



Pilar Morata Losa

ALGUNOS ASPECTOS DE LA RELACION DEL METABOLISMO
CLUCIDICO EN LA TRUCHA (*Salmo gairdneri*)

TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA **254**



Biblioteca Universitaria de Granada



01611462

C Prov T 9-67
(2)

R. 48.794
B-137-135

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO INTERFACULTATIVO DE BIOQUIMICA

T
10
153

ALGUNOS ASPECTOS DE LA RELACION DEL METABOLISMO CLUCIDICO EN
LA TRUCHA (*Salmo gairdneri*)

PILAR MORATA LOSA
Tesis Doctoral

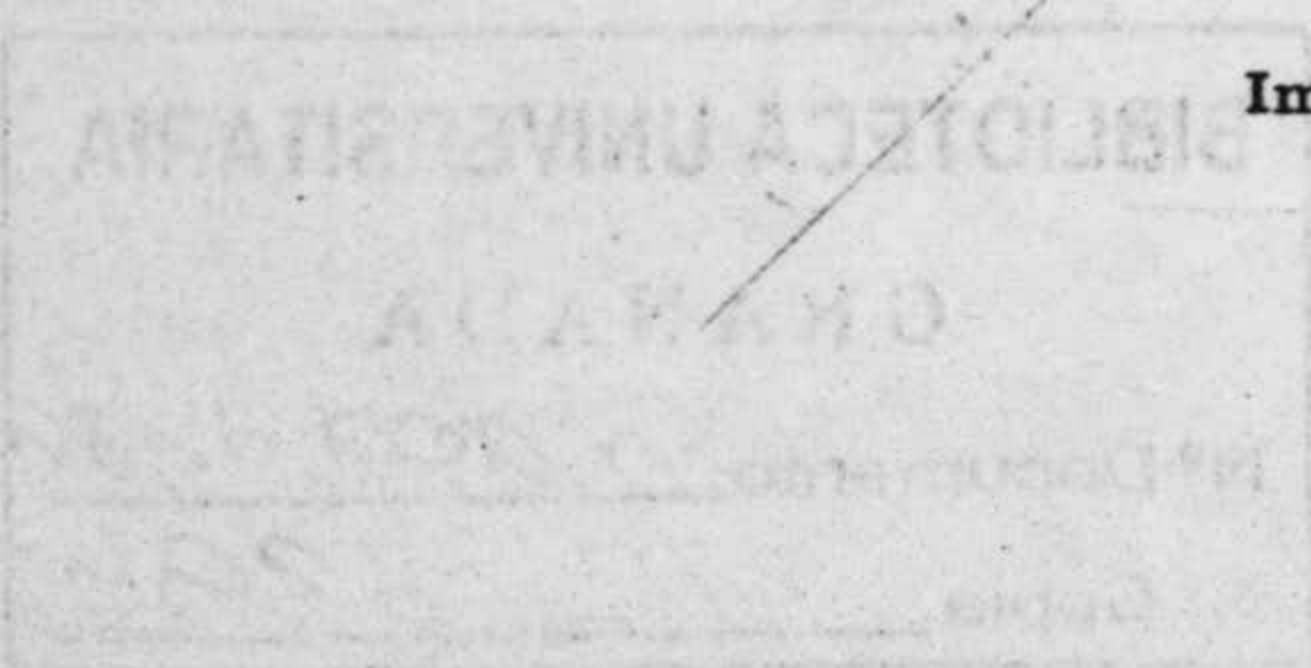
UNIVERSIDAD DE GRANADA
1979



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento blasa 0489
Nº Copia 121168948

Im.Un.Gr.144.1979. Depósito legal Gr.525.1979.

Imprenta de la Universidad de Granada. Hospital Real.



Tesis doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Fermín Sánchez de Medina Contreras, Director del Departamento Interfacultativo de Bioquímica de la Universidad de Granada. Fue leída el 28 de Noviembre de 1979, obteniendo la calificación de sobresaliente "cum laude", ante el tribunal formado por los Profesores: Jiménez Millán; Cortijo Mérida; Sánchez de Medina; García Peregrín y Zamora Navarro.

El trabajo que presentamos ha sido realizado en el DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA de la Universidad de Granada durante los cursos 1976-77, 1977-78 y 1978-79.

Las medidas de radiactividad se han efectuado en la sección de Radioquímica del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

Parte de los resultados de esta Memoria han sido presentados en el XVI Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas., Barcelona, Diciembre 1977 y en el VIII Congreso de la S. E. B., Murcia, Septiembre 1979.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Sánchez de Medina, director de esta Memoria Doctoral, por haberme admitido en su equipo de investigación y por el interés y dedicación prestados a la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Salvador Zamora, del Departamento de Fisiología Animal por las valiosas orientaciones aportadas.

A la Dra. Muñoz-Clares, del Departamento de Bioquímica por su intensa dedicación en el comienzo del trabajo.

A mis compañeros Alberto Vargas, Antonio Sánchez, Marisa Pita, Paloma Hortelano, Andres Corno y M^a José Faus por su colaboración.

A Dolores Franco, Luis Sánchez de Medina, Mercedes Perez y Vicente Sánchez por la gran ayuda de ellos recibida.

A Manolo García y Gabriel Cardenete por su ayuda y amistad.

A D. Julio Domezaín, Director de la Piscifactoria de Industria Piscícola Navarra, S. L. de Riofrio (Granada), que cedió muy generosamente todos los animales requeridos en este trabajo.

A Maria Romero, por su dedicación y buena disposición en la realización mecanografica de esta Memoria, así como a todos aquellos que de una u otra forma me han ayudado. A todos gracias.



A mi madre
A Juande, mi mejor
compañero

ABREVIATURAS

α -KG	Acido α -cetoglutárico
ADP	Adenosín difosfato
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
AMP	Adenosín monofosfato
ANSA	Acido 1-amino, 2 naftol, 4-sulfónico
ATP	Adenosín trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E.C.	Comisión internacional de enzimas
EDTA	Acido etilen diamil- tetraacético
FDP	Fructosa 1-6, difosfato
FDPasa	Fructosa 1-6, difosfatasa
GDH	Glicerol 1-fosfato deshidrogenasa
GMP	Guanosín monofosfato
GOD	Glucosa oxidasa
G6P	Glucosa 6 fosfato
G6Pasa	Glucosa 6 fosfatasa
3-HBDH	3-hidroxibutirato deshidrogenasa
IMP	Inosín monofosfato
IDP	Inosín difosfato
ITP	Inosín trifosfato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MDH	Malato deshidrogenasa
NAD	Nicotín adenín dimucleótido
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
OAA	Oxalacetato

PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinas
PK	Piruvato kinasa
POD	Peroxidasa
POPOP	2, 2'-fenilen bis (5-feniloxazol)
PPO	2, 5-difeniloxazol

INDICE

	<u>Página</u>
I. - INTRODUCCION.....	21
II. - PARTE TEORICA.....	23
2. - Metabolismo intermediario en peces.....	25
2. 1. - Metabolismo de los carbohidratos.....	25
2. 2. - Metabolismo lípidico.....	27
2. 3. - Metabolismo nitrogenado.....	30
2. 4. - Regulación hormonal.....	33
2. 5. - Efectos del ayuno.....	36
2. 6. - Efectos del estrés.....	38
2. 7. - Efectos de la hipoxia.....	39
2. 8. - Efecto del ejercicio.....	41
2. 9. - Aspectos específicos del metabolismo glucídico en trucha..	43
III. - MATERIAL Y METODOS.....	47
3. 1. - Material.....	49
3. 1. 1. - Especie biológica.....	49
3. 1. 2. - Material usado para el mantenimiento de los animales.	49
3. 1. 3. - Aparatos.....	49
3. 1. 4. - Productos.....	51
3. 2. - Métodos.....	52
3. 2. 1. - Cultivo de las truchas.....	52
3. 2. 1. 1. - Agua.....	52
3. 2. 1. 2. - Aireación.....	52
3. 2. 1. 3. - Termoregulación.....	52
3. 2. 1. 4. - Preparación y composición de las dietas.....	53

	<u>Página</u>
3. 2. 2. - Tratamiento de los animales.....	54
3. 2. 2. 1. - Alimentación.....	54
3. 2. 2. 2. - Ayuno.....	54
3. 2. 2. 3. - Hipoxia.....	54
3. 2. 2. 4. - Adrenalina.....	55
3. 2. 2. 5. - Insulina.....	55
3. 2. 2. 6. - Glucagon.....	55
3. 2. 2. 7. - Dibutiril AMPc.....	55
3. 2. 2. 8. - Acido α -ciano 3-hidroxicinamato.....	55
3. 2. 3. - Determinación "in vitro" de la glucogenolisis en cor- tes hepáticos.....	56
3. 2. 3. 1. - Determinación enzimática de glucosa.....	56
3. 2. 3. 2. - Determinación enzimática de glucógeno hepá- tico.....	58
3. 2. 4. - Tratamiento de los tejidos para la determinación de las actividades enzimáticas.....	62
3. 2. 4. 1. - Glucosa 6 fosfatasa.....	62
3. 2. 4. 2. - Láctico deshidrogenasa.....	62
3. 2. 4. 3. - Fructosa 1.6. difosfatasa.....	62
3. 2. 4. 4. - Fosfoenolpiruvato carboxicinasa.....	63
3. 2. 4. 5. - Transaminasas GOT y GPT.....	63
3. 2. 5. - Determinación de actividades enzimáticas.....	64
3. 2. 5. 1. - Determinación de la actividad enzimática de la glucosa 6 fosfatasa.....	64
3. 2. 5. 2. - Determinación de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa.....	67

	<u>Página</u>
3. 2. 5. 3. – Determinación de la actividad enzimática de la fructosa 1.6. difosfatasa.....	68
3. 2. 5. 4. – Determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas.....	71
3. 2. 5. 5. – Determinación de la actividad enzimática de la glutamato oxalacetato transaminasa.....	74
3. 2. 5. 6. – Determinación de la actividad enzimática de la glutamato piruvato transaminasa.....	76
3. 2. 6. – Determinación del contenido proteico.....	78
3. 2. 7. – Tratamiento de la sangre para la determinación de metabolitos.....	80
3. 2. 7. 1. – Determinación de glucosa en sangre.....	80
3. 2. 7. 2. – Determinación de L-lactato en sangre.....	80
3. 2. 7. 3. – Determinación de acetoacetato en sangre...	83
3. 2. 7. 4. – Determinación de amoniaco en sangre.....	84
IV. – RESULTADOS.....	87
4. 1. – Efectos de la composición de la dieta sobre algunas enzimas gluconeogénicas de hígado y riñón.....	89
4. 1. 1. – Dieta de un contenido proteico elevado.....	89
4. 1. 1. 1. – Efecto sobre la actividad de la lactato deshidrogenasa.....	90
4. 1. 1. 2. – Efecto sobre la actividad de la fructosa difosfatasa.....	90
4. 1. 1. 3. – Efecto sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa.....	90
4. 1. 1. 4. – Medidas en sangre de glucosa y ácido láctico.	93
4. 1. 2. – Dieta de contenido lipídico elevado.....	93

	<u>Página</u>
4. 1. 2. 1. – Efecto sobre la actividad de la láctico deshidrogenasa.....	96
4. 1. 2. 2. – Efecto sobre la actividad de la fructosa difosfatasa.....	96
4. 1. 2. 3. – Efecto sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa.....	99
4. 1. 2. 4. – Medidas en sangre de glucosa y ácido láctico.	99
4. 1. 2. 5. – Variación del peso de los animales.....	99
4. 2. – Efecto del ayuno prolongado sobre las actividades de algunas enzimas gluconeogénicas y metabolitos sanguíneos....	103
4. 2. 1. – Enzimas hepáticas.....	104
4. 2. 2. – Enzimas renales.....	104
4. 2. 3. – Glucógeno hepático y metabolitos en sangre.....	104
4. 3. – Variaciones de la glucemia despues de la ingesta.....	107
4. 4. – Efecto de la hipoxia, hormonas e inhibidores sobre la producción de glucosa por el hígado.....	107
4. 4. 1. – Ensayos "in vitro".....	110
4. 4. 1. 1. – Efecto de la hipoxia.....	110
4. 4. 1. 2. – Efecto de la adrenalina.....	111
4. 4. 1. 3. – Efecto del glucagón.....	111
4. 4. 1. 4. – Efecto de la insulina.....	114
4. 4. 1. 5. – Efecto del dibutiril AMPc.....	114
4. 4. 1. 6. – Efecto de algunas inhibidores de la gluconeogénesis.....	118
4. 4. 2. – Efectos "in vivo".....	122
4. 4. 2. 1. – Efecto de la hipoxia.....	122
4. 4. 2. 2. – Efecto de la insulina.....	122
4. 4. 2. 3. – Efecto del glucagon y adrenalina.....	127

	<u>Página</u>
4.4.2.4. - Efecto del dibutiril AMPc.....	127
4.4.2.5. - Efecto "in vivo" de la inyección simultanea de dibutiril AMPc + ácido α -ciano 3-hidro- xicinamato.....	127
V. - DISCUSION.....	131
5.1. - Efecto de la composición de las dietas.....	133
5.2. - Efecto del ayuno prolongado.....	136
5.3. - Tolerancia a la glucosa.....	138
5.4. - Liberación de glucosa por el hígado.....	139
VI. - CONCLUSIONES.....	149
VII. - BIBLIOGRAFIA.....	153

1. - INTRODUCCION

I. - INTRODUCCION

Existe en la actualidad un creciente interés por el estudio del metabolismo de los peces. Ello ocurre, entre otras razones, por la posibilidad de encontrar en estos orígenes modelos de procesos bioquímicos de menor complejidad que los que tienen lugar en los mamíferos. En el caso de la trucha confluye además el interés económico, ya que un mayor conocimiento del metabolismo de esta especie puede repercutir en la mejora de su aprovechamiento industrial. Por otra parte, la trucha presenta unas características metabólicas singulares que la hacen un animal de experimentación muy adecuado para el estudio de la diabetes, algunas glucogenosis y aterosclerosis.

Los trabajos que constituyen esta Memoria Doctoral han surgido de la colaboración con el Departamento de Fisiología Animal en el estudio de las repercusiones de la sustitución de proteína por grasa en la dieta de estos animales. Los resultados obtenidos en este campo han aconsejado estudiar más detenidamente el metabolismo glucídico en trucha. Con este objeto se ha examinado la evolución de algunas enzimas relacionadas con la gluconeogénesis a lo largo de un periodo prolongado de ayuno, tanto en hígado como en riñón. Por otra parte se han iniciado los estudios de regulación de la liberación de glucosa por el hígado, trabajando con cortes de tejido hepático y realizando en paralelo los oportunos tratamientos "in vivo". Los resultados obtenidos en estas experiencias parecen indicar que la regulación hormonal del metabolismo del glucógeno hepático es muy primitiva, si es que existe, lo que confirma el interés de la trucha como modelo simplificado de este proceso metabólico.

Panchenm

II. - PARTE TEORICA

270

II. - PARTE TEORICA

2. - Metabolismo intermediario en peces

2.1. - Metabolismo de los carbohidratos

La ruta principal del catabolismo de la glucosa en la mayor parte de los tejidos de los peces es la via de Embden Meyerhof-Farnas, ruta que convierte la glucosa en piruvato. Un segundo camino del catabolismo de la glucosa es la desviación a partir de la glucosa 6 fosfato hacia la ruta de las hexosas monofosfato.

La mayoría de los estudios realizádos sobre el metabolismo de los carbohidratos en peces se han centrado en las actividades de diversas enzimas dependiendo de la cantidad de hidratos de carbono en la dieta, cantidad de proteina, especie considerada, etc.

Nagayama y col (1) hicieron un estudio en tejidos de peces sobre la distribución de la hexokinasa (HK); glucosa 6P deshidrogenasa (G6PDH), 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), fosfoglucomutasa (PGM) fosfoglucosa isomerasa (PGI) y glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa) tratando de establecer una estimación del metabolismo potencial de la glucosa.

La actividad de la hexoquinasa (HK) que dá cuenta del poder de captación de glucosa en las rutas metabólicas es muy baja, de 1/3 a 1/7 del valor encontrado en el hígado de rata. Las enzimas relacionados con el ciclo de Embden Meyerhof-Farnas (PGM y PGI) y con el "Shunt" de las hexosas monofosfato (G6PDH y 6 PGDH) presentan una gran actividad en la carpa, anguila y trucha.

Mc Cartney (2) en 1970 estudió los efectos de diferentes azúcares en la dieta sobre la actividad enzimática de la fosfohexosa isomerasa (PHI), glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa) y pirofosfatasa inorgánica, no encontrando diferencias apreciables, excepto para el caso de la (PHI) que es muy poco activa tras la dieta rica en maltosa.

Cowey y col. (3) encontraron en la platija (Pleuronectes platessa) grandes variaciones en la actividad de la glucosa 6 fosfatasa, de acuerdo con el contenido protéico de la dieta sus resultados sugieren que en ausencia de proteína en la dieta, o cuando las concentraciones de la misma están muy disminuidas, se acude a las fuentes de energía provenientes de los ácidos grasos y carbohidratos, para mantener la glucemia dentro de unos límites aceptables, ya que se presupone que la glucosa le es necesaria para el mantenimiento de las células del cerebro, eritrocitos, sistema nervioso y gónadas. Cowey y col. (4) así como Sing y Nose señalan que los hidratos de carbono complejos son asimilados muy deficientemente por la mayor parte de los peces y que la glucosa es oxidada muy lentamente en comparación con otros grupos de animales (5).

En cuanto a la digestibilidad del almidón Inaba y col. (6) llegan a unos resultados similares a los de los autores anteriores, pues en las dietas en que se encuentra el almidón al 11.5 % y 40.2 % la digestibilidad es del 90 % y 48.2 % respectivamente. A excepción de la glucosa y otros monosacaridos que se absorben directamente, el resto de los hidratos de carbono necesitan para su absorción una hidrólisis previa por los enzimas correspondientes.

La digestibilidad varía de unas especies a otras, lo que hace suponer una actividad enzimática diferente.

Nagayama y col. (7) realizaron estudios sobre la actividad lactásica de la trucha arco iris y observaron que aumentaba con alimentos ricos en hidratos de carbono (especialmente lactosa). Sin embargo la actividad de la galactosidasa se reducía tanto en el hígado como en el riñón.

A resultados similares trabajando en carpas jóvenes llegan Kaway y col. (8). Los animales habían sido alimentados con dietas las cuales incluían diferentes porcentajes de proteína e hidratos de carbono, encontrando que las actividades de maltosa y amilasa intestinales a los 7 y 10 días del régimen alimenticio eran muy elevadas.

El problema fundamental en una alimentación con una elevada concentración de carbohidratos, sustituyendo a parte de proteínas, reside en el acúmulo de glucógeno hepático con la posterior degeneración del hígado (9, 10, 11, 12, 13, 14). A pesar de ello la glucemia no presenta alteraciones sustanciales en estos casos ni se induce la glucocinasa (15).

2.2. - Metabolismo lipídico

Los peces requieren en la dieta lípidos, por la misma razón que los mamíferos, ya que crea una mayor contribución calórica, para una mayor economía del animal, y secundariamente ciertos ácidos grasos, son componentes esenciales en las células, ya que son necesarios para el mantenimiento integral de las membranas y su funcionamiento. La ausencia de estos ácidos grasos esenciales en la dieta puede dar lugar a enfermedades.

Al contrario que los carbohidratos los peces pueden digerir y absorber grandes cantidades de lípidos hasta tal punto que según Lovern, la trucha de río puede continuar desarrollando una vida normal ingiriendo dietas de hasta un 57% de grasa (16).

Las grasas fundamentalmente son digeridas por lipasas, hasta ácidos grasos y glicerol antes de la absorción. En los teleosteos se han encontrado al menos dos fuentes de lipasas, los ciegos pilóricos y la mucosa intestinal (17).

Kitamikado y Tachino (18) detectaron una fuerte actividad esterásica en el hígado, bazo y bilis de la trucha arco iris y mas ligera en los ciegos pilóricos, intestino y estómago; esta actividad era máxima para un pH comprendido entre 6,8 y 7,6 y a temperatura de 25°C.

Brockhoff (19) ha observado "in vivo" una actividad lipásica en el páncreas del bacalao que ataca preferencialmente al enlace α de los ésteres de los ácidos grasos.

Leger y col. han estudiado una actividad lipasa pancreática en la trucha arco iris, comprobando su diferente pH óptimo según su aclimatación a la temperatura (20), su especificidad de acción (21) y determinando su Km y sus relaciones con el Ca^{++} y las sales biliares (22).

Chepik (23) detectó un cambio estacional en la actividad lipolítica del intestino de la carpa, máxima en la primavera y que es un reflejo de la disponibilidad de alimento en cada estación.

Nose y col(24, 25) concluyen que la digestibilidad de los ácidos grasos ocurre en el salmón, según Greene (26), a través del epitelio de todas las porciones del digestivo, aunque esta es la función primordial de los ciegos pilóricos. Para Bergot y Flechon (27) las células encargadas de la absorción de los ácidos grasos en la trucha arco iris poseen un mecanismo de esterificación por lo que pasan a los tejidos en forma de di y triglicéridos.

En la carpa, según Noaillac- Depeire (28), la absorción ocurre a nivel de los enterocitos de la región proximal del intestino, donde la grasa absorbida da lugar a dos tipos de inclusiones, unas que son de almacenamiento en forma de gotículas y otras de transporte que son particuladas.

Robinson y Mead (29) en trabajos de absorción realizados en la trucha arco iris, abogan por la siguiente explicación: sugieren que la rápida difusión de los lípidos, procedentes de la digestión de las grasas a través de las células del epitelio intestinal, es debida a que los lípidos son convertidos en moléculas inertes, con la consiguiente acumulación de un depósito lípidico en la lámina media, debajo del intestino. Los ácidos grasos por tanto aparecen en la sangre a través de la consiguiente movilización e hidrólisis de los triglicéridos existentes en la lamina media.

En recientes experimentos realizados por Kayama e Ijima (30), sobre el mecanismo de transporte de los lípidos en peces, concluyen, que este no es replica del de mamíferos, y subrayan el importante papel que desempeñan en los peces la fracción de ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo.

Las vías de síntesis y degradación de los ácidos grasos son básicamente muy similares a las de mamíferos. Parece ser que existe un primer paso de esterificación, a nivel de las células absorbentes del epitelio intestinal para convertir a los ácidos grasos en di y triglicéridos y poder ser transportados a los tejidos (27). Una vez que dichos ácidos grasos se encuentran en los órganos del cuerpo del animal, el consiguiente estudio bioquímico nos revela, según los trabajos de Bilinski (31, 32), la gran capacidad oxidativa del músculo rojo, riñón y corazón, y la casi inactividad en este sentido del cerebro y el músculo blanco; actividad que está perfectamente correlacionada con las de las enzimas carnitina acil-transferasa y carnitina palmítil-transferasa en los respectivos tejidos, y que se encarga del transporte

de los ácidos grasos activos, tanto de cadena corta como larga, a las mitocondrias (33).

Las vías biosintéticas han sido estudiadas con detalle por Hochachka (34) y Holub (35). Por su parte, Lin y col. (36, 37), trabajando con el salmón (Oncorhynchus kisutch) en los órganos lipogénicos, han comprobado el papel principal del hígado con respecto al tejido adiposo, y comprueban también como al subir el nivel lipídico de la dieta la actividad lipogénica hepática se deprime, mientras que la del tejido adiposo no varía.

2.3. - Metabolismo proteico.

Parece ser que la digestión de las proteínas en peces, no varía demasiado del patrón estructural de mamíferos, ya que las enzimas que están implicadas en estos procesos son de características similares. Kenyon en 1925 (38), señaló la existencia de una actividad péptica en el estómago de la carpa y en otros peces. A partir de entonces numerosos investigadores han probado la existencia y determinado las principales características de las endo y exopeptidasas de diversas especies de peces.

En los salmones, Norris y Elan detectaron en un extracto de mucosa gástrica del salmón del Pacífico una pepsina que presentaba un máximo de actividad a pH entre 2 y 3 (39).

Kitamikado y Tachino (40) observaron una actividad proteolítica en el estómago de la trucha arco iris que es máxima a un pH 2.8 y a una temperatura comprendida entre 40 y 45 °C. Dicha actividad aumenta con el tamaño del animal. También, estos mismo autores detectaban la actividad de una proteasa alcalina en los ciegos pilóricos, a pH 9.

Croston (41), encontró una actividad péptica en los ciegos pilóricos del salmón (Oncorhynchus tshawytscha) con un pH óptimo de 9, similar en todo a lo que se había encontrado en la trucha arco iris por Kitamikado y Tachino.

Sin embargo Onishi y Murayama (42, 43) observan diferencias entre distintas especies de peces. Por ejemplo, la proteasa de los ciegos pilóricos es de menor actividad en la trucha fario que en los salmones. También observan cambios de actividad a lo largo del ciclo biológico, siendo máxima en el salmón fontaine durante el periodo de reproducción.

Kaway e Ikeda (8) detectaron influencia en la actividad de las enzimas pépticas teniendo en cuenta la cantidad de proteína en la dieta así como la edad y el tamaño (40, 43).

Kashiwada (44) y Chepik (45) detectaron en diversas especies de peces diferencias estacionales en la actividad que están relacionadas con la forma de alimentación.

En cuanto a la absorción de los aminoácidos libres en peces, se dispone de poca documentación de los mecanismos en cuestión. Diversos autores y para especies de peces diferentes, han comprobado la existencia de mecanismos de transporte ligados a la bomba de Na^+ (46, 47) donde señalan diferencias morfológicas y funcionales entre las porciones proximal y distal del intestino (48, 49, 50).

En cuanto al metabolismo nitrogenado en peces responde al esquema general encontrado en los vertebrados superiores. Sin embargo presenta una serie de modificaciones adaptativas, con sus peculiaridades consecuentes.

Cuando los aminoácidos contenidos en la dieta son absorbidos, estos pueden ser utilizados para resintetizar nuevas proteínas con fines plásticos que sirvan para el crecimiento del animal, para reabastecer los "pool"

intra y extracelulares; o bien, para ser consumidos por el animal con fines energéticos siendo oxidados a CO_2 y H_2O tras perder el grupo amino.

En los tejidos de los peces los aminoácidos se desaminan a través de procesos de transaminación. Esto fue demostrado por Mc. Bean y col. (51), al encontrar que la alanina, aminoácido más abundante en los líquidos extracelulares, no se desamina directamente, sino a través de las vías de transaminación. Estos autores calcularon el grado de desaminación de los aminoácidos, via glutámico deshidrogenasa (GDH), y encontraron que dicha desaminación es cuantitativamente comparable con la producción de amoníaco.

Dicha capacidad de desaminación ha sido observada por Pequin y Serfaty (52) perfundiendo hígado e intestino de carpa, y observando que la glutamina, asparragina y leucina eran rápidamente desaminados. Esta rápida desaminación de la glutamina y asparragina está de acuerdo con los trabajos de Smith (53), quien en el hígado de carpa encontró glutaminasa y asparraginasas.

Jansen en 1964 (54) encontró en peces pulmonados africanos la glutamato piruvato transaminasa (GPT) y glutamato oxalacetato transaminasa (GOT).

La actividad de dichas enzimas esta íntimamente relacionada con el porcentaje de proteína en la dieta. Cowey y col. (3) en la platija, encontraron que por regla general, al aumentar la proteína con respecto a la dieta natural, la actividad tanto de la GOT como de la GPT se encontraba aumentada significativamente.

Como consecuencia del catabolismo de los aminoácidos, los radicales nitrogenados deben ser eliminados. Los peces fundamentalmente eliminan NH_3 en un porcentaje del 60-80 % del N. total excretado, siendo

mas secundarias las vias de eliminación de metabolitos tales como: urea, óxido de trimetilamina, creatinina, creatina, ácido úrico etc.

Tanto el amoniaco como la urea se eliminan a través de las branquias, en un porcentaje muy elevado, mientras que por via urinaria solo se eliminan los catabolitos nitrogenados menos difusibles tales como: creatina, creatinina y ácido úrico (55). Parece ser que los procesos metabólicos que originan esta excreción tienen lugar fundamentalmente en el hígado y secundariamente en el riñón (56, 57, 58, 59). Para Vellas y Serfaty (59), la glutamina es el principal compuesto implicado en el proceso de formación de amonio en la carpa. La glutamina se forma tanto en el hígado como en el riñón, por acción de la glutamina sintetasa. El amoniaco se libera en las branquias por acción de la glutaminasa. Para Walton y Cowey (60), en la trucha arco iris están implicados fundamentalmente el glutámico y la glutámico deshidrogenasa en la liberación de amoniaco. Con estos resultados coinciden diversos autores en distintas especies de peces. (51, 56, 61).

2.4. - Regulación hormonal

El metabolismo de los carbohidratos en peces difiere en ciertos aspectos fundamentales, respecto del de mamíferos, fundamentalmente en lo que respecta a la regulación hormonal.

Los estudios realizados por numerosos autores sobre la intolerancia característica que presentan los peces a la administración oral de glucosa (62, 63, 64, 65) indican que esta intolerancia es similar a la que ocurre en la diabetes humana (62, 63, 66).

