarth, R.E. y Baldwin, R.L.** (1971). *J.Nutr.*, **101**:477-484.
- Hutson, S.N. y Mortimore, G.E.** (1982). *J.Biol.Chem.*, **257**:9548-
- Ince, B.** (1983). In: *Control processes in fish physiology*, Rankin, J.C.; Pitcher, T.J. y Duggan, R. (Eds). Croom- Helm, Londres. Reino Unido.
- Ince, B.W. y Thorpe, A.** (1976). *J.Fish.Biol.*, **8**:79-88.
- Ingham, L. y Arme, C.** (1977). *J.Comp.Physiol.*, **117B**:323-335.
- Ingwall** (1976). *Circ.Res.(Supp I)*, **38**:115-123.
- Inui, Y. y Oshima, Y.** (1966). *Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish.*, **32**:492-Jackim, E. y
- LaRoche, G.** (1973). *Comp.Biochem.Physiol.*, **44A**:851-866.
- James, W.P.T.; Garlick, P.J.; Sender, P.M. y Waterlow, J.C.** (1976). *Clin.Sci.*, **50**:525-532.
- Jeejeebhoy, K.N.; Bruce-Robertson, A.; Ho, J. y Sodtke, U.** (1973). In: *Protein turnover CIBA foundation symposium*, N° 9, pp 217-247. Elsevier. Amsterdam. Holanda.
- Jefferson, L.S. y Korner, A.** (1969). *Biochem.J.* **111**:703-712.
- Jefferson, L.S. y Kimball, S.R.** (1989). In: *Molecular and cellular biology of diabetes mellitus. Insulin action*, Draznin, B.; Melmed, S. y LeRoith, D. **Vol.**

- 2, pp 133-142. Alan R. Liss Inc. Nueva York. EEUU.
- Jefferson, L.S.; Rannels, D.E.; Munger, B.L. y Morgan, H.E.** (1974). *Fed.Proc.*, **33**:1098-1111.
- Jefferson, L.S.; Li, J.B. y Rannels, S.R.** (1977). *J.Biol.Chem.*, **252**:1476-1483.
- Jepson, M.M.; Bates, P.C. y Millward, P.J.** (1988). *Br.J.Nutr.*, **59**:397-415.
- Jobling, M.** (1980). *J.Fish.Biol.*, **17**:325-
- Jobling, M.** (1985). Growth. In: *Fish energetics new perspectives*. Tytler, P. y Calow, P. (Eds). Croom Helm-Londres. Reino Unido.
- Jost, J.P.; Khairallah, F.A. y Pitot, H.C.** (1968). *J.Biol.Chem.*, **243**:3057-3066.
- Kanamoto, R.; Su, Y. y Pitot, H.C.** (1991). *Arch.Biochem. Biophys.*, **288**:562-566.
- Kaplan, E. y Richman, H.G.** (1976). *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **152**:24-28.
- Kariya, Y.; Ochiai, Y. y Hashimoto, K.** (1986). *J.Soc.Fish.Sci.*, **52**:131-138.
- Karlson, P.** (1963). *Angew.Chem.* **2**:175-
- Karst, H.; Steiniger, J.; Noack, R. y Steglich. H.D.** (1984). *Ann.Nutr.Metab.*, **28**:245-252.
- Kaushik, S.J.; Dabrowski, K. y Luquet, P.** (1982). *Can.J.Fish.Aquatic.*, **39**:1095-1105.
- Kaushik, S.J.; Fauconneau, B. y Blanc, J.M.** (1984). *Reprod. Nutr.Develop.* **24**
En prensa.
- Kelman, L.; Saunders, S.J.; Wicht, S.; Frith, L.; Corrigan,**
A.; Kirsch, R.E. y Terblanche, J. (1972). *Biochem.J.*, **129**:806-809.
- Kelly, F.; Lewis, S.E.M.; Anderson, P. y Goldspink, D.F.** (1984). *Muscle Nerve.*, **7**:235-242.

