



Alanina aminotransferasa en *Sparus aurata*: control de la expresión génica mediante RNAi y de la actividad enzimática por aminoácido

Juan Diego González García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)

**Alanina aminotransferasa en *Sparus aurata*:
control de la expresión génica mediante RNAi y
de la actividad enzimática por aminooxiacetato**

Juan Diego González García

2012



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR (FARMÀCIA)

PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOTECNOLOGIA

BIENNI 2005-2007

**Alanina aminotransferasa en *Sparus aurata*: control de la
expresión génica mediante RNAi y de la actividad
enzimática por aminoxiacetato**

Memoria presentada por Juan Diego González García para obtener el título de doctor por la
Universitat de Barcelona

Directors:

Autor:

Isabel Vázquez Baanante

Isidoro Metón Teijeiro

Juan Diego González García

Juan Diego González García

2012

*“Nothing can stop the man with the right mental attitude from achieving his goal;
nothing on earth can help the man with the wrong mental attitude.”*

Thomas Jefferson

AGRADECIMIENTOS

Finalmente el momento ha llegado, la tan ansiada defensa de la tesis... Ha sido un viaje largo pero con muchas sorpresas que han surgido al recorrerlo.

Al realizar este viaje he crecido mucho a nivel personal, ya que he tenido que forjar el carácter, aprender a tener templanza por los experimentos, que éstos dan tristezas y alguna que otra alegría. A nivel técnico uno está obligado a dominar todas las técnicas que son necesarias para llegar a los resultados tan ansiados y es un deber si se quiere alcanzar el grado de doctor. Sin embargo hay variables ajenas a la de los experimentos que uno en verdad no tiene ningún control, estas variables son las personas. En este viaje conocí grandes personas a las cuales agradeceré a continuación.

Quiero empezar agradeciendo a mi familia, especialmente a mis padres, hermano, abuelas, tíos y tías, primos y amigos incondicionales porque siempre han estado ahí para apoyarme y ayudarme en los tiempos difíciles. A mi familia política que siempre me bancaron durante todas las etapas y una mención especial a la persona que ha estado a mi lado durante esta etapa y otras etapas duras, sí a vos Mariela.

Sigo por mis directores de tesis, Maribel e Isidoro que confiaron en un argentino que no habían visto ni en foto. Maribel me integró en su laboratorio y me ayudó a que yo mismo lo sintiera como mi segundo hogar, asesorándome en los aspectos técnicos y también en muchos consejos que los aplico a la vida cotidiana. Por otra parte también agradezco a Isidoro por haberme ayudado en los primeros días de papeleos y a lo largo de la tesis con su conocimiento y apoyo. Felipe fue también una persona muy importante en esta tesis por su dedicación y conocimientos sobre las doradas.

A mis excelentes compañeros de laboratorio los echo de menos. Hemos pasado muchos momentos excelentes, risas y tristezas. Mari, sos una persona maravillosa, desinteresada, alegre, un poquitín despistada y sobre todo una gran amiga, siempre le has dado vida al laboratorio y también palabras raras como aldaleado, acituna, etc. Miriam, otra gran persona, siempre dispuesta a ayudar a los demás y siempre te voy a recordar por tus gestos para que me integre al laboratorio. Con Ginny hemos pasado buenos momentos tanto en el laboratorio como compañera de piso por unos meses. Marina, Freak!! Frog ella diría, una caja de sorpresas, desde sus muñequitas hasta su conocimiento de japonés, pero ante todo muy divertida y gracias por soportar mis bromas, que ya por eso, te has ganado el cielo. I-VAN, eh eh eh blandito.... sabes que siempre estarás en Portugal o en cualquier lugar del mundo que vos decidas estar, pero sabes una cosa?, sha va a volver.. Siempre has sido muy

atento con todas las personas con las que te has rodeado y ayudado a todo el mundo, en verdad sos una persona especial ay, si eu te pego.. Albert, una persona extremadamente buena, ojo muy bueno, no como mi amigo Sebastián Real que es buenudo!. A mi amigo Diego K. que compartimos una sucesión de asados y buenos momentos en el ámbito científico y personal. Vittorio, Don Corleone!, un gran personaje, empezó siendo una persona muy reservada pero después de un tiempo se transformo en una bestia salvaje ... Fabio, una gran persona, otro de los italianos que como Vittorio le dieron un toque “tano” al laboratorio. A las chicas que han pasado por lab haciendo trabajo práctico o máster: Loly, Anna Palau, Anna Aguilar, Judith del Castillo, Ana, María José, Judith y Andreia. Judith, gracias por compartir cafés y charlas de laboratorio! Andreia, la alegría personificada, con sus pasarinho, los champiñones... y piri piri nos dio una versión portuguesa de la alegría!!.

A todas las personas del departamento en general, ha sido un gusto pasar tiempo con ustedes!!!.

A la gente de plantas (nuestros vecinos), Vero, Marta, Toni, Benjamín, Pahissa, Massimo, Dani, Oriol, Paola, David! Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado. Tony, el mallorquín, una persona muy culta y con la que hemos pasado muy buenos momentos al igual que con todas las personas del laboratorio. A los Colis, Elaine, la garota mas energética y graciosa del laboratorio, Fernando, Eva, Rafa, Laura, Carla, mi compañera de sushi, Lorena, shuuuta po!! A las Ciudad!, Alicia, Cris, la cubanita con la que hemos pasado muchos bueno momentos, Eli, que buena la barbacoa por tu pueblo, Carlota y sus cockteles, Xènia, Núria, sos especiales! A Tauler, Lilia, Sebas, sos un fierro, Basu, Natalie! A Fausto, Chandru aka Shiva, Pepe, Paula, Kamil, y Laura. P&D lab, Xisca, Núria, Juana, Cris, Ana, Mariona, Mar, Ana Lu, Elena, Cédric, ha sido un gusto compartir tiempo con ustedes!

A la Dra. Montserrat Miñarro del Dept. de Farmacia y Tecnologia Farmaceutica de la Facultat de Farmacia de la UB por haber colaborado en la producción de nanopartículas de quitosán-vector. Al personal de administración del departamento merecen una mencion especial, Mari Carmen, Brugués, Tina y Montse, por ayudarnos siempre con la burocracia, los pedidos, los tramites. Gracias a los técnicos, Silvia, Andrés y a Quim, que se ha esforzado un montón para aprender todo de forma continua, Gracias también a todos los profesores del departamento, Albert Ferrer, Montse, Diego Haro, Pedro Marrero, Juan Carlos, Pepita, Laura Baldomà, Rosa, Albert Tauler, Fausto, Guillermina, Dolors, Laura Herrero.

En general ha sido un camino digno de realizarlo y a pesar de las adversidades uno siempre encuentra a personas que hacen que sea una experiencia única.

Juan Diego González García

ABREVIATURAS

6PGDH	6-fosto-Gluconato deshidrogenasa
ADP	adenosina difosfato
ALT	alanina aminotransferasa
AMP	adenosina monofosfato
AMPK	proteína quinasa activada por AMP
AOA	aminooxiacetato
ATP	adenosina trifosfato
cALT	alanina aminotransferasa citosólica
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	citomegalovirus
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>
ddNTP	didesoxinucleotido trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	<i>desoxiribonucleic acid</i>
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiamina tetra acetato
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FBPasa	fructosa-1,6-bifosfatasa
Foxo	<i>forkhead box</i>
fru-2,6P ₂	fructosa-2,6-bifosfato
G6Pasa	glucosa-6-fosfatasa
G6PDH	Glucosa-6-fostato deshidrogenasa
GDH	glutamato deshidrogenasa
GK	glucoquinasa
GLUT	transportador de glucosa
GRIP-1	<i>glutamate receptor-interacting protein 1</i>
HDL	lipoproteínas de alta densidad
Hepes	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etansulfato
HNF	factor nuclear hepatocitario
HPRT	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>

IRS	substrato del receptor de la insulina
KLF	<i>Krüppel-like factors</i>
K_m	constante de Michaelis-Menten
LB	medio de cultivo Luria-Bertrani
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LPS	lipopolisacárido
mALT	alanina aminotransferasa mitocondrial
miRNA	microRNA
MODY	<i>maturity-onset diabetes of the young</i>
MOPS	ácido 3-[<i>N</i> -morfolino] propansulfónico
MOS	morfolinos
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEPCK	fosfoenol piruvato carboxiquinasa
PFK	6-fosfofructo-1-quinasa
PFKFB	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa
PK	piruvato quinasa
PL	vitamina B ₆
PLP	piridoxal-5-fosfato
PMP	fosfato de piridoxamina
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoruro
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
qPCR	PCR cuantitativa
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
RT	transcriptasa inversa o retrotranscriptasa
SBL	<i>sea bass larvae</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-	
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
siRNA	small interfering RNA
Sp	<i>specific protein</i>
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
Stat	<i>signal transducers and activators of transcription</i>

STZ	estreptozotocina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletilendiamina
TFIIB	<i>transcription factor</i> II B
TOR	<i>target of rapamycin</i>
V_{\max}	velocidad máxima de reacción
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN LOS PECES CARNÍVOROS	3
1.2 REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA GLUCÓLISIS Y GLUCONEOGÉNESIS EN PECES	7
1.3 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES.....	10
1.3.1 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE AMINOÁCIDOS	11
1.3.1.1 CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN HÍGADO	12
1.3.1.2 GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA A PARTIR DE AMINOÁCIDOS.....	13
1.3.2 TRANSAMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS: ORIGEN DE LA EXCRECIÓN DE AMONIO	15
1.4 ALANINA AMINOTRANSFERASA.....	16
1.4.1 PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA ALT	19
1.4.2 REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA ACTIVIDAD ALT	20
1.4.3 CARACTERIZACIÓN DEL GEN ALT	21
1.4.4.1 ALT COMO MARCADOR DE LESIONES HEPÁTICAS.....	24
1.4.4.2 ALT COMO MARCADOR DE LESIONES CORONARIAS.....	25
1.4.4.3 ALT COMO MARCADOR DE DIABETES TIPO 2	25
1.5 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA	25
1.5.1 SILENCIACIÓN GÉNICA.....	27
1.5.2 SILENCIACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL.....	28
1.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y DE LA ACTIVIDAD ALT	32
1.6.1 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ALT POR AMINOOXIACETATO.....	32
1.7 INTRODUCCIÓN DE DNA EXÓGENO EN CÉLULAS EUCARIOTAS.....	33
1.8 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	36
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIALES y MÉTODOS	43
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	45
3.2 MANIPULACIÓN DE LOS PECES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	45
3.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS HEPÁTICOS	46
3.3 ANTICUERPOS.....	48
3.4 PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN EN EUCARIOTAS Y VECTORES REPORTEROS.....	48
3.5 INHIBIDORES DE mRNA.....	49

3.5.1	SHORT INTERFERENCE RNA (siRNA).....	49
3.5.2	SHORT HAIRPIN RNA (shRNA)	49
3.6	OLIGONUCLEOTIDOS.....	50
3.7	CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS Y TRANSFORMACIÓN.....	50
3.7.1	CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> UTILIZADAS.....	50
3.7.2	OBTENCIÓN DE CÉLULAS <i>ESCHERICHIA COLI</i> COMPETENTES	51
3.7.3	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS <i>E. COLI</i> COMPETENTES.....	52
3.7.3.1	PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR SHOCK TÉRMICO.	52
3.8	CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS Y TRANSFECCIÓN	54
3.8.1	CONDICIONES Y TÉCNICAS	54
3.8.2	LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS	54
3.8.3	MEDIOS Y REACTIVOS	54
3.8.4	INICIO DEL CULTIVO CELULAR.....	55
3.8.5	MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES	55
3.8.6	ALMACENAJE DE CÉLULAS.....	56
3.8.7	TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS.....	57
3.8.8	TRANSFECCIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DEL FOSFATO CÁLCICO	57
3.8.9	TRANSFECCIÓN FACILITADA POR COMPLEJOS LIPÍDICOS.....	59
3.8.9.1	ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE LOS siRNA.....	59
3.9	TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	60
3.9.1	ELECTROFORESIS DE DNA	60
3.9.2	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	61
3.9.3	PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN SUSPENSIÓN	62
3.9.4	RT-PCR	63
3.9.5	REAL-TIME PCR (qPCR)	64
3.9.6	DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y PURIFICACIÓN DE DNA.....	66
3.9.7	PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	66
3.9.8	LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA	66
3.9.9	OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	67
3.9.10	SECUENCIACIÓN DEL DNA.....	67
3.9.11	AISLAMIENTO DE RNA.....	68
3.9.12	ELECTROFORESIS DE RNA.....	68
3.9.12.1	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	68
3.9.12.2	PREPARACIÓN DEL GEL	69

3.10	TÉCNICA DE WESTERN BLOT	69
3.10.1	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	69
3.10.2	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA: MÉTODO DE BRADFORD	70
3.10.3	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	70
3.10.3.1	PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (PAGE-SDS)	70
3.10.3.2	PROCESO DE ELECTROFORESIS	71
3.10.4	TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA	73
3.10.5	TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON AZUL DE COOMASSIE.....	74
3.10.6	INMUNODETECCIÓN	74
3.11	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y METABOLITOS	75
3.11.1	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	75
3.11.1.1	DETERMINACIÓN DE ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT)	75
3.11.1.2	DETERMINACIÓN DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST)	76
3.11.1.3	DETERMINACIÓN DE GLUCOQUINASA (GK)	77
3.11.1.4	DETERMINACIÓN DE 6-FOSFO-GLUCONATO DESHIDROGESANA (6PGDH)...	79
3.11.1.5	DETERMINACIÓN DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH)	80
3.11.1.6	DETERMINACIÓN DE FRUCTOSA 1-6 BIFOSFATASA (FBPasa).....	81
3.11.1.7	DETERMINACIÓN DE FOSFOFRUCTOQUINASA (PFK1)	82
3.11.1.8	DETERMINACIÓN DE PK.....	83
3.11.2	DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.....	84
3.12	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	85
3.13	TRATAMIENTOS A LOS QUE FUERON SOMETIDOS LOS PECES	86
3.13.1	TRATAMIENTO CON COMPUESTOS ORGÁNICOS INHIBIDORES DE ALT.....	86
3.13.1.1	PREPARACIÓN DE AMINOOXIACETATO	86
3.13.1.2	PREPARACIÓN E INCORPORACIÓN DE AMINOOXIACETATO EN LA DIETA	86
3.13.2	PREPARACIÓN DE COMPLEJOS shRNA-QUITOSÁN PARA INYECCIÓN INTRAPERITONEAL	87
3.14	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	88
4	RESULTADOS.....	89
4.1	EXPRESIÓN DE cALT1, cALT2 Y mALT de <i>S. AURATA</i> EN CÉLULAS HEK293	91
4.1.1	OBTENCIÓN DE LOS VECTORES pcDNA3-cALT1, pcDNA3-cALT2 y pcDNA3-mALT ..	91
4.1.2	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ALT TRAS LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS cALT1, cALT2 Y mALT DE <i>S. AURATA</i> , EN CÉLULAS HEK293.....	91