Se puede pensar por tanto que hay una muy estrecha relación entre la intolerancia a la administración de glucosa, y los efectos similares que se observan, cuando se les alimenta durante un largo periodo de tiempo

con una dieta elevada en carbohidratos (62). Como resultado de esta mala utilización, se produce un acúmulo de glucógeno, produciendo hepatomegalia, que va asociada con un abultamiento abdominal y un incremento de la mortalidad.

A los mismos resultados llegan Palmer y Ryman (67) en 1972 en la trucha arco iris. Los peces exhiben una marcada hiperglucemia, como consecuencia de la administración de glucosa, observando que el exceso de glucosa va acompañado de un descenso significativo en los ácidos grasos, aminoácidos y colesterol plasmáticos y un incremento muy marcado de acúmulo de glucógeno en hígado.

Lo mismo que los autores anteriores piensan que la intolerancia a la glucosa sea debida a unos bajos niveles endógenos de insulina, ésta ejerce una acción hipoglucemiante muy activa, bajando los niveles de glucosa hasta límites más aceptables.

Estos mismo autores, Palmer y Ryman (67, 68), han realizado unos estudios dietéticos en la carpa dorada, manteniendo al pez con una alimentación cuya concentración de glúcidos era muy elevada. En el hígado, al cabo de un cierto tiempo se acusa el acúmulo de glucógeno, al mismo tiempo que se va cargando paulatinamente de grasa, bajando al mismo tiempo los niveles de nitrógeno, y apareciendo en el mismo un metabolismo defectuoso.

Por tanto es evidente que los peces en general, son deficientes en un mecanismo endocrino que controle los niveles de glucosa en sangre. Esto es muy lógico, si se piensa que han sufrido una adaptación metabólica, como consecuencia del medio ambiente en el que se desarrollan, ya que las dietas en estos casos son bastante deficientes en carbohidratos, y es posible que en caso de necesidades energéticas, sea la gluconeogénesis la encargada de su producción.

Analogamente a los mamíferos, el hipoinsulinismo está asociado a un incremento compensatorio en la producción de corticosteroides, y además es posible, que en estos casos la pituitaria también juegue un papel muy importante (69, 70, 71, 72).

Los estudios clásicos de endocrinología en mamíferos han demostrado a través del tiempo que tanto el glucagon como la adrenalina son hormonas que producen una fuerte hiperglucemia debida a la hidrólisis del glucógeno.

En los animales poiquiloterms esto no sucede de la misma manera. Así, Murat y Serfaty han observado en la carpa (Ciprinus carpio) que después de la inyección de glucagon y adrenalina se produce hiperglucemia, como era de esperar, pero los niveles de glucógeno hepático permanecen sin grandes alteraciones (73). Esto sugiere que el proceso metabólico que se esté produciendo sea la gluconeogenesis, que sería de gran importancia en estos peces.

En la Anguila europea, Ince y Torpe (74) encuentran que el glucagon no produce ningún efecto significativo sobre los niveles de insulina plasmática, mientras que la adrenalina y noradrenalina causan respuestas bifásicas en los niveles de insulina, consistente, en que los primeros sesenta minutos, hay un declive de la insulina en plasma, seguido de un aumento significativo después de tres horas. Administrando nuevamente noradrenalina, se inhibe la elevación de insulina. Se comprobó de que a pesar de que todas estas hormonas tienen un efecto hiperglucemiante muy marcado en la anguila, la más potente es la adrenalina.

Como consecuencia de esto se sugiere que las catecolaminas pueden inducir una inhibición de la insulina, permitiendo una muy rápida movilización de los metabolitos energéticos.

2. 5. - Efecto del ayuno

El ayuno es uno de los fenómenos más comunes en los peces durante determinados periodos de tiempo de su ciclo vital. Estos animales, por tanto, están capacitados para soportar periodos de privación de alimento mucho más prolongados que en los animales homeotermos. Durante estos periodos, los peces se van a nutrir tanto de las reservas hidrocarbonadas, (en menor grado) como de las proteínas y grasas, por lo que el contenido de los mismos en el organismo disminuirá considerablemente, al igual que el metabolismo irá disminuyendo, a medida que se vayan agotando dichas reservas energéticas.

En épocas de ayuno, los peces recurren en gran proporción a las reservas lipídicas. Esta dependencia varía con el tipo de pez, según se trate de peces grasos, de peces magros con hígado graso, o de peces magros con hígado magro, en este caso la movilización grasa se hace a expensas de las reservas existentes en la pared intestinal y mesenterio (75).

En periodos de ayuno de 45 días la grasa corporal en la trucha desciende desde 8,2 % a 6,3 % aunque el descenso más acusado se produce en los 30 primeros días, alcanzando después una estabilidad. Esto sugiere que los lípidos son una reserva energética de primer orden utilizada por los peces y que después se produciría una readaptación metabólica o un viraje en el metabolismo hacia otra fuente de energía (76).

Durante los primeros días de ayuno se elevan los niveles de ácidos grasos libres en sangre para después estabilizarse, sin embargo en el músculo blanco no se observan cambios significativos. (27).

Lin y col. (77) miden actividades de algunos enzimas lipogénicos, en el hígado del salmón (Oncorhynchus kisutch) y vieron que la actividad no disminuye a no ser que el ayuno sea muy prolongado (23 días).

Como apuntábamos al principio, los peces en ayuno tienden a movilizar las reservas proteicas existentes en los tejidos. Dado que el porcentaje muscular de estos animales es aun grande se puede pensar que constituyen una fuente de energia utilizable (75).

En los primeros días de ayuno, hay un incremento del porcentaje de proteínas corporales aunque luego haya un descenso neto que va desde 3.9 - 2.8 % del peso corporal como lo demuestra Sorvachev (78) en la carpa, sometiendola a seis meses de ayuno.

La movilización, y posterior utilización de los aminoácidos con fines energéticos, se produce al mismo tiempo que la de los ácidos grasos, siendo los glúcidos los que se movilizan mas tardiamente (75, 79). También hay una movilización de proteínas sanguineas particularmente en los primeros meses de ayuno (80, 81), que se haria primero a partir de albuminas y luego a partir de α y β globulinas, permaneciendo alta la fracción de γ -globulinas (82).

En la anguila, en los primeros 96 días de ayuno, se usan triglicéridos hepáticos y musculares. Al mismo tiempo, tiene lugar un aumento de la glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), lo que indica, que el catabolismo de los aminoácidos también esta incrementado. Sin embargo el glucógeno hepático permanece constante (83). La relativa inalterabilidad del contenido en glucógeno hepático durante el ayuno ha sido observada en distintas especies de peces por numerosos investigadores (84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92).

Nagayama y col. (93) hicieron un estudio de las actividades de las enzimas hepáticas relacionadas con el metabolismo de la glucosa 6 fosfato en la anguila, carpa y trucha arco iris, encontrandose que disminuia durante los primeros dias de ayuno. El efecto depresivo del ayuno sobre las

actividades de la hexokinasa , fosfoglucomutasa y fosfoglucosa isomerasa del hígado de la carpa era menor que sobre las enzimas hepáticas de la trucha arco iris y anguila. Así mismo las actividades de la glucosa 6 fosfatasa de la carpa fueron muy elevadas en el ayuno, en el periodo comprendido entre 5 y 10 días, volviendo a los valores normales despues de 30 días de ayuno.

2.6.- Efecto del estrés

Son sorprendentes los cambios ocurridos en el funcionamiento fisiológico de los peces, cuando estos se encuentran sometidos a unas condiciones de estrés.

Así, Chaving y Yount (94) advirtieron que el transporte o transvase de los animales de un acuario a otro lleva aparejado un aumento de la glucosa sanguínea que persiste durante dos días.

También ha sido demostrado por diversos autores que algunas manipulaciones del laboratorio (inyecciones, anestesia etc.) llevan aparejadas un estrés considerable, que influyen particularmente en el metabolismo de los carbohidratos (95, 96).

Slicher y col. han conseguido reducir los efectos del estrés en Fundulus heteróclitus mediante un procedimiento de entrenamiento, consistente en el acostumbramiento de los peces a las manipulaciones de laboratorio mediante el manejo de los mismos durante la alimentación (97).

Chaving y Young (94) proponen otro método para la eliminación de la hiperglucemia, como consecuencia del estrés en la carpa dorada. Consiste en la rápida captura seguida de muerte instantanea del animal. Pero este

procedimiento no puede ser utilizado siempre a la hora de llevar a cabo un trabajo de investigación, ya que elimina todo tipo de manipulación que en muchos casos es necesaria (inyecciones, anestesia, cambio de acuario etc.).

Aparte de la hiperglucemia, el estrés produce una leucopenia muy marcada y un aumento de la osmolalidad en el suero sanguíneo (97).

Los trabajos de Rush (98) en la carpa dorada vienen a ratificar los de Slicher. En este caso las carpas fueron sometidas además a una temperatura de 37°C. La respuesta fue una elevada concentración de glucosa sanguínea con disminución de glucógeno hepático. Este estrés inducido produce cambios en el metabolismo de los carbohidratos que es patente a las 6 horas de aplicarse y permanece durante un día.

El glucógeno hepático desciende como consecuencia de la glucogenolisis, pero este descenso no va acompañado de un incremento en la actividad de la glucógeno fosforilasa.

2.7.- Efecto de la hipoxia.

En peces, exactamente igual que en mamíferos, la falta de aporte de oxígeno a los tejidos tiene implicaciones metabólicas muy importantes, afectando en gran magnitud al sistema nervioso, circulatorio y cardíaco.

En los peces la falta de suministro de oxígeno se puede llevar a cabo por la emersión del mismo a la superficie, o bien, mediante la colocación de los animales en acuarios desprovistos de aireación.

Las modificaciones producidas como consecuencia de la falta de oxígeno van asociadas a unos cambios metabólicos profundos asociados a alteraciones en la regulación hormonal (99, 100). El más afectado por la falta de oxígeno es el metabolismo glucídico, ya que se puede pensar en él como

una de las fuentes de energía que aseguran la supervivencia del animal (101). Por tanto las hormonas intervienen regulando la velocidad de movilización de dichos carbohidratos y la posterior utilización de los mismos.

Demäel (102) realiza un estudio en la tenca (Tinca vulgaris), pez que por su biotipo natural puede soportar amplias variaciones en cuanto a la oxigenación del agua. La falta de oxígeno produce disminución del glucógeno en varios tejidos debido a la activación de la glucógeno fosforilasa. Ello va acompañado de un aumento en los niveles sanguíneos y musculares de lactato y de una hiperglucemia muy marcada.

Mazeaud (103) opina que la emersión del animal produce un estrés agudo que provoca una liberación de catecolaminas que no va acompañada en este caso de corticosteroides (104).

En estas condiciones se han medido las concentraciones de insulina circulantes y se ha comprobado que es muy sensible al déficit de oxígeno. En los primeros momentos hay una disminución de los niveles de insulina, fenómeno que puede ser debido a una inhibición llevada a cabo por las catecolaminas (105).

El hecho de que la insulina no descienda de forma acusada es primordial, ya que el pez anóxico necesita una buena permeabilidad celular a la glucosa para el aporte de energía. Al mismo tiempo la presencia conjunta de insulina y glucosa puede favorecer la lipólisis.

Trabajos realizados en la carpa dorada (Carassius auratus) (106), a diferentes temperaturas en anoxia, indican una mayor supervivencia de la misma a bajas temperaturas. En esta especie que también por su biotipo tolera modificaciones en el oxígeno del agua, se produce un descenso de los niveles de glucógeno, así como un incremento en el contenido de agua en el hígado permaneciendo constante el tamaño del mismo. La actividad de la glucosa 6 fosfatasa se encuentra incrementada, pero no aparece activación en la glucógeno fosforilasa.

Thillar y col. (107) demuestran que en anaerobiosis y a 20 °C, en la carpa dorada, se produce un marcado descenso en los niveles de ATP y creatin fosfato, mientras que el lactato, ADP y creatina aparecen muy incrementados. No se producen modificaciones en las concentraciones de AMP, glutamato y ácidos grasos libres, pero en este caso la supervivencia del animal se ve muy disminuida, no siendo superior a las 10 horas.

2.8. - Efecto del ejercicio

En los peces el miotomo muscular esta compuesto por dos tipos de fibras, rojas y blancas. Estos dos sistemas, se pueden distinguir de muy distintas maneras: por la hemoglobina, mioglobina, contenido mitocondrial y propiedades enzimáticas, diferentes en cada uno de los sistemas.

Con estas características descritas, se acepta que el metabolismo del músculo rojo es fundamentalmente aerobio, utilizando como metabolitos energéticos las grasas y los carbohidratos, mientras que el músculo blanco funciona anaerobicamente utilizando el glucógeno y produciendo lactato (108).

Existe una revisión bibliografica muy extensa realizada por Bilinski (109), sobre la relación cuantitativa entre la degradación de glucógeno y acumulación de lactato en el pez durante el ejercicio. La degradación de glucógeno en el músculo blanco es muy rápida. Una actividad media del pez es suficiente para que toda la energia almacenada se degrade en 15 segundos con la consecuente producción de lactato (110).

Los trabajos realizados en la carpa común (Ciprinus carpio) por Driedzic y col. (111), muestran que después de una actividad máxima de natación, disminuian las concentraciones de ATP, también las de ADP,

pero menos drásticamente, mientras que las de AMP permanecían bajas e inalterables. La consecuencia más patente de todos estos sucesos metabólicos, es el descenso en el "pool" de adenilato libre. Simultáneamente con todos estos hechos, hay un incremento en los niveles de IMP y NH_4^+ . El incremento en los niveles de IMP y el descenso del "pool" de adenilato están correlacionados y en proporción estequiométrica 1:1. Lo mismo ocurre en el músculo del bacalao (112).

Los mismos autores trabajando con la trucha arco iris, observan que durante una natación constante no existe un aumento significativo en los niveles de lactato sanguíneo. Sin embargo, cuando la velocidad de natación se aumenta y con un solo minuto de fatiga del animal, el lactato se hace 4 ó 5 veces superior.

Puede concluirse por tanto que el lactato es producido por el músculo blanco sólo en periodos de intensa actividad, tal como Bone había propuesto para los elasmobranquios en 1966 (114).

Bilinski y Jones (115), sugieren que el lactato puede ser utilizado por las branquias del pez como fuente de energía. Se sabe que las branquias de los crustáceos tienen una capacidad gluconeogénica muy elevada (116) y es muy lógico pensar que las de los peces sean muy similares y puedan convertir el lactato en glucosa a través de la vía gluconeogénica. Driedzic sostiene esta misma teoría (113).

2.9. - Aspectos específicos del metabolismo glucídico en trucha

Las peculiaridades metabólicas de la trucha encajan dentro del contexto general de los peces que acabamos de considerar. Sin embargo, las diferencias con el mundo de los mamíferos son aun más acusadas.

Spannhof (117) ha realizado una serie de estudios comparativos en la anguila y en la trucha arco iris, en los cuales los niveles de glúcidos en la dieta eran muy elevados. Cuando a la trucha se le alimenta con dietas de este tipo, el crecimiento de la misma se ve muy disminuido, mientras que el de anguila apenas sufre modificaciones. Se puede pensar que la anguila es capaz de usar los carbohidratos mucho mas facilmente y que posiblemente esto sea debido a que la actividad de la amilasa este disminuida en mucho menor grado que en la trucha.

Uno de los procesos metabólicos mejor estudiados en la trucha es la gluconeogénesis. En efecto la síntesis de glucosa a partir de aminoácidos es fundamental en este animal dado que su dieta natural es rica en proteínas y deficitaria en glúcidos.

Cowey y col. (118) han estudiado la gluconeogénesis en cortes hepáticos de trucha arco iris demostrando que la velocidad de formación de glucosa a partir de piruvato es de $6 \mu\text{moles} / \text{kg}$. Esto induce a pensar que los requerimientos de glucosa en la trucha son más bajos que en los mamíferos.

Estos autores han estudiado los cambios en las actividades de varios enzimas de la via gluconeogénica en respuesta a la modificación de los niveles de carbohidratos y proteínas en las dietas encontrando una activación de la fosfoenol piruvato carboxicinaasa (PEPCK) y fructosa 1, 6 difosfatasa (F. 1,6 DPasa) al aumentar la riqueza proteica de la dieta.

La insulina administrada en dosis fisiológicas reduce la gluconeogénesis en la trucha. Esto se debe en parte al incremento en la velocidad de incorporación de aminoácidos en las proteínas tisulares, concretamente en el músculo (119), reduciendo los niveles de aminoácidos en la sangre (120).

La trucha al igual que los peces teleosteos toleran largos periodos de ayuno dentro del ciclo vital de los mismos, y es muy probable que bajo estas circunstancias la gluconeogénesis se encuentre muy incrementada.

Esta evidencia es muy importante si nos basamos en los cambios que ocurren en las proteínas musculares y el glucógeno. En los casos mas extremos como el de la migración para el deshove, el contenido de glucógeno se incrementa en la última parte de la migración, llevando este fenómeno aparejado un incremento en la gluconeogénesis (84).

En estos casos la trucha, utiliza como fuentes primordiales de energia las grasas y después las proteínas, dejando para el final, y en mucho menor grado la utilización de los carbohidratos.

Jürs y Nicolai (121) detectan cambios muy importantes tras 9 semanas de ayuno, en la trucha arco iris. En este periodo de tiempo hay un descenso en el índice hepatosomatico, mientras que los niveles de glucógeno se reducen en un 90 % del contenido total del mismo. Disminuye la concentración de proteínas solubles en el hígado, volviendo a la normalidad cuando la alimentación se normaliza.

En las tres primeras semanas de ayuno no detectan cambios ni en la GOT ni en la GPT mientras que a las 9 semanas de ayuno hay un aumento en los niveles de GOT.

En el músculo estas mismas enzimas no presentan modificaciones en las tres primeras semanas de ayuno, incrementándose tanto GOT como GPT en la novena semana, para volver a los niveles basales cuando se reanuda la alimentación.

Shibata y col. (122), en la trucha arco iris señalan una serie de efectos como consecuencia del ayuno. Al 55 día desciende la glucemia. Las proteínas decrecen pero no muy significativamente. Tanto los triglicéridos como los ácidos grasos libres se incrementan durante el transcurso del ayuno, lo cual nos indica que la primera fuente energética a la que recurren es a las reservas lipídicas. Los niveles de colesterol también se encuentran significativamente elevados.

En trabajos realizados por otros autores los niveles de glucosa aumentan en los 10 primeros días de ayuno, volviendo a la normalidad a partir de este día y mientras concluye el experimento (123).

Las etapas enzimáticas de la gluconeogénesis en trucha son similares a las de mamíferos. A diferencia de la rata, la PEPCK de la trucha es fundamentalmente mitocondrial (124).

Parthenium



L. A. P.

III. - MATERIAL Y METODOS

III. - MATERIAL Y METODOS

3. 1. - MATERIAL

3. 1. 1. - Especie biológica

Las experiencias han sido realizadas en truchas de la especie, Salmo gairdneri Richardson, juvenes, de peso medio comprendido entre 90 y 100 gr, procedentes de la piscifactoria de Riofrio (Granada).

3. 1. 2. - Material usado para el mantenimiento de los animales

- Cubas de alimentación o mantenimiento, con facil evacuación del agua, aireación y termoregulación.

- Burbujeadores

- Refrigerador termoregulado.

3. 1. 3. - Aparatos

Las pesadas se realizaron en Balanza Mettler H 20 T (peso máximo = 160 g 0.01 mg).

Para la medida del pH se utilizó un pehachímetro Beckman Expandomatic SS-2 (pH 0.005).

Los cortes hepáticos se realizaron con un microtomo manual (A. Thomas Co, Filadelfia, USA) y cuchillas de acero nº 7, 120 D.

La homogenización tisular se realizó en un aparato tipo "Potter" mecánico (MSE) con pistilo de teflón-vidrio.

Las centrifugaciones en frio a gran velocidad se realizaron en la ultracentrífuga Beckman L 3-50. En los demás casos se utilizó una centrífuga angular modelo "Piccolo" de la firma Martin Christ. Para la agitación de los

tubos se empleó un agitador Whirlimixer de la firma Fisons Scientific Apparatus Limited (Inglaterra). Las incubaciones se realizaron en baños termostatzados del tipo Tecam Tempunit (precisión: $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$).

Las incubaciones de los cortes de tejido hepático, se realizaron en aparatos Gallekamp IH-350 a una temperatura de $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Las incubaciones para la determinación de la actividad de la fosfoenol piruvato carboxicinaisa isotópica, se realizarón en un incubador Grant SS-30.

La adición de sustratos y enzimas se realizó con micropipetas "EMIL WORKS" de enrase automático por estrangulamiento (AutoCero High Precision) y con micropipetas automáticas Finnpiette.

Las lecturas colorimétricas en la zona entre 440 y 660 nm se realizaron en un fotocolorímetro Bausch-Lomb modelo Spectronic 20. Las medidas espectrofotométricas a 340 nm se realizaron en el espectrofotómetro Unicam SP 1.700 con registro gráfico incorporado y compartimento de cubetas termostatzado. Se utilizaron cubetas TSL de 1 cm de espesor.

Las medidas isotópicas se han realizado en un contador de centelleo líquido, Espectrómetro C.L. Philips Modelo Pw 4510.

Para los gaseos se han utilizado bombonas de carbógeno (O_2 : CO_2) (95:5) y CO_2 puro.

La dialisis de la málico deshidrogenasa y láctico deshidrogenasa, para la determinación de la actividad enzimática de las transaminasas (GOT y GPT), se realizó en tubo especial tipo Wisking Tubing 8/32.

Para la ruptura mitocondrial se ha empleado un equipo de ultrasonido Branson Sonifier, modelo B-12, dotado de un generador de alta frecuencia, un convertidor piezoelectrico de energia electrica en mecánica, y un recipiente cilindrico de vidrio borosilicatado, provisto de una camisa refrigeradora con entrada y salida de agua, que mantiene el extracto adisgregar a una temperatura de $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

3. 1. 4. - Productos

En la preparación de tampones, soluciones salinas y demás reactivos generales se han utilizado productos PROBUS (España) y MERCK (Darmstad, Alemania). El hidrato de hidrazina y el indicador universal interno procedían de la firma BDH Chem. LTD (Poole, Inglaterra). El naranja de metilo de la firma MERCK.

Los sustratos y coenzimas utilizados procedían de las firmas Sigma Chemical Co (USA) y Boehringer (Mannheim, Alemania).

Las enzimas fueron suministradas en general, por Boehringer y Sigma. La peroxidasa procedía de Sigma .

La heparina procedía de los laboratorios Leo (Madrid) y la ortodianisidina de Fluka, Ab. Bush S.G. Suiza.

El glucagon y la Insulina (Actrapid M.C. 40UI/ml) procedía de los laboratorios Novo (Copenhague Dinamarca). La adrenalina de Sigma Chemical Co. (USA).

Para preparar los líquidos de centelleo se utilizarón PPO y POPOP de Merck, el bicarbonato marcado, por el Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra.

3. 2. - METODOS

3. 2. 1. - Cultivo de las truchas

Consta, en esencia de una serie de cubas paralelepipedas, de material plástico transparente, con una capacidad de 200 l. Cada una de ellas va provista de un grifo de entrada de agua y de un desagüe, que facilita el cambio del agua de las mismas.

Para mantener a los animales, en una circunstancias, lo mas parecidas posibles a las de su habitad natural, son fundamentales: agua limpia, oxigenada y temperatura adecuada.

3. 2. 1. 1. - Agua

Para conseguir una mayor limpieza y oxigenación, el agua se cambia en su totalidad una vez al dia como mínimo. El agua procede de la red potable de Granada, y es desprovista previamente del cloro añadido, muy tóxico para estos animales, mediante la intercalación de un filtro de carbón activado y arena silíceas, entre su salida de la red y su vertido a las cubas

3. 2. 1. 2. - Aireación

La aireación, se consigue mediante difusores colocados en nº conveniente y conectado con un depósito de aire comprimido existente en la Facultad; la presión de salida puede ser regulada para cada cuba adaptandola a las necesidades de cada momento.

3. 2. 1. 3. - Termoregulación

Otra característica de estos animales, es que requieren una temperatura entre 12 y 14°C. La temperatura se mantiene durante todas las

experiencias gracias a un sistema de refrigeración, consistente, en una unidad condensadora, que emplea Freón 12 como gas refrigerante, acoplados a unos serpentines de acero inoxidable (uno para cada cuba), en los que el gas se expande y se evapora; cada cuba va provista de un termostato regulable, independiente, conectado a la unidad de refrigeración.

3. 2. 1. 4. - Preparación y composición de las dietas

Se han utilizado dos tipos de dietas, una cuya composición se aproxima a la de los piensos comerciales para truchas, a la que hemos denominado dieta protéica, y otra en la cual hemos aumentado el nivel graso, disminuyendo el protéico habitualmente consumido, y a la que denominamos dieta grasa.

	<u>Dieta protéica</u>	<u>Dieta grasa</u>
Humedad %	7, 6	6, 0
Proteína %	45, 0	35, 7
Grasa %	6, 2	16, 2
Cenizas %	16, 7	10, 4
Glúcidos %	24, 5	31, 7

La protéica es una dieta semisintética, preparada en el laboratorio, con una fuente protéica mixta (harina de pescado comercial + caseína + metionina 5%) añadiendo celulosa micronizada como agente diluyente, y los correctores mineral y vitamínicos. Después de mezclados los componentes, se han granulado con una granuladora comercial, provista de una matriz capaz de proporcionar el tamaño del grano requerido por los animales. De la misma manera, se ha preparado la dieta grasa, en donde se ha sustituido parte de la harina de pescado (manteniendo constante en ambas dietas la cantidad de caseína + metionina 5%) , por aceite de hígado de bacalao refinado,

para aumentar el nivel graso, procurando mantener el contenido calórico.

La composición mineral y vitamínica, así como las cantidades de ingredientes utilizados en la preparación de las dietas problemas, son exactamente iguales a los utilizados por Garcia Gallego, en su memoria doctoral (125).

3. 2. 2. - Tratamientos de los animales

3. 2. 2. 1. - Alimentación

Se suministran tres tipos de dietas: estandar (preparado comercial), protéica y grasa; estas dos últimas preparadas en nuestro departamento según describimos en la sección 3. 2. 1. 4.

Con las dietas protéica y grasa, se alimentan las truchas "ad libitum", durante 21 días intercalando periodos de ayuno de 10 días.

3. 2. 2. 2. - Ayuno

Se mantuvieron a los animales durante un periodo de tiempo entre 8 y 12 semanas desprovistos de alimento, en las condiciones de mantenimiento anteriormente citadas.

3. 2. 2. 3. - Hipoxia

Las truchas se mantuvieron durante 2 horas en recipientes, con una cantidad aproximada de agua de 5 litros, desprovistos de aireación.

3. 2. 2. 4. - Adrenalina

A los animales se les administró, por inyección intraperitoneal, adrenalina, en dosis aproximada de 5 mg/kg de peso. Los animales fueron sacrificados a las 2 horas de la inyección.

Los animales control, fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina, al 0,9 %, por el mismo procedimiento.

3. 2. 2. 5. - Insulina

Se les inyectó intraperitonealmente 200 UI/kg de peso por el mismo procedimiento que el indicado en el apartado 3. 2. 2. 4.

3. 2. 2. 6. - Glucagon

Se les inyectó, 2 mg/kg de peso por el mismo procedimiento que el indicado en la sección 3. 2. 2. 4.

3. 2. 2. 7. - Dibutiril AMPc

Las truchas fueron inyectadas por el mismo procedimiento descrito en la sección 3. 2. 2. 4. En este caso, los distintos lotes de animales fueron sacrificados a los 30 , 60 y 120 minutos después de la inyección. La dosis fué de 10 mg/Kg peso.

3. 2. 2. 8. - Acido α ciano hidroxycinamato.

La dosis fué de 500 mg/Kg de peso, los animales fueron inyectados intraperitonealmente, por el mismo procedimiento descrito en el apartado 3. 2. 2. 4.



3. 2. 3. - Determinación "in vitro" de la glucogenólisis, en cortes de hígado

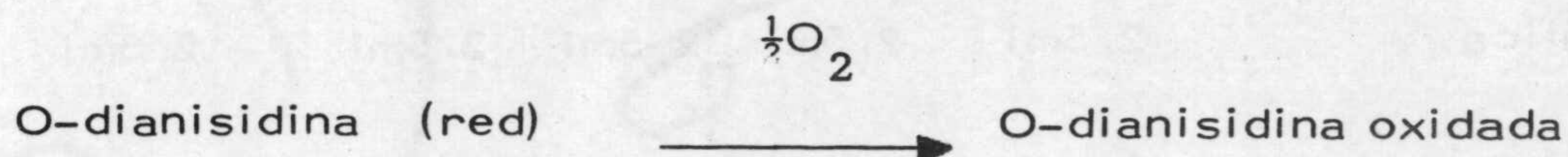
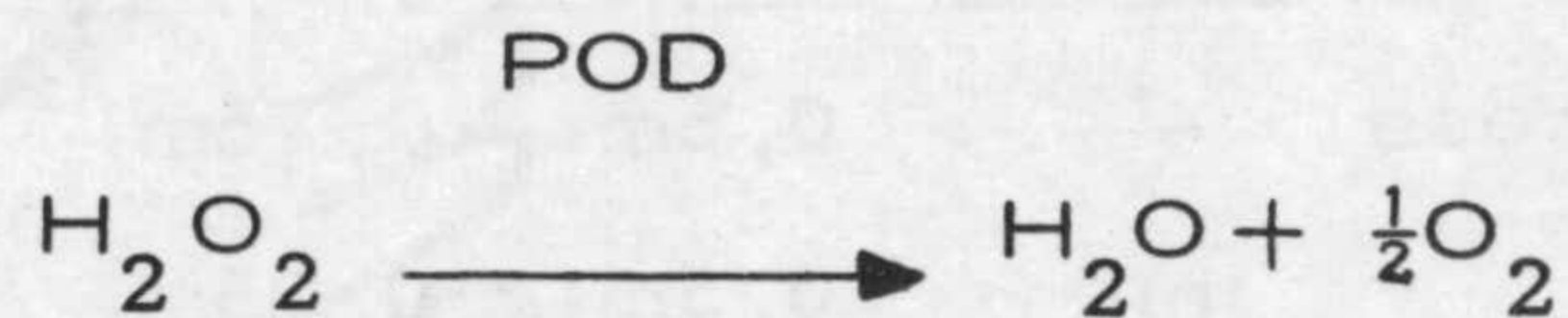
Se ha empleado el método descrito por Krebs y col. (126) para la determinación de la capacidad gluconeogénica en corteza renal de rata.