-
- Kiessling, A.; Storebakken, T.; Asgard, T. y Kiessling, K.H.**
(1991). *Aquaculture*, **93**:335-356.
- Kirsch, R.; Frith, L.; Blck, E. y Hoffenberg, R.** (1986). *Nature (London)*, **217**:578-579.
- Kita, K.; Muramatsu, T. y Okumura, J.** (1989). *Br.J.Nutr.*, **61**:235-244.
- Klein, I.; Hong, C. y Schreider, S.**(1990)*J.Moll.Cell.Cardiol.*, **22**:461-468.
- Korner, A.** (1965a). *Recent.Prog.Hormone Res.*, **21**:205-
- Kosterlitz, H.W.** (1947). *J.Physiol.* **106**:194-201.
- Krebs, H.A.** (1976). *Adv.Enzyme.Regul.*, **10**:397-420.
- Larsson, A. y Lewander, D.** (1973). *Comp.Biochem.Physiol.*, **477**: 367-
- Laurent, G.J. y Sparrow, M.P.** (1977). Submitted for publication.
- Laurent, G.J.; Sparrow, M.P. y Millward, D.J.** (1978). *Biochem.J.* **176**:407-
- Laurent, B.C.; Moldawer, L.L.; Young, V.R.; Bistran, B.R. y Blackburn, G.L.** (1984). *Am.J.Physiol.*, **246**: E444-E451.
- Leech, A.R.; Goldstein, L.; Cha, C. y Goldstein, J.M.** (1979).
J.Exp.Zool., **207**:73-
- Lewis, C.G. y Winick, M.** (1977). *Fed.Proc.*, **36**:4677 (Abstract).
- Lewis, S.E.M.; Kelly, F.J. y Gomldspink, D.I.** (1984). *Differentiation*, **25**:168-175.
- Li, J.B. y Jefferson, L.S.** (1977). *Fed.Proc.*, **36**:1653 (Abstract).
- Lied, E.; Roselund, G.; Lund, B. y Von der Decken, A.** (1983).
Comp.Biochem.Physiol., **76B**:777-781.
- Lied, E. y Roselund, G.** (1984). *Comp.Biochem.Physiol.* **77A**:489-494.
- Lied, E.; Lund, B. y Von der Decken, A.**(1982).*Comp.Biochem.Physiol.*, **72B**:187-193.

- Lied, F.; Lie, O. y Lambertsen, G. (1985). In: *Nutrition and feeding in fish*. Cowey, C.B.; Mackie, A.M. y Bell, S.G. (Eds). Academic Press. Londres. Reino Unido.
- Lipman, R.L.; Schnuse, J.J.; Bradley, E.M. y Lecoq, F.R. (1970). *J.Lab.Clin.Med.* 76:221-230.
- Lipman, R.L.; Raskin, P.; Love, T.; Triebwasser, Lecoq, F.R.; Schnure, J.J. (1972). *Diabetes*, 21:101-107.
- Lobley, G.E. y Lovie, J.M. (1979). *Biochem.J.*, 182:867-874.
- Loughna, P.T. y Goldspink, G. (1984). *J.Fish.Biol.*, 25:223-230.
- Love, R.M. (1980). *The chemical biology of fishes*, Vol. 2 Academic Press. Londres. Reino Unido.
- Lowery, M.S. y Somero, G.N. (1990). *Physiol.Zool.*, 63:630-648.
- Lunn, P.G.; Whitehead, R.G. y Baker, B.A. (1976a). *Br.J.Nutr.* 36:219-230.
- Lunn, P.G.; Whitehead, R.G.; Baker, B.A. y Austin, S. (1976b). *Br.J.Nutr.* 36:537-550.
- Lusk, G. (1928). *The elements of the science of nutrition*. 4th edición. WB Saunders. Filadelfia. EEUU.
- Lyndon, A.R.; Houlihan D.F. y Hall, S.J. (1989). *Arch.Int.Physiol.Biochem.* 97:C31-
- Magnusson, K.; Wahren, J. y Ekman, L. (1990). *Metabolism Clinical and Experimental*, 39:1113-1117.
- Mariani, A.; Spadoni, M.A. y Tomassi, G. (1963). *Nature (London)*, 199:378-380.
- Martin, N.M.B. (1990). Protein turnover in salmonids: sexual maturation and hormonal control. *Tesis Doctoral*, Universidad de

Aberdeen. Reino Unido.

Martín-Requero, A.; Pérez-Díaz, J.; Ayuso-Parrilla, M.S. y Parrilla, R. (1979). *Arch.Biochem.Biophys.*, **195**:223-234.

Matty, A.J. y Lone, K.P. (1985). Hormonal control of protein deposition. In: *Nutrition and feeding in fish*, Cowey, C.B.; Mackie, A.M. y Bell, J.G. (Eds). pp 147-168. Academic Press. Londres. Reino Unido.

Mayel-Afshar, S. y Grimble, R.F. (1982). *Biochim.Biophys.Acta*, **716**:201-207.

McCance, R.A. (1976). *Proc.Nutr.Soc.*, **35**:309-313.

McCance, R.A. y Widdowson, E.M. (1974). *Proc.Roy.Soc.B.*, **185**:1-12.

McMillan, D.N. y Houlihan, D.F. (1988). *Physiol.Zool.* **61**:429-441.

McMillan, D.N. y Houlihan, D.F. (1989). *Aquaculture*, **79**:37-46.

McMillan, D.N. y Houlihan, D.F. (1992). *Fish Physiol.Biochem.*, **10**:23-34.

McNurlan, M.A.; McHardy, K.C. y Broom, J. (1987). *Clin.Sci.* **73**:69-75.

McNurlan, M.A.; Tomkins, A.M. y Garlick, P.J. (1979). *Biochem.J.*, **178**:373-379.