4.2	SILENCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS cALT1, cALT2 Y mALT DE <i>S. AURATA</i> MEDIANTE RNAi <i>IN VITRO</i>	93
4.3	EXPRESIÓN DEL VECTOR pCpG-siRNA EN HÍGADO DE <i>S. aurata</i>	102
4.4	SILENCIACIÓN DE LA ALT DE <i>S. AURATA IN VIVO</i>	103
4.4.1	SILENCIACIÓN DE LAS ISOFORMAS cALT de <i>S. AURATA, IN VIVO</i>	103
4.4.2	EFFECTO DE LA SILENCIACIÓN DE ALT E SOBRE LA ACTIVIDAD ALT EN HÍGADO DE <i>S. AURATA</i>	106
4.5	INHIBICIÓN POSTRADUCCIONAL DE LAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS Y MITOCONDRIAL DE ALT DE <i>S. AURATA</i>	107
4.5.1	INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ALT DE HÍGADO DE <i>S. AURATA</i> MEDIANTE AMINOOXIACETATO (AOA).....	108
4.5.2	INHIBICIÓN <i>IN VIVO</i> DE LAS ISOFORMAS ALT HEPÁTICAS DE <i>S. AURATA</i> POR AOA INCORPORADO EN LA DIETA.....	109
4.5.3	INHIBICIÓN DE ALT DE CORAZÓN EN <i>S. AURATA</i> MEDIANTE AMINOOXIACETATO SUMINISTRADO CON LA DIETA	111
4.5.4	INHIBICIÓN <i>IN VIVO</i> DE ALT DE <i>S. AURATA</i> MEDIANTE ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE AOA.....	112
4.5.5	EFFECTO EN EL TIEMPO DEL AMINOOXIACETATO SUMINISTRADO CON LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD ALT DE HÍGADO DE <i>S. AURATA</i>	114
5	DISCUSIÓN	131
5.1	SILENCIACIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS ALT	133
5.2	INHIBICIÓN POSTRADUCCIONAL DE LA ACTIVIDAD DE LAS ISOFORMAS ALT	138
6	CONCLUSIONES	147
7	REFERENCIAS	151
8	ANEXOS	189

- A. **González J.D.**, Caballero A., Viegas I., Metón I., Jones J. G., Barra J., Fernández F., Baanante I. V. (2012). Effects of alanine aminotransferase inhibition on the intermediary metabolism in *Sparus aurata* through dietary amino-oxyacetate supplementation. *British Journal of Nutrition*, 107(12):1747-56.
- B. Salgado, M. C., Metón, I., Anemaet, I., **González, J. D.** & Baanante, I. V. (2012). Hepatocyte Nuclear Factor 4 α transactivates the mitochondrial alanine aminotransferase gene in the kidney of *Sparus aurata*. *Marine Biotech*, Volume 14, Issue 1, pp 46-62.
- C. Ana F. Soares, Rui A. Carvalho, Francisco J. Veiga, Marco G. Alves, Fátima O. Martins, Ivan Viegas, **González, J. D.**, Isidoro Metón, Isabel V. Baanante, John G. Jones. (2012). Restoration of Direct

Pathway Glycogen Synthesis Flux in the STZ-diabetes Rat Model by Insulin Administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, doi:10.1152/ajpendo.00161.2012.

- D. Anemaet, I. G., **González, J. D.**, Salgado, M. C., Giralt, M., Fernández, F., Baanante, I. V. & Metón, I. (2010). Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol*, 45(3):119-32.
- E. Shacka JJ, Sahawneh MA, **Gonzalez J.D.**, Ye YZ, D'Alessandro TL, Estévez AG. (2006). Two distinct signaling pathways regulate peroxynitrite-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Death Differ*, 13(9):1506-14

1 INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN LOS PECES CARNÍVOROS

Los peces carnívoros no presentan un control estricto de los niveles de glucosa en sangre. En estos animales, después de la administración de glucosa o la alimentación con dietas con niveles elevados de carbohidratos, se observa que la hiperglucemia se mantiene elevada durante más tiempo que en los mamíferos. Este perfil metabólico imita a la diabetes tipo 2 en humanos (Cowey y Walton, 1989; Wright et al., 1998; Moon et al., 2001). Por otro lado, los peces omnívoros metabolizan mejor la glucosa que los peces carnívoros, sin embargo esta capacidad es menor que la que presentan los mamíferos (Furuichi y Yone, 1981).

Aunque se ha reportado que la utilización de carbohidratos, suministrados con la alimentación, es limitada, diversos trabajos muestran que los carbohidratos, suministrados con las dietas a peces en cultivo pueden ser utilizados para sustituir a las proteínas como fuente de energía. La cantidad óptima de carbohidratos en estas dietas depende de: la especie de pez, el tipo de carbohidrato y tratamiento previo del mismo, y por último del contenido lipídico y proteico. Así, para una especie de pez dada, el tipo y el nivel óptimo de carbohidratos deben ser determinados experimentalmente (Furuichi y Yone, 1980; Wilson, 1994; Shiau, 1997; Hemre et al., 2001). El almidón tratado (gelatinizado, dextrinizado, compactado) es un componente adecuado para dorada (*Sparus aurata*) (Fernández et al., 1996, 1998; Georgopoulos y Conides, 1999; Venou et al., 2003) y otras especies de peces (Bergot, 1979; Bergot y Breque, 1983; Jeoung et al., 1991; Takeuchi et al., 1994; Wilson, 1994; Peres y Olivia-Teles, 2002). La sustitución parcial de proteínas por carbohidratos en las dietas suministradas a peces en cultivo resulta relativamente bien tolerada por la dorada mediante la adaptación de la actividad de enzimas hepáticas que resultan clave en glucólisis, gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato y metabolismo de aminoácidos Fernández et al. (1998), Metón et al. (1999a, 2003) y Fernández et al. (2007).

Las bases moleculares que determinan la baja capacidad de los peces carnívoros para utilizar los carbohidratos aun no han sido totalmente esclarecidas. Se sugirió que los niveles bajos de insulina endógena, observados después de los test de tolerancia a glucosa, podrían contribuir al mantenimiento de una hiperglucemia prolongada y de la baja capacidad de los peces para utilizar niveles elevados de carbohidratos (Palmer y Ryman, 1972; Furuichi y Yone, 1982; Wilson y Poe, 1987). Sin embargo, los niveles de insulina en los peces son similares o a menudo más elevados que los observados en mamíferos (Plisetskaya et al., 1990; Mommsen y Plisetskaya, 1991). Si bien se ha observado un aumento de la insulina en plasma después de la administración de glucosa en los peces (Furuichi y Yone, 1982; Hilton et al., 1987), ciertos aminoácidos parecen ser estimuladores más potentes que la glucosa en la liberación de insulina. Los peces tienen receptores específicos de insulina y también

para los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II (Gutiérrez y Plisetskaya, 1991; Gutierrez et al., 1993; Drakenberg et al., 1993). Las propiedades de unión de estos receptores en diferentes tejidos y en diferentes especies de peces también han sido estudiadas. A pesar de las similitudes estructurales con los mamíferos, los receptores de insulina e IGFs de peces muestran características de unión diferentes que las de sus homólogos en mamíferos (Parrizas et al., 1995). El tejido muscular de trucha arcoíris presenta un 3-10% más de receptores de insulina en membrana que la rata. No obstante, en general, la cantidad total del receptor de insulina que se encuentra unido a insulina en trucha es inferior al reportado en mamíferos (Gutierrez et al., 1991).

La ausencia de transportadores funcionales de glucosa (GLUTs) en el hígado, fue considerada otra posible causa de intolerancia a la glucosa en peces. Sin embargo, investigaciones recientes indican la presencia de isoformas de peces homólogas a las de mamíferos, incluyendo GLUT1 de *Oncorhynchus mykiss* (Teerijoki et al., 2000, 2001A), *Cyprinus carpio* (Teerijoki et al., 2001b) y *Gadus morhua* (Hall et al., 2004); GLUT2 de *Oncorhynchus mykiss* y *Gadus morhua* (Hall et al., 2006); GLUT3 de *Ctenopharygodon idella* (Zhang et al., 2003) y *Gadus morhua* (Hall et al., 2005); y GLUT4 de *Oncorhynchus kisutch* (Planas et al., 2000; Capilla et al., 2004) y *Gadus morhua* (Hall et al., 2006).

En peces, la funcionalidad de GLUT2 ha sido verificada mediante la microinyección de un plásmido de expresión, que contenía la secuencia del cDNA codificante del transportador, en óvulos fertilizados de *Oncorhynchus mykiss*. Los embriones resultantes mostraron una mayor actividad de transporte de glucosa (Krasnov et al., 2001). Asimismo, la caracterización funcional de GLUT4 de tejido adiposo de salmón (okGLUT4), ha sido demostrada en ovocitos de *Xenopus laevis* tras la expresión de okGLUT4 y en adipocitos de salmón, en donde tanto la insulina como la glucosa estimulan la absorción y translocación de okGLUT4 a la membrana plasmática (Capilla et al., 2004). Sin embargo, no se conoce si las isoformas de GLUT se expresan en un número o actividad inferior que sus homólogos en mamíferos. Díaz et al. (2007), mostraron que el contenido de GLUT4 en músculo rojo en trucha, disminuye en situación de ayuno y aumenta después del tratamiento con insulina. Por el contrario, la expresión de GLUT4 en músculo blanco disminuye tras el ayuno, pero no se ve afectada por el tratamiento con insulina.

También se ha propuesto como un factor crucial para explicar la baja capacidad de los peces carnívoros para utilizar glucosa, la desregulación de la expresión de las enzimas que controlan el flujo de sustratos de glucosa y glucosa-6-fosfato en el hígado (Cowey y Walton, 1989; Wilson, 1994; Panserat et al., 2002). En los mamíferos, la alteración de la expresión de glucoquinasa (GK, hexoquinasa IV; EC 2.7.1.2) o glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa; EC 3.1.3.9) puede conducir a una excesiva producción de glucosa hepática, resultando así en intolerancia a la glucosa e hiperglucemia (O'Brien y Granner, 1996; Seoane et al., 1997; Trinh et al., 1998). Las isoformas de hexoquinasa (HK)

son enzimas claves en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Las hexoquinasas I-III tienen baja especificidad y baja K_m para el sustrato, lo que permite la fosforilación de diversas hexosas y su utilización vía glucólisis. En condiciones de valores normales de glucemia, las HKs I-III están saturadas y no pueden responder a pequeños cambios en los niveles de glucosa en sangre; sin embargo, en hígado la isoforma predominante es la HK IV (GK), que tiene una K_m más elevada para glucosa y que por lo tanto se activa cuando los niveles de glucosa son elevados (Wilson, 1994). En mamíferos, se ha demostrado que la interacción de GK con otras proteínas, como la proteína reguladora de glucoquinasa, fosfatasa asociada a glucoquinasa, subunidad β -propionilo-CoA carboxilasa, 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB; EC. 2.7.1.105/EC 3.1.3.46), óxido nítrico sintasa, pentaubiquitina y Bad, afectan a la afinidad y la actividad de la GK (Iynedjian et al., 2008). Se han descrito diversas mutaciones en la secuencia proteica de GK asociadas a una disminución de la actividad GK relacionadas con la diabetes tipo 2 (MODY-2) en humanos (Stoffel et al., 1992; Gidh-Jain et al., 1993; Burke et al. 1999; Davis et al., 1999; Miller et al., 1999; Galan et al., 2006; García-Herrero et al., 2007).

En los últimos 30 años, la incapacidad relativa de los peces carnívoros para utilizar los carbohidratos se describió que era debida en parte a la ausencia de actividad GK en hígado (Nagayama et al., 1974; Cowey et al., 1977; Christiansen et al., 1987; Cowey y Walton, 1989; Steffens, 1989; Cowey y Walton, 1989; Wilson R.P., 1994). Sin embargo, análisis bioquímicos recientes indicaron la presencia de actividad tipo GK en el hígado de salmón atlántico (*Salmo salar*) y en los cuerpos de Brockmann de *Hippoglossus hippoglossus* (Tranulis et al., 1996, 1997). Nuestro grupo de investigación aisló y clonó el cDNA que codifica la GK de hígado de *Sparus aurata*, y estudió la modulación de la expresión génica en función del estado nutricional de los peces (Caseras et al., 2000, 2002). Por otra parte, se aislaron secuencias parciales de cDNA que codifican para GK de otras especies de peces (Panserat et al., 2000a). Los niveles de actividad GK hepática en hígado de *Salmo salar* y de *Sparus aurata*, son inferiores a los observados en ratas alimentadas, pero curiosamente similares a los descritos para ratas en ayuno o diabéticas (Iynedjian et al., 1987, 1988, 1989; Magnuson et al., 1989; Tranulis et al., 1996; Caseras et al., 2000). Estos resultados respaldan la hipótesis de que la GK es funcional en el hígado de los peces, aunque la baja capacidad de los peces para metabolizar los carbohidratos puede ser el resultado, al menos en parte, de que la GK sea menos eficiente que la enzima de rata. Una menor actividad GK en hígado de peces, podría ser responsable de la baja utilización de los carbohidratos y las características “*diabetes like*” de los peces carnívoros. Por otra parte, la ausencia de detección de la GK en estudios previos puede deberse a la administración de dietas con bajo contenido en carbohidratos o al aporte de carbohidratos que no se asimilan fácilmente por los peces, y no a la ausencia de la enzima. En hígado de doradas alimentadas con dietas pobres en carbohidratos, la gluconeogénesis predomina sobre la glucólisis (Cowey y Walton, 1989; Baanante et al., 1991). Las condiciones de ayuno y restricción energética conducen a

una disminución de la expresión de GK hepática en dorada, tanto a nivel de mRNA como a nivel de actividad enzimática (Caseras et al., 2000). Asimismo, se han observado variaciones en la expresión hepática de GK a lo largo del día relacionadas con la alimentación (Caseras et al. 2002; Polakof et al., 2007). En hígado de ratas, los niveles de proteína y actividad GK hepática incrementan por acción de la insulina (Iynedjian et al., 1995). Las doradas tratadas con insulina y glucosa mostraron un incremento en la expresión de GK a las 6 horas del tratamiento (Egea et al., 2007).

En mamíferos, la G6Pasa hepática contribuye a la homeostasis de glucosa en sangre, ya que cataliza la defosforilación de glucosa-6-fosfato a glucosa, reacción terminal de la gluconeogénesis (Arion et al., 1975, 1980; Nordlie et al., 1999; Van de Werve et al., 2000). La ausencia de regulación de la expresión de G6Pasa en el hígado de peces se propuso como posible causa para explicar la hiperglucemia en estos animales alimentados con dietas con alto contenido de carbohidratos (Panserat et al., 2000b, c). El ciclo de sustrato glucosa/glucosa-6-fosfato está sometido a regulación nutricional y hormonal en hígado de *S. aurata* (Caseras et al., 2002). Los niveles de mRNA y la actividad de la GK hepática disminuyen fuertemente en *Sparus aurata* en condiciones de ayuno, mientras que la expresión de G6Pasa es regulada de forma positiva. Tras la realimentación, no hubo inducción de la expresión de la GK hasta 4 horas después de la ingesta de alimento; la actividad máxima se alcanzó a un tiempo postprandial de 4-8 h. En contraste, los niveles de mRNA de G6Pasa fueron mínimos a un tiempo postprandial de 4-15 h. Estos resultados sugieren que la prolongada hiperglucemia observada en los peces puede ser resultado de un retraso en la estimulación de la expresión de GK o a diferencias en las características cinéticas de esta enzima (Caseras et al., 2000, 2002). El efecto de la alimentación con dietas de diferente composición sobre la expresión de G6Pasa y GK, indicó que el metabolismo intermediario hepático en peces alimentados con una dieta baja en proteína y alta en carbohidratos, es impulsado hacia la utilización de los carbohidratos de la dieta, primordialmente por el aumento de la expresión de los niveles de mRNA de GK (Caseras et al., 2002).