El método consiste en la incubación de cortes hepáticos en un medio Krebs-Henseleit (127), durante un periodo de tiempo que oscila desde los 30' a las 2 horas, a una temperatura de $15 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Como consecuencia de la agitación, se favorece el contacto del tejido con las distintas hormonas e inhibidores ensayados, existentes en el medio de incubación, y gas carbónico para su respiración. Los líquidos resultantes de la incubación se desnaturalizan y neutralizan, y se determina en ellos la glucosa producida como se indica a continuación. Los resultados, se expresan en μmoles de glucosa producida durante el tiempo de incubación, por gramo de tejido húmedo.

3. 2. 3. 1. - Determinación enzimática de glucosa

La determinación de glucosa se ha realizado por el método enzimático de la glucosa-oxidasa-peroxidasa, usando como cromógeno la O-dianisidina.

La técnica ha sido descrita por Bergmeyer y col (128). La glucosa oxidasa (GOD), cataliza la oxidación de la glucosa y por la peroxidasa (POD), el H_2O_2 formado se descomponen en H_2O y oxígeno atómico que oxida al cromógeno.



La O-dianisidina oxidada, presenta un color que absorbe a 440 nm. Las pequeñas cantidades de α -D Glucosa que puedan existir en las muestras, también se determinan al estar la GOD comercial acompañada de pequeñas cantidades de mutarrotasa.

a) Reactivos

Tampón Fosfato, Tris-ClH 0, 2:0, 1 M pH 7.3

Suspensión de O-dianisidina en etanol de 95° al 1% p/v

Solución estándar de glucosa 0, 2 mM

Glucosa-oxidasa (GOD) (E. C. 1. 1. 3. 4.) comercial 9, 3 mg para 75 ml de mezcla enzimática.

Peroxidasa (POD) (E. C. 1. 11. 1. 7.) comercial, 3 mg para 75 ml de mezcla enzimática.

Mezcla enzimática: se prepara mezclando 9, 3 mg de GOD, 3 mg de POD, 0, 5 ml de la suspensión de O-dianisidina y se completa con tampón fosfato, tris-ClH hasta 75 ml.

b) Técnica

Se preparan los siguientes tubos con las cantidades siguientes:

	<u>Blanco</u>	<u>S₁</u>	<u>S₂</u>	<u>S₃</u>	<u>Muestra</u>
Solución estándar de glucosa	-	0,5ml	0,75ml	1ml	-
H ₂ O destilada	1ml	0,5ml	0,25ml	-	0,8ml
Muestra neutralizada	-	-	-	-	0,2ml
Mezcla enzimática	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml

Se incuba una hora a 37°C y se determina la D.O. existente en cada tubo a 440 nm.

c) Cálculos

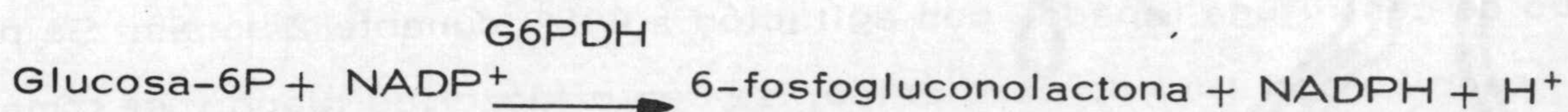
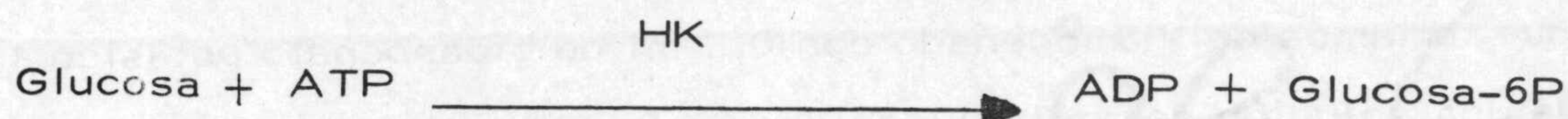
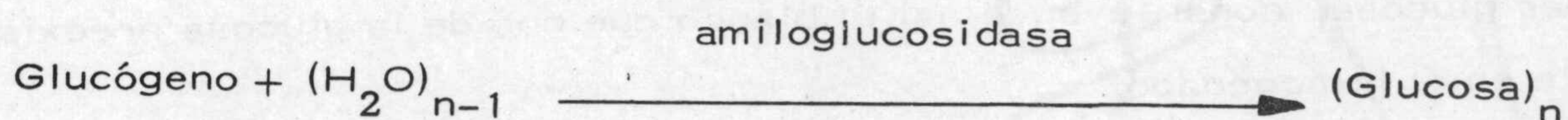
Para hallar los μ moles de glucosa de la muestra es necesario representar una recta patrón con las densidades ópticas de los estándar y sus respectivas concentraciones de 0,1, 0,15 y 0,2 μ moles de glucosa. Así se obtiene los μ moles de glucosa existentes en 1 ml de muestra neutralizada.

Los cálculos son diferentes dependiendo de que la muestra proceda de una toma de sangre o del líquido de incubación de los cortes hepáticos, teniendo en cuenta el volumen de que proceden y la neutralización o dilución realizada en cada caso, y la expresión a que se quiere referir el resultado.

3. 2. 3. 2. - Determinación de glucógeno hepático

Se determina el glucógeno al estado de glucosa después de hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa (129).

La enzima libera glucosa a partir de glucógeno hidrolizando las uniones α -D (1 \rightarrow 4) y α -D (1 \rightarrow 6). La enzima es específica lo que permite efectuar la hidrólisis en homogenados de órganos y de células sanguíneas sin necesidad de aislar el glucógeno. La glucosa formada es específicamente determinada con hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



a) Reactivos

Solución de bicarbonato potásico 1 M

Amiloglucosidasa comercial (E. C. 3. 2. 1. 3.)

Tampón acetato 0, 2 M, pH 4, 8

ATP

NADP

Glucosa-6P deshidrogenasa (G6PDH) (E. C. 11. 1. 4. 9.) comercial

Hexokinasa (HK) (E. C. 2. 7. 1. 1.) comercial

Acido perclórico 0, 6 N

b) Técnica

1. Hidrólisis del glucógeno:

Se extrae rápidamente el hígado del animal y se pesa por diferencia en un tubo de centrífuga; se añade en la proporción 1:5 p/v, en ácido

perclórico 0,6 N e inmediatamente se homogeniza en un Potter Elvehjem mecánico, teflón-vidrio. A continuación se pipetea 0,2 ml del homogenado en un tubo de centrifuga y se conservan en baño de hielo. Esta alícuota se utiliza para la hidrólisis del glucógeno.

El resto del homogenado se centrifuga durante 15 minutos y después de neutralizar con CO_3HK sólido, se toman 0,05 ml para determinar glucosa, constituyendo así el blanco que nos da la glucosa preexistente en el homogenado.

Para realizar la hidrólisis del glucógeno, se incuban los 0,2 ml que tomamos del homogenado con 0,1 ml de bicarbonato potásico 1 M y 2 ml de una solución de amiloglucosidasa a 0,02% en tampón acetato, en un tubo de centrifuga tapado, con agitación a 40°C, durante 2 horas. Se para la reacción con 1 ml de perclórico, se centrifugan los tubos y se toman 0,05 ml del sobrenadante para determinar la glucosa.

2. Determinación de glucosa:

Se prepara una cubeta para el blanco de glucosa y otra para el hidrolizado del glucógeno, siguiendo el protocolo descrito a continuación:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco Glu.</u>	<u>Blanco</u>
Cocktail	2,00 ml	2,00 ml	-
Muestra del hidrolizado	0.05 ml	-	-
Muestra inicial	-	0,05 ml	-
Agua destilada	-	-	2,00 ml
HK	0,005 ml	0,005 ml	-

El cocktail se prepara disolviendo en tampón trietanolamina el ATP en concentración 1 mM/ml, el NADP en concentración 0,9 mM/ml y la G6PDH en concentración 5,0 $\mu\text{g/ml}$.

El curso de la reacción se sigue espectrofotométricamente midiendo a 340 nm el ΔE debido a la formación de NADPH.

c) Cálculos

El glucógeno se expresa como μmoles de glucosa/g de tejido húmedo.

$$\text{umoles/g} = \frac{\Delta E_p \times 2,055 \times 3,3}{6,22 \times 10^6 \times 10^{-6} \times 0,05 \times 0,2} \times \frac{V_t}{P}$$

$$- \frac{\Delta E_b \times 2,055}{6,22 \times 10^6 \times 10^{-6} \times 0,05} \times \frac{V_t}{P}$$

Siendo:

ΔE_p = Medida del incremento de la densidad óptica correspondiente al hidrolizado

ΔE_b = Medida del incremento de la densidad óptica correspondiente al blanco de glucosa

2,055 = Volumen del medio de reacción (Det. de glucosa)

3,3 = Volumen total del hidrolizado de glucógeno

$6,22 \times 10^6$ = Coeficiente de extinción molar del NADP

0,05 = Volumen de muestra en cubeta (det. de glucosa)

0,2 = Volumen del homogenado en el hidrolizado de glucógeno

P = Peso en gramos de la muestra de hígado fresco.

3. 2. 4. - Tratamiento de los tejidos para la determinación de las actividades enzimáticas.

3. 2. 4. 1. - Glucosa-6-fosfatasa

En la determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa de hígado y riñón, se han homogenizado 50 mg de tejido fresco exactamente pesados con 2 ml de tampón citrato 0,1 M pH 6.5, en un Potter Elvehjem mecánico, vinilo-vidrio, en frío. El homogenizado se filtra por una torunda de gasa. En el filtrado se determina la correspondiente actividad enzimática. El filtrado mantiene su actividad glucosa-6-fosfatasa por un espacio de 2 horas cuando se conserva en frío.

3. 2. 4. 2. - Láctico deshidrogenasa

En la determinación de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa de hígado y riñón, se han homogenizado 100 mg de tejido fresco pesados con exactitud, con 1 ml de tampón Tris-sacarosa 0,01:0,25 M en un Potter-Elvehjem de tipo mecánico, vinilo-vidrio, en frío. El extracto obtenido se centrifuga a 38.000 x g y 4°C durante 30 min. En el sobrenadante se determina la actividad de la LDH como se describe en la secciones correspondientes a cada enzima.

3. 2. 4. 3. - Fructosa 1-6-difosfatasa

En la determinación de la fructosa 1-6 dP-asa, de hígado y riñón, se han homogenizado 100 mg de tejido fresco pesados con exactitud con 1 ml de tampón glicocola 0,04 M pH 9.4 en un Potter Elvehjem de tipo mecánico, vinilo-vidrio, en frío. El homogenado obtenido se centrifuga a

38.000 x g y 4°C durante 30 min. En el sobrenadante se determina la actividad de FDP-asa, como se describe en la sección correspondiente a esta enzima.

3. 2. 4. 4. - Fosfoenolpiruvato carboxicinasas

En la determinación de la actividad enzimática de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas de hígado y riñón por el método isotópico, se han homogenizado 250 mg de tejido fresco, pesados con exactitud, en 5 ml de tampón Tris-sacarosa 0,05:0,25 M, en un Potter-Elvehjem de tipo mecánico, teflón-vidrio, en frío. El extracto obtenido se centrifuga a 105.000 x g y 4°C durante 45 min. En el sobrenadante se determina la correspondiente actividad enzimática.

3. 2. 4. 5. - Transaminasas GOT y GPT

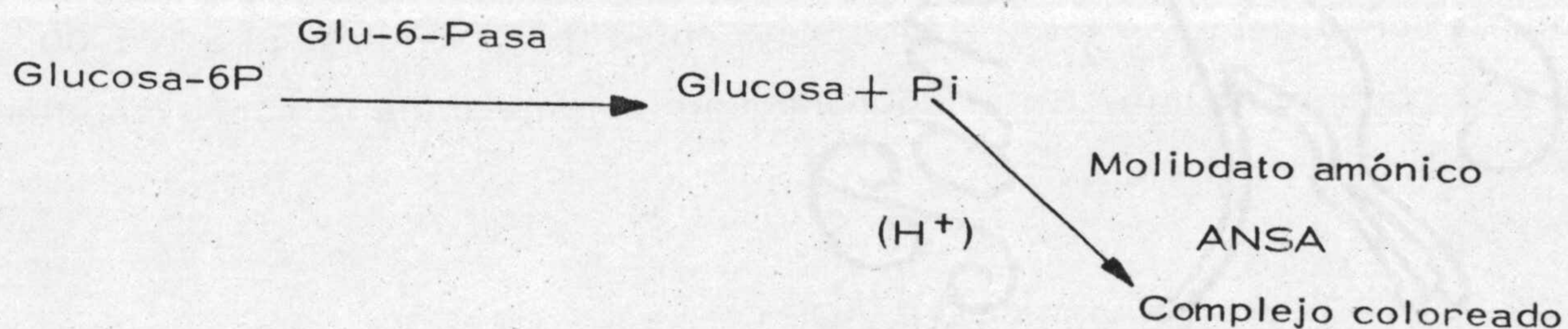
En la determinación de la actividad enzimática de la glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT) de hígado y riñón, se han homogenizado 250 mg de tejido fresco con 2 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.4 en un Potter-Elvehjem mecánico, vinilo-vidrio, en frío. El homogenado se filtra por una torunda de gasa. Como parte de estas enzimas están localizadas en el interior de la mitocondria, es necesario someter el homogenado a ondas ultrasonicas con intensidad de 15 Kilociclos, en un tiempo aproximado de 10 min. Una vez que se han sometido al ultrasonido, los homogenados se centrifugan a 38.000 x g. y 4°C durante 30 min. En el sobrenadante se determinan las correspondientes actividades enzimáticas.

3. 2. 5. - Determinación de actividades enzimáticas.

3. 2. 5. 1. - Determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa

La actividad de la glucosa-6-fosfatasa se determina por la cantidad de fosfato liberado en presencia de glucosa-6P a pH 6.5 y 37°C según Harper (130).

El fundamento es el siguiente:



a) Reactivos

Tampón citrato 0,1 M pH 6.5

Solución extemporánea de glucosa-6-P al 33%

Acido tricloroacético al 10%

Solución estándar de fosfato 5×10^{-4} M

Agente reductor ANSA (ácido 1-amino, 2-naftol, 4-sulfónico)
0,56 M

Homogenado obtenido según se refiere en la sección 3.2.4.1.

Solución de molibdato amónico al 0,36% en medio sulfúrico.

b) Técnica

La reacción se realiza en tubos de ensayo dispuestos en un baño a 37°C con agitación. Es necesario preparar un blanco por cada muestra y un ciego por cada serie de experiencias. El homogenado se obtiene según la sección 3.2.4.1. Los reactivos se adicionan en el orden y cantidad que indica el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>
Homogenado	0,1 ml	0,1 ml	-
Tampón citrato	-	-	0,1 ml
Agitación en el baño a 37°C durante 5 minutos y añadir:			
Tampón citrato	-	0,1 ml	-
Glucos-6P	0,1 ml	-	0,1 ml
Incubar durante 15 minutos exactamente medidos, en el baño con agitación a 37°C. Se para la reacción por adición:			
Acido tricloroacético	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

Los tubos se centrifugan a temperatura ambiente a 4.500 r.p.m. durante 10 min. En el sobrenadante decantado se hace la determinación de Pi.

La determinación de fosfato inorgánico se ha realizado según la técnica de Fiske y Subarrow (131), siguiendo el orden indicado en el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>	<u>Estándar</u>
Molibdato	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Sobrenadante	1 ml	1 ml	1 ml	-
S. estándar de fosfato	-	-	-	1 ml
ANSA	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Los tubos se mantienen 20 minutos a temperatura ambiente y se realiza la lectura colorimétrica a 660 nm. El cero se ajusta con el ciego y se lee la D.O. correspondiente a cada tubo.

c) Cálculos

La actividad de la glucosa-6-Pasá se expresa en μmoles de fosfato liberado de la glucosa-6P en 1 minuto por gramo de tejido fresco.

Para el cálculo se tiene en cuenta las diluciones sufridas por el proceso de modo que se hace según lo siguiente:

$$\mu\text{moles} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1} = \frac{(\text{D.O.}_M - \text{D.O.}_{Bl})}{\text{D.O.}_{St}} \times 0,5 \times 2,2 \times \frac{1000}{15 \times V \times 25}$$

Siendo:

D.O._M = Densidad óptica del problema

D.O._{Bl} = Densidad óptica del blanco

D.O._{St} = Densidad óptica del estándar de fosfato

0,5 = μmoles de fosfato existente en 1 ml de solución estándar de fosfato

2,2 = Volumen final del tubo en que se realiza la reacción enzimática

15 = Minutos que dura la reacción

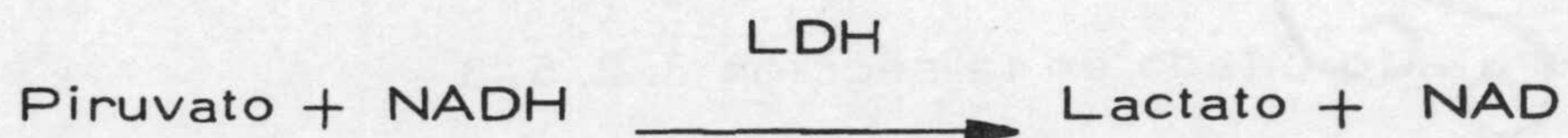
1000 = para expresar la actividad por gramo de tejido fresco

V = 0, 1 ml de muestra del homogenado

25 = mg de tejido fresco en 1 ml de homogenado

3. 2. 5. 2. - Determinación de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa

La determinación de la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa (LDH) ha sido realizada según el método de Bergmeyer y col (132) cuyo fundamento es el siguiente:



a) Reactivos

Tampón fosfato 0,05 M, pH 7.5

Solución extemporánea de NADH 8×10^{-3} M

Solución extemporánea de Piruvato sódico 1×10^{-3} M

Extracto, obtenido según 3.2.4.2. y se ha hecho una dilución en tampón Tris-sacarosa 0,01:0,25 M, pH7.4 al 1/25 antes de la determinación enzimática.

b) Técnica

Las cubetas se preparan con las soluciones antes citadas y en las cantidades siguientes:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	2,91 ml	3,00 ml
Piruvato	0,10 ml	0,10 ml
NADH	0,05 ml	0,01 ml
Extracto	0,05 ml	-

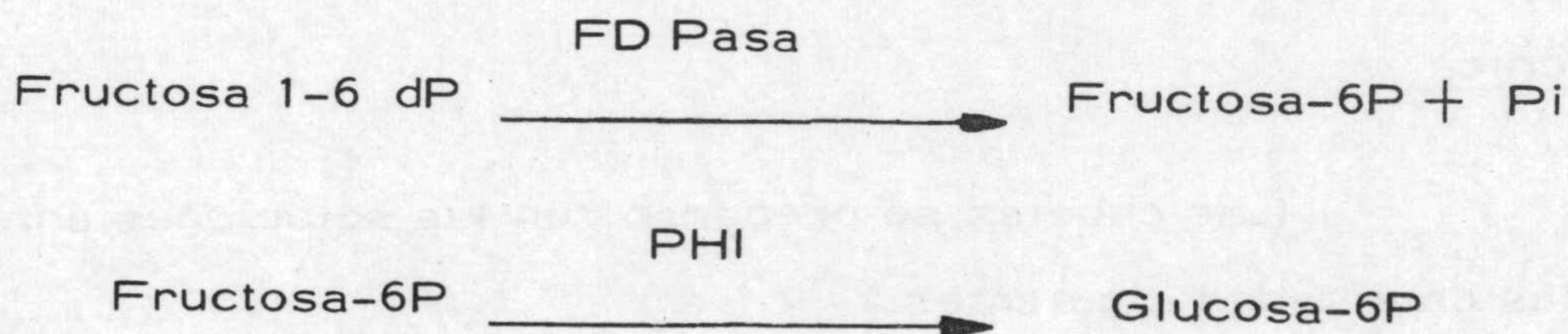
Las lecturas se hacen a 15°C y 340 nm. Se anotan los descensos de la $\Delta E/\text{min}$, durante seis minutos.

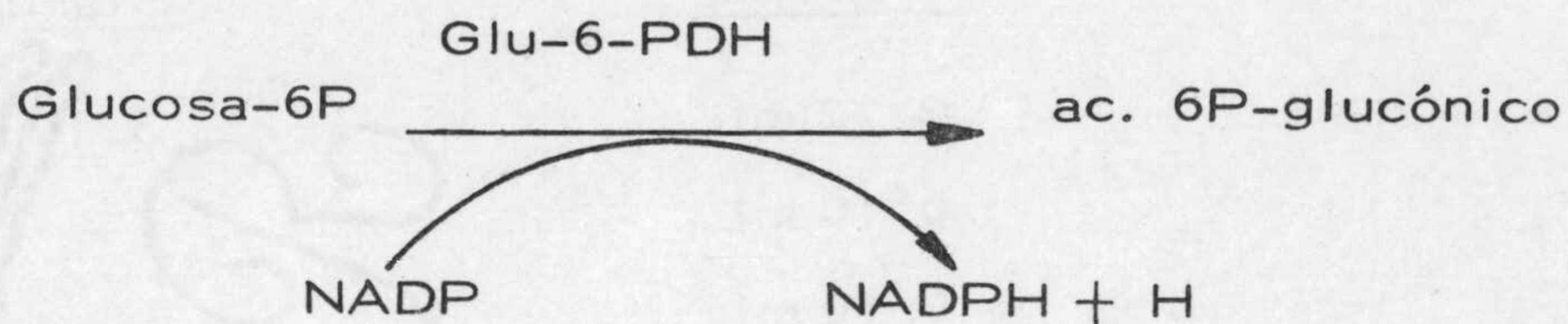
c) Cálculos

La cantidad de lactato producido en nmoles por milígramo de proteína y minuto, expresa la actividad de este enzima. Los cálculos se hacen de igual manera a lo citado en la sección 3.2.5.3.

3.2.5.3. - Determinación de la actividad enzimática de la fructosa 1-6 difosfatasa

La determinación de la actividad de la fructosa 1-6-difosfatasa se ha realizado según Mendicino (133). El método seguido está basado en tres reacciones enzimáticas en cadena, siendo la desencadenante la catalizada por la fructosa 1-6 difosfatasa y la última la catalizada por la glucosa-6-P deshidrogenasa ligada al sistema NADP-NADPH. Estas reacciones son:





La aparición de NADPH seguida espectrofotométricamente a 340 nm nos va a referir cuantitativamente la actividad de la enzima desencadenante del proceso.

a) Reactivos

Tampón glicocola 0,04 M, pH 9.4

Solución de Cl_2Mn 0,5 mM

Solución extemporánea de NADP 0,5 mM

Solución extemporánea de FDP 1 mM

Fosfohexosa isomerasa (E.C. 5.3.1.9) (PHI) 10 μml por determinación

Glucosa-6P-deshidrogenasa (E.C. 11.1.4.9.) 20 μml por determinación

Homogenado obtenido según se refiere en la sección 3.2.4.3.

b) Técnica

Para cada serie de experiencias se preparan las siguientes cubetas con el contenido que a continuación se expresa:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Tampón glicocola	2.72 ml	3.10 ml
Cl ₂ Mn	0.10 ml	-
FDP	0.10 ml	-
NADP	0.10 ml	-
PHI	0.01 ml	-
Glu-6-PDH	0.02 ml	-
Homogenado	0.05 ml	-

La determinación se hace a 340 nm y 15°C. Se anota el $\Delta E/\text{min.}$ de los seis primeros minutos de la reacción.

c) Cálculos

La actividad de la FDP-asa se expresa en los nmoles de fructosa-6P producidos por un minuto y miligramo de proteína.

$$\text{nmoles} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1} = \frac{\Delta E \times V}{10^{-6} \times \xi \times d \times v \times P} \times 1000$$

ΔE = Valor medio del incremento de la D. O. en un min.

V = Volumen total de la cubeta

$\xi = 6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2 / \text{Mol}$ = coeficiente de extinción molar aproximado del NADPH a 340 nm

d = Espesor de la cubeta

v = 0.050 ml de homogenado

1000 = Para expresarlo en nmoles

P = mg de proteína por ml de homogenado

a) Reactivos

Tampón imidazol 1 M, pH 6.6

Solución de Cl_2Mn 0,02 M

Acido Tricloroacético al 10%

Solución extemporánea de IDP 25 mM

Tampón Tris-sacarosa 0,05:0,25 M, pH7.0

DTT

CO_3NH_a

$^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ comercial

NADH

PEP

Málico deshidrogenasa (MDH) (E. C. 1.1.1.37) comercial

Líquido de centelleo:

Naftaleno 100 g

PPO 7 g

Dimetil-POPOP 0,3 g

Dioxano 1l

b) Técnica

El extracto se obtiene según la sección 3.2.4.4. (al 1/20 en tampón Tris-sacarosa 0,05:0,25 M, pH 7.0)

La reacción se realiza en tubos de ensayo dispuesto en un baño a 37°C con agitación, Es necesario preparar por cada muestra, dos tubos y dos blancos.

Se prepara un cocktail que lleva los siguientes reactivos en las cantidades que se indican por cubeta: tampón imidazol 100 μmoles , Cl_2Mn

2 μ moles, DTT 3.8 μ moles, CO_3HNa 30 μ moles, $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$ 20 μ moles, NADH 2,5 μ moles, PEP 1,5 μ moles y málico deshidrogenasa 2 unidades.

Los reactivos se adicionan a la cubeta en el siguiente orden y cantidad:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>
Agua destilada	-	0.05 ml
IDP	0.05 ml	-
Cocktail	0.90 ml	0.90 ml
Se mantienen en el baño a 37°C bajo campana durante unos minutos y se añade el:		
Extracto	0.05 ml	0.05 ml
Se incuban durante 10 minutos exactamente medidos en el baño con agitación a 37°C. La reacción se para por adición de:		
Acido Tricloroacético	0.50 ml	0.50 ml

Paralelamente se han preparado dos estándar en sendos viales según el siguiente protocolo:

Líquido de centelleo	10 ml
Hidróxido de Hiamina	0.05 ml
Cocktail	0.05 ml

Los tubos donde se ha producido la reacción se gasean con CO_2 durante tres minutos con abundante burbujeo, en cabina de gases, para desprender el exceso de bicarbonato.

A continuación se centrifugan a 2.500 r.p.m. durante diez minutos. Del sobrenadante se toman 0,5 ml y se llevan a un vial que contiene 10 ml de líquido de centelleo. Se agitan bien los viales y se mide su radiactividad en un contador de centelleo líquido.

c) Cálculos

La actividad de la enzima se expresa en nmoles de OAA producidos por minuto y por miligramo de proteína.

$$\text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteína} = \frac{(\text{Dpm muestra} - \text{Dpm blanco}) \times 1,5 \times 2,775}{\text{Dpm estándar} \times \text{mg proteína} \times 0,5 \times 0,05 \times 10}$$

Siendo:

Dpm = Desintegraciones por minuto

2,775 = μmoles de $^{14}\text{CO}_3\text{H}^-$ en el estándar

1,5 = Volumen final del medio de reacción

0,5 = Volumen del medio de reacción llevado al vial

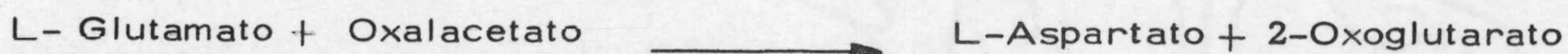
0,05 = Volumen de extracto utilizado

10 = Tiempo de reacción en minutos.

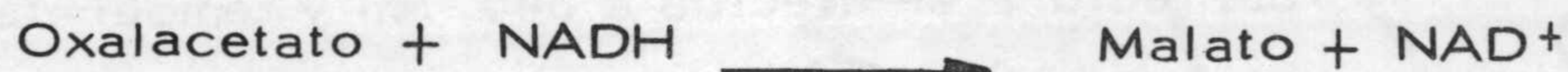
3.2.5.5. Determinación de la actividad enzimática de la glutamato oxalacetato transaminasa

La determinación de la actividad enzimática de la GOT ha sido realizada según el método de Bergmeyer y col.(136) cuyo fundamento es el siguiente:

La glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) cataliza reversiblemente la reacción:



La actividad la hemos determinado por la cantidad de oxalacetato formado. El oxalacetato se determina por los μmoles de NADH consumidos al ser reducido a malato por la málico deshidrogenasa.



a) Reactivos

Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.6

Tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 7.6

Solución de L-Aspartato 0.5 M.