Meier, D.R.; Peterson, R.G.; Bonds, D.R.; Meschia, G. y Battaglia, F.C. (1981). *Am.J.Physiol.*, **240**:320-324.

Mendes, C.B. y Waterlow, J.C. (1958). *Br.J.Nutr.* **12**:74-88.

Mertz, E.T. (1972). In: *Fish Nutrition*, Halver, J.E. (Ed). pp 106-144. Academic Press. Nueva York. EEUU.

Millicam, P.E.; Vernon, R.G. y Pain, V.M. (1987). *Biochem.J.*, **248**:251-257.

Millward, D.J. (1989). *Aquaculture*, **79**:1-28.

Millward, D.J. y Garlick, P.J. (1972). *Proc.Nutr.Soc.*, **31**:257-263.

Millward, D.J. y Waterlow, J.C. (1978). *Fed.Proc.*, **37**:2283-2290.

- Millward, D.J.; Nnanyelungo, D.O.; James, W.P.T. y Garlick, P. J. (1974). *Br.J.Nutr.*, **33**:127-142.
- Millward, D.J.; Nnanyelugo, D.O. y Chatterjee, A.K. (1975). *Proc.Nutr.Soc.*, **34**:95-96 (Abstract).
- Millward, D.J.; Garlick, P.J.; Stewart, R.J.C.; Nnanyelugo, D.O. y Waterlow, J.C. (1975). *Biochem.J.*, **150**:235-243.
- Millward, D.J.; Garlick, P.J.; Nnanyelugo, D.O. y Waterlow, J.C. (1976). *Biochem.J.*, **156**:185-188.
- Millward, D.J.; Garlick, P.J.; James, W.P.T.; Sender, P.M. y Waterlow, J.C. (1976). In: *Protein metabolism and nutrition*, Cole, J.A.; Boorman, K.W.; Buttery, P.J.; Lewis, D.; Neale, R.J. y Swan, H. (Eds). pp 446-491. Butterworths. Londres. Reino Unido.
- Millward, D.J.; Bates, P.C.; Brown, J.G.; Rosochacki, S.R. y Rennie, M.J. (1980). *Excrepta Medica*, **75**:307-329.
- Millward, D.J.; Brown, J.G. y Odedra, G. (1981). In: *Nitrogen metabolism in man*, Waterlow, J.C. y Stephen, J.M.L. (Eds). Appl.Sci.Publ. Londres. Reino Unido.
- Millward, D.J.; Bates, P.C.; Brown, J.B. y Cox, M. (1982). In: *Nitrogen metabolism in man*, Waterlow, J.C. y Stephen, J.M. (Eds). Applied Science Publishers Ltd. Londres, Reino Unido.
- Mommsen, T.P. y Plisetskaya, E.M. (1991). *Crit. Rev.Aquat.Sci.*, **4**:(En prensa).
- Mommsen, T.P.; French, C.J. y Hochachka, P.W. (1980). *Can.J.Zool.* **58**:1785-
- Mommsen, T.P.; Ballantyne, J.; McDonald, D.; Gosline, J. y Hochachka,

-
- P.W.** (1981). *Proc.Nat.Acad.Sci.* **78**:3274-3278.
- Monroy, A.; Ishida, M. y Nakano, E.** (1961). *Embryologia*, **6**:151-158.
- Montgomery, R.D.** (1962). *J.Clin.Invest.* **41**:1653-1663.
- Moon, T.W.** (1983). *Can.J.Zool.* **61**:802-
- Moon, T.W. y Johnston, I.A.** (1980). *J.Comp.Physiol.*, **136B**:31-
- Moon, T.W. y Johnston, I.A.** (1981). *J.Fish.Biol.* **19**:653-
- Morgan, H.E. y Peters, T.** (1971). *J.Biol.Chem.*, **246**:3500-3505.
- Morgan, H.E.; Gordan, E.E.; Kira, Y.; Chua, B.H.L.; Russo, L.A.; Peterson, C.J.; McDermott, P.J. y Watson, P.A.** (1987). *Annu.Rev.Physiol.*, **49**:533-543.
- Morkin, E.** (1974). *Circ.Res. (Supp II)*, **34**:37-48.
- Morkin, E.; Kimata, S. y Skillman, J.J.** (1972). *Circ.Res.*, **30**:690-702.
- Morris, J.E. y Peraino, C.** (1976). *J.Biol.Chem.*, **251**:2571-2578.
- Mortimore, G.E. y Ward, W.F.** (1976). In: *Lysosomes in biology and pathology*, Dingle, J.T. y Dean, R.T. (Eds). **Vol. 5**, pp 157-184. North-Holland, Amsterdam. Holanda.
- Motil, J.K.; Bier, D.M.; Matthews, D.E. Burke, J.F. y Young, V.R.** (1981). *Metabolism.*, **30**:783-791.
- Mueller, G.C.** (1965). In: *Mechanisms of hormone action*, Karlson, P. (Ed). p 228. Thieme. Stuttgart. Alemania.
- Munro, H.N.** (1951). *Physiol.Rev.*, **31**:449-488.
- Munro, H.N.** (1964a). In: *Mammalian protein metabolism.*, Munro, H.N. (Ed). **Vol.1**, pp 397-402. Academic Press, Nueva York. EEUU.
- Munro, H.N. y Fleck, A.** (1966). In: *Methods of Biochemical Analysis*. Glick, D. (Ed). Interscience Publishers John Wiley and Sons. Nueva York, Londres,

Sidney, vol. XIV pp 113.