Muchas especies de peces presentan períodos prolongados de ayuno en su medio natural, a menudo relacionados con la migración y el desove. En estas situaciones, las variaciones en los niveles de glucógeno en hígado y músculo dependen en gran medida de la especie estudiada. En *Sparus aurata*, el glucógeno hepático, tiende a disminuir significativamente tras 8 días de ayuno y alcanza niveles mínimos después de 20 días de ayuno (Baanante et al., 1991; García de Frutos et al., 1991; Metón et al., 1999). Asimismo, Hickling y March (1982) observaron que un período corto de ayuno, causó una disminución significativa en el contenido de glucógeno en hígado y músculo de trucha arcoíris. Navarro et al. (1992) encontraron también una disminución significativa del contenido de glucógeno hepático tras 8 días de ayuno, en trucha de río. Sin embargo, en anguila europea (*Anguilla anguilla*) sometida a ayuno en condiciones de laboratorio, la concentración de glucógeno en hígado no disminuyó hasta superar los 96 días de ayuno, y el glucógeno muscular permaneció en sus niveles

iniciales tras 164 días de ayuno (Dave et al., 1975). Comparado con los peces, el glucógeno hepático de rata es rápidamente metabolizado y sus niveles son prácticamente agotados después de 24 horas de ayuno, incluso en ausencia de actividad física vigorosa (Freedland, 1967).

1.2 REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA GLUCÓLISIS Y GLUCONEOGÉNESIS EN PECES

En mamíferos, la homeostasis de glucosa resulta principalmente controlada por el hígado mediante dos vías metabólicas fundamentales: la glucólisis y la gluconeogénesis. La vía de la glucólisis es la principal vía de catabolismo de glucosa, una serie de reacciones convierte glucosa en piruvato, del cual la célula obtiene energía en forma de ATP. La vía de la gluconeogénesis es la vía metabólica que genera glucosa a partir de precursores diferentes a los carbohidratos, como: piruvato, lactato, glicerol, y metabolitos intermediarios del ciclo Krebs o del catabolismo de aminoácidos. Tres ciclos de sustrato modulan el flujo neto de sustratos hacia glucólisis o gluconeogénesis. Si consideramos el flujo neto de sustrato en el sentido de la gluconeogénesis, la primera enzima importante involucrada en este ciclo de sustrato es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK; EC 4.1.1.32), que cataliza la formación de fosfoenolpiruvato. En el mismo ciclo de sustrato, pero en sentido opuesto, se encuentra la piruvato quinasa (PK; EC 2.7.1.40), enzima responsable de la defosforilación de fosfoenolpiruvato para obtener piruvato. El siguiente ciclo sustrato en la vía gluconeogénica implica la conversión de fructosa-1,6-bifosfato en fructosa 6-fosfato. Esta reacción es catalizada por la fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa; EC 3.1.3.11), y la reacción inversa está catalizada por la enzima glucolítica 6-fosfofructo-1-quinasa (PFK-1; EC 2.7.1.11). En este ciclo, la enzima bifuncional PFKFB desempeña también un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa, al catalizar tanto la síntesis como la degradación de fructosa-2,6-bisfosfato (fru-2,6-P₂), que resulta un potente activador alostérico de la enzima glucolítica PFK-1 e inhibidor de la enzima gluconeogénica FBPasa. Por lo tanto, mediante el control de la expresión de PFKFB se regula la dirección y el ciclo de sustrato fructosa-6-fosfato/fructosa-1,6-bifosfato. Otro punto de control es el ciclo de sustrato catalizado por la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), que es responsable de la defosforilación de glucosa-6-fosfato a glucosa y que constituye la etapa final en la gluconeogénesis, y, en el sentido opuesto, la glucoquinasa (GK) que cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato y constituye el primer paso de la glucólisis.

En dorada, al igual que en mamíferos, las actividades GK, PFK-1 y PK hepáticas disminuyen en condiciones de ayuno, y se recuperan tras la realimentación de los peces (Bonamusa et al., 1992; Metón et al., 1999a; Caseras et al., 2000; Metón et al., 2003a). Largos periodos de ayuno promueven el aumento de la actividad G6Pasa en hígado de trucha arcoíris (Morata et al., 1982) y *Sparus aurata*

(Caseras et al., 2002), mientras que causan un descenso en la perca amarilla, *Perca flavescens* (Foster y Moon, 1991). La alimentación con niveles elevados de carbohidratos en la dieta induce la expresión génica de PFKFB en hígado de *Sparus aurata* (Metón et al., 2000) y *Oncorhynchus mykiss* (Panserat et al., 2001b). Cantidades crecientes de ingesta de dietas con un alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de proteínas también resultan en un aumento de la actividad de GK, PFK-1 y PK en hígado de dorada, mientras que las actividades G6Pasa y FBPasa disminuyen (Suárez et al., 1995; Metón et al., 1999a; Caseras et al., 2002; Fernández et al., 2007). La estimulación de la gluconeogénesis en hígado también se observó en truchas arcoíris después de una alimentación con dietas de alto contenido en proteínas (Kirchner et al., 2003; Enes et al., 2008). De manera similar a los peces carnívoros, en peces herbívoros, como la tilapia (*Oreochromis niloticus*), dietas altas en proteína y bajas en contenido de carbohidratos aumentan la actividad de G6Pasa (Shimeno et al., 1993).

Tras el aislamiento del cDNA que codifica para la GK hepática de hígado de dorada (Caseras et al., 2000), se clonó y caracterizó el promotor de este gen. La importancia de la regulación de este gen en la homeostasis de la glucosa es evidente ya que en humanos, mutaciones en el promotor de la GK pueden causar síndromes de hiperglucemia e hipoglucemia (Froguel et al., 1992; Hattersley et al., 1992; Matschinsky y Magnuson, 2004; Velho et al., 2004).

Egea et al., (2007) demostraron la presencia de elementos tipo SRE (*sterol regulatory elements*) en el promotor de la GK de *Sparus aurata*. En estos estudios observaron que SREBP-1a tiene un papel importante en la regulación de la actividad promotora de la GK y, a través de la unión a la región situada entre los pares de bases -105 y -95 en relación al inicio de transcripción, promueve la transactivación del promotor. Adicionalmente, reportaron que el factor de transcripción Sp1 transactiva al promotor de la GK hepática de dorada. La sobreexpresión de Sp3 en células HepG2 contrarrestó la activación de la expresión de GK por Sp1. En este trabajo indicaron que Sp1 y Sp3 compiten por el mismo sitio de unión al promotor de la GK.

El factor de transcripción Sp1 media la estimulación dependiente de insulina de la transcripción de GK. Estas conclusiones son coherentes con la regulación por insulina de Sp1 y la regulación hormonal y nutricional de la expresión a niveles de mRNA de GK en el hígado de *Sparus aurata* (Egea et al., 2008). Estos hallazgos junto con la contribución de SREBP-1 a la estimulación dependiente de insulina de la expresión de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB) (Metón et al., 2006), apoyan que estos factores desempeñan funciones importantes en el control transcripcional y la expresión de enzimas claves que intervienen en el metabolismo de la glucosa en hígado de peces.

Recientemente se clonó y caracterizó la subunidad catalítica de la G6Pasa de dorada (Metón et al., 2004) y el promotor de dicho gen (Salgado et al., 2004). Puesto que la insulina apenas afecta a

la actividad promotora G6Pasa de hígado de *Sparus aurata* en ausencia de glucosa, se concluyó que la disminución de la capacidad de represión dependiente de insulina de la G6Pasa puede contribuir a la resistencia a insulina en los peces carnívoros (Salgado et al., 2004).

Nuestro grupo también purificó y caracterizó las isoformas hepáticas y musculares de la PFKFB de dorada (García de Frutos y Baanante, 1994, 1995). Como sucede en rata, las actividades quinasa y bifosfatasa de la enzima hepática de *Sparus aurata* están reguladas por mecanismos de fosforilación / defosforilación (García de Frutos y Baanante, 1994). Metón et al., (1999b) clonaron y secuenciaron el cDNA que codifica la isoenzima PFKFB de hígado de *Sparus aurata*. Los dominios quinasa y bifosfatasa, en donde se encuentran los residuos cruciales para el funcionamiento de la enzima, presentan un alto grado de homología con los de las isoenzimas de hígado de otros vertebrados. La elevada homología entre la secuencia de aminoácidos de PFKFB de peces y mamíferos así como en los modelos moleculares de las isoformas PFKFB de peces y rata, indican un alto grado de similitud estructural y conservación durante la evolución de los vertebrados (Metón et al., 2003b).

El ayuno produce una disminución de la expresión de la PFKFB en hígado de doradas, mientras que la realimentación a corto plazo (8 h) promueve una rápida recuperación de la actividad quinasa de la enzima, presumiblemente por defosforilación y modulación alostérica (Metón et al., 1999b). Además, el tamaño de la ración y la composición de la dieta suministrada, modulan la expresión de PFKFB en hígado de *Sparus aurata*; la actividad quinasa y los niveles de mRNA incrementan al aumentar la cantidad de dieta y la proporción de carbohidratos de la dieta (Metón et al., 2000). Esta adaptación metabólica permite a *Sparus aurata* hacer frente a una sustitución parcial de proteínas por carbohidratos en la dieta. Recientemente, la región promotora del gen PFKFB de *Sparus aurata* ha sido aislada y caracterizada (Metón et al., 2006). En este estudio se demostró que el factor de transcripción SREBP-1a se une a la caja del elemento regulador de esteroides (SRE), y activa la transcripción del gen PFKFB de *Sparus aurata*. Además, en este trabajo, se evidencia que SREBP-1a está involucrado en la regulación nutricional y hormonal de la expresión génica de PFKFB. Técnicas como la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y *Northern blotting* han permitido demostrar que en ayuno se reduce la unión de SREBP-1 al promotor de PFKFB a la vez que disminuyen los niveles de mRNA de PFKFB en hígado de dorada, mientras que la realimentación revierte este efecto. El tratamiento con insulina o glucosa aumentó la unión de SREBP-1 al promotor de PFKFB *in vivo* e indujo un aumento de los niveles de mRNA de PFKFB en hígado de *Sparus aurata*. Estos estudios indican que, el aumento de la expresión de SREBP-1 y de la unión de SREBP-1a al promotor de PFKFB tienen lugar en hígado de *Sparus aurata* durante el periodo postprandial, como consecuencia del aumento de los niveles de glucosa e insulina en plasma.

1.3 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN PECES

Los aminoácidos (AA) son los componentes fundamentales de las proteínas, clasificándose en esenciales y no esenciales. Los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser suministrados con la dieta. Además de utilizar los aminoácidos para síntesis de proteínas, los peces carnívoros los utilizan de manera importante para síntesis de azúcares y grasas (Wood, 1993). La mayoría de las especies de peces marinos son carnívoras y su crecimiento óptimo requiere de un nivel muy alto de proteína en la dieta, alrededor del 30-55% (Wilson, 1989); siendo la proteína el componente más abundante y costoso de las dietas para peces carnívoros (Wilson, 2002). Los peces muestran una eficiencia de conversión de la proteína de la dieta a proteína tisular de hasta 20 veces superior a la observada en pollos, cerdos y bovinos (Tacon y Cowey, 1985). Un exceso de proteína en la dieta suministrada a peces en cultivo conduce a una mayor degradación de aminoácidos y la eliminación de elevadas cantidades de compuestos nitrogenados al agua, lo que a su vez resulta en la eutrofización de las aguas en acuicultura (Pearson y Black, 2001; Davenport et al., 2003). En el organismo, los aminoácidos derivan de dos fuentes principales: la dieta y el catabolismo de proteínas corporales. El catabolismo de proteínas corporales suministra menos del 50% de los aminoácidos precursores para formar proteínas en peces, lo que hace que éstos sean más dependientes de las fuentes dietéticas que otros vertebrados. En términos energéticos, una de las principales funciones de los aminoácidos es actuar como sustratos catabólicos para proveer ATP con fines biomecánicos, sintéticos y para procesos de transporte. En este sentido los aminoácidos parecen ser una fuente de energía más importante que los carbohidratos en peces (Cowey y Walton, 1989).

A pesar de muchos años de investigación sobre el metabolismo intermediario de los peces, se sabe relativamente poco acerca de los factores que regulan el flujo de aminoácidos en las vías catabólicas y anabólicas. Se ha sugerido que algunos aminoácidos se dirigen preferentemente hacia el crecimiento en lugar de hacia el catabolismo en peces. Este hecho podría deberse a que la K_m de las aminoacil-tRNA sintetetas sea unas 10 veces más baja que la K_m de las transaminasas, enzimas que conducen a los aminoácidos a vías oxidativas (Walton, 1985). Por otra parte, la cantidad de aminoácidos libres juega un papel importante en la regulación de la síntesis de proteínas (Houlihan et al., 1993) y la proporción de aminoácidos lo hace a su vez sobre el crecimiento y desarrollo (Li et al., 2009).

1.3.1 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE AMINOÁCIDOS

En el estómago, el proceso de proteólisis se inicia con la acción de la pepsina, hidrolizando péptidos. Después de haber sido procesados en el estómago, los alimentos pasan al intestino en donde se incorporan los jugos pancreáticos, bilis, y enzimas como la tripsina, quimotripsina o leucina aminopeptidasa. En peces herbívoros, como *Signatus canaliculatus*, las enzimas proteolíticas presentan una actividad de funcionamiento óptima a pH ácido (estómago) y pH alcalino (intestino), como en los mamíferos (Sabapathy y Teo, 1993). Lundstedt et al. (2004) analizaron las enzimas proteolíticas digestivas (proteasa no específica, amilasa, tripsina, quimotripsina y lipasa) en *Pseudoplatystoma corruscans*. En este trabajo, alimentaron peces con diferentes dietas que variaban en su composición, observando que la proteína cruda no induce la actividad proteolítica. La actividad amilasa fue mayor en peces alimentados con dietas que contenían 13-25% de almidón. La actividad lipasa fue elevada en todo el tracto intestinal principalmente en la sección media. En contraste, algunos metabolitos de plasma e hígado se alteraron y el catabolismo de aminoácidos se vio incrementado, concluyendo que el nivel de las proteasas digestivas no se puede utilizar como modelo para establecer un nivel de proteína en dieta para estos peces. Correa et al. (2007) analizaron el efecto de dietas con diferentes cantidades de almidón de maíz sobre proteasas digestivas y mostraron que el incremento del almidón no varía los niveles de tripsina o quimotripsina, mientras que los niveles de amilasa y maltasa aumentaron en *Colossoma macropomum*. Galvão et al. (1997) demostraron que las enzimas proteolíticas digestivas de *Mugil planatus* son responsables de la digestión de los alimentos durante las fases de larva y en juveniles. A partir de los 4 días de vida de las larvas, ya se observa una actividad de la tripsina y la carboxipeptidasa, aunque la actividad de estas enzimas es menor comparada con la de los juveniles. El nivel de aminoácidos esenciales requeridos por los peces se asemeja al que se encuentra en la composición total de aminoácidos del tejido muscular de otros peces (Mambrini y Kaushik, 1995). Ya que un suministro óptimo de aminoácidos indispensables es esencial para maximizar la proteína para crecimiento, una suplementación con aminoácidos indispensables es a menudo necesaria para mejorar el valor nutritivo de la dieta. Esto se logra incorporando proteínas de origen vegetal en la dieta suministrada a peces en cultivo (Regost et al., 1999; Cheng et al., 2003; Sitja-Bobadilla et al., 2005). Gómez-Requeni et al. (2003) mostraron que, aproximadamente un tercio de la harina de pescado incluida en la dieta podría ser sustituida por proteínas de otras fuentes, y que el perfil aminoacídico ideal sería el de las proteínas presentes en músculo de dorada, ya que contienen una proporción relativamente alta de aminoácidos esenciales/no esenciales. Los aminoácidos son captados desde el intestino como aminoácidos libres o como dipéptidos. En peces existe una adaptación del sistema de transporte intestinal a diferentes niveles de aminoácidos presentes en la dieta. Así, la K_m de los transportadores de aminoácidos en el intestino de peces herbívoros y omnívoros son inferiores a los de carnívoros, presumiblemente como adaptación a menores niveles de

aminoácidos en intestino (Ferraris y Ahearn, 1984). Su transporte a la sangre tiene lugar en la superficie basolateral de las células intestinales mediante transportadores de aminoácidos (Reshkin et al., 1988; Collie y Ferraris, 1995). Algunos aminoácidos como la alanina, lisina y fenilalanina son transportados mediante transportadores independientes de sodio. El transporte de prolina y glutamato es realizado a través de transportadores dependientes de sodio, y el transporte de glicina utiliza el gradiente de sodio y potasio (Reshkin et al., 1988).