Solución extemporanea y neutra de α -KG 0.2 M.

Solución extemporanea de NADH 0.3 %

Suspensión de málico deshidrogenasa (MDH) (E. C. 1. 1. 1. 37)

comercial al 50 % en glicerol - agua. Es necesario dializar la enzima en tampón fosfato 0.01 M, pH 7.6 durante 12 horas a 4° C cambiando cada cuatro horas de tampón.

Extracto obtenido segun se refiere en la sección 3.2.4.5. y diluido en tampón fosfato 0.1 M pH 7.6 al 1/10 antes de la determinación enzimática.

b) Técnica

Las cubetas se preparan con las soluciones antes citadas y en las cantidades siguientes:

	<u>Muestra</u>	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>
Tampón fosfato 0.1 M pH 7.6	1.9 ml	1.9 ml	1.9 ml
Agua destilada	-	1.1 ml	1.1 ml
NADH	0.1 ml	-	0.1 ml
L-Aspartato	1 ml	-	-
MDH	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Extracto diluido 1 / 10	0.05 ml	-	0.05 ml
α -KG	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

La lectura se efectua a 340 nm y temperatura de 15°C

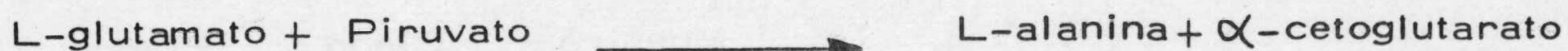
c) Cálculos

El descenso de la densidad óptica que tiene lugar en la cubeta del ciego se debe a la actividad de la glutamato deshidrogenasa existente en el extracto. Este descenso se resta del descenso obtenido en la cubeta muestra donde se realiza la reacción de transaminación. La actividad se expresa en nmoles de OAA producidos por minuto y mg de proteína segun de ha descrito en la sección. 3. 2. 5. 3.

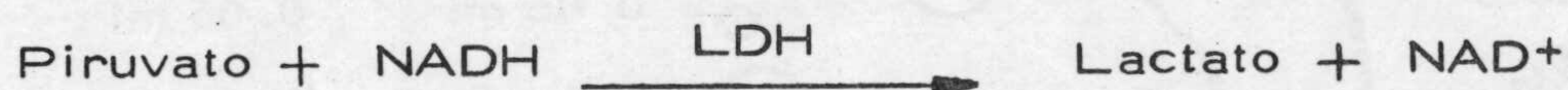
3. 2. 5. 6. - Determinación de la actividad enzimática de la glutamato piruvato transaminasa

La determinación de la actividad enzimática de la GPT ha sido realizada segun el metodo de Bergmeyer y col.(137) que se fundamenta:

La glutamato piruvato transaminasa (GPT) cataliza la reacción.



La reacción se ha realizado en el sentido de la formación del piruvato. El piruvato formado de este modo se determina espectrofotométricamente por su reducción a lactato con la lactato deshidrogenasa y NADH.



a) Reactivos

Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.4

Tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 7.6

Solución de L-alanina 0.5 M

Solución extemporánea y neutra de α -KG 0.2 M

Solución extemporánea y neutra de NADH 0.3 %

Suspensión de lactato deshidrogenasa (LDH) (E.C. 1.1.1. 27.)

al 50 % (v/v) en glicerol - agua. La enzima comercial necesita ser dializada durante 12 horas a 4°C en tampón fosfato 0.01 M, pH 7.6

El extracto obtenido como se describe en la sección 3.2.4.5. y diluido en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 al 1 / 10 antes de la determinación enzimática.

b) Técnica

Las cubetas se preparan siguiendo el siguiente protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Ciego</u>	<u>Blanco</u>
Tampón fosfato 0.1 M pH 7.4	2.4 ml	2.4 ml	2.4 ml
Agua destilada	-	0.5 ml	0.5 ml
NADH	0.1 ml	0.1 ml	-
L-alanina	0.5 ml	-	-
LDH	0.01 ml	0.01 ml	-
Extracto	0.05 ml	0.05 ml	-
α -KG	0.1 ml	0.1 ml	-

La reacción se inicia con α -KG. Las lecturas se hacen a 340 nm. y temperatura de 15°C.

c) Cálculos

La actividad se expresa en nmoles de piruvato formado por minuto y miligramo de proteína, según lo descrito en la sección 3.2.5.3.

3.2.6. - Determinación del contenido proteico

Para la determinación del contenido proteico se ha seguido el método de Lowry y col. (138). Se trata de un método colorimétrico basado en la reacción de las proteínas con el reactivo Folin-Ciocalteu. Esta reacción tiene dos fases: una previa en la que la proteína en solución reacciona con el cobre alcalino y una segunda que consiste en la reducción del fosfomolibdato del reactivo por la tirosina y el triptófano presentes en ésta.

a) Reactivos

Solución alcalina de cobre. Se mezclan 50 ml de solución al 2 %

de carbonato sódico en NaOH 0.1 M, con 1 ml de solución de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5 % en tartrato sódico al 1 %.

la preparación es extemporánea.

Reactivo de Folin-Ciocalteu comercial. En el momento de la determinación se diluye al doble con agua destilada.

Solución de albúmina bovina al 0.5%

b) Técnica

Se prepara una curva estándar de albúmina con concentraciones comprendidas entre 50 y 250 $\mu\text{g/ml}$.

Para las distintas muestras es conveniente preparar distintas diluciones con objeto de que la concentración proteica quede dentro del margen marcado por la curva estándar.

Se sigue el protocolo descrito a continuación:

	<u>Blanco</u>	<u>S1</u>	<u>S2</u>	<u>S3</u>	<u>S4</u>	<u>S5</u>	<u>Muestra</u>
Albúmina	-	0.1 ml	0.2 ml	0.3 ml	0.4 ml	0.5 ml	-
Agua destilada	1.0 ml	0.9 ml	0.8 ml	0.7 ml	0.6 ml	0.5 ml	-
Problema	-	-	-	-	-	-	1.0 ml

Una vez preparados los tubos se añaden 5 ml del reactivo alcalino, se agitan y se espera 15 minutos a temperatura ambiente. Al continuación se añaden 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y, tras agitar, se esperan 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se hace la lectura de las D.O. a 640 nm.

c) Cálculos

Con los datos suministrados por los estándares se construye una curva patrón representando las distintas concentraciones de albúmina frente a sus D.O. respectivas. A continuación, y por interpolación, se obtienen las concentraciones de los problemas en los que habrá que tener en cuenta la dilución sufrida por cada uno de ellos. Los resultados se expresan en mg/ml.

3. 2. 7. - Tratamiento de la sangre para la determinación de metabolitos

La sangre se extrae de la vena dorsal de truchas anestesiadas con un golpe seco en la cabeza con jeringa heparinizada. De ella se toman 0.5 ml y se desnaturalizan con 4 ml de ácido perclórico al 2%. Posteriormente se centrifuga la muestra y se neutraliza con indicador universal interno.

3. 2. 7. 1. - Determinación de glucosa en sangre.

De la muestra preparada como se indica en la sección 3. 2. 7. se determina la glucosa como se describe en la sección 3. 2. 3. 1. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa existente en 1 ml de sangre.

3. 2. 7. 2. - Determinación de lactato en sangre

La obtención y tratamiento de las muestras se ha descrito anteriormente en la sección 3. 2. 7. Una vez neutralizadas y centrifugadas las muestras, se determina la cantidad de lactato observando en el espectro-

fotometro la formación de NADH paralela al consumo de lactato por lactato deshidrogenasa a pH 9.5. El procedimiento ha sido descrito por Hohorst y col. (139).



a) Reactivos

Tampón Hidrazina:glicocola 0.4: 1 M, pH 9.5

Solución extemporánea de NAD al 0.5 %

Lactato deshidrogenasa (LDH) (E.C. 1.1.1.27.) comercial

b) Técnica

Las cubetas han sido preparadas con las siguientes cantidades de reactivos:

	<u>Muestra</u>	<u>Ciego</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.50 ml	1.50 ml	1.50 ml
NAD	0.40 ml	0.40 ml	0.20 ml
Agua destilada	1.00 ml	1.20 ml	1.40 ml
Muestra	0.20 ml	-	-
LDH	0.01 ml	0.01 ml	-

El curso de la reacción es detectado espectrofotométricamente midiendo a 340 nm el ΔE debido a la formación de NADH.

c) Cálculos

Los μmoles de L-lactato por ml de sangre vienen dados por la expresión:

$$\mu\text{moles} \times \text{ml}^{-1} \text{ de sangre} = \frac{(\Delta E - \Delta E_{\phi}) \cdot V}{10^{-6} \times \xi \times d \times v} \times F_1 \times F$$

Siendo:

ΔE (DOi - DOf) = Medida del incremento de densidad óptica del problema

ΔE_{ϕ} (DOi - DOf) = Medida del incremento de densidad óptica del ciego.

V = Volumen de la cubeta

ξ = Coeficiente de extinción molar del NAD

d = Espesor de la cubeta

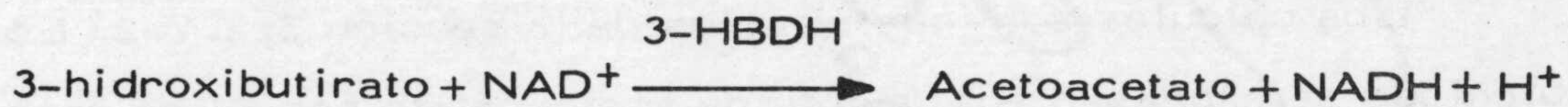
v = volumen de la muestra

F_1 = Factor de neutralización

F = Factor de dilución.

3.2.7.3. - Determinación de acetoacetato en sangre

El acetoacetato se ha determinado por reducción enzimática a 3-hidroxiacetato mediante la enzima 3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HADH) y NADH, según el método de Williamson y J. Mellanby (140).



A pH = 7.0 y con un exceso de NADH el 98 % del acetoacetato como mínimo es reducido a 3-hidroxiacetato, con la oxidación simultánea de una cantidad equivalente de NADH.

a) Reactivos

Tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0

Solución de NADH 6 mM

3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HADH) (E.C. 1.1.1.30)

b) Técnica

Se preparan las cubetas siguiendo el protocolo:

	<u>Muestra</u>	<u>Ciego</u>	<u>Blanco</u>
Tampón	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
NADH	0.10 ml	0.10 ml	0.05 ml
Muestra	2.00 ml	-	-
Agua destilada	-	2.00 ml	2.00 ml
3-HADH	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml

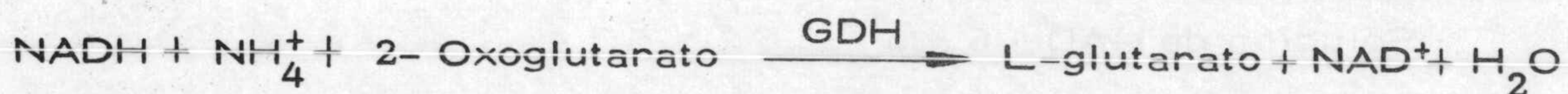
El descenso de extinción debido a la oxidación del NADH es proporcional a la cantidad de acetoacetato presente. Medir a 340 nm y temperatura ambiente hasta estabilización.

c) Cálculos

Los cálculos son iguales a los de la sección 3.2.7.2. Los valores obtenidos se expresan en μ moles de acetoacetato por ml de sangre.

3.2.7.4. - Determinación de amoniaco en sangre

La muestra de sangre se obtiene como se ha descrito en la sección 3.2.7. El amoniaco se ha determinado enzimáticamente según el método de E. Kun y E.B. Kearney (141). El método utiliza la aminación reductora de 2-oxoglutarato catalizada por la glutamato deshidrogenasa



a) Reactivos

Tampón Tris 0.5 M pH 8

Solución de α -cetoglutarato 0.1 M

Solución extemporánea de NADH 8 mM

Glutamato deshidrogenasa (GDH) (E.C. 1.4.1.2.) comercial, disuelta en glicerol

b) Técnica

El protocolo seguido ha sido el siguiente:

	<u>Blanco</u>	<u>Ciego</u>	<u>Muestra</u>
Tampón Tris	-	2.00 ml	2.00 ml
α -KG	-	0.10 ml	0.10 ml
NADH	-	0.10 ml	0.10 ml
Agua desionizada	3.11 ml	0.90 ml	0.85 ml
Muestra	-	-	0.20 ml
GDH	-	0.01 ml	0.01 ml

La determinación se realiza a 365 nm y temperatura ambiente. La lectura final se hace a las 3 horas de haber puesto el enzima.

c) Cálculos

Los μ moles de amoniaco por ml de sangre vienen dados por la expresión:

$$\mu\text{moles / ml} = \frac{\Delta E \times V}{3.4 \times 10^6 \times 10^{-6} \times v \times d} \times F_1 \times F$$

Siendo:

ΔE = Medida del incremento de densidad óptica

V = Volumen de la cubeta

3.4×10^6 = Coeficiente de extinción molar del NAD a 365 nm

v = Volumen de muestra

F_1 = Factor de dilución de la muestra de sangre

F = Factor de neutralización

d = Espesor de la cubeta



Parachromis

por la expresión

$$\text{unidos/ml} = \frac{\Delta \text{XV}}{\text{XV} \times 10^{-10}}$$

IV. - RESULTADOS

Estado

ΔXV = medida del incremento de actividad catalítica

Valor Volumen de la muestra

IV.- RESULTADOS

4.1.- Efectos de la composición de la dieta sobre algunos enzimas gluconeogénicos de hígado y riñón

Los salmonidos son fundamentalmente carnívoros, a diferencia de otros animales explotados por el hombre que son herbívoros u omnívoros. Consumen entre un 49 y un 65 % de proteínas en materia seca (142).

El desarrollo de la industria piscícola motivó paralelamente un desarrollo de la industria de piensos compuestos para la alimentación de dichos animales, y al mismo tiempo ha impulsado al estudio, tanto de determinados parámetros fisiológicos como bioquímicos, en orden a un mejor aprovechamiento industrial.

Algunos efectos de la dieta sobre el metabolismo de la trucha han sido estudiados previamente en el Departamento de Fisiología Animal de esta Universidad (143, 125). El presente estudio se ha realizado como complemento de estos trabajos. Así, hemos determinado algunas actividades enzimáticas tanto del hígado como del riñón, relacionadas con el metabolismo de los glúcidos, fundamentalmente implicadas en el proceso gluconeogénico, y algunos metabolitos sanguíneos, tales como glucosa y ácido láctico.

4.1.1.- Dieta de un contenido proteico elevado.

El diseño experimental comprende ensayos realizados a lo largo de 4 meses, alternando periodos de alimentación de 21 días, con otros de ayuno mas cortos, de una duración de 10 días.

A lo largo de este periodo experimental se registró un aumento significativo de peso en los animales, a pesar de la existencia de periodos de ayuno mas o menos largos.

4.1.1.1.- Efecto sobre la actividad de la láctico deshidrogenasa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I. En el caso del hígado esta enzima experimenta un descenso significativo en el primer periodo de ayuno, así como un aumento también significativo en el tercer periodo de alimentación.

La enzima renal, sigue un curso evolutivo muy parecido a la del hígado, mostrando, al igual que en el caso anterior, un descenso significativo en su actividad en el primer periodo de ayuno.

4.1.1.2.- Efecto sobre la actividad de la fructosa difosfatasa.

Los resultados se muestran en la Tabla II. En la enzima hepática se observa un ligero descenso de la actividad, en el 2º periodo de alimentación, experimentando despues del ayuno correspondiente un nuevo aumento de la actividad en el 3º periodo de alimentación.

La fructosa difosfatasa de riñón experimenta en el 2º y 3º periodo de ayuno un aumento significativo en su actividad, volviendo a valores normales a partir de este punto.

4.1.1.3.- Efecto sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa.

Los resultados se muestran en la Tabla III. En el hígado se observa un descenso significativo en el 2º periodo de alimentación regresando

TABLA I

	LDH hepática	LDH renal
Controles	1337 ± 252 (4)	537 ± 89 (4)
Alimentación (21 días)	1950 ± 67 (4)	895 ± 31 (3)**
Ayuno (10 días)	1061 ± 127 (4)***	590 ± 37 (4)**
Alimentación (21 días)	1165 ± 97 (4)	559 ± 113 (3)
Ayuno (10 días)	1465 ± 258 (4)	804 ± 192 (4)
Alimentación (21 días)	2285 ± 100 (4)*	662 ± 43 (4)
Ayuno (10 días)	1765 ± 275 (4)	834 ± 150 (4)
Alimentación (21 días)	1379 ± 68 (3)	864 ± 51 (3)

Efecto de la dieta proteica sobre la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa de hígado y riñon. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado / min. / mg. de prot. El ± representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por: ***p < 0.001 **p < 0.01 *p < 0.05.

TABLA II

	FDPasa hepática	FDPasa renal
Controles	48.25 ± 2.77 (4)	11.10 ± 0.65 (4)
Alimentación (21 días)	51.59 ± 3.21 (4)	12.09 ± 0.16 (3)
Ayuno (10 días)	57.16 ± 2.57 (4)	15.75 ± 0.46 (4)***
Alimentación (21 días)	39.90 ± 4.09 (4)*	11.30 ± 1.34 (4)*
Ayuno (10 días)	38.33 ± 1.47 (4)	19.01 ± 1.65 (4)*
Alimentación (21 días)	54.95 ± 1.83 (4)***	13.75 ± 1.49 (4)
Ayuno (10 días)	48.40 ± 2.97 (4)	13.85 ± 2.41 (4)
Alimentación (21 días)	46.89 ± 2.88 (4)	11.44 ± 0.43 (4)

Efecto de la dieta proteica sobre la actividad enzimática de la fructosa difosfatasa de hígado y riñón. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado / min. / mg. de prot. El ± representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por: ***p < 0.001 *p < 0.05

de nuevo a valores proximos a la normalidad en el periodo de ayuno siguiente y manteniendose aproximadamente con estos valores hasta la conclusión del experimento.

En el riñón no se observan modificaciones demasiado apreciables a lo largo de la experiencia, en ninguno de los periodos de alimentación y ayuno con la excepción del último periodo de alimentación que experimenta un aumento significativo.

4.1.1.4. - Medidas en sangre de glucosa y ácido láctico.

Las concentraciones en sangre de estos dos metabolitos se muestran en la Tabla IV. La glucosa muestra un descenso significativo en el primer periodo de alimentación con respecto a los controles, volviendo a valores normales en el resto del experimento.

El ácido láctico experimenta un curso muy paralelo al de la glucosa, a lo largo de los periodos ensayados sin modificaciones significativas.

4.1.2. - Dieta de contenido lipídico elevado.

A traves de trabajos realizados por diversos autores (143, 144, 145, 146) aparece la posibilidad de sustituir parte de la proteina contenida en la dieta por grasa. Esto resulta muy interesante a nivel industrial, porque el coste de los piensos comerciales se abarata extraordinariamente.

Hemos realizado un estudio similar al anterior, siguiendo el mismo diseño experimental que el descrito en la sección 4.1.1. sustituyendo

TABLA III

	G6Pasa hepática	G6Pasa renal
Controles	9.18 ± 2.09 (4)	3.52 ± 1.15 (3)
Alimentación (21días)	8.01 ± 0.50 (4)	2.03 ± 0.19 (4)
Ayuno (10días)	8.84 ± 1.19 (4)	1.36 ± 0.23 (4)
Alimentación (21días)	4.23 ± 0.43 (4)*	1.14 ± 0.29 (4)
Ayuno (10días)	7.66 ± 0.76 (3)***	0.69 ± 0.23 (4)
Alimentación (21días)	7.74 ± 1.86 (4)	1.97 ± 0.83 (4)
Ayuno (10días)	5.02 ± 1.54 (4)	0.96 ± 0 (4)
Alimentación (21días)	7.52 ± 0.48 (4)	3.43 ± 0.83 (4)**

Efecto de la dieta proteica sobre la actividad enzimática de la glucosa 6 fosfatasa de hígado y riñón. La actividad enzimática se expresa en μ moles de sustrato transformado / min. / g tejido fresco. El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por:

***p < 0.001 **p < 0.01 *p < 0.05.

TABLA IV

	Glucosa	Lactato
Controles	2.33 ± 0.20 (4)	0.98 ± 0.30 (4)
Alimentación (21días)	1.06 ± 0.02 (4)***	0.63 ± 0.14 (4)
Ayuno (10días)	2.46 ± 0.28 (4)	0.89 ± 0.24 (4)
Alimentación (21días)	2.26 ± 0.08 (4)	0.85 ± 0.08 (4)
Ayuno (10días)	—	—
Alimentación (21días)	—	—
Ayuno (10días)	2.17 ± 0.19 (4)	0.90 ± 0.20 (4)
Alimentación (21días)	2.59 ± 0.28 (4)	1.34 ± 0.28 (4)

Efecto de la dieta proteica sobre la concentración de glucosa y lactato en sangre. Las concentraciones se expresan en $\mu\text{moles} / \text{ml}$. El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por: *** $p < 0.001$

un 16 % de proteína por grasa. Se han medido las mismas enzimas relacionadas con el metabolismo glucídico, fundamentalmente de la ruta gluconeogénica, no habiéndose obtenido variaciones muy ostensibles con respecto a los resultados obtenidos con la dieta proteica, a excepción de que en este periodo experimental los animales no aumentarán casi nada de peso.

4.1.2.1. - Efecto sobre la actividad de la láctico deshidrogenasa.

Los resultados se muestran en la Tabla V. Hay un descenso significativo en la actividad de la enzima hepática en el primer periodo de alimentación aumentando a partir del 1º periodo de ayuno y 2º de alimentación, recuperando a lo largo de la experiencia los valores normales.

La actividad de la enzima renal, sigue un curso paralelo a la del hígado, pero, en este caso, experimentando en las últimas etapas un aumento significativo con respecto a los controles.

4.1.2.2. - Efecto sobre la actividad de la fructosa difosfatasa.

Los resultados aparecen en la Tabla VI. La actividad de la enzima hepática sufre un descenso significativo en el primer periodo de alimentación; aumenta de nuevo significativamente hasta valores muy próximos a los de los controles durante el ayuno, vuelve de nuevo a disminuir con la alimentación y regresa progresivamente hasta los valores iniciales en el resto de la experiencia.

Las fluctuaciones sufridas por la enzima renal son muy parecidas a las del hígado, aunque de menor grado.

TABLA V

	LDH hepática	LDH renal
Controles	1500 ± 213 (4)	376 ± 56 (4)
Alimentación (21 días)	588 ± 63 (4) ^{***}	210 ± 26 (4) [*]
Ayuno (10 días)	1185 ± 109 (4) ^{***}	310 ± 25 (4) [*]
Alimentación (21 días)	2509 ± 122 (4) ^{***}	769 ± 188 (4)
Ayuno (10 días)	1888 ± 205 (4) [*]	588 ± 123 (4)
Alimentación (21 días)	2002 ± 67 (4)	812 ± 79 (4)
Ayuno (10 días)	1963 ± 61 (4)	800 ± 107 (4)
Alimentación (21 días)	1436 ± 320 (4)	579 ± 94 (4)

Efecto de la dieta grasa sobre la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa de hígado y riñón. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado / min. / mg. de prot. El ± representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por: ***p < 0.001 *p < 0.05

TABLA VI

	FDPasa hepática	FDPasa renal
Controles	44.94 ± 3.64 (4)	14.13 ± 1.26 (4)
Alimentación (21días)	22.72 ± 3.89 (4) ^{***}	8.36 ± 0.94 (4) ^{**}
Ayuno (10días)	41.00 ± 4.31 (4) ^{**}	9.71 ± 0.61 (4)
Alimentación (21días)	26.87 ± 2.63 (4) [*]	5.39 ± 0.40 (4) ^{***}
Ayuno (10días)	25.27 ± 3.90 (4)	6.11 ± 0.85 (4)
Alimentación (21días)	27.41 ± 4.80 (4)	8.25 ± 1.40 (4)
Ayuno (10días)	34.79 ± 1.23 (4)	9.63 ± 0.42 (4)
Alimentación (21días)	45.23 ± 9.17 (4)	16.39 ± 1.94 (4) [*]

Efecto de la dieta grasa sobre la actividad enzimática de la fructosa difosfatasa de hígado y riñón. La actividad enzimática se expresa en nmoles de sustrato transformado / min. / mg. de prot. El ± representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por:

***p<0.001 **p<0.01 *p<0.05.

4.1.2.3. - Efecto sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa.

Los resultados se muestran en la Tabla VII. La actividad de la enzima hepática sufre un descenso muy significativo en el primer y tercer periodo de alimentación, mientras que en el 2º periodo de ayuno la actividad aumenta hasta valores próximos a los iniciales.

La enzima renal sufre modificaciones menos acusadas, siendo significativos los aumentos de la actividad en el primer y último periodo de ayuno.

4.1.2.4. - Medidas en sangre de glucosa y ácido láctico.

Los resultados se muestran en la Tabla VIII . La glucosa sanguínea experimenta fluctuaciones considerables, pero ninguna de ellas son significativas ya que los errores de la media son muy elevados.

Las concentraciones de lactato fluctúan de manera similar a la glucosa, aunque existen aumentos significativos con respecto a los valores iniciales en el segundo y tercer periodo de alimentación.

4.1.2.5. - Variación del peso de los animales.

Los resultados se muestran en la Tabla IX. Puede observarse que hay un progresivo aumento de peso en las truchas alimentadas con dieta protídica (con los naturales descensos en los periodos de ayuno), mientras que los animales alimentados con la dieta mas rica en grasa permanecen practicamente en el mismo peso.

TABLA VII

	G6Pasa hepática	G6Pasa renal
Controles	9.62 ± 0.87 (4)	1.77 ± 0.11 (4)
Alimentación (21días)	1.15 ± 0.16 (3) ^{***}	1.36 ± 0.10 (4)
Ayuno (10días)	1.36 ± 0.21 (4)	3.96 ± 0.84 (4) [*]
Alimentación (21días)	7.48 ± 0.32 (4) ^{***}	2.07 ± 0.21 (4)
Ayuno (10días)	9.56 ± 1.50 (4)	2.52 ± 0.62 (4)
Alimentación (21días)	4.32 ± 0.91 (4) [*]	1.14 ± 0.23 (4)
Ayuno (10días)	3.82 ± 1.38 (4)	2.01 ± 0.11 (4) [*]
Alimentación (21días)	—	—

Efecto de la dieta grasa sobre la actividad enzimática de la glucosa 6 fosfatasa de hígado y riñón. La actividad enzimática se expresa en μ moles de sustrato transformado / min. / g tejido fresco. El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por: *** $p < 0.001$ * $p < 0.05$

TABLA VIII

	Glucosa	Lactato
Controles	3.32 ± 0.78 (4)	0.32 ± 0.06 (4)
Alimentación (21 días)	2.98 ± 0.20 (4)	0.42 ± 0.02 (4)
Ayuno (10 días)	5.29 ± 2.20 (4)	1.16 ± 0.37 (4)
Alimentación (21 días)	3.68 ± 1.21 (4)	0.69 ± 0.13 (4)*
Ayuno (10 días)	9.47 ± 2.95 (4)	1.62 ± 0.63 (4)
Alimentación (21 días)	4.48 ± 0.66 (4)	1.66 ± 0.23 (4)**
Ayuno (10 días)	3.24 ± 0.35 (4)	1.29 ± 0.61 (4)
Alimentación (21 días)	2.49 ± 0.27 (4)	1.53 ± 0.57 (3)

Efecto de la dieta grasa sobre la concentración de glucosa y lactato en sangre. Las concentraciones se expresan en $\mu\text{moles} / \text{ml}$. El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

TABLA IX

	Dieta Proteica Peso (g)	Dieta Grasa Peso (g)
Controles	56 ± 3 (4)	69 ± 6 (4)
Alimentación (21días)	58 ± 2 (4)	73 ± 12 (4)
Ayuno (10días)	61 ± 6 (4)	60 ± 1 (4)
Alimentación (21días)	81 ± 9 (4)	66 ± 3 (4)
Ayuno (10días)	65 ± 1 (4)	64 ± 3 (4)
Alimentación (21días)	101 ± 6 (4)**	62 ± 4 (4)
Ayuno (10días)	90 ± 8 (4)	63 ± 3 (4)
Alimentación (21días)	127 ± 11 (4)*	57 ± 4 (4)

Efecto comparativo de las dietas, proteica y grasa sobre el peso de los animales. Los resultados se expresan en gramos. El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, se expresan por:

**p < 0.01 *p < 0.05

4.2. - Efecto del ayuno prolongado sobre las actividades de algunas enzimas gluconeogénicas y metabolitos sanguíneos.

De los resultados expuestos con anterioridad parecía desprenderse que la trucha no acomoda su metabolismo con rapidez a la situación de ayuno. Por ello se diseñó esta experiencia, en la que se midieron las actividades enzimáticas anteriormente ensayadas, a lo largo de un período de ayuno de hasta doce semanas.