Munro, H.N.; Hubert, C. y Baliga, B.S. (1975). In: *Alcohol and abnormal protein biosynthesis*, Rothschild, M.A.; Oratz, M. y Schreiber, S.S. (Eds). pp 33-66. Pergamon. Nueva York. EEUU.

Muramatsu, T. y Okumura, J. (1985). *J.Nutr.*, **115**:483-490.

Muramatsu, T.; Aoyagi, Y.; Okumura, J. y Tasaki, I. (1987a).
Br.J.Nutr., **57**:269-277.

Muramatsu, T.; Kita, K.; Tasaki, I. y Okumura, J. (1987b).
Br.Poult.Sci., **28**:471-482.

Nagai, M. e Ikeda, S. (1971). *Bull.Jpn.Soc.Sci.Fish*, **37**:404-

Nahas, R.; Jones, N.V. y Goldspink, G. (1982). *J.Mar.Biol.Ass.U.K.*, **62**:699-708.

Nair, K.S.; Halliday, D. y Garrow, J.S. (1983). *Clin.Sci.*, **65**:307-312.

Nakagawa, H. (1971). *Seikagaku*, **43**:1-22.

Newsholme, E.A. and Leech, A.R. (1983). *Biochemistry for the medical sciences*. Wiley. Chichester.

Nishizawa, N.; Shimbo, M.; Hareyama, S. y Funabiki, R. (1977).
Br.J.Nutr., **37**:345-353.

Noda, C.; Tomomura, M.; Nakamura, T. y Ichihara, A. (1984).
J.Biochem.(Tokyo), **95**:37-45.

Norman, M.; Gamulin, S. y Clark, K. (1973). *Biochem.J.* **134**:387-398.

Nose, T. (1972). *Bull.Freshw.Fish.Res.Lab.Tokyo*, **22**:137-

O'Dor, R.K. y Wells, M.J. (1987). In: *Cephalopod life cycles*, Boyle, P.R. (Ed).
Vol.2, Academic Press, Londres, Reino Unido.

Ogino, C. (1980). *Bull.Jap.Soc.Scient.Fish.*, **46**:171-174.

-
- Omstedt, P.T. y Von der Decken, A.** (1972). *Br.J.Nutr.* **27**:467-474.
- Omstedt, P.T. y Von der Decken, A.** (1974). *Br.J.Nutr.*, **31**:67-76.
- Omstedt, P.T.; Von der Decken, A.; Hendengkog, G. y Hogren, H.**
(1973). *J.Sci.Fd.Agr.*, **24**:1103-1113.
- Ogawa, H.; Fujioka, M.; Su, Y.; Kanamoto, R. y Pitot, H.C.** (1991).
J.Biol.Chem., **266**:20412-20417.
- Padian, T.J.** (1987). Fish. In: *Animals energetics*, Pandian,
T.J. y Vernberg, F.J. Academic Press. Londres. Reino Unido.
- Parmacek, M.S.; Magid, M.N.; Lesch, M.; Decker, R.S. y Jamarel, A.M.**
(1986). *Am.J.Physiol.*
- Parrilla, R.** (1978). *Pflügers Archiv.*, **374**:3-7.
- Patterson, S. y Goldspink, G.** (1973). *Z.Zellforsch.Mikrosk. Anat.*, **146**:375-384.
- Patterson, S.; Johnston, I.A. y Goldspink, G.** (1974). *Experientia*, **30**:892-894.
- Peavy, D.E. y Hansen, R.J.** (1976). *Biochem.J.* **160**:, 797-801.
- Peraino, C. y Pitot, H.C.** (1964). *J.Biol.Chem.*, **239**:4308-4313.
- Peraino, C.; Lamar, C.Jr. y Pitot, H.C.** (1966). *Adv.Enz.Regul.*, **4**:199-217.
- Pérez-Sala, D.; Parrilla, R. y Ayuso, M.S.** (1987). *Biochem.J.* **241**:491-498.
- Perry, R.P. y Kelly, D.E.** (1970). *J.Cell.Physiol.*, **76**:127-140.
- Perry, S.T.; Rothrock, R.; Isham, K.R.; Lee, K.-L, y Kenney,
F.T.** (1983). *J.Cell.Biochem.*, **21**:47-61.
- Peters, T. y Peters, J.C.** (1972). *J.Biol.Chem.* **247**:3858-3863.
- Pitot, H.C. y Peraino, C.** (1963). *J.Biol.Chem.* **238**:PC1910-PC1912.
- Pitot, H.C. y Peraino, C.** (1964). *J.Biol.Chem.* **239**:1783-1788.