1.3.1.1 CATABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN HÍGADO

El principal lugar de catabolismo de aminoácidos es el hígado, lo que explica la presencia de altas concentraciones de aminoácidos libres en el tejido hepático (Van den Thillart y Van Raaij, 1995). En hígado de peces, los aminoácidos son sustratos oxidativos más importantes que los lípidos (French et al., 1981). La tasa de oxidación de los aminoácidos supera a su papel en otras vías, tales como la gluconeogénesis. Por ejemplo, en el salmón atlántico la tasa de oxidación de alanina supera a su tasa de incorporación en glucosa en más de 10 veces (Mommsen et al., 1985), y en hepatocitos de atún, la alanina se oxida en tasas cinco veces superiores que a su utilización como precursor de lactato (Buck et al., 1992). El principal mecanismo para el catabolismo de aminoácidos en hígado de peces implica un proceso de transaminación, reacción en la que el grupo amino de determinados aminoácidos es transferido a α -cetoglutarato para formar glutamato, que posteriormente puede ser desaminado por la glutamato deshidrogenasa (GDH). La GDH es una enzima mitocondrial que resulta activada alostéricamente por ADP, AMP y leucina, e inhibida por ATP y GTP en peces (Jürss y Bastrop, 1995). Así, cuando los niveles de ATP son bajos y los de ADP altos, se potencia la desaminación oxidativa. En mamíferos, la leucina activa preferentemente la transaminación y estimula la síntesis de proteínas musculares (Nakashima et al., 2007). Esta función ha sido investigada en animales acuáticos (Li et al., 2009), en donde se ha observado un aumento de la eficiencia metabólica en juveniles y sub-adultos; además se han realizado estudios extensos en hepatocitos de trucha arcoíris (Lansard et al., 2011) en los cuales se observaron que la leucina regula la gluconeogenesis y la lipólisis pero no la glucólisis.

En peces alimentados, el incremento de proteína en la dieta resulta en un aumento de la tasa de crecimiento. Este hecho está directamente relacionado con la estimulación del metabolismo oxidativo y la síntesis de proteínas, probablemente como consecuencia de un exceso de aminoácidos y efectos hormonales (Houlihan et al., 1993). En peces, el exceso de aminoácidos asociado a la ingesta de dietas ricas en proteínas no puede ser directamente almacenado; por lo que estos son desaminados y convertidos en compuestos energéticos (Ballantyne, 2001; Stone et al., 2003). Los peces tienen un

alto requerimiento de arginina, que es un aminoácido abundante en las proteínas de los peces y su síntesis *de novo* es escasa o ausente en algunos peces como la dorada. Estos animales, no obstante, son capaces de convertir citrulina a arginina por la vía de la arginina succinato sintetasa y la arginina succinato liasa en hígado (Mommsen et al., 2001). El incremento de actividad de la arginina succinato sintetasa es importante para el catabolismo de aminoácidos en situación de ayuno (Ballantyne, 2001; Wood, 2001). La comparación de la tasa de oxidación de varios aminoácidos en hepatocitos y en mitocondrias aisladas de hepatocitos, ha sido utilizada para determinar los pasos limitantes en el catabolismo de aminoácidos en el hígado de peces. En hepatocitos de pez gato, la producción de amoníaco a partir de aminoácidos es mayor con la adición de asparagina y menor con los aminoácidos siguientes, en orden decreciente: glutamina > alanina y serina > aspartato y glutamato. Estudios con preparaciones de mitocondrias mostraron un orden de preferencia diferente, ya que el glutamato se oxidó en mayor proporción que alanina, serina y asparagina (Campbell y Vorhaben, 1983).

El metabolismo del glutamato en peces difiere del de mamíferos. El glutamato es principalmente desaminado con producción de amoníaco, mientras que en mamíferos el glutamato se transamina a aspartato (Walton y Cowey, 1977; Campbell y Vorhaben, 1983). El destino metabólico del glutamato varía con las especies. El glutamato se oxida mayoritariamente vía GDH en el hígado de *Carassius auratus* (Van Waarde y de Wilde-Van Berghe Henao, 1982), trucha arcoíris (Walton y Cowey, 1977), lubina (Peres y Olivia-Tele, 2006) y bagre (Bibiano Melo JFB et al., 2006). En mitocondria de hígado de pez gato, un 40% del glutamato es transaminado a aspartato y el resto resulta desaminado (Campbell y Vorhaben, 1983).

1.3.1.2 GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA A PARTIR DE AMINOÁCIDOS

El hígado desempeña un papel importante en la regulación de los niveles sanguíneos de aminoácidos y en la gluconeogénesis, siendo los aminoácidos la principal fuente de carbono. El suministro de dietas de alto contenido en proteína expone al hígado a concentraciones elevadas de aminoácidos y hormonas. Esto promueve la activación de las enzimas que intervienen para catabolizar el exceso de aminoácidos de la dieta, lo que conlleva a una disminución de la concentración de aminoácidos en la circulación general, pero no en la circulación portal (Chan y Hargrove, 1993; Brosnan, 2003). Thorpe e Ince (1976) han mostrado que los aminoácidos son potentes estimuladores de la liberación de insulina en el pez carnívoro *Esox lucius*. Además, Ince y Thorpe (1977) demostraron que la glucosa es una señal menos eficaz para liberación de insulina que algunos aminoácidos en *Anguilla anguilla*. Aminoácidos como la arginina (precursor de gluconeogénesis) y la lisina (precursor de cuerpos cetónicos) son mas eficaces que la glucosa para impulsar la liberación de insulina en los peces teleósteos (Suárez y Mommsen, 1987). Por otra parte, la administración de

insulina aumentó la incorporación de glicina en las proteínas musculares (Ince y Thorpe, 1976), y de lisina en proteínas de salmón (Plisetskaya et al., 1984). Tanto la glucosa como los aminoácidos son potentes moduladores de la secreción de insulina y glucagón (Hyde et al., 2003). Sin embargo, en peces, los aminoácidos son mejores secretagogos de insulina que la glucosa (Moon, 2001). Lansard et al. (2010) demostraron que los aminoácidos en combinación con la insulina contribuyen a la regulación molecular de varios genes del metabolismo hepático de relacionado con la vía de transducción de TOR. Sin embargo, la capacidad de los diferentes aminoácidos para promover la secreción de insulina difiere entre especies. En trucha arcoíris se observó que la administración de insulina induce la fosforilación de ciertos factores claves en el control de la síntesis de proteína (IRS1, TOR y 4E-BP1) y de su degradación (Seilliez et al., 2011).

La gluconeogénesis se produce principalmente durante el ayuno o cuando se alimenta a los peces con dietas bajas en carbohidratos (Metón et al., 2003). La mayoría de los aminoácidos pueden llegar a generar 1 mol de glucosa por cada 2 moles de aminoácidos. Durante el ayuno o el desove del salmón, se consideró que la alanina era el único aminoácido que se libera significativamente del tejido muscular (Mommensen et al., 1980). Un gran número de estudios han reportado la conversión de alanina a glucosa en peces (Cowey et al., 1977; Bever et al., 1981). Como sucede en mamíferos, la gluconeogénesis a partir de alanina es cuantitativamente la vía más importante de producción de glucosa desde una fuente aminoacídica (Newsholme y Leech, 1983). Sin embargo, French et al. (1981) indicaron que serina, y no alanina, es el principal aminoácido utilizado como sustrato para gluconeogénesis en peces. Las tasas de síntesis de glucosa a partir de aminoácidos en hepatocitos aislados de trucha ocurre en el siguiente orden: serina > asparagina > alanina > glicina > prolina > valina. Experimentos con hepatocitos aislados de *Raja erinacea* indicaron que la absorción de β -alanina puede ser un paso limitante en la oxidación de este aminoácido en el hígado (Shuttleworth y Goldstein, 2005). La importancia relativa de los aminoácidos en la síntesis de glucosa puede variar dependiendo de la disponibilidad de lactato. Walton y Cowey (1979) han demostrado que *in vitro* la incorporación de precursores marcados a glucosa, procedían principalmente del lactato y en menor proporción de la alanina y de piruvato. Sin embargo, Buck et al. (1992) comprobaron que la gluconeogénesis a partir de alanina es cuantitativamente muy superior que a partir de lactato en hepatocitos de atún.

Aunque la incorporación de grupos carbonados de aminoácidos a glucosa es rápida, no todos los átomos de carbono terminan formando parte de la glucosa en algunas especies de peces (Bever et al., 1981). Se ha sugerido que una porción significativa de los grupos carbonados de aminoácidos gluconeogénicos son utilizados para la producción de mucopolisacáridos presentes en las secreciones mucosas (Bever et al., 1981; Weber y Zwingelstein, 1995). Fauconneau y Tesseraud (1990) estiman

que el 11% del nitrógeno ingerido es utilizado para la producción de proteínas de mucosas en trucha arcoíris, lo que representa una importante fuga de nitrógeno.

1.3.2 TRANSAMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS: ORIGEN DE LA EXCRECIÓN DE AMONIO

En base a las formas de excretar el nitrógeno proteico, los animales vertebrados se dividen en tres grupos: amoniotélicos, ureotélicos y uricotélicos. Muchos animales acuáticos, como por ejemplo los peces teleósteos, son amoniotélicos. El principal producto final de la degradación de los aminoácidos es el amoníaco. El amoníaco (NH_3) es muy tóxico, pero a pH fisiológico, un 99% del amoníaco en solución acuosa está presente en una forma menos tóxica: el ión amonio (NH_4^+). Ya que la glutaminasa y GDH, enzimas que producen amoníaco, se localizan en la mitocondria, el amoníaco se forme en la matriz mitocondrial, desde donde pueden salir hacia el citosol como NH_4^+ (Campbell y Vorhaben, 1983).

Durante la degradación de los aminoácidos se produce la eliminación de nitrógeno, que en peces se produce principalmente por las branquias (Fromm, 1963). No obstante, las branquias no parecen desempeñar un papel importante en la formación de amoníaco (Pequin y Serfaty, 1963; Fromm, 1963; Goldstein et al., 1964; Mommsen, 1984). En la degradación de la mayoría de los aminoácidos, un paso previo es la transaminación, que consiste en la transferencia del grupo α -amino desde un aminoácido a un α -cetoácido. Hay varias aminotransferasas, cada una de las cuales es específica para un aminoácido o grupo de aminoácidos químicamente similares. El α -cetoácido que acepta el grupo amino es siempre α -cetoglutarato, para formar glutamato. La transaminación es un proceso reversible; en el que glutamato y α -cetoglutarato actual como sustratos de todas las transaminasas. El mecanismo de reacción enzimática que catalizan es de tipo "Ping Pong" según el cual, el primer sustrato se une a la enzima, se transforma en producto y abandona la enzima dejándola modificada para que el segundo sustrato pueda unirse a la enzima modificada, permitiendo así que se forme el segundo producto.

En algunos peces, particularmente bajo condiciones ambientales adversas y cuando la excreción de amoníaco se reduce, la excreción de urea se dispara (Wood et al., 1995; Saha y Ratha, 1998). En el teleosteo neotropical *Hoplias malabaricus*, condiciones elevadas de alcalinidad, o exposición al aire, inducen la formación de urea (Polez et al., 2003; Moraes et al., 2004). Estudios en *Cyprinus carpio* mostraron que el hígado es el principal lugar de formación de urea (Pequin y Serfaty, 1963). Otros tejidos, como riñón y músculo, desempeñan un papel menor, pero importante en la formación de NH_3 . Kenyon (1967) demostró que anguilas a las que se les ha extirpado quirúrgicamente el hígado pueden excretar amoníaco, pero no tienen la capacidad de desaminar el

exceso de aminoácidos procedentes de la dieta, lo que se traduce en una disminución de la excreción postprandial de NH_3 . Los grupos amino de aminoácidos son los principales contribuyentes del amoníaco excretado. La transaminación de la alanina a α -cetoglutarato produce la formación de piruvato y glutamato. La acción de la GDH sobre este último contribuye a formar amoníaco y α -cetoglutarato, tal como se describió por primera vez por Braunstein (1957). El aumento de proteínas en la dieta de los peces, resulta en un aumento de la concentración de urea en plasma y amoníaco en hígado, como se observó en *Bidyanus bidyanus*, *Dicentrarchus labrax* y *Rhamdia quelen* (Peres y Olivia-Teles, 2002; Yang et al., 2002a; Bibiano Melo et al., 2006).

1.4 ALANINA AMINOTRANSFERASA

La alanina aminotransferasa (ALT), también conocida como glutamato-piruvato transaminasa (GPT), es una enzima homodimérica dependiente de piridoxal-5-fosfato (PLP) que cataliza la transaminación reversible entre L-alanina y α -cetoglutarato para formar piruvato y L-glutamato (Fig. 1).

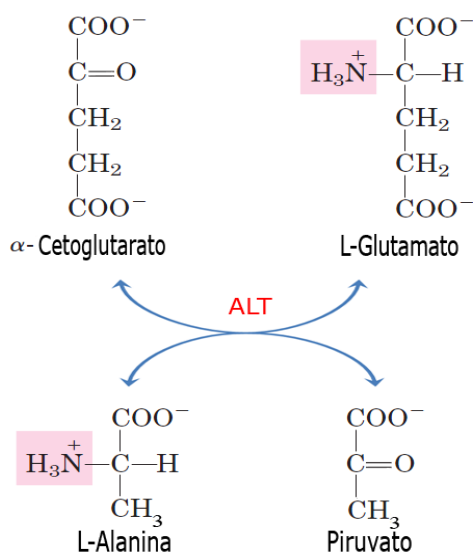


Fig. 1. Reacción catalizada por la enzima ALT. La ALT transfiere de forma reversible el grupo amino desde alanina a α -cetoglutarato, resultando en la formación de piruvato y glutamato.