Después de su traslado desde la piscifactoría, donde habían estado alimentadas con una dieta rica en proteínas, similar a la utilizada en las experiencias anteriores, los animales pasaron a las cubas de mantenimiento, donde se les sometió a ayuno durante doce semanas. Las truchas sobrevivieron en condiciones satisfactorias hasta pasadas ocho semanas de ayuno, a partir de las cuales se registró una mortalidad creciente. El peso medio de las truchas estaba comprendido entre 60 y 80 gramos.

En esta experiencia se midieron las enzimas ensayadas con anterioridad (láctico deshidrogenasa, glucosa 6 fosfatasa y fructosa difosfatasa), ampliándose el estudio a la glutamato oxalacetato transaminasa (GOT), glutamato piruvato transaminasa (GPT) y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK). Las medidas se realizaron tanto en hígado como en riñón a los 5, 10, 20, 30, 60, 75 y 85 días de ayuno. También se determinó la concentración de glucógeno hepático y los niveles sanguíneos de glucosa, lactato, amonio y compuestos cetónicos.

4.2.1. - Enzimas hepáticas.

Los resultados se muestran en la Gráfica nº 1. Durante los treinta primeros días existen fluctuaciones en las actividades de las enzimas ensayadas, apareciendo un descenso en algunas de ellas a los treinta días, que es significativo para las transaminasas y fructosa difosfatasa. A partir de los treinta días se registra un incremento hasta el día sesenta, descendiendo posteriormente la actividad en todos los casos a excepción de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa.

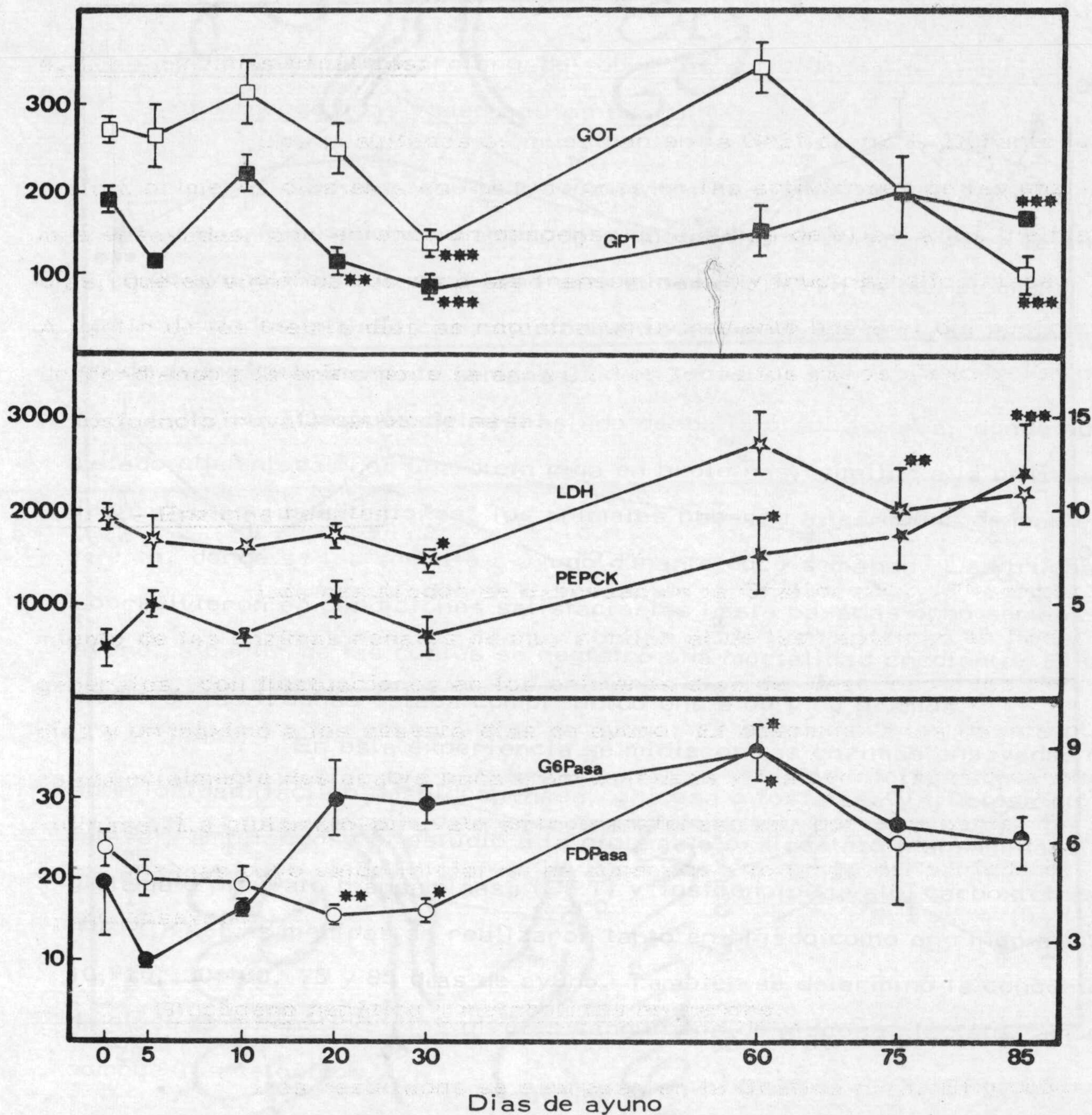
4.2.2. - Enzimas renales.

Los resultados se expresan en la Gráfica nº 2. El comportamiento de las enzimas renales es muy similar al de las hepáticas en líneas generales, con fluctuaciones en los primeros días, de descenso a los treinta días y un máximo a los sesenta días de ayuno. El descenso a los treinta días es especialmente destacable para transaminasas y fosfoenolpiruvato carboxicinasa. La glutamato-piruvato aminotransferasa es, por otra parte, la única enzimas cuyo valor inicial no es superado a lo largo del período de ayuno ensayado.

4.2.3. - Glucógeno hepático y metabolitos en sangre.

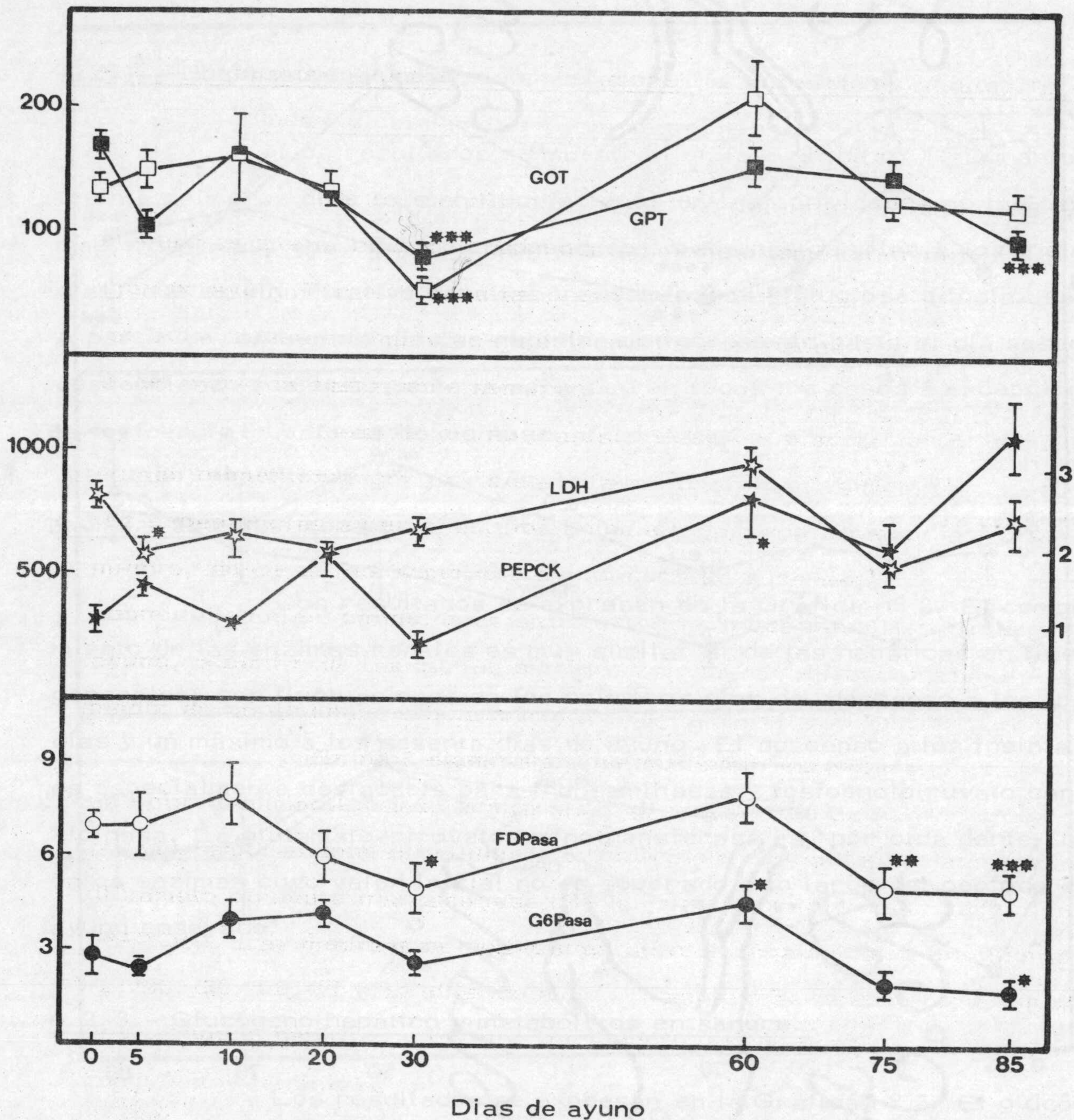
Los resultados se expresan en la Gráfica nº 3. El glucógeno hepático desciende en los cinco primeros días, manteniéndose estos niveles con fluctuaciones más o menos acusadas hasta los sesenta días de ayuno. A este tiempo hay un significativo descenso que se prolonga hasta el final del período estudiado.

GRAFICA nº 1



Efecto del ayuno prolongado sobre las actividades de algunas enzimas hepáticas. Los resultados se expresan en nmoles de sustrato transformado / min. / mg. Prot., a excepción de la glucosa 6 fosfatasa que se expresa en μ moles / min. / gramo de tejido fresco. Las escalas representativas de la LDH y FDPasa se sitúan a la izquierda de la gráfica, la de PEPCK y G6Pasa, a la derecha. Cada punto representa una media de 4 experiencias. Los valores que son significativos según el test de Student, referidos a los controles respectivos, se expresan por:*** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

GRAFICA nº 2



Efecto del ayuno prolongado sobre las actividades de algunas enzimas renales. Los resultados se expresan en nmoles de sustrato transformado / min. / mg. Prot., a excepción de la glucosa 6 fosfatasa que se expresa en μ moles / min. / gramo de tejido fresco. Las escalas representativas de la LDH, FDPasa y G6Pasa se sitúan a la izquierda de la gráfica, la de PEPCK, a la derecha. Cada punto representa una media de 4 experiencias. Los valores que son significativos según el test de Student, referidos a los controles respectivos, se expresan por:

***p < 0.001 **p < 0.01 *p < 0.05

La glucosa en sangre experimenta un aumento entre los diez y veinte días de ayuno. A partir de aquí los niveles se mantienen con valores ligeramente inferiores a los iniciales.

El lactato en sangre no experimenta modificaciones sensibles salvo un aumento significativo a los 75 días.

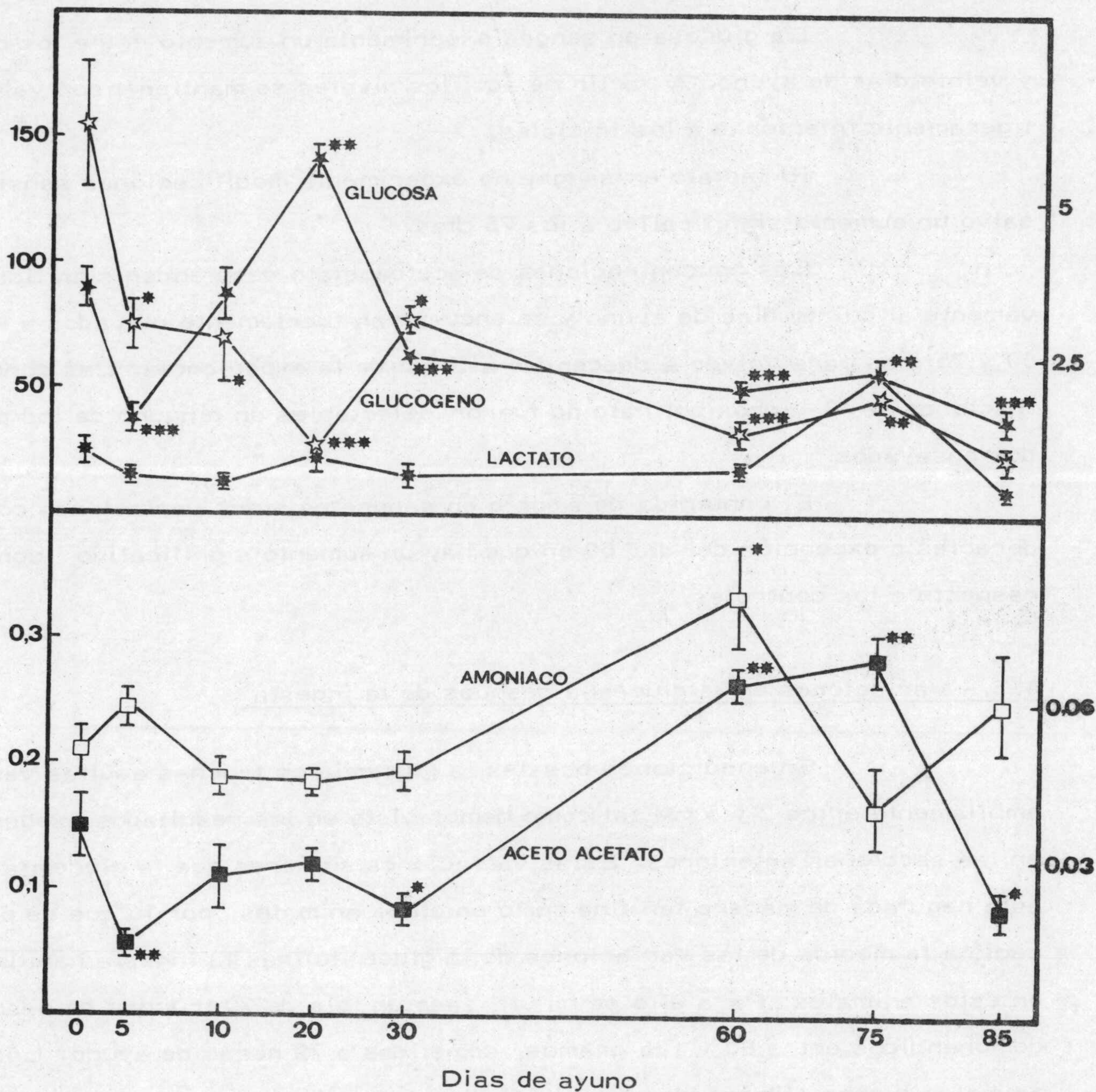
Las concentraciones de acetoacetato descienden significativamente al quinto días de ayuno y se encuentran fuertemente elevados a los 60 y 75 días para volver a descender al final de la experiencia. Las concentraciones de 3-hidroxibutirato no fueron detectables en ninguno de los perfo- dos ensayados.

El contenido de amonio en sangre no sufre variaciones consi- derables a excepción del día 60 en que hay un aumento significativo con respecto a los controles.

4. 3. - Variaciones en la glucemia después de la ingesta

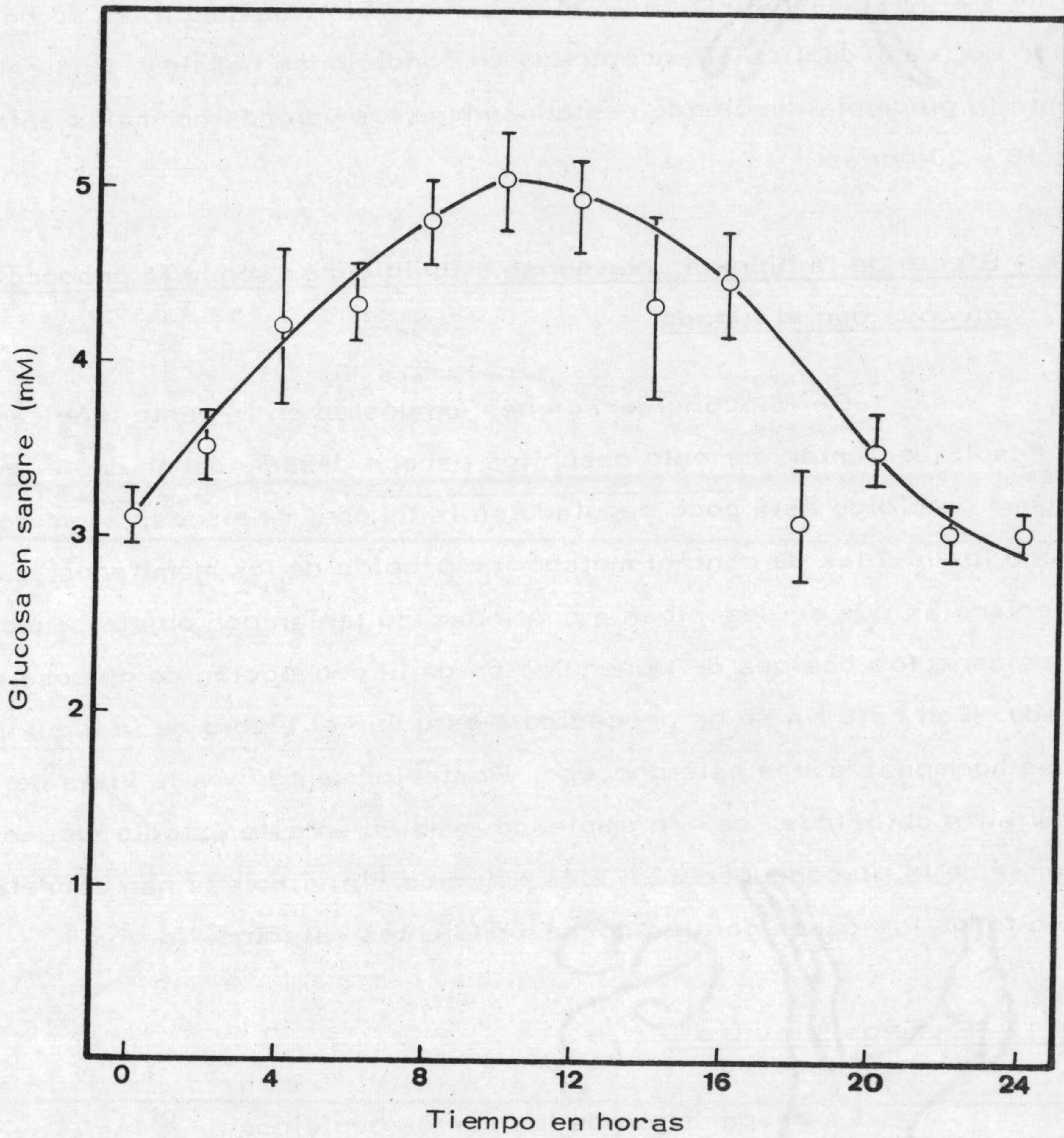
En condiciones basales la glucemia en truchas adultas varía ampliamente entre 2 y 5 mM, tal como hemos visto en los resultados expuestos en las secciones anteriores. Estas variaciones sugieren que la glucemia no está regulada de manera tan fina como en otros animales, por lo que se procedió a la medida de las variaciones de la glucemia tras la ingesta habitual en estos animales. Para ello se ha utilizado un lote de 70 truchas de pesos comprendidos entre 80 y 135 gramos, sometidas a 72 horas de ayuno. Los animales fueron alimentados "ad libitum", proporcionándoseles la comida a las ocho de la mañana (2.35 g / 100 g. de peso, con un contenido de 27.9 % de glúcidos). Posteriormente se les tomó una muestra de sangre cada dos horas hasta completar un ciclo de 24 horas. Como puede verse en la Gráfi- ca nº 4, a las 6 horas de la comida de glucemia está elevada significativa-

GRAFICA nº 3



Efecto del ayuno prolongado sobre la concentración de glucógeno hepático, y algunos metabolitos sanguíneos. Los resultados para el glucógeno se expresan en μmoles de glucosa / gramo de tejido fresco, para los metabolitos sanguíneos en mM. Las escalas representativas de glucosa lactato y acetoacetato en sangre se sitúan a la derecha de la gráfica, glucógeno hepático y amoniaco sanguíneo a la izquierda. Cada punto representa una media de 7 experiencias. Los valores que son significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos se expresan por: $***p < 0.001$ $**p < 0.01$ $*p < 0.05$

GRAFICA nº 4



Variaciones de la glucosa sanguinea despues de la alimentacion, a lo largo de 24 horas. Cada punto representa una media de 5 experiencias. Los valores representados son altamente significativos según el test de Student, entre las 6 y 16 horas, con respecto a los controles. La significancia se expresa por: *** $p < 0.001$

mente y sigue aumentando hasta alcanzar el valor máximo a las 10 horas, valor que casi duplica el encontrado en condiciones basales. Posteriormente la glucemia desciende restaurándose los valores normales entre las 18 y 20 horas.

4.4. - Efecto de la hipoxia, hormonas e inhibidores sobre la producción de glucosa por el hígado.

De las consideraciones expuestas en la parte teórica y de los resultados anteriormente descritos parece desprenderse que el metabolismo glucídico está poco regulado en la trucha, al menos, si se compara con los niveles de control metabólico propios de los mamíferos. Las experiencias que se describen a continuación tenían por objeto conocer algunos aspectos básicos de la regulación de la producción de glucosa por el hígado. Con este fin se ha procedido a estudiar el efecto de la hipoxia y algunas hormonas sobre este proceso. Posteriormente, y a la vista de los resultados obtenidos, se han empleado también en este estudio algunos inhibidores de la gluconeogénesis. Los estudios "in vitro" se han correlacionado en todos los casos con los correspondientes estudios "in vivo".

4.4.1. - Ensayos "in vitro".

La preparación de los cortes hepáticos para las experiencias "in vitro" se realizó de la siguiente manera. Las truchas (100-125 g) se sacrificaron con un golpe seco en la cabeza, se extrajo el hígado rápidamente y se lavó con solución salina al 0.9 %. Después se cortó una porción del mismo para hacer la determinación del glucógeno inicial en el tejido, tal

como se describe en la sección 3.2.3.2. de Material y Métodos. Del resto del hígado se realizaron cortes de peso medio entre 30 y 70 mg, depositándose cada uno en un vaso de incubación tipo Warburg, conteniendo 4 ml. de medio Krebs-Henseleit. Los frascos se incubaron a 15° con agitación conveniente y gaseo con gas carbógeno (O₂ - CO₂, 95:5 v/v) durante 30, 60 y 120 minutos (uno o dos cortes para cada tiempo de incubación, perteneciendo todos los cortes a un mismo animal). Al finalizar el período de incubación se secaron los cortes en papel de filtro y se pesaron determinando después en cada uno la concentración de glucógeno y determinando la glucosa en el medio, de acuerdo con el método descrito en la sección 3.2.3.1. de Material y Métodos.

4.4.1.1. - Efecto de la hipoxia.

Las condiciones hipóxicas "in vitro" se han conseguido incubando los cortes hepáticos tal como se acaba de describir, pero sin gasear los vasos con carbógeno. Los resultados aparecen en la Tabla X. Puede observarse que el contenido en glucógeno no se altera significativamente durante la incubación en ninguno de los casos. La glucosa en el medio es idéntica a los 120 minutos para ambos lotes, aunque la velocidad de liberación parece ligeramente menor en los cortes incubados en hipoxia.

4.4.1.2. - Efecto de la adrenalina.

La concentración de adrenalina en el medio de incubación fué de 5×10^{-2} mM. Los resultados se expresan en la Gráfica nº 5. Puede observarse que no existen diferencias entre los controles y los tratados con

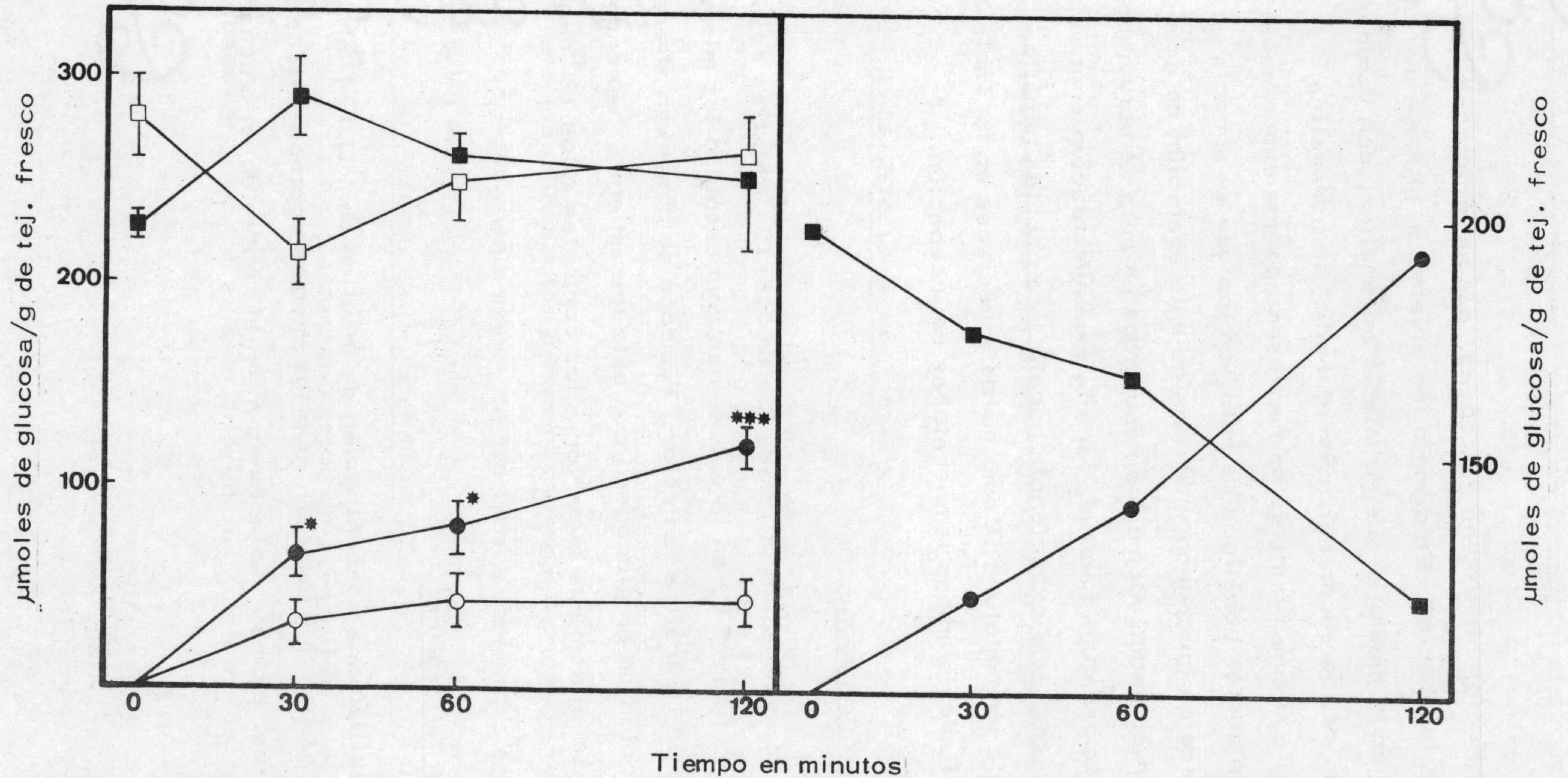
TABLA X

	NORMALES		HIPOXIA	
	Glucógeno	Glucosa	Glucógeno	Glucosa
Inicial	307 ± 22 (7)	—	279 ± 24 (7)	—
30 minutos	244 ± 18 (12)	40 ± 5 (14)	234 ± 23 (11)	25 ± 3 (11)*
60 minutos	278 ± 15 (12)	54 ± 10 (12)	252 ± 36 (13)	37 ± 4 (13)
120 minutos	282 ± 14 (14)	42 ± 4 (12)	252 ± 29 (11)	42 ± 4 (11)

Efecto de la hipoxia "in vitro" en cortes hepáticos de trucha a lo largo del tiempo, sobre la concentración de glucógeno y liberación de glucosa. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa / gramo de tejido fresco.

El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos se expresan por: * $p < 0.05$.

GRAFICA nº 5



Efecto de la adición "in vitro" de adrenalina en cortes hepáticos de trucha y rata a lo largo del tiempo, sobre la concentración de glucógeno hepático y liberación de glucosa. Cada punto representa una media de 6 experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos, se expresan por: *** $p < 0.001$

* $p < 0.05$.