- Pitot, H.C.; Peraino, C.; Lamar, C.Jr. y Kennan, A.L. (1965).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 54:845-851.
- Phillips, A.M. (1969). In: *Fish physiology*, Hoar, W.S. y Randall, D.D. Vol.1, pp 391-432. Academic Press. Nueva York. EEUU.
- Picou, D. y Taylor-Roberts, T. (1969). *Clin.Sci.*, 36:238-296.
- Pimstone, B.L.; Beckers, D.J. y Hansen, J.D.L. (1973). In: *Endocrine aspects of malnutrition, Kroc Foundation Symposia*, N°1, pp 73-90. Santa Ynez. California.
- Plakas, S.M.; Katayama, T.; Tanaka, Y. y Deshimaru, O. (1980).
Aquaculture, 21:307-
- Pocrnjic, Z.; Mathews, R.W.; Rappaport, S. y Haschemeyer, A.E.V. (1983). *Comp.Biochem.Physiol.* 74B:735-738.
- Potter et al. (1968).
- Preedy, V.R. y Garlick, P.J. (1986). *Biosci.Rep.*, 6:177-183.
- Rabinowitz, M. y Zak, R. (1972). *Annu.Rev.Med.*, 23:245-262.
- Rao, G.M. (1968). *Can.J.Zool.* 46:781-786.
- Rannels, D.E.; Kao, R. y Morgan, H.E. (1975). *J.Biol.Chem.*, 250:1694-1701.
- Rannels, D.E.; Pegg, A.E.; Rannels, S.R. y Jefferson, J.S. (1977). *Fed.Proc.*, 36:1647(Abstract).
- Rao, G.M. (1968). *Can.J.Zool.*, 46:781-786.
- Reeds, P.J. y Loble, G.E. (1980). *Proc.Nutr.Soc.*, 39:43-52.
- Reeds, P.J. y Palmer, R.M. (1986). In: *Control and manipulation of animal growth*, Buttery, P.J.; Lindsay, P.B. y Haynes, N.B. (Eds). Butterworth, Londres. Reino Unido.
- Reeds, P.J.; Fuller, M.F.; Cadenhead, A.; Loble, G.E. y McDonald, J.D.

-
- (1981). *Br.J.Nutr.*, **45**:539-546.
- Reeds, P.J.; Wahle, K.W.J. y Haggarty, P.** (1982). *Proc.Nutr.Soc.*, **41**:155-159.
- Reeds, P.J.; Fuller, M.F. y Nicholson, B.A.** (1985). In: *Energy metabolism in man*, Garrow, J. y Halliday, D. (Eds). pp 46-57. John Libbey. Londres, Reino Unido.
- Remesar, T.; Arola, L.; Palou, A. y Alemany, M.** (1981). *Lab. Anim.Sci.* **31**:67-70.
- Rennie, M.J.; Edwards, R.H.T.; Halliday, D.; Matthews, D.E.;**
Wolman, S.L. y Millward, D.J. (1982). *Clin.Sci.*, **63**:519-523.
- Reynolds, R.D.; Potter, V.R. y Pitot, H.C.** (1971). *J.Nutr.*, **101**:797-802.
- Riis, P.M.** (1983). In: *Dynamic biochemistry of animal production*. Riis, P.M. (Ed). pp 75-108. Elsevier, Amsterdam, Oxford, Nueva York, Tokyo.
- Robinson, J.S. y Mead, J.F.** (1973). *Can.J.Biochem.*, **51**:1050-
- Robinson, A.M. y Williamson, D.H.** (1980). *Physiol.Rev.*, **60**:143-187.
- Robinson, S.M.; Jaccard, C.; Persand, C.; Jackson, A.A.; Jequier, E. y Schutz, Y.** (1990). *Am.J.Clin.Nutr.*, **52**:72-80.
- Rogers, Q.R.** (1976). In: *Protein metabolism and nutrition.*, Cole, D.J.A.; Boorman, K.W.; Buttery, P.J.; Lewis, D.; Neale, R.J. y Swan, H. (Eds). pp 279-301. Butterworth, Londres, Reino Unido.
- Roselund, G.; Lund, B.; Saudnes, K.; Braekkan, O.R. y Von der Decken, A.** (1984). *Comp.Biochem.Physiol.* **77B**:7-13.
- Rothrock, R.; Lee, K.-L.; Islam, K.R.; Johnson, A.C. y Kenney, F.T.** (1987). *Biochem.Biophys.Res.Com.*, **144**:1182-1187.
- Rothschild, M.A.; Oratz, M.; Mongelli, J.; Fishman, L. y Schreiber, S.S.**
-