El PLP interviene en la reacción catalizada por la ALT interaccionando con el centro activo (Fig. 2). El PLP es la forma activa de la vitamina B6 (piridoxal) y con frecuencia está descrito como el coenzima más versátil de la naturaleza. El PLP es necesario para numerosas enzimas que catalizan una amplia gama de reacciones de síntesis, catabolismo e interconversión de aminoácidos (Snell, 1990; Leklem, 1991). En hígado, la piridoxal quinasa fosforila el piridoxal para formar PLP en presencia de

ATP y un catión divalente (Zn^{2+}). Posteriormente el PLP es liberado al torrente sanguíneo unido a la albúmina mediante una base de Schiff (Merrill et al., 1984).

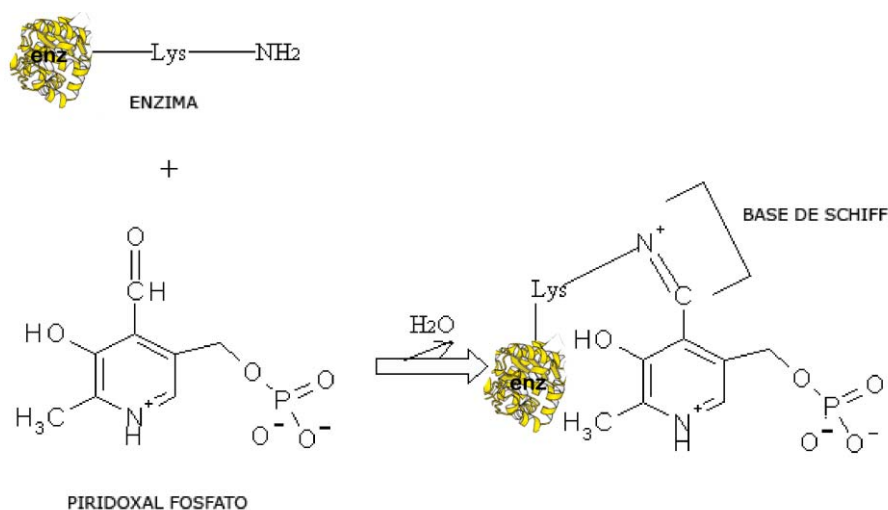


Fig. 2. Unión del PLP al centro activo de ALT. Al comienzo de la reacción, el PLP está unido, como base de Schiff al grupo amino de la Lys313, en el centro activo de la ALT de rata. El vínculo entre el PLP y la enzima se rompe y el PLP establece una base de Schiff con el aminoácido sustrato en lugar de con la enzima.

La ALT de rata es un homodímero con una masa molecular de 100 kDa y subunidades de 50 kDa, cada una de las cuáles se une a una molécula de PLP (DeRosa y Swick, 1975). Estudios de fluorescencia polarizada y de resonancia de plasmón superficial (SPR) demostraron que la piridoxal quinasa se une a la ALT (Cheung et al., 2003). Por otra parte, los perfiles de unión de ALT a la piridoxal quinasa resultan alterados por exceso de PLP. Las constantes de afinidad para ALT de rata en ausencia y presencia de PLP son $20.4 \times 10^4 M^{-1}$ y $6.7 \times 10^4 M^{-1}$, respectivamente. La afinidad de la piridoxal quinasa por ALT disminuye en presencia de PLP (Cheung et al., 2003).

La presencia de isoformas citosólica y mitocondrial de ALT ha sido propuesta en base a estudios bioquímicos. Mediante centrifugación diferencial de homogeneizados de hígado de rata, en presencia de 0.25 M de sacarosa, Hopper y Segal (1964) y Swick et al. (1965) mostraron que la actividad ALT está presente mayoritariamente en el citosol, mientras que sólo un 10-20% de la actividad total se recupera en el sedimento mitocondrial. Takeda et al. (1964) mostraron la separación de dos fracciones con actividad ALT mediante cromatografía en DEAE-celulosa, y Katunuma et al. (1962) separaron dos fracciones con actividades ALT utilizando geles de fosfato cálcico.

La ALT constituye un nexo molecular entre el metabolismo de carbohidratos y el de aminoácidos, a través de la interconversión de metabolitos intermediarios (Fig. 3). La alanina, sustrato de esta enzima, es reconocida como uno de los aminoácidos más eficaces para la gluconeogénesis

hepática en mamíferos (Yamamoto et al., 1974; MacDonald et al., 1976; Remesy et al., 1978). Asimismo, es uno de los principales aminoácidos liberados por el músculo esquelético y captado por el hígado humano en condiciones de ayuno (Felig et al., 1975). La alanina también tiene una gran importancia, no sólo por ser un constituyente de las dietas sino también porque es el producto final del metabolismo de glutamina en las células intestinales (Watford, 1994). En peces, la alanina y el aspartato son los principales precursores gluconeogénicos y sustratos energéticos (Li et al., 2009). En diferentes órganos de peces, la alanina es un donador de nitrógeno para el metabolismo de aminoácidos (Mommssen et al., 1980). Es posible que el aspartato procedente de la dieta se catabolice en el intestino de los peces, de manera que la mayor parte del aspartato circulante provenga de la síntesis en el músculo esquelético (Wu, 1998).

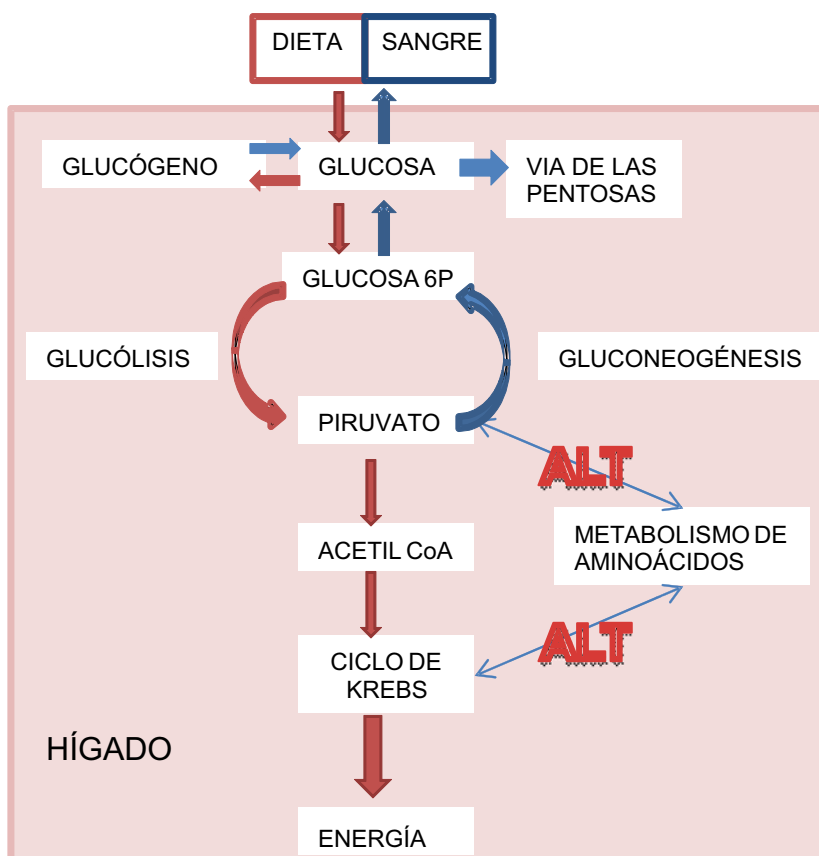


Fig. 3. La ALT constituye un nexo de unión entre el metabolismo de carbohidratos, el de aminoácidos y el energético. En los peces carnívoros la principal fuente de energía proviene de los aminoácidos ya que su dieta natural presenta un alto contenido proteico y bajo contenido en carbohidratos. El hígado utiliza los aminoácidos para obtener energía mediante la oxidación del esqueleto carbonado o para la conversión del esqueleto carbonado a glucosa (Jurss and Bastrop, 1995).

1.4.1 PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA ALT

La actividad ALT puede determinarse en la dirección de formación de L-glutamato (reacción directa) o en la dirección de formación de L-alanina (reacción inversa). En hígado de rata, la K_m para α -cetoglutarato y alanina se encuentra en el entorno de 1.1 mM y 34 mM, respectivamente. En la reacción inversa, la K_m observada para el glutamato y piruvato fue de 15 mM y 0.9 mM, respectivamente (Hopper y Segal, 1962). Para la ALT purificada de tejido cardíaco de cerdo, los valores de K_m para alanina y α -cetoglutarato resultaron ser 28 mM y 0.4 mM, respectivamente. El piruvato se comporta como inhibidor de la reacción de transaminación de glutamato a piruvato en corazón de cerdo.

La ALT mitocondrial de hígado porcino mostró un valor de K_m para alanina de 1.9 mM (DeRosa et al., 1979), un orden de magnitud inferior que la de la enzima citosólica, 34 mM (DeRosa y Swick, 1975). La K_m para α -cetoglutarato, por otro lado, fue similar para ambas isoenzimas. Para la isoforma mitocondrial de ALT aislada de hígado y riñón de cerdo se reportó también que es inhibida por los sustratos L-glutamato y piruvato (De Rosa et al., 1979). Vedavathi et al. (2006) purificaron y caracterizaron una nueva isoforma ALT de ratas en ayuno. El peso molecular de la isoforma era 17.7 kDa y el punto isoeléctrico 4.2. La enzima mostró en relación al sustrato L-alanina un valor de K_m de 0.51 mM y 0.12 mM para α -cetoglutarato. Por otra parte, la K_m de la ALT citosólica fue determinada con enzima purificada de hígado de dos especies de peces de agua dulce, *Clarias batrachus* y *Labeo rohita*. Los valores de K_m observados fueron de 18.5 y 23.55 mM para alanina, y 0.29 y 0.33 mM para α -cetoglutarato, respectivamente (Srivastava et al., 2004).

Una molécula de ALT contiene aproximadamente 15-20 residuos de lisina dependiendo de la especie animal estudiada. Sólo uno de ellos, la Lys 313, ubicada en el centro activo de la enzima en rata, es el sitio de unión a PLP (Ishiguro et al., 1991a, 1991b). La enzima puede ser glucosilada por glucosa y otros monosacáridos, y se ha descrito que la ALT citosólica de corazón porcino puede resultar inhibida en presencia de azúcares. Diversos estudios mostraron el orden en el que diferentes azúcares inhiben a la ALT: D-glucosa < D-fructosa < D-ribosa < D,L-gliceraldehído (Okada et al., 1994, 1997; Beránek et al., 2001). Estos autores previamente habían descrito que la actividad enzimática de la aspartato aminotransferasa (AST) (EC 2.6.1.1), una transaminasa con un mecanismo de reacción similar al de la ALT, resulta inhibida por glucosilación.

Hasta la fecha, la funcionalidad celular de las isoformas citosólicas y mitocondriales es todavía poco clara. Los estudios de DeRosa y Swick, (1975) condujeron a la hipótesis de que la función principal de la ALT mitocondrial *in vivo* es la formación de piruvato a partir de alanina. Estudios anteriores sobre gluconeogénesis hepática a partir de alanina sugieren que la conversión de

alanina a piruvato es más probable que ocurra dentro de la mitocondria (Mendes-Mourao et al., 1975; Quistorff e Isnard, 1987). Sin embargo, posteriormente, revisando este postulado se demostró que una parte considerable de alanina producida a partir de piruvato tiene su origen en el citoplasma (Dieterle et al., 1978) y que la contribución de la ALT mitocondrial de hígado de rata a la gluconeogénesis es insignificante en comparación con la de la enzima citoplasmática (Lenartowicz y Wojtczak, 1988). Estos hallazgos aparentemente contradictorios podrían explicarse por la presencia de más de una isoforma, con diferente funcionalidad en el mismo compartimento subcelular (Anemaet et al., 2008).

1.4.2 REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA ACTIVIDAD ALT

La actividad ALT, determinada en extractos hepáticos, muestra cambios notables en respuesta a diversos tratamientos fisiológicos y nutricionales del organismo. En hígado de ratas alimentadas con dietas altas de proteína, en situación de ayuno, tratadas con cortisol y en animales diabéticos se observó un incremento de actividad ALT (Rosen et al., 1959, 1963). Además, los agonistas β -adrenérgicos como epinefrina, glucagón y norepinefrina inducen la actividad ALT hepática en ratas (Begum y Datta, 1991, 1992). Gavosto et al. (1957) señalaron que la actividad AST en hígado incrementa en un 67%, y la actividad ALT en un 81% en ratas inyectadas con cortisona (120 mg/kg diarios durante 3 días). En otros estudios, Beaton et al. (1957), mostraron que los tratamientos diarios con cortisona no afectan a los niveles de AST hepáticos, pero duplican la actividad ALT en rata. Rosen et al. (1959, 1963) comprobaron que en el hígado de rata la actividad ALT aumenta en condiciones asociadas a gluconeogénesis, sugiriendo que se produce la síntesis *de novo* de enzima en lugar de la liberación de inhibidores o activadores de ALT. En hígado de mamíferos, el ayuno produce un aumento en la actividad específica de la isoenzima ALT citosólica, pero no de la isoenzima mitocondrial (Swick et al., 1965).

ALT y AST son las aminotransferasas cuantitativamente más importantes en el hígado de los peces teleósteos (Cowey y Walton, 1989). En el hígado de *Sparus aurata*, Metón et al. (1999a) comprobaron que la actividad ALT disminuye tras un periodo de ayuno prolongado, mientras que la actividad AST mostró una ligera tendencia a aumentar. Sin embargo, el efecto del ayuno sobre las actividades ALT y AST en otras especies de peces es variable. La alimentación de peces con dietas altas en proteína promovió un aumento en las actividades de ALT y AST en hígado de dorada (Metón et al., 1999a; Fernández et al., 2007). En salmón atlántico (*Salmo salar*), Fynn-Aikins et al. (1995) comprobaron que la actividad de AST no depende del tipo de fuente de energía suministrada a los peces, mientras que dietas altas en proteína promovieron un incremento de la ALT hepática. Lupiáñez et al. (1989) también observaron un aumento de actividad ALT en truchas arcoíris alimentadas con

dietas altas en proteína. En esta especie, Sánchez-Muros et al. (1998) comprobaron que la actividad ALT se adaptó a los cambios en la composición de la dieta, mientras que, la actividad AST no se afectaba. Estos autores también mostraron que dietas con un alto contenido de proteína promovían un aumento de las actividades GDH y ALT hepáticas en un 100% y 65%, respectivamente, con respecto a los valores observados en truchas arcoíris alimentadas con una dieta control. Ambas transaminasas se vieron incrementadas con el aumento en el contenido proteico de la dieta en *Mugil capito* (Alexis y Papaparaskeva-Papoutsoglou, 1986). La alimentación de peces juveniles de *Rhamdia quelen* con dietas con alto contenido de proteínas (41% de proteína bruta) promovió un aumento de la actividad ALT hepática de casi un 30%, duplicó la actividad de AST y aumentó un 54% la actividad GDH, en comparación con peces alimentados con dietas bajas en proteínas (Bibiano Melo et al., 2006). Por otra parte, Kirchner et al. (2003) al ensayar el efecto de dietas que diferían en el contenido proteico, en truchas alimentadas durante 14 días, no observaron cambios en las actividades ALT, AST y GDH, mientras que se observó una inhibición significativa en las actividades FBPasa y G6Pasa.