(□) concentración de glucógeno en los controles; (■) concentración de glucógeno en los tratados;
 (○) liberación de glucosa en los controles; (●) liberación de glucosa en los tratados.

adrenalina en cuanto al contenido en glucógeno, que no se altera significativamente durante la incubación. En cambio los niveles de glucosa aumentan significativamente en el medio al que se añadió adrenalina, con valores claramente por encima de los encontrados en el medio sin adrenalina.

En la misma figura se ha representado una experiencia similar realizada con cortes hepáticos de rata, en los que se aprecia un descenso en el contenido en glucógeno y la consiguiente aparición de gran cantidad de glucosa en el medio. Como los resultados en rata se obtuvieron incubando a 37 °C (temperatura habitual para la experimentación en mamíferos), también hemos realizado una experiencia paralela con cortes hepáticos de trucha incubados a esta temperatura. Como puede apreciarse en la Tabla XI, los resultados son similares a ambas temperaturas de incubación.

4.4.1.3. - Efecto del glucagon.

La concentración utilizada fué de 5.8×10^{-6} mM. Los resultados se expresan en la Gráfica nº 6, en la que se han representado los mismo valores controles que en la gráfica anterior. Tampoco se observan alteraciones significativas del contenido en glucógeno con este tratamiento, habiendo en cambio una producción sensiblemente superior a los controles a los 120 minutos de incubación.

4.4.1.4. - Efecto de la insulina.

Se utilizó una concentración de insulina de 1 U.I. / ml. Los resultados se expresan en la Tabla XII, con los mismos controles de la experiencia con adrenalina. No hay variaciones ni en el contenido en glucógeno ni en la producción de glucosa.

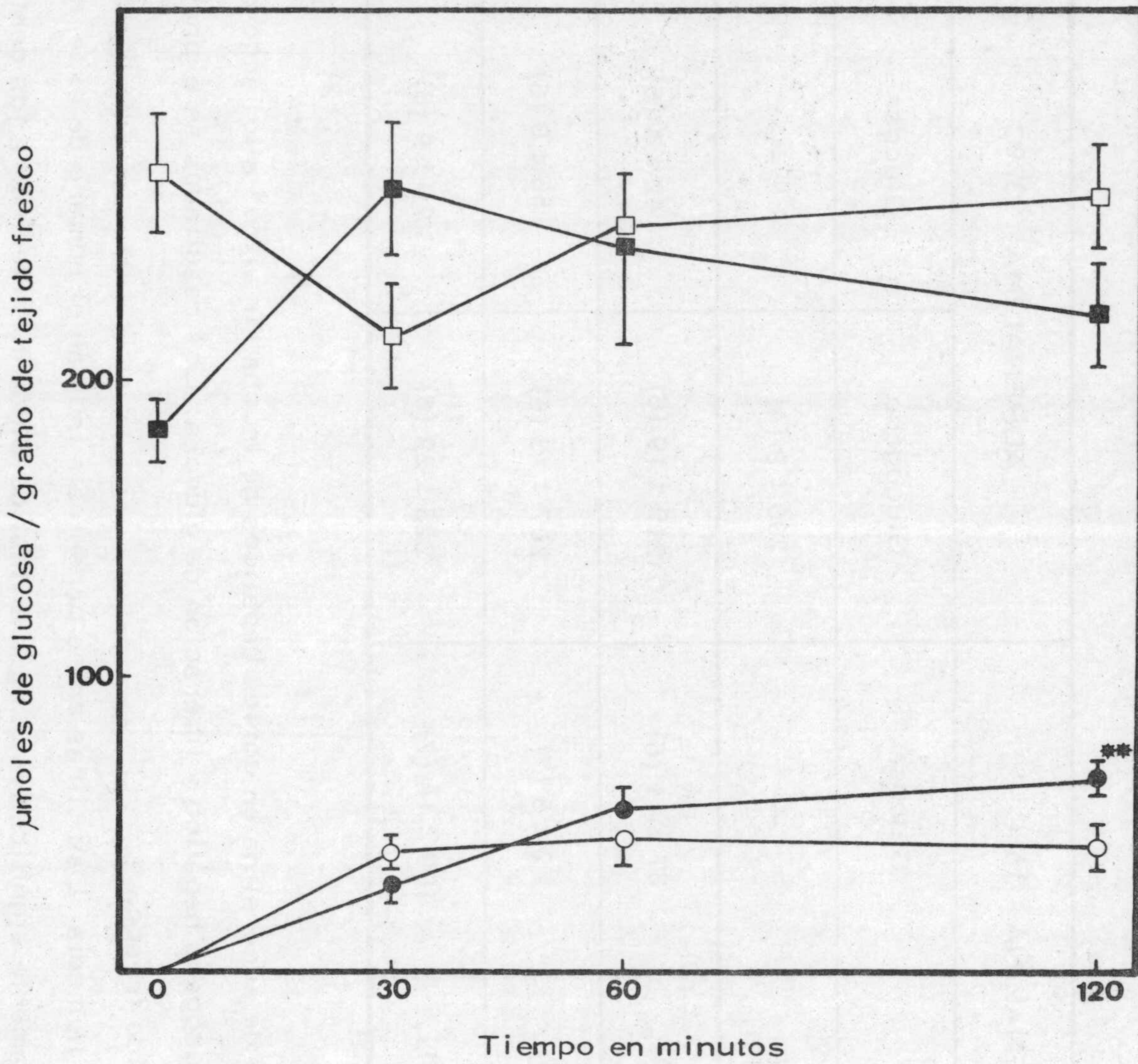
TABLA XI

	ADRENALINA 15°C		ADRENALINA 37°C	
	Glucógeno	Glucosa	Glucógeno	Glucosa
Inicial	224 ± 5 (4)	—	200 ± 8 (4)	—
30 minutos	278 ± 19 (4)	67 ± 11 (6)	219 ± 19 (6)	42 ± 4 (6)
60 minutos	261 ± 7 (5)	72 ± 6 (7)	207 ± 13 (6)	56 ± 8 (6)
120 minutos	254 ± 33 (6)	109 ± 14 (7)	228 ± 22 (6)	70 ± 9 (6)*

Efecto de la temperatura y la adición de adrenalina en cortes hepáticos de trucha "in vitro" a lo largo del tiempo, sobre la concentración de glucógeno hepático y liberación de glucosa. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa / gramo de tejido fresco.

El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a los controles (adrenalina 15°C) se expresan por: * $p < 0.02$.

GRAFICA nº 6



Efecto de la adición de glucagon en cortes hepáticos de trucha "in vitro" a lo largo del tiempo, sobre la concentración de glucógeno y liberación de glucosa. Cada punto representa una media de 6 experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos, se expresan por:

*** $p < 0.01$; (□) concentración de glucógeno en los controles; (■) concentración de glucógeno en los tratados; (○) liberación de glucosa en los controles; (●) liberación de glucosa en los tratados.

TABLA XII

	NORMALES		INSULINA	
	Glucógeno	Glucosa	Glucógeno	Glucosa
Inicial	272 ± 21 (4)	—	196 ± 5 (4)	—
30 minutos	215 ± 18 (8)	39 ± 5 (8)	213 ± 14 (6)	41 ± 8 (6)
60 minutos	253 ± 19 (7)	44 ± 9 (7)	234 ± 14 (7)	37 ± 5 (7)
120 minutos	264 ± 18 (6)	43 ± 6 (6)	233 ± 11 (6)	45 ± 6 (5)

Efecto de la adición de insulina en cortes hepáticos de trucha "in vitro" a lo largo del tiempo, sobre la concentración de glucógeno y liberación de glucosa. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa / gramo de tejido fresco.

El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experiencias.

4.4.1.5. - Efecto del dibutilil AMPc.

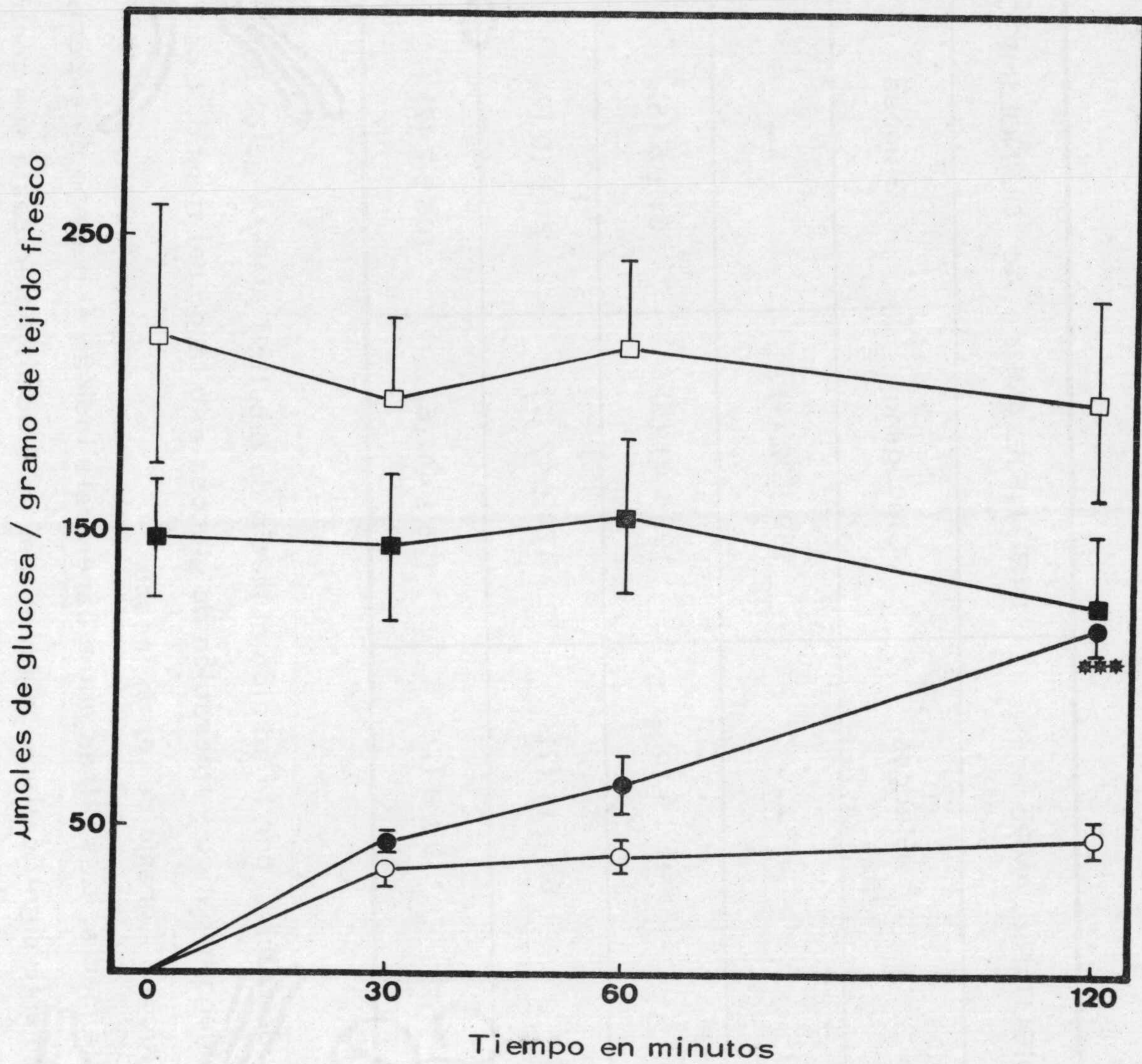
Este metabolito se ha añadido al medio de incubación a una concentración 5×10^{-2} mM. Los resultados expuestos en la Gráfica nº 7 indican que tampoco existen alteraciones en el glucógeno a lo largo de la incubación, aunque las concentraciones iniciales son muy diferentes en cada caso. La producción de glucosa es claramente mayor tras la adición del derivado del AMPc, siendo las diferencias muy significativas a los 120 minutos. Como es sabido, el empleo del dibutilil AMP cíclico es preferible al del nucleótido puro, ya que se favorece la penetración por las membranas celulares y se dificulta la acción de la fosfodiesterasa.

4.4.1.6. - Efecto de algunos inhibidores de la gluconeogénesis.

De los resultados expuestos parecía desprenderse que la liberación de glucosa al medio debía tener un importante componente gluconeogénico, pues la glucosa final en el medio era superior en todos los casos a la pérdida de glucógeno. Para tratar de esclarecer esta hipótesis se han utilizado varios inhibidores de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, enzima clave del proceso gluconeogénico: quinolinato (147), aminoxiacetato (148) y α -ciano 3-hidroxicinamato (149). Todos estos inhibidores se han ensayado en presencia de dibutilil AMPc, que producía una gran liberación de glucosa al medio.

Como puede apreciarse en la Tabla XIII, la adición de quinolinato (10 mM) no modifica la acción del dibutilil AMPc sobre la producción de glucosa. La adición de aminoxiacetato (0.2 mM) modifica solo muy ligeramente la liberación de glucosa (Tabla XIV). En cambio, la adición de α -ciano 3-hidroxicinamato (5 mM) bloquea claramente la liberación de glucosa al medio

GRAFICA nº 7



Efecto de la adición de dibutiril AMPc en cortes hepáticos de trucha "in vitro" a lo largo del tiempo, sobre la concentración de glucógeno y liberación de glucosa. Cada punto representa una media de 5 experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos se expresan por: *** $p < 0.001$.

(□) concentración de glucógeno en los controles; (■) concentración de glucógeno en los tratados; (○) liberación de glucosa en los controles; (●) liberación de glucosa en los tratados.

TABLA XIII

	DIBUTIRIL AMP _c		DIBUTIRIL AMP _c + Ac. QUINOLINICO	
	Glucógeno	Glucosa	Glucógeno	Glucosa
Inicial	133 ± 23 (4)	—	159 ± 32 (4)	—
30 minutos	110 ± 28 (6)	45 ± 4 (5)	193 ± 41 (5)	31 ± 5 (5)*
60 minutos	117 ± 31 (7)	65 ± 11 (7)	174 ± 47 (7)	71 ± 10 (7)
120 minutos	109 ± 27 (7)	119 ± 8 (7)	176 ± 44 (6)	108 ± 7 (7)

Efecto "in vitro" en cortes hepáticos de trucha, por la adición al medio de dibutiril AMP_c y ácido quinolínico, sobre la concentración de glucógeno hepático y liberación de glucosa a lo largo del tiempo. Los resultados se expresan en μ moles de glucosa / gramo de tejido fresco.

El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos se expresan por: * $p < 0.05$

TABLA XIV

	DIBUTIRIL AMP _c		DIBUTIRIL AMP _c + AMINOXIACETATO	
	Glucógeno	Glucosa	Glucógeno	Glucosa
Inicial	133 ± 23 (4)	—	163 ± 19 (4)	—
30 minutos	110 ± 28 (6)	45 ± 4 (5)	187 ± 44 (6)	32 ± 3 (6)**
60 minutos	117 ± 31 (7)	65 ± 11 (7)	151 ± 45 (7)	57 ± 8 (7)
120 minutos	109 ± 27 (7)	119 ± 8 (7)	100 ± 43 (6)	93 ± 6 (7)*

Efecto "in vitro" en cortes hepáticos de trucha, por la adición al medio de dibutiril AMP_c y ácido amino-
xiacetato, sobre la concentración de glucógeno hepático y liberación de glucosa, a lo largo del tiempo.

Los resultados se expresan en μ moles de glucosa / gramo de tejido fresco.

El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experien-
cias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus contro-
les respectivos, se expresan por: **p < 0.01 *p < 0.02

(Gráfica nº 8). El efecto inhibitor del α -ciano 3-hidroxicinamato sobre la producción de glucosa es patente también en ausencia de AMPc (Gráfica nº9)

4.4.2. - Efectos "in vivo".

Los tratamientos efectuados se describen en la sección 3.2.2. de Material y Métodos.

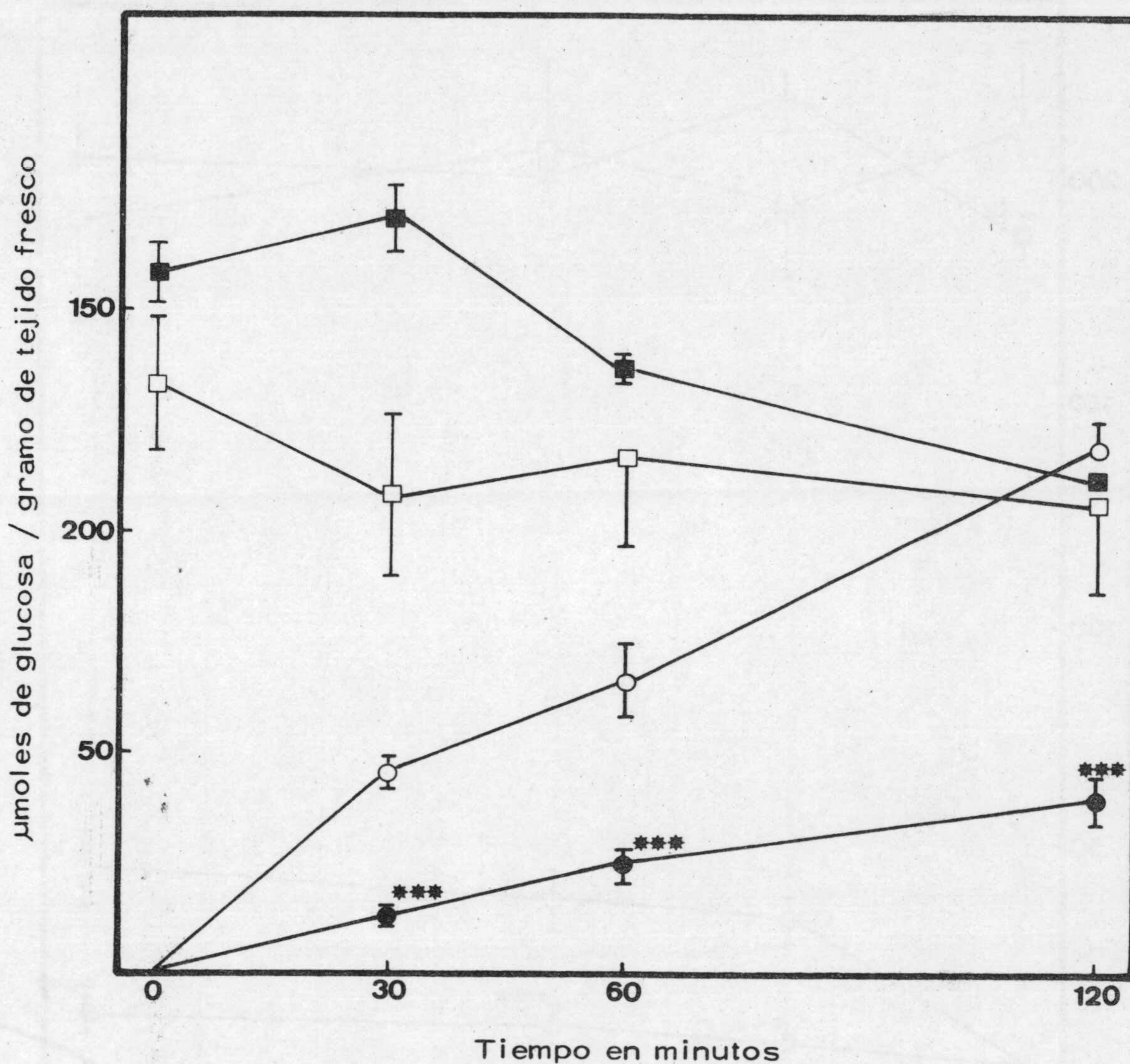
4.4.2.1. - Efecto de la hipoxia.

Los resultados se muestran en la Tabla XV. El glucógeno hepático no sufre modificaciones significativas, mientras que los niveles de glucosa y lactato sanguíneo se encuentran elevados significativamente, sobre todo en el caso del lactato.

4.4.2.2. - Efecto de la insulina.

Los resultados se muestran en la Tabla XVI. No hay cambios significativos en la concentración de glucógeno, ni en el lactato sanguíneo, pero los niveles de glucosa se encuentran disminuidos significativamente.

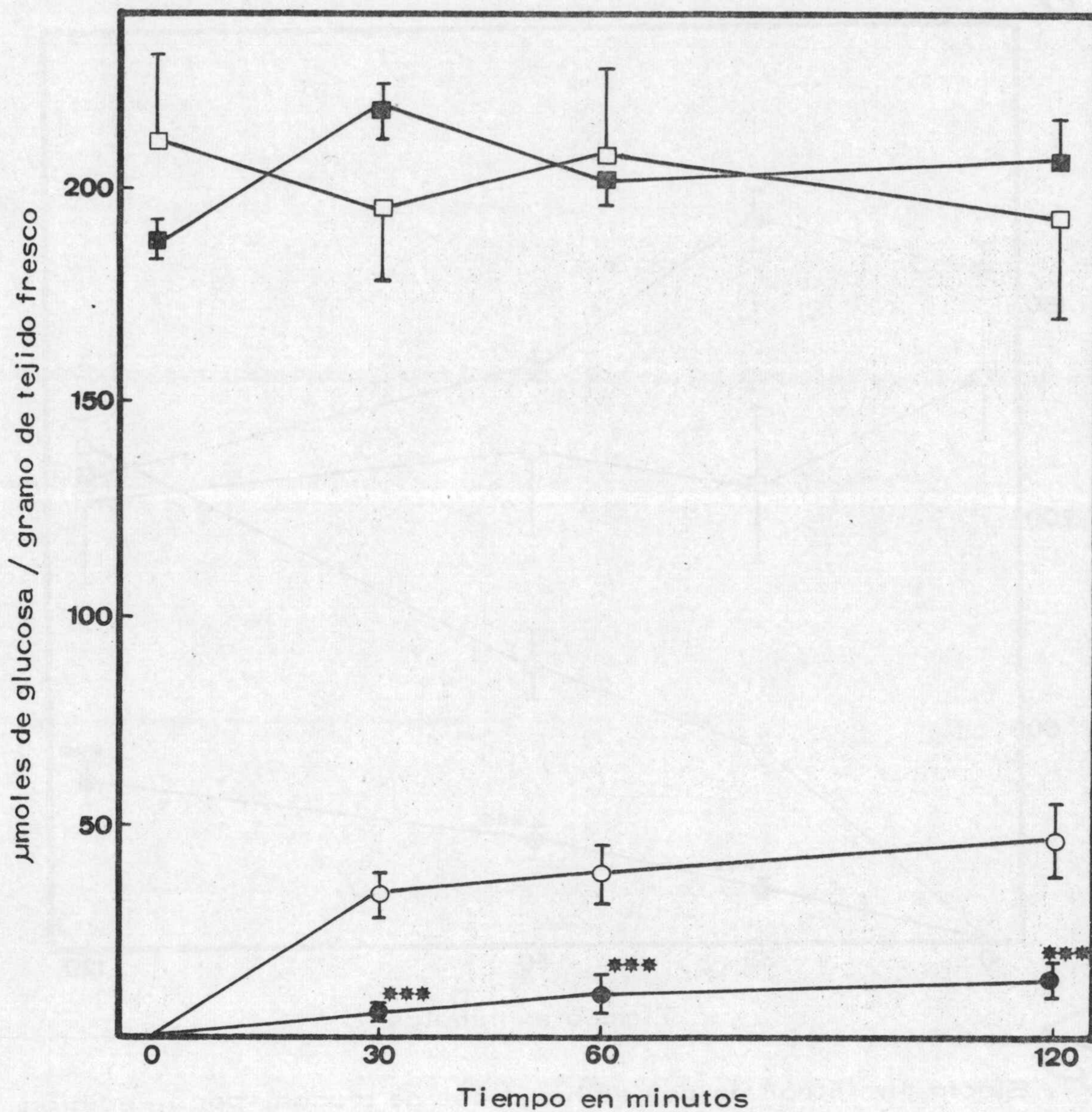
GRAFICA nº 8



Efecto "in vitro" en cortes hepáticos de trucha, por la adición al medio de dibutiril AMPc y ácido α -ciano 3-hidroxicinamato a lo largo del tiempo, sobre la concentración de glucógeno hepático y liberación de glucosa. Cada punto representa una media de 6 experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos se expresan por: *** $p < 0.001$

(□) concentración de glucógeno con dibutiril AMPc; (■) concentración de glucógeno con dibutiril AMPc + ácido α -ciano 3-hidroxicinamato; (○) liberación de glucosa con dibutiril AMPc (●) liberación de glucosa con dibutiril AMPc + ácido α -ciano 3-hidroxicinamato.

GRAFICA nº 9



Efecto "in vitro" en cortes hepáticos de trucha, por la adición al medio de ácido α -ciano 3-hidroxicinamato, sobre la concentración de glucógeno hepático y liberación de glucosa. Cada punto representa una media de 6 experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos se expresan por: *** $p < 0.001$. (□) concentración de glucógeno en los controles; (■) concentración de glucógeno en los tratados; (○) liberación de glucosa en los controles; (●) liberación de glucosa en los tratados.

TABLA XV

Efecto de la hipoxia "in vivo" durante 2 horas, sobre la concentración de glucógeno hepático expresado en μmoles de glucosa / gramo de tejido fresco y los niveles sanguíneos de glucosa y lactato expresado en mM, en trucha.

El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre paréntesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos, se expresan por: *** $p < 0.001$ * $p < 0.02$

	NORMALES	HIPOXIA
Glucógeno	194 ± 20 (14)	154 ± 27 (16)
Glucosa	2.46 ± 0.10 (10)	3.77 ± 0.46 (10)*
Lactato	1.41 ± 0.16 (10)	5.65 ± 0.33 (10)***

TABLA XVI

Efecto de la inyección intraperitoneal de insulina durante 2 horas, sobre la concentración de glucógeno hepático expresado en μ moles de glucosa / gramo de tejido fresco, y los niveles de glucosa y lactato sanguíneo expresados en mM, en trucha. Los controles fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina al 0.9 %.

El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos, se expresan por: *** $p < 0.001$

	CONTROLES	INSULINA
Glucógeno	180 \pm 38 (4)	200 \pm 29 (5)
Glucosa	2.98 \pm 0.18 (5)	1.84 \pm 0.10 (5)***
Lactato	3.32 \pm 1.22 (5)	2.11 \pm 0.80 (5)

4.4.2.3. - Efecto del glucagon y adrenalina.

Los resultados se expresan en la Tabla XVII. Ni el glucagon ni la adrenalina alteran significativamente las concentraciones de glucógeno hepático.

Con el glucagon los niveles de glucosa sanguínea experimentan un incremento significativo con respecto al control mientras que el lactato no se modifica significativamente.

La adrenalina, por el contrario, produce un aumento significativo tanto en los niveles sanguíneos de glucosa como de lactato.

4.4.2.4. - Efecto del dibutiril AMPc.

Los resultados se representan en la Gráfica nº 10. No hay modificaciones significativas en el glucógeno.

Los niveles de lactato sanguíneo experimentan un incremento significativo en los primeros 30 minutos, para volver a los niveles basales a las 2 horas.

La glucosa sanguínea, se encuentra elevada significativamente a la hora y dos horas, después de la inyección.

4.4.2.5. - Efecto "in vivo" de la inyección simultánea de dibutiril AMPc + ácido α -ciano 3-hidroxicinamato.

Los resultados de esta experiencia se representan en la Tabla XVIII. Se puede observar que la inyección de α -ciano 3-hidroxicinamato junto al dibutiril AMPc bloquea parcialmente el incremento en la glucemia producido por el nucleótido.