- (1969). *J.Nutr.* **98**:395-403.
- Ruiz-Bravo, N. y Ernest, M.J.** (1982). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **79**:365-368.
- Ruiz-Bravo, N. y Ernest, M.J.** (1985). *Endo*, **116**:2489-2496.
- Rumsey, G.L.** (1981). *Salmonid.*, **5**:20-
- Sainz, R.D.; Calvert, C.C. y Baldwin, R.L.** (1986). *J.Nutr.*, **116**:1820-1829.
- Sampson, D.A. y Jansen, G.R.** (1984). *J.Nutr.*, **114**:1470-1478.
- Sampson, D.A. y Jansen, G.R.** (1985). *J.Pediatr.Gastroenterol. Nutr.* **4**:274-283.
- Sampson, D.A.; Hunsacker, H.A. y Jansen, G.R.** (1986). *J.Nutr.* **116**:365-375.
- Sanders, S.J.; Truswell, A.S.; Barbezat, G.U.; Wittman, W. y Mansen, J.D.L.** (1967). *Lancet*, **2**:795-798.
- Sandoval, I.V. y Sols, A.** (1974). *Eur.J.Biochem.* **43**:609-616.
- Schimke, R.T.** (1964). *J.Biol.Chem.*, **239**:3808-
- Schimke, R.T. y Doyle, D.** (1970). *Annu.Rev.Biochem.*, **39**:929-976.
- Schlisio, W. y Nicolai, B.** (1978). *Comp. Biochem.Physiol.* **59B**:373-379.
- Schmidt, G. y Thannhauser, S.J.** (1945) *J.Biol.Chem.* **161**:83
- Schmid, E.; Schmid, W.; Jantzen, M.; Mayer, D.; Jastoff, B. y Schütz, G.** (1987). *Eur.J.Biochem.*, **165**:499-506.
- Scornick, O.A.** (1972). *Biochem.Biophys.Res.Com.*, **47**:1063-1066.
- Scornick, O.A.** (1974). *J.Biol.Chem.*, **249**:3876-3883.
- Scornick, O.A. y Botbol, V.** (1976). *J.Biol.Chem.*, **251**:2891-2897.
- Searle, T.W.; Graham, N.Mc.C. y O'Callaghan, M.** (1972). *J.Agric.Sci.*, **79**:371-382.
- Sender, P.M.; James, W.P.T. y Garlick, P.J.** (1975). In: *Regulation of energy balance in man*, Sequier, E. (Ed). pp 224-227. Editions Médecine et Hygiène,

Genova. Italia.

Sereni, F.; Kenney, F.T. y Kretchmer, N. (1959). *J.Biol.Chem.*, **234**:609-612.

Servillo, G.; Della Fazia, M.A. y Viola-Magni, M. (1991).
Biochem.Biophys.Res.Com., **175**:104-109.

Shelly, L.L.; Tynan, W.; Schmid, W.; Schütz, G. y Yeoh, G.C.T.
(1989). *J.Cell.Biol.*, **109**:3403-3410.

Sherwin, R.S.; Hendler, R.G. y Felig, P. (1975). *J.Clin.Invest.*, **55**:1382-1390.

Sidrawsky, H. y Verney, E. (1967). *Biochem.Biophys.Acta*, **138**: 426-431.

Siebritz, F.; Martínez, J.A. y Buttery, P.J. (1985). *Int.J.Biochem.*, **17**:731-732.

Smith, M.A.K. (1981). *J.Fish.Biol.*, **19**:213-220.

Smith, M.A.K. y Haschemeyer, A.E.V. (1980). *Physiol.Zool.*, **53**:373-382.

**Smith, M.A.K.; Mathews, R.N.; Hudson, A.P. y Haschemeyer,
A.E.V.** (1980). *Comp.Biochem.Physiol.*, **65B**:415-418.

Snell, K. (1984). *Adv.Enzyme Regul.*, **22**:325-400.

Somero, G.N. y Doyle, D. (1973). *Comp.Biochem.Physiol.*, **46B**: 463-474.

Soofiani, N.M. y Hawkins, A.D. (1985). In: *Fish energetics new perspectives.*,
Tytler, P. y Calow, P. (Eds). Croom Helm. Londres. Reino Unido.

**Steffee, W.P.; Goldsmith, R.S.; Pencharz, P.B.; Scrimshaw, N.S. y Young,
V.R.** (1976). *Metabolism.*, **25**:281-297.

Stephen, J.M.L. (1968). *Br.J.Nutr.*, **22**:153-163.

Stephen, J.M.L. y Waterlow, J.C. (1968). *Lancet*, **1**:118-120.

Stirling, H.P. (1976). *Mar.Biol.*, **34**:85-91.

Storey, K.B. y Storey, J.M. (1983). In: *The molluscs*, Hochachka, P.W. (Ed).
Vol.1, Academic Press. Nueva York. EEUU.

Strickland, N.C. (1983). *J.Anat.*, **137**:323-333.