1.4.3 CARACTERIZACIÓN DEL GEN ALT

Son actualmente escasos los trabajos centrados en el estudio del control de la expresión génica de ALT. En vertebrados, han sido reportadas secuencias de cDNA que codifican para las isoenzimas ALT en humanos, rata, ratón, perro, cerdo, vaca, pez cebra y dorada (Tanase et al., 1979; Sohocki et al., 1997; Yang et al., 2002b; Jadhao et al., 2004; Winter et al., 2004; Metón et al., 2004b, Rajamohan et al., 2006; Anemaet et al., 2008). Se ha demostrado la presencia de al menos dos isoformas ALT, ALT1 y ALT2, codificadas por genes diferentes en humanos y ratón (Sohocki et al., 1997; Yang et al., 2002b; Jadhao et al., 2004). El gen ALT1 fue clonado en humanos a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína ALT citosólica (Ishiguro et al., 1991b) y se localizó en el cromosoma 8q24.3 (Sohocki et al., 2001). El mRNA de otra isoenzima humana, ALT2, fue clonado 11 años después y se localizó en el cromosoma 16q12.1 (Yang et al., 2002a). Adicionalmente, Lindblom et al. (2007) han descrito una isoforma procedente de un procesamiento alternativo diferente denominada ALT2_2, de menor tamaño que la proteína ALT2 descrita por Yang et al. (2002b). La isoforma ALT2_2 se expresa principalmente en corazón y músculo esquelético. En ratón, los genes ALT1 y ALT2 pertenecen a los cromosomas 15 y 8, respectivamente (Jadhao et al., 2004). Trabajos recientes (Yang et al., 2009) han reportado el cDNA de las isoenzimas ALT1 y ALT2, y estudiado la expresión de los niveles de mRNA y de proteína en diferentes tejidos de rata. Adicionalmente, Glinghammar et al. (2009) demostraron por primera vez que la localización subcelular de la isoforma ALT2 de humanos se encuentra en mitocondria.

Las isoenzimas ALT1 y ALT2 tienen diferentes patrones de distribución en los distintos tejidos, lo que sugiere un rol dependiente de tejido para las isoformas de ALT. En humanos, análisis por *Northern blot* indicaron que hay una expresión elevada de ALT2 principalmente en músculo, tejido adiposo, riñón y cerebro, mientras que ALT1 se expresa principalmente en riñón, hígado y corazón (Yang et al., 2002b). Análisis por *Western blot* indican que la ALT1 se expresa en hígado, músculo esquelético, riñón, y en menor medida en corazón. De hecho, estudios de inmunohistoquímica muestran expresión de ALT1 en hepatocitos, células epiteliales de túbulos renales y glándulas salivales, mientras que ALT2 se encuentra en la corteza de la glándula suprarrenal, cuerpos neuronales, miocitos cardíacos, fibras de músculo esquelético y páncreas endocrino. Por otra parte, ensayos de inmunoprecipitación demostraron que ALT1 es la isoforma que se expresa preferentemente en hígado humano y la que cuantitativamente más contribuye al mantenimiento de los niveles de actividad ALT basal circulante en los seres humanos (Lindblom et al., 2007).

Las isoenzimas ALT1 y ALT2 hepáticas humanas fueron clonadas en baculovirus con una cola de histidinas para facilitar su posterior purificación. La actividad específica de la ALT1 expresada y purificada fue aproximadamente 15 veces superior a la de ALT2 (Liu et al., 2008).

En hepatocitos en cultivo primario y células HuH-7, la expresión ALT1 a nivel de mRNA, pero no de ALT2, aumentó en una forma dependiente de la dosis en respuesta al tratamiento con fenofibrato (Thulin et al., 2008). En ratones obesos los niveles de mRNA de ALT2 son aproximadamente el doble que en ratones normales, mientras que la expresión de ALT1 permanece sin cambios (Jadhao et al., 2004). Por otra parte, Gray et al. (2007) han proporcionado indicios que sugieren que el factor KLF-15 puede desempeñar un papel importante en la regulación de la gluconeogénesis mediante el control de la expresión hepática de ALT1, pero no de ALT2.

Recientemente, nuestro grupo de investigación clonó y determinó la localización subcelular de dos isoenzimas ALT clonadas de hígado de *Sparus aurata*, estas isoformas son las enzimas cALT1, cALT2 y mALT, que corresponden a las isoformas de ALT citosólicas y mitocondrial, respectivamente.

La actividad de las isoformas ALT *in vivo* fueron analizadas en fracciones subcelulares de extractos de hígado de *Sparus aurata*. El estudio de la distribución de la actividad de ALT indicó que más del 85% de la actividad ALT se localiza en la fracción citosólica, y alrededor del 15% de la actividad corresponde a la ALT mitocondrial. La localización subcelular de cALT1 y mALT, se determinó mediante estudios de transfección transitoria de estas proteínas, fusionadas con la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), en células CHO y por microscopía confocal de fluorescencia. La mALT de *Sparus aurata* fue la primera secuencia reportada para una ALT mitocondrial en animales (Metón et al., 2004b).

Posteriormente, Anemaet et al. (2008) clonaron y caracterizaron una segunda isoforma citosólica de ALT procedente de un procesamiento alternativo del gen cALT de dorada, que fue denominada cALT2. Para determinar la localización subcelular de cALT2, se fusionó esta proteína a la EGFP en los extremos N- y C- terminal de cALT2. Estudios cinéticos indican que cALT2 es más eficiente para catalizar la reacción de conversión de alanina a piruvato, mientras que cALT1 es más eficiente catalizando la reacción opuesta, de piruvato a alanina. También se estudiaron los efectos del estado nutricional y hormonal en la expresión de estas dos isozimas en el hígado de *Sparus aurata*. Los niveles de mRNA de cALT1 disminuyeron de forma significativa en peces en situación de ayuno hasta un 50% respecto a los peces alimentados, mientras que los niveles de cALT2 aumentaron 2.5 veces con respecto a los peces control. Asimismo, se analizaron los niveles de cALT1 y cALT2 a diferentes tiempos tras la ingesta, en doradas alimentadas una vez al día. Los niveles máximos de cALT1 se observaron entre 2 y 8 h después de la ingesta. En contraste, entre las 4 y 8 h los niveles de mRNA de cALT2 disminuyeron un 25% respecto a los peces control (tiempo 0). Por otra parte, se examinaron los efectos de glucosa e insulina en la expresión de cALT1 y cALT2 en hígado de *Sparus aurata*. Si bien los niveles de cALT1 no mostraron cambios significativos a las 6 h después del tratamiento con glucosa o insulina, la expresión de cALT2 disminuyó significativamente 2.2 y 2.9 veces 6 h después de la administración de glucosa e insulina, respectivamente. Asimismo, se analizó el efecto de la estreptozotocina (STZ), droga que causa necrosis celular selectiva de células β de páncreas (Junod et al., 1969; Like y Rossini, 1976; Wilson y Leiter, 1990). Veintidós horas después de la administración intraperitoneal de 600 mg/kg de STZ, los valores de glucemia en dorada aumentaron 2 veces. El tratamiento con STZ produjo un aumento de 3 veces en la expresión de cALT2. En conjunto, estos datos indican que las dos isoformas citosólicas presentes en hígado de *Sparus aurata* presentan una función diferente; cALT2 aumenta en condiciones relacionadas con gluconeogénesis, mientras que la expresión de cALT1 está más relacionada con la utilización postprandial de los nutrientes de la dieta.

Anemaet et al. (2010) clonaron y caracterizaron el promotor de cALT. En este trabajo se mostró que p300 y c-Myb activan la transcripción de cALT y se observó que el aumento de los niveles de p300 y c-Myb en hígado de doradas en ayuno contribuye a la activación de la transcripción de cALT2. Por otra parte, la administración de insulina promovió un descenso en la expresión de p300 y c-Myb.

Recientemente, Salgado et al. (2011) han clonado el promotor de mALT de dorada y reportado que el factor nuclear hepatocitario 4 (HNF4) transactiva al promotor de mALT. Estudios de deleciones en el extremo 5' del promotor mALT de dorada, mutagénesis dirigida y ensayos de EMSA permitieron identificar a HNF4 como un nuevo factor relacionado con la regulación de la expresión de

mALT en riñón de *S. aurata*. Además, ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) mostraron que la administración de STZ disminuye los niveles de HNF4 y mALT en riñón de *S. aurata*.

1.4.4 PATOLOGÍAS ASOCIADAS CON LA ACTIVIDAD ALT

1.4.4.1 ALT COMO MARCADOR DE LESIONES HEPÁTICAS

Los niveles de actividad ALT en suero se utilizan como marcador biológico para la detección de lesiones hepáticas (Karmen et al., 1955; Sherman, 1991). Una actividad ALT elevada en suero se asocia a daño hepático, hepatitis, cirrosis o hepatotoxicidad por drogas (Dufour et al., 2000; Bondini et al., 2007). Estudios recientes indican que niveles elevados de actividad ALT en humanos también están asociados con patologías como la obesidad (Iacobellis et al., 2007; De Luis et al., 2007), enfermedades musculares, (Begum et al., 2000; Nathwani et al., 2005), diabetes tipo 1 (Thakran et al., 2003; West et al., 2006), enfermedad aterosclerótica coronaria (Schindhelm et al., 2007, Sung et al., 2008), síndrome metabólico (Wannamethee et al., 2005) y el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Vozarova et al., 2002; West et al., 2006; Sattar et al., 2007).

El mecanismo por el cual la ALT intracelular aparece en suero es debido en su mayor parte a la fuga desde los hepatocitos dañados (Gores et al., 1990). Sin embargo, otros mecanismos y tejidos pueden estar involucrados en la liberación de ALT, ya que niveles elevados de ALT se han observado en estudios histopatológicos preclínicos sin evidencias de daño hepático (Valentine et al., 1990; Draper et al., 1994; O'Brien et al., 2002).

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) es probablemente la causa más común de valores de ALT incrementados entre los adultos en países occidentales, pudiendo afectar hasta un 3% de la población (Ludwig et al., 1980; Ruhl y Everhart, 2003). Los factores de riesgo para NAFLD son: obesidad, diabetes e hiperlipidemia (Bacon et al., 1994). Niveles elevados de ALT pueden ser un componente del síndrome metabólico, un marcador de la resistencia a la insulina, manifestada por hiperglucemia, hiperlipidemia, obesidad abdominal e hipertensión. En estos pacientes, los ensayos de ALT facilitarían el diagnóstico oportuno de NAFLD antes de que haya ocurrido fibrosis irreversible en el hígado. Una actividad ALT alta puede ser la única pista para determinar esta patología ya que no existen pruebas serológicas definitivas que confirmen el diagnóstico. Además, los pacientes con niveles de ALT elevados, entre aquéllos que presentan componentes del síndrome metabólico, pueden representar un subgrupo de propensos a una inflamación sistémica que a su vez, aumenta el riesgo de aterosclerosis, dando lugar a enfermedad arterial coronaria o cerebrovascular (Kerner et al., 2005).

1.4.4.2 ALT COMO MARCADOR DE LESIONES CORONARIAS

Incrementos de la actividad ALT sérica aumentan significativamente el riesgo de sufrir una enfermedad coronaria, incluso después del ajuste de ingesta de alcohol y del componente de síndrome metabólico (Schindhelm et al., 2007). Se ha sugerido que en la población en general, la ALT puede ayudar a predecir la mortalidad cardiovascular a 10 años vista independientemente de los factores de riesgo cardiovasculares, tales como la presión sanguínea sistólica, hemoglobina glicosilada, colesterol LDL e índice de masa corporal.

1.4.4.3 ALT COMO MARCADOR DE DIABETES TIPO 2

En años recientes se ha publicado un creciente número de estudios que apoyan la hipótesis de que niveles elevados de actividad ALT sérica dentro del rango normal, pueden ser considerados un marcador para el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Vozarova et al., 2002; Hanley et al., 2004; West et al., 2006; Sattar et al., 2007; Krakoff et al., 2010). Aunque el mecanismo molecular tras este efecto sigue siendo una incógnita, el exceso de grasa en el hígado que conduce a NAFLD y a una actividad ALT aumentada parece contribuir al desarrollo de la resistencia a insulina y diabetes tipo 2 (Westerbacka et al., 2004; Schindhelm et al., 2006; Chang et al., 2007). El mecanismo que podría explicar la elevación de ALT en suero puede ser la necesidad de sustratos gluconeogénicos, en particular alanina, en el hígado de pacientes con diabetes tipo 2, que se caracterizan por una mayor tasa de gluconeogénesis hepática (Zawadzki et al., 1988; Schindhelm et al., 2006).

1.5 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

La diferenciación de las células de un organismo multicelular depende de la inactivación de ciertos grupos de genes y de la activación de otros, es decir, de un patrón específico de regulación de la expresión génica.

Una gran variedad de proteínas reguladoras desempeñan papeles centrales en la regulación de la expresión génica. Para poder iniciar la transcripción, la RNA polimerasa requiere que un grupo de proteínas, denominadas factores de transcripción, se ensamblen en la región promotora del gen que se va a transcribir. Esto permite la unión de la RNA polimerasa y la posterior transcripción. En eucariotas, la transcripción de un gen responde a la integración de diferentes proteínas reguladoras,

algunas de las cuales tienden a estimular la transcripción del gen y otras a inhibirla. Además, existen secuencias en *cis* de regulación positiva que pueden estar lejos de la secuencia promotora a la que se une la RNA polimerasa, como las denominadas secuencias *enhancer* (potenciadoras), por incrementar la transcripción.

El grado de condensación y, en general, los cambios en la estructura de la cromatina, desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica en las células eucariotas, ya que la transcripción no se puede producir en las zonas donde la cromatina está muy condensada o no accesible a la formación del complejo de transcripción, pudiendo distinguirse, por lo tanto, entre una cromatina activa transcripcionalmente y una cromatina inactiva (Thomas y Chiang, 2006; Li et al., 2007; Misteli, 2007). Otro factor que está involucrado en la regulación génica es la metilación del DNA. La metilación diferencial de ciertos genes, que ocurre durante la gametogénesis, desempeña un papel importantísimo en el desarrollo temprano del embrión.

A modo de organización temporal de los procesos de regulación en la expresión génica, se señalan las siguientes etapas de regulación: control transcripcional, modificación postranscripcional, síntesis proteica y control postraducciona.

CONTROL TRANSCRIPCIONAL Y MODIFICACIÓN POSTRANSSCRIPCIONAL

Por medio de la regulación del inicio de la transcripción se determina qué genes se activan o reprimen en un momento determinado. Este nivel de regulación se logra a través de mecanismos muy diferentes. Uno de ellos implica mantener inhibidos ciertos genes: en determinados tipos celulares, hay regiones de DNA que están siempre silenciadas y cuyos genes no se transcriben nunca. Otro mecanismo involucra a regiones reguladoras, ubicadas en la secuencia anterior al inicio de la transcripción. Estas secuencias permiten la unión de factores de transcripción que pueden facilitar o impedir la unión de la RNA polimerasa al promotor, regulando de esta manera la cantidad de mensajeros producidos. Para que la transcripción ocurra es necesario que la RNA polimerasa se una al promotor del gen. Este paso de unión es regulado por factores de transcripción que interactúan en secuencias concretas con elementos de control del DNA situados en promotores o secuencias potenciadoras (Orphanides y Reinberg, 2002).