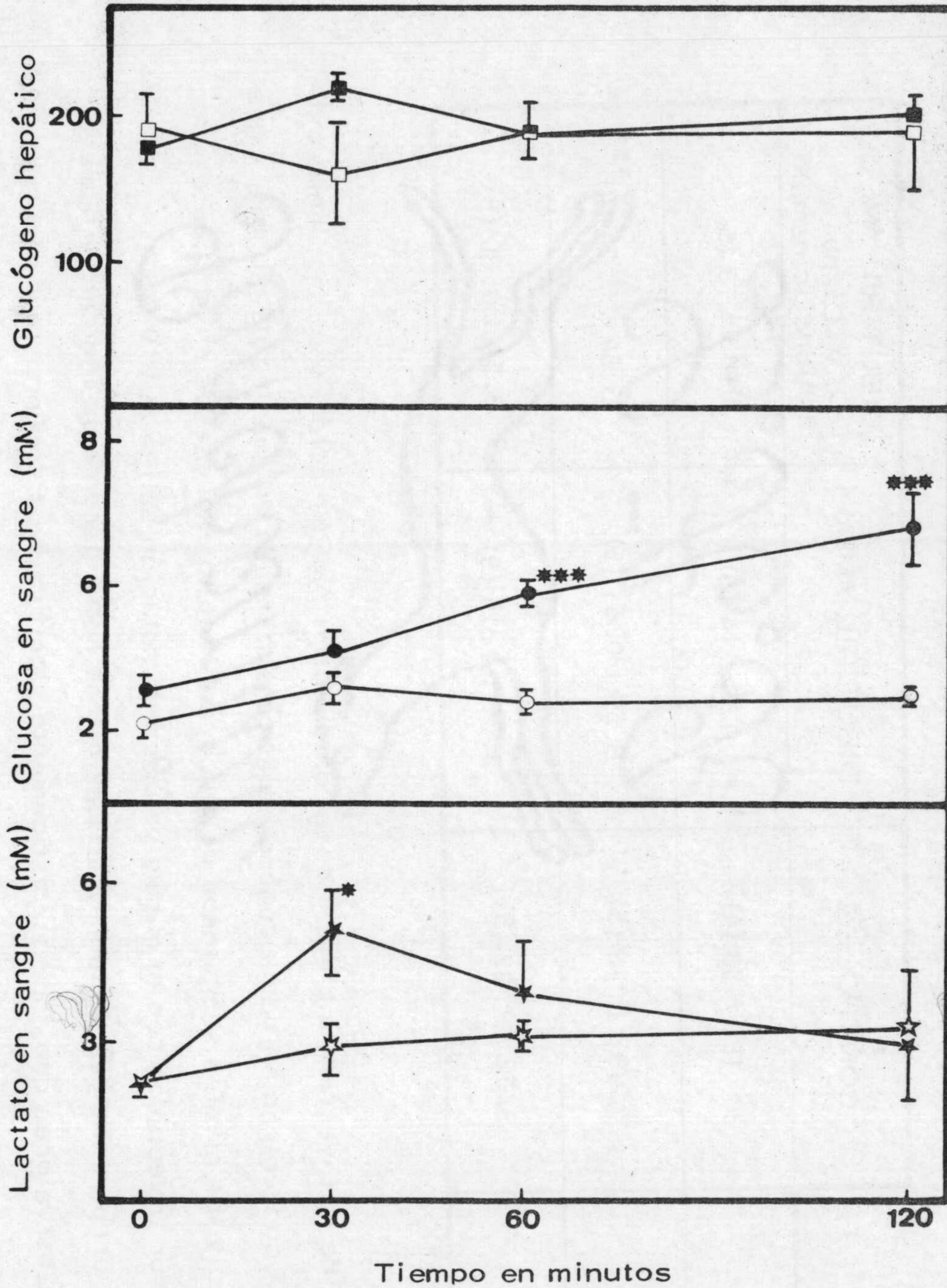
TABLA XVII

Efecto de la inyección intraperitoneal de adrenalina y glucagon durante 2 horas, sobre la concentración de glucógeno hepático expresado en μ moles glucosa / gramo de tejido fresco y los niveles sanguíneos de glucosa y lactato expresado en mM, en trucha. Los controles fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina al 0.9%. El \pm representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles respectivos se expresan por: *** $p < 0.001$

* $p < 0.05$

	CONTROLES	ADRENALINA	GLUCAGON
Glucógeno	187 \pm 22 (6)	140 \pm 20 (5)	148 \pm 28 (5)
Glucosa	3.31 \pm 0.20 (6)	7.01 \pm 0.73 (5)***	5.34 \pm 1.06 (5)*
Lactato	2.93 \pm 0.17 (6)	4.71 \pm 0.42 (5)***	3.98 \pm 1.17 (5)

GRAFICA nº 10



Efecto de la inyección intraperitoneal de dibutiril AMPc a lo largo del tiempo sobre la concentración de glucógeno hepático y los niveles sanguíneos de glucosa y lactato, en trucha. Los animales controles fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina al 0.9 %. Cada punto representa una media de 5 experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a sus controles se expresan por: *** $p < 0.001$ * $p < 0.05$. (□) controles; (■) tratadas; (○) controles; (●) tratadas; (☆) controles; (★) tratadas.

TABLA XVIII

	CONTROLES	DIBUTIRIL AMP _c	DIBUTIRIL AMP _c α-Ciano- 3-hidroxicinamato
Glucógeno	180 ± 38 (4)	188 ± 14 (5)	183 ± 18 (5)
Glucosa	2.98 ± 0.18 (5)	8.59 ± 0.61 (5)***	5.57 ± 0.24 (4)***
Lactato	3.32 ± 1.22 (5)	3.06 ± 1.16 (5)	3.54 ± 0.80 (5)

Efecto simultáneo de la inyección intraperitoneal de dibutiril AMP_c+ ácido α-ciano 3-hidroxi-cinamato, sobre la concentración de glucógeno hepático expresado en μmoles de glucosa / gramo de tejido fresco y los niveles sanguíneos de glucosa y lactato expresados en mM, en trucha. Los controles fueron inyectados con el mismo volumen de solución salina al 0.9 %.

El ± representa el error estándar de la media. Las cifras entre parentesis indican el número de experiencias. Los valores que son estadísticamente significativos según el test de Student, referidos a los controles respectivos, se expresan por: ***p<0.001

V. - DISCUSSION

BB

BB
Winnipeg
BB

V. - DISCUSION

5. 1. - Efecto de la composición de la dieta.

Como se ha indicado anteriormente, estas experiencias se realizaron como complemento a las llevadas a cabo en el Departamento de Fisiología Animal, siguiendo el diseño experimental adecuado para el estudio de las repercusiones nutritivas y metabólicas de la sustitución de proteína por grasa en la dieta. De ahí la existencia de períodos cortos de ayuno intercalados a lo largo de las experiencias, con el fin de reducir el acúmulo de grasa corporal. Efectivamente, durante estos períodos de ayuno desciende el contenido lipídico tanto en hígado como en digestivo, lo que indica una utilización de este material con fines energéticos. Por otra parte, también desciende durante estos períodos de ayuno la proteína corporal, especialmente en las truchas alimentadas con la dieta protéica, lo que indica un consumo energético importante de aminoácidos en estos animales en dichos períodos (125). Tanto la dieta protéica como el ayuno inducen el funcionamiento de la gluconeogénesis en mamíferos (150). Por ello era interesante la medida de la actividad de las enzimas relacionadas con la gluconeogénesis a lo largo de estas experiencias.

Nuestros resultados indican que no hay efectos bien definidos por la dieta lipídica (de menor contenido proteico) o los períodos de ayuno, sobre la actividad de estas enzimas. Existen amplias fluctuaciones a lo largo de los tratamientos que son difíciles de interpretar porque no siempre son del mismo signo en períodos equivalentes, de forma similar a lo que se había observado en las enzimas determinadas con anterioridad (aspartato y alanina

aminotransferasas y fosfoenolpiruvato carboxicinasas) en estas condiciones (125). Entre las causas que pueden invocarse para explicar la irregularidad de algunas de estas oscilaciones está la variabilidad de respuesta individual de las truchas a cualquier tipo de cambio. Ello repercute en la periodicidad de la ingesta y haría especialmente crítica la intercalación de los períodos de ayuno, demasiado cortos para la lentitud de adaptación que presentan los peces, sobre todo en lo que concierne al metabolismo glucídico (67, 118). Por otra parte, es importante tener en cuenta que los sacos pilóricos de estos animales constituyen un reservorio de alimento que puede ser incorporado a la digestión mucho después de comenzado el período de ayuno.

Aparte de las oscilaciones citadas, a veces contrapuestas, los valores finales de la lactato deshidrogenasa hepática son similares al final del período ensayado con ambos tipos de dieta. La falta de efecto de la dieta sobre la lactato deshidrogenasa no es de extrañar. En efecto, esta enzima cataliza una reacción fisiológicamente reversible y no es, por tanto, propiamente gluconeogénica. Por otra parte, el lactato no parece ser un sustrato importante para la gluconeogénesis en las condiciones estudiadas, en las que el funcionamiento anaerobio del músculo blanco-productor de lactato- es claramente inferior al del músculo rojo, de metabolismo claramente aerobio (151, 152).

Por lo que se refiere a la fructosa difosfatasa, las actividades son claramente inferiores en el hígado de los animales alimentados con la dieta lipídica a lo largo del período ensayado, para igualarse al final de la experiencia. Ello concuerda con los resultados obtenidos en la determinación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasas en las mismas con-

diciones (125) y parece sugerir un mayor funcionamiento de la gluconeogénesis en los animales alimentados con mayor cantidad de proteína.

Cowey y col. encuentran un fuerte decrecimiento en la actividad de la fructosa difosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa al alimentar a las truchas con una dieta rica en hidratos de carbono durante seis semanas (120). El mayor efecto de este cambio de dieta sobre ambas enzimas puede explicarse fácilmente ya que la dieta rica en hidratos de carbono empleada por estos autores contiene una cantidad bajísima de proteína, mientras que la dieta rica en grasa empleada por nosotros es solo ligeramente inferior en contenido proteico a la dieta rica en proteína. Por otra parte, los hidratos de carbono tienen un marcado efecto depresor de la gluconeogénesis, que no poseen los lípidos. (150).

Más complicado de interpretar es el efecto de la dieta lipídica sobre la actividad de la glucosa 6 fosfatasa ya que, aunque los valores finales quedan por debajo de los iniciales, las oscilaciones a lo largo de la experiencia son de una gran amplitud. Esta enzima parece bastante sensible a la regulación en peces (106) debido fundamentalmente a que también representa la llave de salida para la glucosa procedente del glucógeno hepático. Quizá en este aspecto radique la diferencia de comportamiento con respecto al resto de enzimas gluconeogénicas.

Con relación a las enzimas de origen renal es interesante destacar que en todos los casos presentan una actividad menor que las de origen hepático. Esto había sido ya señalado por Cowey y col. para fructosa difosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxicinasa (118). En cualquier caso, no aparecen alteraciones destacables para ninguna de ellas por efecto de la dieta lipídica.

La glucemia se mantiene más alta en el lote correspondiente a la dieta lipídica durante toda la experiencia. Esto puede interpretarse como el resultado de una concentración menor de insulina circulante debida al descenso de proteínas de la dieta. En efecto, parece muy probable que la insulina se libere en peces por estímulo de los aminoácidos y no de la glucosa, (119, 153).

5.2. - Efecto del ayuno prolongado.

Varias especies de peces teleósteos soportan largos períodos de ayuno (84, 154, 87, 155, 86, 156, 123, 85, 91, 13, 75, 122, 76, 121). Basándose en datos de concentraciones recíprocas de proteína muscular y glucógeno hepático, Inui y Ohshima (155) y Larsson y Lewander (13) concluyen que la gluconeogénesis se incrementa durante estos períodos. Otros autores han estudiado la evolución de algunos parámetros metabólicos durante el ayuno prolongado en truchas y otras especies, incluyendo la determinación de actividades aminotransferásicas (87, 86, 156, 123, 85, 122, 76, 121). De acuerdo con las consideraciones realizadas en la sección anterior y teniendo en cuenta la inexistencia de datos relativos a la determinación de las principales enzimas gluconeogénicas durante el ayuno prolongado, pareció interesante realizar este estudio en la trucha durante un largo período de ayuno.

Nuestros datos relativos a contenido de glucógeno hepático y glucosa en sangre a lo largo del período estudiado coinciden globalmente con los señalados anteriormente para la misma especie (123, 122, 121). Es destacable que el glucógeno hepático no se agota, aunque disminuye fuertemente.

La glucemia también desciende al final de la experiencia y existe una clara relación recíproca entre los valores de ambos parámetros bioquímicos desde el quinto al trigésimo día, especialmente evidente en el vigésimo día de ayuno. Dado que en este momento aumenta la actividad de la glucosa 6 fosfatasa parece lógico pensar que el aumento de la concentración de glucosa en sangre se debe a la glucogenolisis hepática favorecida por la activación de dicha enzima.

Parece bastante bien establecido que durante el primer mes de ayuno existe una fuerte movilización de la reserva grasa tisular para sostener el metabolismo energético de la trucha y otros peces (84, 156, 122, 76). Esto es coherente con la ausencia de alteraciones o incluso el descenso en las actividades de las enzimas implicadas en la gluconeogénesis encontrados por nosotros. También concuerda con los datos de Cowey y col. que señalan la inexistencia de variaciones en la gluconeogénesis "in vivo" a partir de alanina tras veintiun días de ayuno (118). Las enzimas gluconeogénicas se encuentran, por el contrario, aumentadas al finalizar el segundo mes de ayuno, momento en el que es lógico pensar que existe ya una fuerte actividad gluconeogénica. La movilización de aminoácidos necesaria para la resíntesis de glucosa en este período parece demostrada por el aumento de amoniaco en sangre como resultado de las desaminaciones anejas a la utilización de su esqueleto carbonado. El incremento paralelo de acetoacetato en sangre refleja, por otra parte, la actividad cetogénica hepática que acompaña a la gluconeogénesis en la mayor parte de los vertebrados (157).

Después del sexagésimo día de ayuno se registra un fuerte aumento del índice de mortalidad, lo que indica que las truchas no se encontraban en buenas condiciones fisiológicas y puede explicar el descenso en la actividad de algunas de las enzimas ensayadas.

Por lo que se refiere al riñón, la evolución de las actividades enzimáticas es paralela a la del hígado, lo que sugiere que este órgano está también implicado en la gluconeogénesis en la trucha, aunque sea en una escala menor. Es también interesante resaltar que la glucosa 6 fosfatasa renal sigue en este órgano una evolución similar a la del resto de enzimas gluconeogénicas, sin que se estimule previamente, como ocurría en el hígado. El riñón, al contrario que el hígado, posee muy poco glucógeno, por lo que la glucosa 6 fosfatasa renal es en éste órgano una enzima casi exclusivamente gluconeogénica.

Tenemos que indicar, por último que la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxicinasa ha sido medida en la fracción citoplasmática, a pesar de que la mayor parte de la actividad corresponde a la fracción mitocondrial en trucha (124). Sin embargo, es un hecho general que solo la fracción citoplasmática es sensible a la inducción en la mayoría de las especies que poseen ambas fracciones (158).

5. 3. - Tolerancia a la glucosa.

Nuestros datos de glucemia en animales sin tratamiento previo son muy variables. Esta variabilidad ha sido observada por otros autores en esta misma especie (67, 118, 120) y sugiere que estos animales carecen de un buen sistema de regulación de la concentración de glucosa en sangre. Por otra parte, Shibata y col. han señalado que la glucemia es muy sensible al estrés provocado por el simple manejo de la trucha (122), lo que puede explicar en parte estas oscilaciones. Lo mismo indican Murat y col. para la

carpa común (Cyprinus carpio) (159).

La evolución de la glucemia después de una comida normal indica que la gluconeogénesis es muy intensa en el período postprandial (a partir de los aminoácidos de la dieta). Por otra parte, el lento descenso de los niveles de glucosa refleja la carencia de mecanismos hipoglucemiantes eficaces. La curva se parece mucho a la encontrada por Palmer y Ryman en esta especie tras una dosis oral de glucosa (67). Se trata de una curva de tipo diabetoide, que indica una mala tolerancia a la glucosa, fenómeno que parece ser común en peces (160). Excepcionalmente, Young y Chavin encuentran que la tolerancia a la glucosa en el pez rojo (Carassius auratus) es semejante a la de los mamíferos (161).

La intolerancia a la glucosa no es extraña en animales cuya dieta natural no contiene prácticamente carbohidratos. Aunque se ha señalado que esta intolerancia se debe a un estado de hipoinsulinismo (67), determinaciones recientes de insulina en trucha indican niveles semejantes a los de mamíferos (153). Por ello debe pensarse más bien que estos animales carecen de determinados mecanismos enzimáticos para hacer descender la glucemia. A este respecto es interesante destacar que la trucha carece de glucocinasa en el hígado, enzima fundamental para retirar glucosa de la sangre en condiciones de hiperglucemia (120).

5.4. - Liberación de glucosa por el hígado.

La liberación de glucosa por el hígado para satisfacer la demanda del cerebro y demás tejidos que la consumen se realiza a través de dos mecanismos: glucógenolisis y gluconeogénesis. En los animales superio-

res, el hígado almacena glucógeno cuando el aporte de glucosa por la dieta sobrepasa las necesidades de los tejidos periféricos. Posteriormente, este glucógeno almacenado podrá proveer de glucosa al organismo en los períodos de ayuno, de tal manera que durante estos períodos el glucógeno hepático se agota en menos de 24 horas (89). Una vez exhaustas las reservas de glucógeno, el hígado hace frente a la demanda extrahepática de glucosa por medio de la gluconeogénesis.

La dieta natural de la trucha y otros muchos peces contiene muy pocos carbohidratos. Además, estos animales los asimilan mal (5) y oxidan la glucosa muy lentamente en la mayoría de sus tejidos (4). Sin embargo, el cerebro (sistema nervioso en general), los eritrocitos y las gónadas necesitan un aporte continuo de glucosa (118). Por ello estas especies tienen que recurrir a la gluconeogénesis. Efectivamente, se ha demostrado que este proceso se realiza con cierta intensidad en la trucha y otros peces carnívoros (118, 120, 162, 163).

El hígado de estos peces también contiene glucógeno, que procede fundamentalmente de la gluconeogénesis. Por otra parte, al contrario que en los animales superiores, este glucógeno no se consume rápidamente durante el ayuno. Así, en la carpa común (Cyprinus carpio), el glucógeno permanece prácticamente inalterado durante varios meses de ayuno (86). Y en el salmón del Pacífico (Onchorhyncus nerka), la cantidad de glucógeno al final del período de migración para la freza sobrepasa incluso el contenido inicial (84). Sin llegar a estos extremos, nuestros resultados indican que el glucógeno hepático tarda en agotarse en la trucha por el ayuno. Está claro que existen dos diferencias fundamentales en el metabolismo del glucógeno entre mamíferos y peces: a) en estos últimos el glucógeno no procede de los carbohidratos de la dieta sino de la gluconeogénesis, y, b) el glucógeno hepático no es el material de reserva utilizado en las primeras fases del ayuno.

La regulación de la liberación de glucosa por el hígado en los peces ha sido estudiada fundamentalmente en Carassius auratus (106, 87, 164, 165,98), Cyprinus carpio (73, 166, 167) y Salmo gairdneri (118, 168, 169).

En el pez rojo (Carassius auratus) se ha demostrado "in vivo" liberación de glucosa a partir de glucógeno durante el ayuno (87), anaerobiosis (106) y estrés de manejo (98). Por otra parte, adrenalina, glucagón y AMPc son capaces de realizar la glucogenolisis "in vitro" (165). Todo ello parece dar a entender que la regulación del metabolismo del glucógeno hepático en esta especie es similar a la de los mamíferos. Y es interesante recordar a este respecto que se trata de una de las especies de peces que excepcionalmente poseen una tolerancia a la glucosa que no difiere mucho de la de los seres superiores (161). Sin embargo existen algunos datos que matizan esta semejanza. Así, la glucogenolisis provocada por el ayuno no se acompaña de una activación suficiente de la fosforilasa (87). Por otra parte el estrés de manejo produce la degradación del glucógeno hepático sin que se altere la actividad de la fosforilasa (98), mientras que la glucógenolisis originada por anaerobiosis no se debe a la activación de la fosforilasa sino de la glucosa 6 fosfatasa (106). La falta de relación glucogenolisis-fosforilasa durante la hiperglucemia provocada por el estrés de manejo se ha señalado también para Fundulus heteroclitus (170).

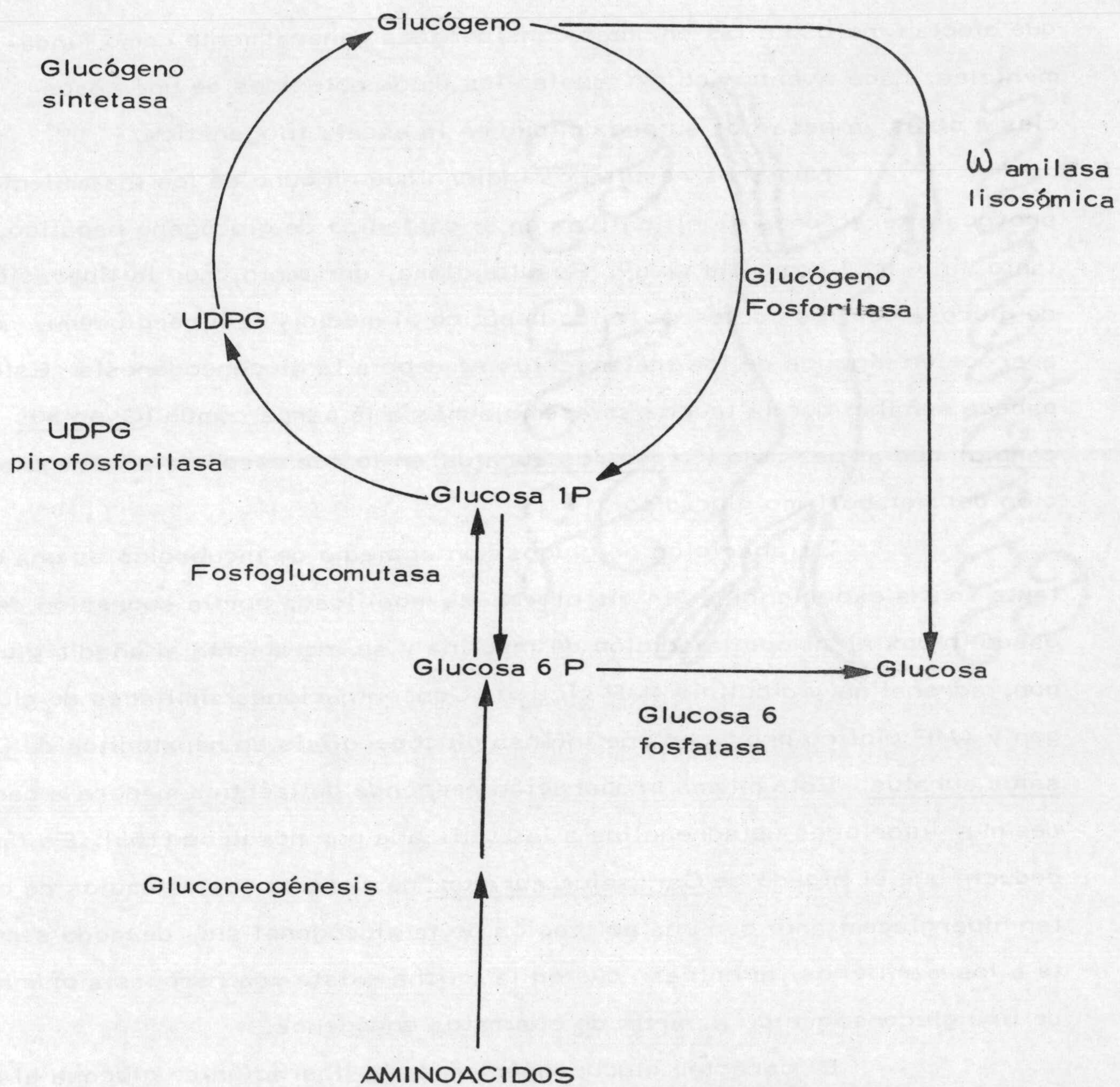
En la carpa común (Cyprinus carpio), la administración de glucagón o adrenalina provocan hiperglucemia sin alteración apreciable del glucógeno hepático, lo que parece indicar que estas hormonas actúan preferentemente sobre la vía gluconeogénica (73, 166). El glucagón produce, por otra parte, una inactivación de la glucógeno sintetasa (167). En cuanto a la insulina, los resultados obtenidos por Murat y col. son paradójicos, puesto que se pro-

duce glucogenolisis apreciable, al contrario de lo habitual en mamíferos (73). Es interesante señalar que el hígado de esta especie no posee fosforilasa, aunque esta enzima existe en otros tejidos del pez, y que la degradación del glucógeno por la insulina parece realizarse a través de una amilasa lisosómica (166).

Por lo que se refiere a la trucha (Salmo gairdneri), los datos bibliográficos son escasos. Nakano y Tomlinson indican que un fuerte estrés de manejo (que realizan agarrando fuertemente a los animales por la cola) provoca hiperglucemia y degradación de glucógeno hepático. Hay un aumento de la adrenalina circulante y una degradación del glucógeno muscular con activación de la fosforilasa en este último tejido. Pero estos autores no miden la fosforilasa hepática (168). Por su parte, Cowey y col. indican que el glucógeno hepático decrece hasta un 10-20 % a las 16 horas de la administración de floridzina(118), de modo semejante, aunque más lentamente, que lo que ocurre en la rata (171).

Es interesante destacar, por último, que la anoxia brutal (sic.) provocada por emersión del ciprínido Tinca vulgaris provoca un agotamiento del glucógeno en hígado, miocardio y músculo esquelético, con hiperglucemia, hiperlactacidemia, aumento de catecolaminas en sangre y activación de la fosforilasa en hígado y músculo (102).

De las consideraciones que acabamos de exponer se desprende que el significado fisiológico del glucógeno hepático en los peces no está dilucidado. No obstante parece lógico pensar que la utilización metabólica del glucógeno se realiza preferentemente en circunstancias fisiológicas de emergencia (anoxia, estrés, etc.) en las que resulta obligado el funcionamiento anaerobio del músculo blanco, y existe, por tanto, un requerimiento intenso de glucosa (151). Por otra parte, la existencia de diferencias interespecíficas evidentes,



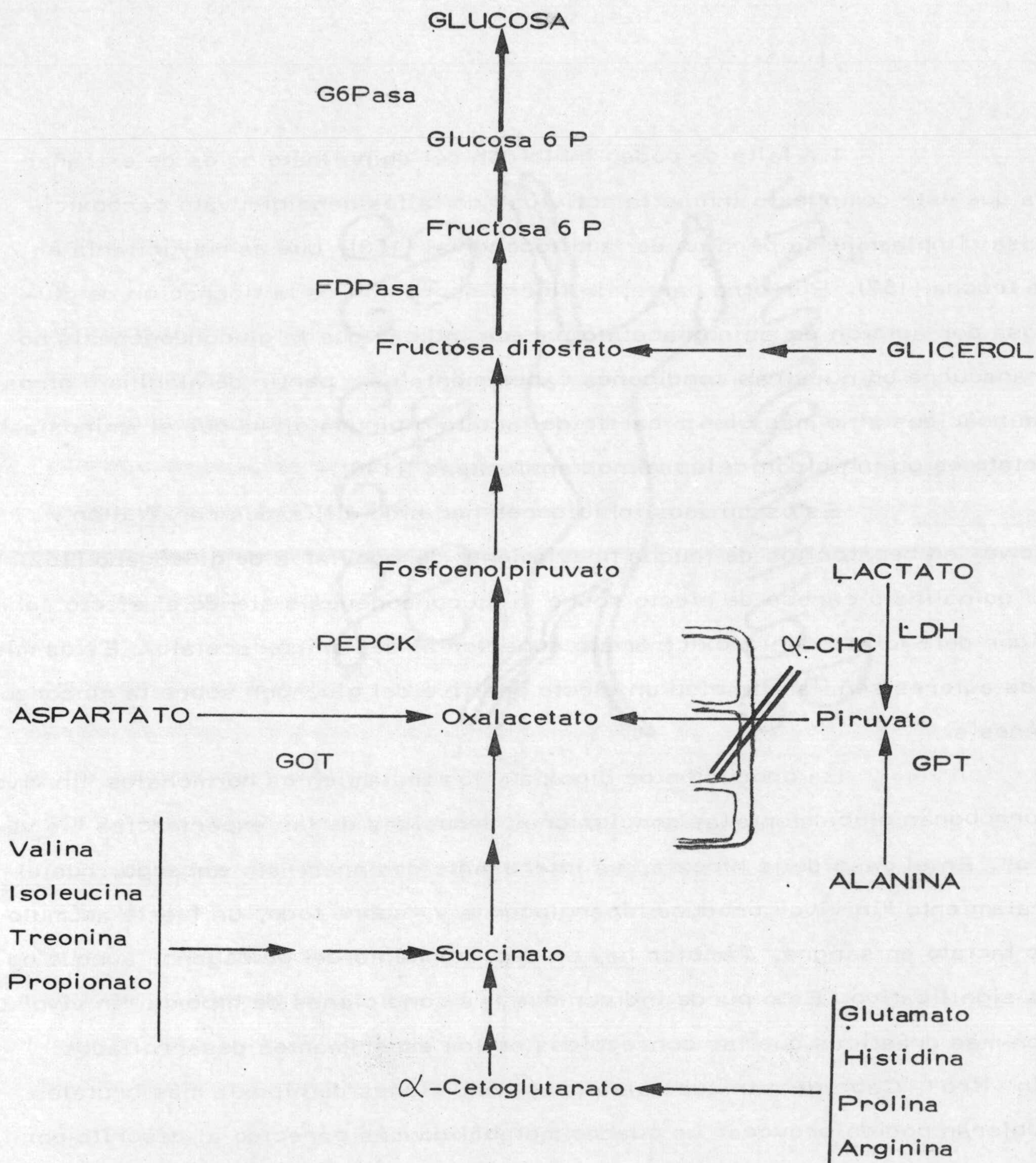
Principales vías metabólicas del metabolismo del glucógeno hepático en peces

que afectan incluso a las enzimas consideradas generalmente como fundamentales, hace aventurado extrapolar los datos obtenidos de unas especies a otras, a pesar de su proximidad en la escala filogenética.

Nuestros resultados indican que ninguno de los tratamientos provoca alteraciones significativas en el contenido de glucógeno hepático, tanto "in vitro" como "in vivo". Resulta claro, por tanto, que la liberación de glucosa por los cortes de tejido hepático al medio y la hiperglucemia que aparece en algunos de los tratamientos se debe a la gluconeogénesis. Esto parece señalar que la trucha se asemeja más a la carpa común (Cyprinus carpio) que al pez rojo (Carassius auratus) en lo que respecta a la regulación del metabolismo glucídico.