- Stuart, C.A.; Shangraw, R.E.; Prince, M.J.; Peters, E.J. y Wolfe, R.R. (1988). *Metabolism.*, **37**:802-806.
- Stuart, C.A.; Shangraw, R.E.; Peters, E.J. y Wolfe, R.R. (1990). *Am.J.Clin.Nutr.*, **52**:509-514.
- Stewart, R.J.C.; Preece, R.F. y Sheppard, H.G. (1975). *Br.J.Nutr.*, **33**:233-253.
- Sudgen, P.H. y Smith, D.M. (1982). *Biochem.J.*, **206**:467-472.
- Sullivan, K.M. y Somero, G.N. (1983). *Biol.Bull.*, **164**:315-326.
- Sundby, A.; Eliassen, K.; Refstie, T. y Plisetskaya, E.M. (1991). *Fish Physiol.Biochem.*, **9**:223-230.
- Suzuki, O y Yagi, K. (1976). *Anal.Biochem.* **75**:192-200.
- Swick, R.W. y Ip, M.M. (1974). *J.Biol.Chem.*, **249**:6836-6841.
- Takama, K.; Love, R.M. y Smith, G.L. (1985). *Comp.Biochem.Physiol.*, **80B**:713-718.
- Tanaka, K. y Ichihara, A. (1975). *Biochim.Biophys.Acta*, **399**: 302-312.
- Tata, J.R. (1964). In: *Actions of hormones on molecular processes*, Litwack, G. y Kritchevsky, D. (Eds). pp 58. Wiley, Nueva York. EEUU.
- Tata, J.R. (1966a). *Progr. Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, **5**:191-
- Tata, J.R. (1967a). *Biochem.J.*, **104**:1-
- Tata, J.R. (1970). In: *Biochemical actions of hormones*, Litwack, G. (Ed), Vol.I, pp 89-134. Academic Press. Nueva York y Londres.
- Tavill, A.S.; East, A.G.; Black, E.G.; Nadkarni, D. y Hoffenberg, R. (1973). In: *Protein turnover CIBA Foundation symposium*, N° 9, pp 155-180. Elsevier. Amsterdam. Holanda.
- Tomashefsky, P. y Tannenbaum, M. (1970). *Lab.Invest.*, **23**:190-195.

-
- Trenkle, A.** (1974). *J.Anim.Sci.*, **38**:1142-1152.
- Turner, L.V. y Garlick, P.J.** (1974). *Biochim.Biophys.Acta*, **349**:109-113.
- Van den Borre, M. y Webb, T.E.** (1972). *Life Sci.*, **11**:347-354.
- Van Waarde, A.** (1981). *Comp.Biochem.Physiol.*, **68B**:407-
- Van Waarde, A.** (1983). *Comp.Biochem.Physiol.*, **74B**:675-
- Von der Decken, A. y Omstedt, P.T.** (1970). *J.Nutr.*, **100**:623-630.
- Von der Decken, A. y Omstedt, P.T.** (1972). *Life Sci.* **11**:347-354.
- Viola-Magni, M.P. y Magni, F.** (1986). In: *Modern trends in aging research*, **147**:141-146. John Libbey Eurotex Ltd.
- Waalkes, T.P. y Underfriend, S.** (1957). *J.Lab.Clin.Med.*, **50**:733-736.
- Walton, M.J. y Cowey, C.B.** (1977). *Comp.Biochem.Physiol.*, **57B**:143-149.
- Walton, M.J. y Cowey, C.B.** (1982). *Comp.Biochem.Physiol.*, **73B**:59-79.
- Walton, M.J. y Wilson, R.P.** (1986). *Aquaculture*, **51**:105-115.
- Wannemacher, R.W. y Allison, J.B.** (1964). In: *Protein nutrition and free amino acid patterns*, Leathem, J.H. (Ed). pp 206-224. Rutgers Univ. Press, New Brunswick.
- Watanabe, M.; Potter, V.R. y Pitot, H.C.** (1968). *J.Nutr.*, **95**:207-227.
- Waterlow, J.C.** (1980). *Invest.Cell.Pathol.*, **3**:107-119.
- Waterlow, J.C.** (1984). *Quart.J.Exp.Physiol.*, **69**:409-438.
- Waterlow, J.C. y Alleyne, G.A.O.** (1971). *Adv.Protein.Chem.*, **25**: 117-241.
- Waterlow, J.C.; Brass, G. y De Pass, E.** (1957). *J.Trop.Pediat.*, **2**:189-195.
- Waterlow, J.C. y Stephen, J.M.L.** (1968). *Clin.Sci.*, **35**:287-305.
- Waterlow, J.C.; Ashworth Hill, A. y Spady, D.W.** (1976). In: *Early nutrition and later development*, Wilkinson, A.N. (Ed). pp 175-189. Pitman Medical, Kent, Reino Unido.