A diferencia de las bacterias, la gran mayoría de los genes de los vertebrados contienen intrones. Los intrones del DNA son transcritos junto con los exones por las RNA polimerasas. A continuación, los intrones son eliminados del transcrito primario de RNA (pre-mRNA) y los exones empalmados, para formar un RNA maduro y funcional. Este mecanismo es importante en la regulación postranscripcional y se denomina procesamiento alternativo del mRNA. Este proceso puede generar proteínas diferentes y fue evidenciado por primera vez en la cadena pesada de una

inmunoglobulina por Baltimore et al. (1988). En algunos casos, la secuencia del mRNA es modificada tras ser transcrita. Los cambios incluyen la inserción de nucleótidos en regiones específicas, lo que motiva un desplazamiento en el marco de lectura y genera la expresión de proteínas muy diferentes (edición del RNA).

En humanos el procesamiento alternativo del RNA es más una regla que una excepción porque se estima que afecta a la expresión de casi el 65% de genes (Kim et al., 2007). Está establecido que el procesamiento alternativo puede ser cotranscripcional y que no sólo depende de la interacción de factores de procesamiento alternativo, como proteínas ricas en serina y arginina, sino también con secuencias diana en el pre-mRNA, y secuencias asociadas a la transcripción por RNA polimerasa II (Cáceres y Kornblihtt, 2002; Maniatis y Reed, 2002; Kornblihtt et al., 2004; Bentley et al., 2005)

Posteriormente el mRNA se transloca al citosol. Si el mRNA no ha sido procesado correctamente se degrada en el núcleo. Durante la traducción, la información génica del mRNA será traducida por los ribosomas, en el citoplasma.

El mRNA contiene en sus extremos 5' y 3' secuencias que no son traducidas (UTR) y que sirven para regular la traducción. Estas secuencias son importantes para el reconocimiento por parte del ribosoma, de lo contrario el RNA no es reconocido por el ribosoma y no se puede traducir el RNA mensajero. Por otro lado, las secuencias que flanquean el codón inicial (AUG) son determinantes para el inicio de la traducción.

La estabilidad del mRNA juega un papel importante en la regulación de la expresión de proteínas. La vida media de un mRNA está determinada principalmente por la longitud de la cola poliA. Una vez en el citoplasma, la secuencia comienza a acortarse; cuando se hace demasiado corta el mensajero es degradado (Lehninger et al., 2009).

En eucariotas, incluyendo nemátodos, mosca de la fruta, vegetales, y animales vertebrados, se ha descubierto una clase de moléculas de RNA de interferencia (RNAi) que son capaces de silenciar genes específicos. Este sistema de RNAi, es utilizado como un mecanismo endógeno para proteger al organismo contra virus invasores de RNA (particularmente importantes en plantas, que carecen de sistema inmune) y controlar la actividad de transposones (Hannon, 2002; McCaffrey et al., 2002a,b).

1.5.1 SILENCIACIÓN GÉNICA

El knockout es una técnica que permite eliminar la expresión de un gen específico en un organismo por eliminación o sustitución de un gen, para generar una versión no funcional, incapaz de

producir la proteína que codificaba el gen original. Diversos estudios fueron determinantes para poder obtener ratones, hámsters y ratas *knockout* (Evans et al., 1981; Smithies et al., 1985; Capecchi et al., 1989).

Ma et al. (2001) utilizaron una línea celular de bazo de trucha arcoíris (RTS34st) para formar una monocapa de cultivo en donde se colocaron embriones de pez cebra, que carecen de pigmentación, para potenciar el crecimiento de los embriones de pez cebra. A los embriones se les introdujo células transgénicas en cultivo derivadas de pez cebra (B7-43), que sí poseen pigmentación. Cuando estas células fueron microinyectadas a los embriones, se obtuvo una eficiencia de obtención de quimeras del 4%, mientras que la frecuencia de obtención de quimeras en células de ratón es del 5%-14%. Sin embargo, el pez cebra tiene un gran número de embriones disponibles para microinyectar y su fase de desarrollo tan sólo dura cuatro días, lo que hace de éste un sistema muy atractivo para determinar la función de genes a gran escala.

Sin embargo hasta la fecha, no se ha logrado producir *knockouts* en otros peces, dado que es una técnica muy tediosa y poco eficaz en animales con un periodo de desarrollo más largo, como es el caso de peces de interés comercial.

1.5.2 SILENCIACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL

Recientemente, se han explorado otro tipo de vías de silenciamiento génica con el objeto de disminuir o anular la expresión de genes. Una alternativa a la delección permanente de la expresión génica es la silenciamiento posttranscripcional transitoria, *knockdown*, utilizando RNA de doble cadena (dsRNA) para diseñar un RNA de interferencia (RNAi), lo que resulta en una de las técnicas más prometedoras para estudiar la función génica (Fire et al., 1998; Elbashir et al., 2001). En la última década, moléculas de entre 20 y 30 nucleótidos de RNA han surgido como reguladoras de la expresión y función génica en eucariotas. La maduración de los RNA es un proceso gradual catalizado por RNAsas específicas de tipo III, denominadas Dicer/Drosha, que contienen RNAsas III catalíticas y dominios de unión a dsRNA (dsRBDs). Los RNAi se agrupan en dos categorías principales: pequeños RNA de interferencia (siRNAs) y microRNAs (miRNAs); ambos se han encontrado en líneas celulares somáticas y germinales, de una amplia gama de especies eucariotas, para regular genes endógenos y defender el genoma de ácidos nucleicos invasores (Carthew, 2009). Tanto los siRNAs como los miRNAs proceden de precursores más largos expresados en el núcleo (Fig. 4). Estos precursores son procesados en el citosol por la enzima Dicer para obtener los productos maduros.

Los peces fueron los primeros vertebrados en los que se utilizó el *knockdown* de la expresión génica por RNAi (Wargelius et al. 1999). El pez cebra (*Dario rerio*) es un modelo muy utilizado para estudios de función génica. Las características de este organismo (un tiempo corto de generación, fertilización externa y embriones transparentes, aptos para realizar manipulaciones de DNA, transferencia celular y transplantes) lo hacen un modelo valioso para estudios genéticos del desarrollo (Streisinger et al., 1981; Nusslein-Volhard et al., 1994). A principios de 2002, varios grupos demostraron que los siRNA no sólo pueden ser introducidos de manera exógena, sino que también se podían expresar intracelularmente mediante vectores que contienen *cassettes* para expresión de siRNA, con las secuencias inhibidoras sentido y anti-sentido separadas mediante horquillas cortas de RNA (shRNA). Los shRNA, ofrecieron soluciones a algunos inconvenientes que comenzaron a ponerse de manifiesto con la utilización de los siRNA, como son la eficiencia de transfección y su estabilidad. Los shRNA son procesados intracelularmente mediante la enzima Dicer para dar lugar a siRNA maduros (Yu et al., 2002; Paul et al., 2002).

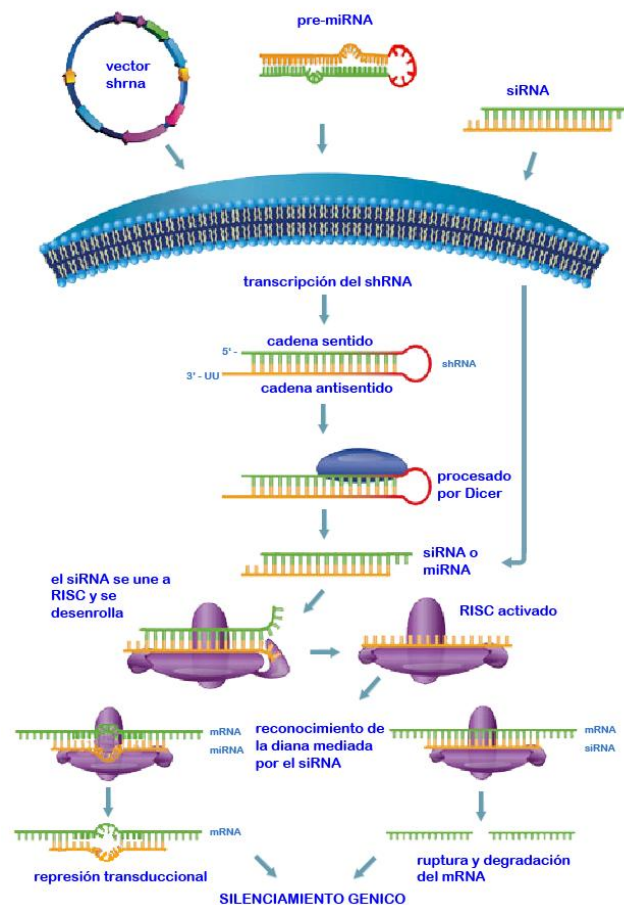


Figura 4. Silenciamiento génico mediante siRNAs, miRNAs y shRNAs. Dicer procesa a los pre-miRNAs y shRNAs en dúplex de siRNA o miRNA que contienen grupos monofosfato 5' y 2 nucleótidos 3' protuberantes. A continuación, estos dúplex son desenrollados e incorporados al complejo RISC. El grado de complementariedad entre el siRNA/miRNA y el mRNA diana parece ser determinante para promover la silenciamiento génico específica mediante degradación o represión. Imagen tomada y modificada de Genetic Engineering & Biotechnology News, 2008.

En cuanto a los miRNAs, una de las cadenas de los miRNAs maduros (de 22 nucleótidos de longitud, con 2 nucleótidos protuberantes) se une a un complejo de silenciación inducido por RNA (RISC), que le permite unirse a la zona 3' de la región UTR a silenciar. Hasta la fecha, los modelos de unión no específica de un miRNA a su diana de mRNA siguen en discusión. Se han propuesto varios modelos respecto al modo de silenciación, incluyendo la inhibición del inicio de la traducción o de los pasos de elongación, degradación del mRNA, relocalización celular, pérdida del cap 5' y desadenilación. En cualquier caso, el resultado del efecto del miRNA es un silenciamiento postranscriptional de la expresión del gen diana (Eulalio et al., 2008).

En contraste, los siRNA son diseñados para complementar perfectamente con su secuencia diana en el mRNA (Pei et al., 2006). La unión entre el siRNA y su diana inducirá en ésta un sitio de corte para un componente del complejo RISC, la proteína Argonauta-2 (Ago-2). De las cuatro proteínas humanas que se encuentran en el corazón del complejo RISC, sólo Ago-2 tiene la capacidad de cortar el mRNA, para permitir su posterior degradación por RNAsas celulares (Hutvagner et al., 2008; Tolia et al., 2007; Song et al., 2006). En comparación con la maquinaria del miRNA, los resultados obtenidos con los siRNA son sustancialmente más potentes y resultan en una ablación superior de la expresión génica. Por razones aún no esclarecidas plenamente, sólo los RNAi que se complementan perfectamente con el mRNA inducirán la acción de Ago-2.

De manera natural los shRNAs, en contraposición a los siRNAs, son sintetizados en el núcleo celular, procesados y transportados al citoplasma, para incorporarse posteriormente al complejo RISC y ejercer su efecto silenciador (Cullen et al., 2005). Para que sean eficaces, los shRNA están diseñados para seguir las reglas específicas de la maquinaria celular y presumiblemente se procesan de forma similar a los miRNA (Zeng et al., 2005). El procesamiento de los shRNA dentro de células transfectadas se muestran en la figura 4. Los shRNAs endógenos en forma de pre-shRNA son cortados por Droscha en el núcleo y una vez en el citoplasma maduran mediante la acción de Dicer, mientras que los shRNA expresados mediante vectores solo son procesados por Dicer en el citoplasma. Los *cassettes* de los vectores utilizados para expresar los shRNAs, pueden ser transcritos en el citoplasma por acción de las RNA polimerasas II o III, mediante promotores como: CMV, U6 o H1. La utilización de señales de terminación permite que los shRNAs se transformen en moléculas de dsRNA para cumplir su propósito de silenciamiento génico. Además, los shRNAs tienen la posibilidad de poder utilizar promotores inducibles para que sean expresados de manera dependiente de tiempo y tejido.

Un aspecto negativo a considerar en la utilización de los shRNAs es que podrían no ser tan específicos como se había pensado. De hecho, un único RNA artificial puede desencadenar y afectar a la expresión de cientos de genes celulares, fenómeno denominado *off-targeting* (Jackson et al., 2003, 2006a, 2006b; Burchard et al., 2009; Rao et al., 2009). Esto puede ocurrir mediante la unión de la

cadena codificante del RNAi a múltiples secuencias de mRNA (un riesgo que se reduce por las mejoras en el diseño de algoritmos de predicción de siRNAs). El fenómeno de *off-targeting* es mucho más difícil de predecir y de eliminar que el silenciamiento mediado por miRNA (Jackson et al., 2006).

En 1985, Summerton ideó estructuras tipo morfolino (MOS), análogos de los ácidos nucleicos de 25 pares de bases, que permiten una silenciación génica solventando importantes limitaciones de los RNAi como son: la degradación por nucleasas, poca predictibilidad de dianas, baja especificidad, y una variedad de actividades no relacionadas con la inhibición antisentido. En los sistemas en los que uno desea bloquear la traducción del mRNA de una proteína normal, de manera independiente de RNAsas, los oligonucleótidos MOS antisentido ofrecen resistencia completa a nucleasas, generalmente tienen una buena predicción, alta eficacia, excelente especificidad, y se ha sugerido que pueden exhibir poca o ninguna actividad que no sea antisentido (Stirchak et al., 1989; Summerton et al., 1999). La síntesis de los MOS se logra introduciendo un grupo amina en un ribonucleósido, transformando la ribosa a MOS. Las subunidades de MOS resultantes pueden polimerizarse para formar oligonucleótidos antisentido, proceso que no implica catalizadores específicos y pasos de oxidación, necesarios en la producción de sus análogos de siRNAs. Además, los MOS no presentan carga eléctrica lo que los hace virtualmente invisibles dentro de las células u organismos.

Los oligonucleótidos MOS son herramientas antisentido de silenciación génica muy utilizadas en pez cebra, habiendo sido utilizados entre otros, para acelerar el descubrimiento de la función génica a gran escala. En varios estudios realizados en peces, se han determinado aproximadamente unas 4000 proteínas que contienen un péptido señal que las convierte en proteínas de secreción, y que desempeñan un papel importante durante la organogénesis (Pickart et al., 2006; Eckfeldt et al., 2005). Para ensayos de función génica, Lan et al. (2007), utilizando MOS contra el gen UTX, que regula la modificación de las histonas, pudo observar que se producen defectos en el desarrollo de los embriones. En otro trabajo, Nasevicius et al. (2000) muestran que mediante el uso de MOS se inhiben de forma efectiva la traducción genética del mRNA de los genes *no tail*, *cordin*, *oep*, *nacre* y *sparce* en pez cebra.

1.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y DE LA ACTIVIDAD ALT

Hasta la fecha son muy escasos los estudios realizados sobre silenciamiento génico de las transaminasas. Existe un trabajo en el que se describe la utilización de siRNA sintéticos para efectuar la silenciamiento de AST (Thornburg et al., 2008). En este trabajo se utilizaron células de adenocarcinoma de mama, y siRNA anti AST, observando una disminución de los niveles de la proteína AST hasta un 35% aproximadamente.