La aparición de glucosa en el medio de incubación es una constante en las experiencias "in vitro". No es modificada por la supresión del gaseo (hipoxia) ni por la adición de insulina y se incrementa al añadir glucagon, adrenalina y dibutiril AMP cíclico. Concentraciones similares de glucagon y AMP cíclico producen una intensa glucogenolisis en hepatocitos de Carassius auratus. Esta misma preparación responde de idéntica manera a cantidades muy inferiores de adrenalina a las utilizada por nosotros (165). Es fácil deducir que el hígado de Carassius auratus responde a los estímulos de carácter hiperglucemiante con una activación de la glucogenolisis, de modo semejante a los mamíferos, mientras que en la trucha existe una respuesta primaria de tipo gluconeogénico a partir de sustratos endógenos.

El carácter gluconeogénico de la liberación de glucosa al medio de incubación queda confirmado al disminuir dicha liberación por la adición de α -ciano 3-hidroxicinamato, ya que este compuesto es un inhibidor de la gluconeogénesis que bloquea el paso de piruvato a través de la membrana mitocondrial (149).



Incorporación de los principales precursores de glucosa a la vía gluconeogénica. G6Pasa: Glucosa 6 fosfatasa; FDPasa: Fructosa difosfatasa; PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinasa; GOT: Glutamato-oxalacetato aminotransferasa; GPT: Glutamato-piruvato aminotransferasa; LDH: Lactato deshidrogenasa; α -CHC: α -Ciano 3-hidroxicinamato.

La falta de poder inhibidor del quinolinato no es de extrañar ya que este compuesto inhibe la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa citoplasmática pero no de la mitocondrial (158), que es mayoritaria en la trucha (157). Por otra parte, la ligera supresión de la liberación de glucosa por adición de aminoxiacetato parece indicar que la gluconeogénesis no transcurre en nuestras condiciones experimentales a partir de alanina u otros aminoácidos sino más bien a partir de lactato o piruvato, ya que el aminoxiacetato es un inhibidor de las aminotransferasas (148).

Estos mismos inhibidores han sido utilizados por Walton y Cowey en hepatocitos de trucha previamente desprovistos de glucógeno (162). El quinolinato carece de efecto sobre la gluconeogénesis siendo el efecto inhibidor del α -ciano 3-hidroxicinamato superior al del aminoxiacetato. Estos mismos autores señalan también un efecto positivo del glucagón sobre la gluconeogénesis.

La producción de hipoxia y los tratamientos hormonales "in vivo" corroboran globalmente las conclusiones deducidas de las experiencias "in vitro". En el caso de la hipoxia, es interesante destacar, sin embargo, que el tratamiento "in vivo" produce hiperglucemia y, sobre todo, un fuerte acúmulo de lactato en sangre. También hay un decrecimiento del glucógeno, aunque no es significativo. Esto puede indicar que las condiciones de hipoxia "in vivo" son más drásticas que las conseguidas en los experimentos desarrollados "in vitro". Cabe pensar que quizá unas condiciones de hipoxia más brutales hubieran podido provocar un cuadro metabólico más parecido al descrito por Demaël-Suard para Tinca vulgaris (102).

También la insulina parece mostrarse más activa "in vivo", aunque no se altera el contenido en glucógeno hepático, hay una clara disminución de la glucemia por el tratamiento. Una dosis similar produce también

hipoglucemia en la trucha, de acuerdo con los datos aportados por Cowey y col (118).

Las acciones "in vivo" de adrenalina y glucagón son semejantes en cuanto a que no se modifica significativamente el contenido de glucógeno hepático y hay hiperglucemia. Sin embargo, la adrenalina produce mayor hiperglucemia y un aumento significativo del lactato sanguíneo. Esto último debe reflejar el estímulo de la glucólisis muscular, en concordancia con lo que ocurre en mamíferos. Es interesante recordar a este respecto que el músculo de la trucha contiene una fosforilasa, activable, al parecer, por AMP cíclico (168).

El tratamiento con AMP cíclico no difiere esencialmente de los tratamientos con adrenalina y glucagón, lo que sugiere que estas hormonas podrían actuar a través de su liberación tisular. Por lo que se refiere a la acción de la adrenalina a nivel hepático, la confirmación de esta hipótesis supondría una clara diferencia con respecto a la rata, en la que esta hormona parece actuar por un mecanismo α -adrenérgico con intervención del AMP cíclico, y un acercamiento a lo que sucede en otros peces, como Carassius auratus (165), y mamíferos carnívoros como el perro (172) o el gato (173), en los que la adrenalina actúa por vía β -adrenérgica.

La hiperglucemia provocada hormonalmente parece depender de la activación de la gluconeogénesis, tal como ocurriría con la liberación de glucosa por los cortes hepáticos. En efecto, la administración de α -ciano 3-hidroxicinamato bloquea la hiperglucemia provocada por la administración de AMP cíclico. Aunque el bloqueo solo es parcial, no hay cambios en el glucógeno hepático. Hay que recordar que el α -ciano 3-hidroxicinamato actúa impidiendo el transporte de piruvato a través de la barrera mitocondrial (149). Por ello, la posibilidad de síntesis de glucosa a través de precursor-

res que no necesitan su conversión en piruvato para su transformación en glucosa es muy grande en el animal entero. Por otra parte, parece que los animales poiquiloterms responden más lentamente que los mamíferos a la administración de tóxicos y fármacos (174, 175). Así Murat y col. no encuentran efecto inhibitor del ácido mercaptopicolínico sobre la hiperglucemia provocada por glucagon en Cyprinus carpio hasta cinco horas después de su administración (159).

En resumen, los resultados expuestos en la última parte de esta Memoria Doctoral indican claramente que el glucógeno hepático de la trucha no se altera en respuesta a los tratamientos hormonales ensayados, debiéndose la liberación de glucosa provocada por estos tratamientos a un aumento de la gluconeogénesis. Se corrobora, por tanto, la importancia de esta vía metabólica en esta especie, mientras que queda para un ulterior estudio el significado del almacenamiento del glúcogeno en el hígado.

VI. - CONCLUSIONES

VI. - CONCLUSIONES

1. - La dieta lipídica no afecta de manera claramente definida a las enzimas gluconeogénicas ensayadas en hígado y riñón de trucha, aunque parece existir una tendencia al descenso en la fructosa difosfatasa y glucosa 6 fosfatasa hepáticas. En todos los casos las enzimas renales exhiben una actividad menor que las de origen hepático.
2. - Existe un incremento generalizado en las actividades de las enzimas gluconeogénicas hepáticas y renales durante el segundo mes de ayuno, lo que parece indicar un mayor funcionamiento de la gluconeogénesis en este período.
3. - La evolución de la glucemia después de una comida normal con dieta rica en proteínas indica un intenso funcionamiento de la gluconeogénesis en el período postprandial y una carencia de mecanismos eficaces para normalizar la glucemia.
4. - La incubación de cortes hepáticos de trucha durante dos horas no modifica el contenido en glucógeno. La liberación de glucosa al medio en estas condiciones se debe fundamentalmente a la gluconeogénesis a partir de sustrato endógenos.
5. - La hipoxia no altera el contenido en glucógeno ni la velocidad de liberación de glucosa por los cortes hepáticos. Tampoco produce alteraciones la adición de insulina.

- 6.- La adición de adrenalina y glucagón aumenta la velocidad de producción de glucosa por los cortes hepáticos sin que se modifique su contenido en glucógeno. El mismo efecto tiene la adición de AMP cíclico, lo que sugiere que este nucleótido podría ser el mediador del efecto activante de ambas hormonas sobre la gluconeogénesis.
- 7.- La producción de hipoxia y los tratamientos hormonales "in vivo" corroboran globalmente las conclusiones deducidas de las experiencias "in vitro". En ningún caso hay efectos significativos sobre el contenido en glucógeno hepático, comportándose la adrenalina, el glucagón y el AMP cíclico como activadores de la gluconeogénesis.

VII. - BIBLIOGRAFIA

VII. - BIBLIOGRAFIA

- 1.- NAGAYAMA, F., OSHIMA, H. y UMEZAWA, K., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38, 589. (1972)
- 2.- Mc CARTNEY, T.H., Fish Res. Bull. 34, (1970)
- 3.- COWEY, C.B. col., Institute of Marine Biochemistry. Report for the period. 1 october 1971 31 March. (1973) Aberdeen
- 4.- COWEY, C. B., ADRON, J. W., BROWN, D. A. y SHANKS, A. M., Br. J. Nutr. 33, 219.(1975)
- 5.- SINGH, R. P. y NOSE, T., Bull. Freshwat. Fish.Res. Lab., Tokio 17, 21. (1967)
- 6.- INABA, D., OGINO, C., TAKAMATSU, C., VEDA, T. y KUROKAWA, K., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 32, 710 (1963)
- 7.- NAGAYAMA, F. y SAITO, Y., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 35, 1017. (1969)
- 8.- KAWAY, S. e IKEDA, S., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38, 265.(1972)
- 9.- PHILLIPS, A. M. y col., Fish. Res. Bull. 11. Cortland Hatchery Report. 16,(1948)
- 10.- PHILLIPS, A. M., LIVINGSTON, D. L. y POSTON, H. A., Fish. Res. Bull. 29 Cortland Hatchery Report 34, (1965).
- 11.- PHILLIPS, A. M., POSTON, H. A. y LIVINGSTON, D. L., Fish. Res. Bull. 30. Cortland Hatchery Report. 35,(1966)
- 12.- PHILLIPS, A. M., POSTON, H. A. y LIVINGSTON, D. L., Fish. Res. Bull. 31. Cortland Hatchery Report. 36, (1967).
- 13.- LARSON, A. y LEWANDER, K., Comp. Biochem. Physiol. 44A, 367. (1973).
- 14.- POSTON, H. A., Fish Res. Bull. 32, 14 Cortland Hatchery Report 37. (1968)



- 15.- COWEY, C. B., ADRON, J. W. y BRONW, D. A., Br. J. Nutr. 33, 219 (1975).
- 16.- LOVERN, J. A., Biochem. Soc. Sympos. 6, 49. (1951). Tomado del Handbook of Physiology. Sección 5. A dipose. Tissue, pag. 55
- 17.- PHILLIPS. A. M., "Fish. Physiology," Academic Press, New York (1969), pag. 391.
- 18.- KITAMIKADO, M. y TACHINO, S., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 28, 679 (1960)
- 19.- BROCKERHOFF, J. H., J. Fish. Res. Bd. Can. 23, 1835. (1966)
- 20.- LEGER, C., BERGOT, P., FLANZY, J. y FRANCOIS, A., C. Compt. Rend. Seances. Acad. Sci. 270D, 2813. (1970)
- 21.- LEGER, C. y BAUCHART, D., Compt. Rend. Seances. Acad. Sci., 275D, 2419. (1972)
- 22.- LEGER, C., BAUCHART, D. y FLANZ, J., Comp. Biochem. Physiol. 57, 359. (1977)
- 23.- CHEPIK, L., Biol. Abstr., 47, 60747. (1966)
- 24.- NOSE, T. y MAMIYA, H., Biol. Chem. 12, 1. (1963)
- 25.- NOSE, T. y TOYAMA, K., Biol. Chem. 15, 213.(1966)
- 26.- GREENE, C. W., U. S. Bur. Fish. Bull. 33, 149. (1963)
- 27.- BERGOT, P. y FLECHON, J. E., Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 10, 459. (1970)
- 28.- NOAILLAC-DEPEYRE, J. y GAS, N., Cell. Tissue. Res. 155, 353. (1974).
- 29.- ROBINSON, J. S. y MEAD, J. F., Can. J. Biochem. 51, 1050. (1973)
- 30.- KAYAMA, M. e IJIMA, N., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 42, 987. (1976)
- 31.- BILINSKI, E., Can. J. Biochem. Physiol., 41, 107.(1973)

32. - BILINSKI, E. y JONAS, R. E. E., *Can. J. Biochem. Physiol.* 42, 345. (1964).
33. - NORUM, K. R. y BREMER, J., *Comp. Biochem. Physiol.* 19, 483. (1966).
34. - HOCHACHKA, P. W., *Comp. Biochem. Physiol.*, 25, 107. (1968)
35. - HOLUB, B. J., CONNOR, J. T. H. y SLINGER, S. J., *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32, 61. (1975)
36. - LIN, H., RONSOS, D. R., TACK, P. I. y CEDERQUIST, D., *Fed. Proc.*, 35 A, 1167 (1976)
37. - LIN, H., RONSOS, D. R., TACK, P. I. y LEVEILLE, G. A., *J. Nutr.*, 107, 846. (1977).
38. - KENYON, W. A., *U. S. Bur. Fish. Bull.*, 41, 181. (1925) (Citado por PHILLIPS, A. M. en "Fish. Physiology" Academic Press. New York. 1969. pag. 391).
39. - NORRIS, E. R. y ELAN, D. W., *J. Biol. Chem.*, 134, 443 (1940)
40. - KITAMIKADO, M. y TACHINO, S., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 26, 685. (1960).
41. - CROSTON, C. B., *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 202. (1960)
42. - ONISHI, T y MURAYAMA, S., *Bull. Tokay. Reg. Fish. Res. Lab.*, 59, 111. (1969)
43. - ONISHI, T. y MURAYAMA, S., *Bull. Tokay. Reg. Fish. Res. Lab.*, 63, 123. (1970)
44. - KASHIWADA, K., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 18, 151. (1952)
45. - CHEPIK, L., *Biol. Abstr.* 47, 60747. (1966)
46. - BOGE, G., RIGAL, A. y PERES, G., *Cah. Lab. Hydrobiol. Monterau* 3, 15. (1976)
47. - BOGE, G., RIGAL, A. y PERES, G., *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 17, 637. (1977).

48. - INGHAM, L. y ARME, C., J. Comp. Physiol., 117, 323. (1977)
49. - MEPHAM, T. B. y SMITH, M. V., J. Physiol., 184, 673. (1966)
50. - ROUT, W. R., LIN, D. S. T., HUANG, K. C., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 953. (1965).
51. - Mc BEAN, R. L., NEPPEL, M. J. y GOLSTEIN, L., Comp. Biochem. Physiol. 18, 909. (1966).
52. - PEQUIN, L. y SERFATY, A., Comp. Biochem. Physiol. 10, 69 (1963)
53. - SMITH, H. W., J. Biol. Chem. 81, 727. (1929)
54. - JANSSEN, P. A., Comp. Biochem. Physiol. 11, 105. (1964)
55. - FORSTER, R. P. y GOLSTEIN, L., "Fish Physiology" Academic. Press. New York. 1969, pag. 313.
56. - GOLSTEIN, L., FORSTER, R. P. y FANELLI, G. M., Comp. Biochem. Physiol., 12, 489. (1964)
57. - PEQUIN, L. y SERFATY, A., Comp. Biochem. Physiol. 10, 315. (1963).
58. - VELLAS, F. y SERFATY, A., J. Physiol., Paris, 68, 245. (1974)
59. - VELLAS, F. y SERFATY, A., J. Physiol. Paris, 68, 591. (1974)
60. - WALTON, M. J. y COWEY, C. B., Comp. Biochem. Physiol. 57, 143. (1977).
61. - GOLSTEIN, L. y FORSTER, R. P., Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism. 2, Acad. Press. New. York. (1970) pag. 495.
62. - PHILLIPS, A. M., TUNISON, A. V. y BROCKWAY, D. R., Fish. Res. Bull. New York. 11, (1948)
63. - FALKMER, S., Acta. Endocri. Copenh. Suppl. 59, 122. (1961)
64. - GRANT, W. C., American Zoologist. 4, 325. (1964)
65. - HARMANT, F. A., LEWIS, L. A., BROWNELL, K. A., ANGERER, C. A. y SHELDEN, F. F., Physiol. Zool. 17, 228. (1944)

- 66.- JOPLIN, G. F. y WRIGHT, A. D., Metabolism. and its Disorders. 2,
1. New York and London: Academic Press (1968).
- 67.- PALMER, T. N., RYMAN-BRENDA, E. , J. Fish. Biol. 4, 311. (1972).
- 68.- KOHLER, E. y LIPPMAN, G. H., Acta Biol. Med. Germ. 11, 866. (1963)
- 69.- ASHMORE, J. y WEBER, G., Carbohidrate Metabolism. and its Disorders
1, 335. New York and London: Academic Press. (1968).
- 70.- NARAHARA, H. T. y CORI, C. F., Carbohidrate Metabolism. and its
Disorders. 1, 375. New York and London: Academic Press. (1968).
- 71.- Mc LEAN, P., BROWN, J. y GREENBAUM, A.L., Carbohidrate Metabo-
lism. and its Disorders. 1, 397. New York and London: Academic Press
(1968).
- 72.- RANDLE, P. J., Diabetologia. 2, 337, (1966)
- 73.- MURAT, J. C. y SERFATY, A., C. R. Soc. Biol. 169, 228. (1975)
- 74.- INCE, B. W., THORPE, A., Gen. Comp. Endocrinol. 33, (4), 453.
(1977).
- 75.- GREACH, Y. y SERFATY, A., J. Physiol. Paris. 68, 245. (1974)
- 76.- DENTON, J. E. y YOUSEF, M. K., J. Fish. Biol. 8, 489. (1976)
- 77.- LIN, H., RONSOS, D. R., TACK, P. I. y LEVEILLE, G. A., J.
Nutri. 107, 1477.(1977).
- 78.- SORVACHEV, C. F., Biokhimiya, 22, 872. (1957)
- 79.- NAGAI, M. e IKEDA, S., Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 37, 404. (1971)
- 80.- BOUCHE, G. y VELLAS, F., Comp. Biochem. Physiol. 51, 185. (1975)
- 81.- CREACH, Y. y BOUCHE, G., Rech. Hydrobiol. Cont., 1, 51. (1969)
- 82.- SORVACHEV, C. F., Zool. Zh. S.S.R.R. 36, 737. (1957).
- 83.- LARSON, A. y LEWANDER, K., Comp. Biochem. Physiol. 44, 367. (1973)

84. - CHAN, V. M. e ILDER, D. R., *Can. J. Biochem. Physiol.* 38, 553. (1960).
85. - NAGAI, M. e IKEDA, S., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 37, 404. (1971)
86. - WITTENBERGER, C. y VITCA, E., *Ser. Biol. Roum.* 11, 117. (1966)
87. - STIMPSON, J. H., *Comp. Biochem. Physiol.* 15, 187. (1965)
88. - HANKE, W. y NEUMANN, V. *Gen. Comp. Endocr.* 3, 198. (1972)
89. - FISTER, V., LUTKIC, A. y ROSA, J., *Physiol. Pharmacol. Acta.* 6, 113. (1970)
90. - NAGAI, M. e IKEDA, S., *Bull. Jap. Soc. Fish.* 38, 137. (1972)
91. - GAS, N., *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris.* 275, 1403. (1972)
92. - CREACH, Y. y SERFATY, A., *J. Physiol. Paris*, 68, 245. (1974)
93. - NAGAYAMA, F., OSHIMA, H., UMEZAWA, K. y KAIMO, M., *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 38, 595. (1972)
94. - CHAVIN, W. y YOUNG, J. E., *Comp. Biochem. Physiol.* 33, 629. (1970)
95. - HOUSTON, A. H., MADDEN, J. A., WOODS, R. J. y MILES, H. M., *J. Fish. Res. Bd. Can.* 28, 625. (1971)
96. - UMMINGER, B. L., *Comp. Biochem. Physiol.* 44A, 967. (1972)
97. - SLICHER, A. M., PICKFORD, G. E. y PANG, P. K. T., *Progue. Fish. Cult.* 28, 216. (1966)
98. - RUSH, S. B. y UMMINGER, B. L., *Comp. Biochem. Physiol.* 60A, 69. (1978).
99. - BAUM, D. y PORTE, D., *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.*, 29, 991. (1969).
100. - MALAISSE, W. J., MALAISSE-LANGE, F., WRIGHT, P. H. y ASHMORE, Y., *Endocrinol.* 80, 975. (1967)

- 101.- LEIVESTAD, H., ANDERSEN, H., SCHOLANDER, P. F., Science. 126, 505. (1957)
- 102.- DEMAEL-SUARD, A., C. R. Soc. Biol. 166, 394. (1972).
- 103.- MAZEAUD, M., C. R. Soc. Biol. 158, 2018. (1964)
- 104.- CHUJKO, V. A., Zh. Evol. Biokhim. Fisiol. S.S.R.R. 6, 396. (1970)
- 105.- MIALHE, P., SUTTER, B. Ch. J. y MEYER, V., Diabetologia, 1, 63. (1965).
- 106.- WALKER, R. M., JOHANSEN, P. H., J. Zool. 55, 1304. (1977)
- 107.- THILLART, G., VAN DEN, KESBEBE, F., WAARDE, A. VAN., Comp. Biochem. Physiol. 55, 329. (1976)
- 108.- LOVE, R. M., Academic Press., Inc. New York (1974).
- 109.- BILINSKI, E., Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology. New York: Academic Press. 1, 247, (1974)
- 110.- STEVENS, E. D. y BLACK, E. C., J. Fisheries Res. Board. Can. 23, 471. (1966).
- 111.- DRIEZIC, W. R. y HOCHACHKA, P. W., American Journal of Physiology 230, 579 (1976).
- 112.- JONES, N. R. y MURRAY, J., J. Exptl. Biol. 55, 541. (1971)
- 113.- DRIEZIC, W. R. y KICENIUK, J. V., J. Fish. Res. Board. 33, 173. (1976).
- 114.- BONE, Q., J. Mar. Biol. Assoc. V. K. 46, 321. (1966)
- 115.- BILINSKI, E. y JONAS, R. E. E., J. Fish. Res. Board. 29, 1467. (1972).
- 116.- THABREW, J. I., P. C. POAT y K. A. MUNDAY., Comp. Biochem. Physiol. 40B, 531. (1971)
- 117.- SPANNHOF, L., Vopr. Ikhtiol. 16(1), 178. (1976)

- 118.- COWEY, C. B., de la HIGUERA, M. y ADRON, J. W., Br. J. Nutr. 38, 385. (1977)
- 119.- TASHIMA, L. y CAHILL, G.F., Gen. Comp. Endocrinol. 11, 262. (1968).
- 120.- COWEY, C. B. KNOX, D., WALTON, M. J. y ADRON, J. W., Br. J. Nutr. 38, 463. (1977).
- 121.- JURSS, K. y NICOLAI, B., Zool. J. Physiol. Bd. 80, 101. (1976).
- 122.- SHIBATA, N., KINUMAKI, T., ICHIMURA, H., Bull. Tokay. Reg. Fish. Res. Lab., 77, 77. (1974)
- 123.- SHERSTNEVA, T. A., Izv. Gos. Nauch. Issled. Inst. Ozer. Rechn. Ryb. Khoz. 75, 136. (1971)
- 124.- PHILLIPS, J. W. y HIRD, F. J. R., Comp. Biochem. Physiol. 57B, 127. (1977).
- 125.- GARCIA-GALLEGO, M., Tesis Doctoral. Univ. Granada. (1979)
- 126.- KREBS, H. A., BENNET, G. A. H., GASQUET, P., GASCOINE, F. y YOSHIDA, T., Biochem. 86. 22. (1963)
- 127.- KREBS, H. A. y HENSELEIT, K. Hoppe-Seyl, 2, 210, 33. (1932)
- 128.- BERGMAYER, H. V. "Methods of Enzimatic Analisis" (Academic Press. New York, London) 788 (1965).
- 129.- KEPPLER, D. y DECKER, K. "Methods of Enzimatic Analisis" (Academic Press, New York, London) 3, 1125. (1974).
- 130.- HARPER, A. E. "Methods of Enzimatic Analisis" (Academic Press, New York, London) 788. (1965).
- 131.- FISKE, C. H. y SUBARROW, T., J. Biol. Chem., 66, 375 (1925)
- 132.- BERGMAYER, H. V. "Methods of Enzimatic Analisis" (Academic Press, New York, London) (1965).

- 133.- MENDICINO, J., OLIVER, R. M. y KRATOWICH, N., J. Biol. Chem. 247, 6643. (1972)
- 134.- BALLARD, F. J. y HANSON, R. W., J. Biol. Chem. 244, 5625. (1969).
- 135.- CHANG, H. C. y LANE, M. D., J. Biol. Chem. 241, 2413 (1966)
- 136.- BERGMEYER, H. V., "Methods of Enzymatic Analisis" (Academic Press, New York, London) 837. (1963)
- 137.- BERGMEYER, H. V., "Methods of Enzimatic Analisis" (Academic Press. New York, London) 846 (1965).
- 138.- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 139.- HOHORST, L. L., KREUTZ y BUCHER, Th., Biochem. Z. 332, 18 (1959).
- 140.- WILLIANSON, D. H., MELLANBY, J., "Methods of Enzymatic Analisis" (Academic Press, New York, London) 1837. (1974).
- 141.- KUN, E., KEARNEY, E. B., "Methods of Enzymatic Analisis" (Academic Press, New York, London) 1802. (1974).
- 142.- COWEY, C. B., Proc. Nutr. Soc. 34, 57. (1975)
- 143.- De la HIGUERA, M. Tesis Doctoral Univ. Granada. (1974)
- 144.- HIGHASI, H., KANEKO, T., ISHII, S., USHIYAMA, M. y SUGIHASHI, T., J. Vitaminol., 12, 74. (1966)
- 145.- PHILLIPS, A. M., LIVINGSTON, D. L. y POSTON, H. A., Fish. Res. Bull., 28, 11. (1965)
- 146.- STEFFENS, W. y ALBRECHT, M. L., Arch. Tierern. , 25, 717 (1975).

- 147.- VENEZIALE, C. M., WALTER, P., KNEER, N. y LARDY, H. A.
Biochemistry 6, 2129.(1967)
- 148.- HOTTA, S. S., Archs. Biochem. Biophys. , 127, 132. (1968)
- 149.- HALESTRAP, A. P. y DENTON, R. M., Biochem. J., 138, 313
(1974).
- 150.- EXTON, J. H., Metabolism., 21, 945. (1972)
- 151.- DRIEDZIC, W. R. y HOCHACHKA, P. W., "Fish Physiology", edited
by W. S. HOAR and D. J. RANDALL. New York. Academic, Vol. 7,
(1976).
- 152.- LOVE, R. M., New York, Academic.1. (1970)
- 153.- THORPE, A. e INCE, B. W. , Gen. Comp. Endocrinol. 30, 332.
(1976).
- 154.- BEAMISH, F. W. H., Trans. Am. Fisheries Soc. 93, 127. (1964)
- 155.- INUI, Y. y OHSHIMA, Y., Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 32, 492.
(1966).
- 156.- BILINSKI, E. y GARDNER, L. J., J. Fisheries. Res. Board. Can.
25, 1555. (1968)
- 157.- PHILLIPS, J. W. y HIRD, F. J., Comp. Biochem. Physiol. 57, 133.
(1977).
- 158.- SOLING, H. D. y KLEINEKE, J., en "Gluconeogenesis. Its regulation
in mammalian species" editado por HANSON, R. W. y MEHLMAN, M. A.,
p. 369. John Wiley, New York, (1976).
- 159.- MURAT, J. C., CASTILLA, C. y PARIS, H., Gen. Comp. Endocrinol.
34, 243. (1978).
- 160.- EPPLE, A. en "Fish Physiology", editado por HOAR, W. S. y RANDALL
D. J., p. 275. Academic Press, New York (1969).

- 161.- JOUNG, J. E. y CHAVIN, W., Am. Zoologist. 5, 688. (1965)
- 162.- WALTON, M. J. y COWEY, C. B., Comp. Biochem. Physiol. 62B, 75. (1979).
- 163.- HAYASHI, S. y OOSHIRO, Z., Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries, 41, 201. (1975)
- 164.- BENZIGER, D. P., Ph. D. Thesis University of Cincinnati (1974). citado en 98.
- 165.- BIRNBAUM, M. J., SCHULTZ, J. y FAIN, J. N., American Journal of Physiology 231(1), 191. (1976)
- 166.- MURAT, J. C., Comp. Biochem. Physiol., 55B, 461. (1976)
- 167.- MURAT, J. C. y PLISETSKAYA, E. M., C. R. Seanc. Soc. Biol. 171(6), 1302. (1977).
- 168.- NAKANO, J. y TOMLINSON, N., J. Fish Res. Bd. Can. 24, 1701. (1967).
- 169.- SCHRECK, C. B., WHALEY, R. A., BOSS, N. L., NAUGHAN, O. E. y SOLAZZI, N., J. Fish. Res. Bd. Can. 33, 76. (1976)
- 170.- UMMINGER, B. L., BENZIGER, D. y LEVY, S. J., Comp. Biochem. Physiol. 51C, 111. (1975)
- 171.- FOSTER, D. O., RAY, P. D. y LARDY, H. A., Biochemistry. 5, 555. (1966).
- 172.- MAYER, S. N., MORAN, C. y FAIN, J. N., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 134, 18. (1961)
- 173.- ELLIS, S., KENNEDY, B. L., EUSEBI, A. J. y VINCENT, N. H. Ann. N. Y. Acad. Sci. 139, 826. (1967).

174. - LEIBSON, L. G. y PLISETSKAYA, E. M., en "International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics" (ed. Michelson, M. J.) 85, pag. 625. Pergamon Press, Oxford. (1973).
175. - NARBONNE, J. F., GIRE, M. P., MURAT, J. C. y SERFATY, A. Eur. J. Toxicol. 8, 159. (1975).