- Waterlow, J.C.; Garlick, P.J.; Ell, S. y Reeds, P.J. (1977). *Clin.Sci.Mol.Med.*, 52:17p.
- Waterlow, J.C.; Garlick, P.J. y Millward, D.J. (1978). *Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body*. Waterlow, J.C. (Ed). 804 pp. Elsevier, North-Holland Biochemical Press. Holanda.
- Watt, P.W.; Marshall, P.A.; Heap, S.P.; Loughna, P.T. y Goldspink, G. (1988). *Fish. Physiol.Biochem.*, 4:165-173.
- Weatherley, A.H. (1990). *Transactions of the American Fisheries Society.*, 116:662-672.
- Weatherley, A.H. y Gill, H.S. (1985). *Experientia*, 41:353-354.
- Weatherley, A.H. y Gill, H.S. (1989). *Experientia*, 45:875-878.
- Weatherley, A.H.; Gill, H.S. y Lobo, A.F. (1988). *J.Fish.Biol.*, 33:851-859.
- Webster, A.J.F. (1983). In: *Mammalian thermogenesis*, Girardier, L. (Ed). pp 178-207. Chapman y Hall, Londres, Reino Unido.
- Welle, S.; Lilavivat, V. y Campbell, R.G. (1981). *Metabolism*, 30:953-958.
- Whitehead, R.G. y Dean, R.F.A. (1964). *Am.J.Clin.Nutr.*, 14:313-330.
- Whiting, S.J. y Wiggs, A.J. (1977). *Comp.Biochem.Physiol.*, 58B:189-193.
- Wicks, W.D. (1968). *J.Biol.Chem.* 243:900-906.
- Widdenthal, K.; Griffin, E.L. y Ingwall, J.S. (1976). *Circ.Res.(Supp.1)*, 38:138-142.
- Widdowson, E.M. y McCance, R.A. (1975). *Pediat.Res.*, 9:154-159.
- Widdowson, E.M.; Dickerson, J.W.T. y McCance, R.A. (1960). *Br.J.Nutr.*, 14,457-471.
- Wilson, R.P.; Gatlin, D.M. y Poe, W.E. (1985). *Aquaculture*, 49:101-
- Williams, P.E. y Goldspink, G. (1976). *J.Anat.*, 122:455-465.

-
- Williams-Ashman, H.G.; Liao, S.; Hancock, R.L.; Jurkokvitz, L. y Silverman, D.A.** (1964). *Recent.Progr.Hormone Res.* **20**:247-
- Winterer, J.; Bristian, B.R.; Bilmazes, C.; y Blackburn, G.L. y Young, V.R.** (1980). *Metabolism*, **29**:575-581.
- Woo, N.Y.S. y Fung, A.C.Y.** (1981). *Comp.Biochem.Physiol.*, **69A**:461-
- Wu, G. y Thomson, J.R.** (1990). *Int.J.Biochem.*, **22**:263-268.
- Wurtman, R.J.** (1974). *Life Sci.*, **15**:827-847.
- Yamada et al.** (1981).
- Yamaguchi, M. y Kandatsu, M.** (1967). *Agr.Biol.Chem.(Japan)*., **31**:776-787.
- Yanage, S.; Campbell, H.S. y Potter, V.R.** (1975). *Life Science.*, **17**:1411-1422.
- Yeoh, G.C.T.; Bennett, F.A. y Oliver, I.T.** (1979). *Biochem.J.*, **180**:153-160.
- Yeoh, G.C.T.; Brighton, V.J.; Angus, D.A.; Kraemer, M.; Vassy, J. y Chalemean, M.T.** (1985). *Eur.J.Cell.Biol.*, **38**:157-164.
- Yoshida, A.; Lenng, P.M.B.; Rogers, Q.R. y Harper, A.E.** (1966). *J.Nutr.* **89**:80-90.
- Young, V.R.** (1970). In: *Mammalian protein metabolism.*, Munro, H.N. (Ed). **Vol.4.** pp 586-674. Academic Press, New York. EEUU.
- Young, V.R.** (1974). *J.Anim.Sci.*, **38**:1054-1065.
- Young, V.R.** (1976). In: Anabolic agents in animal production, Lu, F.C. y Randall, J. (Eds) *Enviromental quality and safety supp.* **Vol.V** pp 20-42. Georg Thieme, Stuttgart. Alemania.
- Young, V.R. y Alexis, S.D.** (1968). *J.Nutr.*, **96**:255-262.
- Young, V.R.; Chen, S.C. y McDonald, J.** (1968). *Biochem.J.*, **106**:913-919.

Young, V.R.; Steffee, W.P.; Pencharz, P.B.; Winterer, J.C. y Scrimshaw, N.S. (1975). *Nature (London)*, 253:192-194.

Young, V.R.; Haverberg, L.N.; Bilmazes, C. y Munro, H.N. (1973). *Metabolism*, 22:1429-1436.

Zammit, V.A. y Newsholme, E.A. (1979). *Biochem.J.*, 184:313-322.