Se han ensayado distintos compuestos con el objetivo de inhibir la actividad de las transaminasas a nivel postraducciona. En estudios realizados en rata se ha estudiado el efecto inhibitor del aminooxiacetato (AOA), hidroxilamina, hidroxibenzoato de mercurio, HgCl₂, glutarato y maleato (Vedavathi et al., 2004). Trabajos anteriores habían descrito el efecto del AOA como inhibitor de las transaminasas en mitocondrias aisladas de cerebro y en células aisladas de hígado (Hotta, 1968; Parrilla et al., 1974; Rognstad y Clark, 1974; Yu et al., 1982; Fitzpatrick et al., 1983). Cornell et al. (1984) determinaron el efecto del AOA sobre la actividad ALT y AST en hepatocitos de rata, observando inhibición de ALT y AST en presencia de AOA (1 y 5 µM) y que el efecto inhibitor era más intenso en el caso de ALT. En el trabajo de Anemaet et al. (2008) se estudió un análogo del piruvato, el oxamato, con el fin de determinar su efecto sobre la actividad ALT. Se observó un descenso de la actividad ALT, cuando la reacción se determina en el sentido de formación de alanina a partir de piruvato en extractos de levadura que sobreexpresaban cALT1 y cALT2. El porcentaje de inhibición sobre cALT2 fue mayor que sobre cALT1.

1.6.1 INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ALT POR AMINOOXIACETATO

El AOA ha sido utilizado en estudios metabólicos con la intención de producir inhibición de las transaminasas. El AOA es un compuesto derivado de la hidroxilamina que contiene un grupo éster, que puede reaccionar con el piridoxal para formar una oxima. En la ALT de hígado de rata, la inhibición que ejerce el AOA es competitiva con respecto a los sustratos aminoácidos y no competitiva con respecto a los cetoácidos. Las constantes de inhibición observadas a pH 7.3 fueron de 34, 83, 97 y 40 nM frente a alanina, glutamato, piruvato y α-cetoglutarato, respectivamente (Hopper & Segal, 1962). La isoenzima mitocondrial de la ALT de rata parece ser más sensible al AOA que la isoforma citosólica (DeRosa et al., 1978). En estudios realizados por Seglen et al. (1978), la síntesis de proteína en hepatocitos de rata se estimuló tras la adición de una mezcla de aminoácidos, así como tras la adición individual de ciertos aminoácidos, especialmente alanina. El AOA, ejerció un fuerte

efecto inhibitor sobre la síntesis de proteínas (70% de inhibición), lo que indica que estaría influyendo en la síntesis de proteínas a través de la inhibición de las transaminasas. Srivastava et al. (2004) comprobaron que el AOA ejerce un fuerte efecto inhibitor sobre la actividad de la ALT citosólica purificada de hígado de dos especies de peces (*Clarias batrachus* y *Labeo rohita*). En estos estudios, el mecanismo de inhibición observado es competitivo para L-alanina y no competitivo respecto a α -cetoglutarato. Yang et al. (2008), al estudiar el efecto del AOA, en hepatocitos de rata perfundidos con lactato o piruvato, observaron la presencia de aductos de condensación de AOA con piruvato, α -cetoglutarato y con oxaloacetato.

1.7 INTRODUCCIÓN DE DNA EXÓGENO EN CÉLULAS EUCARIOTAS

La introducción de DNA y moléculas de RNA en células de mamífero en cultivo requiere el uso de diversos métodos de transfección que, en parte, dependerán de las líneas celulares que se utilicen y el tipo de experimentos que se realicen. Para realizar la transfección se utilizan métodos virales (retrovirus, adenovirus, lentivirus) y no virales (mediada por liposomas, lípidos no liposomales, polímeros, electroporación).

El uso de vectores virales muestra alta eficiencia (generalmente $> 90\%$) tanto para la introducción del DNA como para su expresión. De hecho, alrededor del 75% de los últimos protocolos de ensayos clínicos de terapia génica utilizaron vectores virales para la introducción de material génico exógeno. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha presentado ninguna evidencia definitiva sobre la eficacia clínica de la utilización de vectores virales como protocolo de terapia génica. Entre las limitaciones de la introducción de DNA mediada por virus se encuentran: la toxicidad, restricción a determinados tipos de células, limitada capacidad de carga de DNA, producción, problemas de ensamblaje, recombinación, y alto coste (Tripathy et al., 1996). Por estas razones, otros sistemas, especialmente sistemas de introducción de DNA sintético, han pasado a ser cada vez más utilizados en investigaciones básicas y clínicas.

Los liposomas son análogos sintéticos de la bicapa lipídica de la membrana celular. Estos compuestos contienen una serie de características físicas de los fosfolípidos, incluyendo la presencia de regiones hidrófobas e hidrofílicas que permiten la formación de esferas liposomales en condiciones acuosas. En presencia de DNA (shRNA) o RNA (siRNA o miRNA), los liposomas son capaces de interactuar y encapsular ácidos nucleicos creando así un sistema de transfección eficiente. La utilización con éxito de complejos liposomales para introducir ácidos nucleicos exógenos en

determinados sistemas biológicos depende de varios factores, entre ellos la formulación de los lípidos, carga, granulometría así como el método de preparación de los liposomas.

Diferentes lípidos catiónicos han sido investigados para introducir genes exógenos en las células y organismos (Eichhorn et al., 2007; Morrey et al., 2008; Lu et al., 2009). Por otra parte, sólo algunos polímeros de otros tipos han sido estudiados minuciosamente: polietilenimina > poli-L-lisina > quitosán > poliamidoamina, ordenados según el número de estudios (Lee et al., 2001; Wu et al., 2002). Esta lista de polímeros catiónicos no es en absoluto exhaustiva y nuevos polímeros y modificaciones de éstos están apareciendo continuamente.

Quitosán es el nombre dado a un grupo de polímeros catiónicos lineales de glucosamina y N-acetilglucosamina que derivan de biopolímeros naturales de quitina por un proceso de desacetilación (Skaugrud. 1989). Se ha mostrado que el quitosán es efectivo como vector no viral de ácidos nucleicos (Guang Liu et al., 2002). Este compuesto es relativamente poco tóxico. (Lee et al., 2001). El quitosán promueve la absorción nasal de la insulina en ratas y ovejas y mejora el transporte de péptidos *in vitro* e *in vivo* (Lehr et al., 1992). Holme et al. (2000) utilizaron la resistencia eléctrica transepitelial para investigar el efecto de quitosán de diversos pesos moleculares y diferentes grados de acetilación sobre la permeabilidad intestinal, en estudios realizados con células epiteliales humanas (Caco-2). Se comprobó que quitosán con un alto grado de acetilación y un grado de polimerización > 50 resultó más eficiente en las células epiteliales. Se ha demostrado también que el quitosán induce a que células de mamíferos pueden interactuar con la superficie de glicoproteínas, y algunos estudios han indicado que el quitosán puede entrar en la célula mediante endocitosis (Carreño-Gómez y Duncan, 1997).

El quitosán tiene un pKa aparente de 6.5, por tanto, es soluble en soluciones ácidas (pH 1-6) donde la mayoría de los grupos amino se encuentran protonados, y se acompleja con diferentes componentes en soluciones a valores de pH superiores a 6. Estudios recientes han demostrado que sólo la forma soluble protonada del quitosán, es decir, en su configuración abierta, puede desencadenar la apertura de las uniones herméticas celulares, y facilitar el transporte de compuestos hidrofílicos (Van der Lubben et al., 2001). Esta propiedad implica que el quitosán sería eficaz como un potenciador de absorción sólo en un área limitada, el lumen intestinal donde los valores de pH son cercanos a su pKa (por ejemplo en el duodeno proximal).

Mumper et al. (1996) fueron los primeros en proponer la introducción de material génico en las células utilizando quitosán como transportador. Los complejos quitosán-DNA con valores medios entre 150 a 600 nm de diámetro pueden formarse al mezclar una cierta proporción de quitosán y de DNA plasmídico. Los tamaños de partículas utilizados están relacionados con el peso molecular del quitosán (108 a 540 kDa), y no con la composición del tampón. Otros investigadores mostraron que el

peso molecular del quitosán, la concentración del DNA, concentración salina, pH, la carga y la temperatura, influyen en el tamaño del complejo quitosán-DNA (Janes et al., 2001a,b; Borchard et al 2001a,b).

El potencial zeta es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de las partículas en suspensión. Erbacher et al. (1998) propusieron que cuando el potencial zeta del quitosán dentro de la partícula se aproxima a 0, tienden a formarse partículas con un tamaño de 1 a 5 μm . Además de tener la habilidad de formar complejos con el DNA/RNA, el quitosán también los protege de la acción de las nucleasas y mostraron que pueden ser incorporados en tejido de hígado, pulmón, bazo y riñones (Richardson et al., 1999). Varios estudios han demostrado que el tamaño de los complejos DNA-quitosán oscila entre 80 y 500 nm (MacLaughlin et al. 1998; Richardson et al., 1999). Estudios recientes han demostrado que además del tamaño de las partículas de quitosán, es importante la carga superficial que tengan las partículas (Dash et al., 2010).

Se ha investigado en detalle el efecto de pH, suero, concentración, peso molecular, formulación, modificaciones en su estructura o la incorporación de aditivos para mejorar la estabilidad del complejo DNA/RNA-quitosán para facilitar la transfección del material génico y hacerlo una herramienta de transferencia génica efectiva (Sato et al., 2001; Ishii et al., 2001; Mao et al., 2009). Para determinar la capacidad de transferencia de genes encapsulados con quitosán *in vitro*, se transfectaron células de carcinoma pulmonar A549 con un plásmido que codifica para la luciferasa (pGL3), estudio que se llevó a cabo en un medio con suero a diferentes pHs. La eficiencia de transfección a pH 6.9 fue más elevada que a pH 7.6. A pH 7, los grupos amina del quitosán se encuentran protonados, y los complejos DNA quitosán tienen carga positiva, lo que facilita la interacción con la células cargadas negativamente.

Los derivados de quitosán han demostrado ser una sistema de transfección de DNA eficiente en hígado (Richardson et al., 1999; Schatzlein et al., 2005). En base a los estudios realizados anteriormente, Howard et al. (2006, 2009a,b) encapsularon moléculas de siRNA en micropartículas de quitosán y observaron que fueron eficaces tanto *in vivo* como *in vitro*. Para los estudios *in vivo* han utilizado siRNA anti TNF alfa logrando una inhibición de aproximadamente de un 66% en macrófagos peritoneales por administración intraperitoneal a ratones. En otros estudios de funcionalidad génica realizados por Ji et al. (2009) en los que se estudió la administración de un complejo de quitosán-siRNA o de un complejo lipofectamina-siRNA, se observó una inhibición de la expresión de FHL2 de un 30% respecto al control, con ambos complejos, en células de cáncer colorectal humanas en cultivo.

La transferencia de genes para expresión génica transitoria en peces es importante por ejemplo para la administración de vacunas de DNA y prevenir enfermedades importantes en especies

comerciales (Anderson et al., 1996). Este método de la transferencia de genes, también conocido como inmunización con DNA, es útil para la introducción de moléculas biológicamente importantes que pueden ser expresadas por medio de DNA recombinante (Robinson y Torres, 1997). La transferencia transitoria y expresión de genes en animales que serán utilizados para consumo humano crean inquietud en el público en general. Sin embargo a diferencia del caso de los organismos modificados genéticamente en los que el DNA se ha integrado en el genoma del animal, el DNA exógeno para inmunización no se integra en el genoma del animal, y se pierde después de un tiempo (Winegar et al., 1996). El éxito de la inmunización transitoria mediante genes en los peces ha sido descrito también por Hansen et al. (1991), Anderson et al. (1996) y Sulaiman et al. (2000). En la mayoría de estos estudios la expresión génica se observó tras la inyección intramuscular en peces. Las vacunas de DNA también han sido administradas a peces oralmente con resultados positivos (Corbeil et al., 2000). La inyección intramuscular es un método poco factible para la piscicultura, pues requeriría la inyección de cientos de miles de peces.

Ramos et al. (2005) reportaron la viabilidad de la transferencia de genes en peces utilizando el quitosán. Los complejos quitosán-DNA plasmídico se suministraron oralmente a los peces, o incorporándolos a la dieta de tilapias (*Oreochromis niloticus*). En la administración con la dieta, los peces permanecieron en ayuno 24 h antes de ingerir 50 μ g de plásmido por pez (acomplejado con quitosán) para expresar el gen reportero β -galactosidasa (β -gal). Ya sea mediante la administración oral, o por incorporación de los complejos quitosán y DNA en la dieta, estos autores observaron la expresión de β -gal en el bazo, estómago, e intestino de estos peces. En otros estudios se utilizó β -ciclodextrina encapsulada con quitosán para eliminar *Philasterides dicentrarchi*, parásito que causa grandes pérdidas en acuicultura. La encapsulación de β -ciclodextrina en complejos de quitosán, es eficiente para eliminar casi el 100% de parásitos (Parama et al., 2005).

1.8 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica de análisis que permite una identificación inequívoca de diferentes compuestos moleculares. Además, mediante RMN se puede cuantificar la concentración de las distintas moléculas presentes en una mezcla. Esta cuantificación puede ser absoluta, utilizando patrones externos o internos en la muestra, o relativa, mediante la determinación de las proporciones existentes entre los distintos componentes de la mezcla. La espectrometría ^1H RMN suministra información de la concentración submilimolar en fluidos corporales, tejidos y células. Esta técnica requiere cantidades relativamente pequeñas de muestra y evita el uso de pasos de derivatización o extracción para investigar grupos específicos de metabolitos,

como se requiere en las técnicas convencionales de muestreo metabólico. Un gran número de estudios han demostrado el valor de la técnica de espectrometría ^1H RMN para caracterizar el perfil metabólico de fluidos y tejidos (Beckonert et al., 2007). En *S. aurata* se han realizado estudios de caracterización del perfil de metabolitos en músculo de dorada para importantes biomarcadores como inosina-5' monofosfato, glucógeno, alanina, histidina y glicina (Savorani et al., 2010).

La espectrometría ^1H RMN nos indica la cantidad de metabolitos presentes en una muestra, sin embargo, para poder obtener datos sobre la tasa de recambio de un metabolito, deben ser contempladas otras técnicas. Para este fin, el deuterio (^2H), ha sido utilizado para medir la tasa de recambio de proteínas en ratones, ratas y humanos (Previs et al., 2004; Bederman et al., 2006; Busch et al., 2006; Belloto et al., 2007; Yuan et al., 2008; Gasier et al., 2009a). Gasier et al. (2009b) determinaron la tasa de recambio de proteína en *Ictalurus punctatus* mediante la adición de $^2\text{H}_2\text{O}$ a concentración del 4%, a los acuarios que contenían los peces. Ya que los peces y mamíferos comparten vías metabólicas comunes para la producción y degradación de glucosa, se pueden utilizar en los peces los principios de enriquecimiento de metabolitos ya validados en mamíferos (Landau et al. 1996). Barosa et al. (2009) demostraron que es posible medir el enriquecimiento en ^2H de glutamina mediante ^2H RMN y determinar si ésta proviene de α -cetoglutarato o citrato derivado del ciclo de Krebs.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Los peces carnívoros han adaptado su metabolismo a la utilización de dietas de alto contenido en proteína. Estos animales presentan baja capacidad para utilizar carbohidratos y muestran hiperglucemia después de la administración de glucosa o cuando son alimentados con dietas ricas en carbohidratos. La intolerancia a la glucosa de los peces carnívoros es una característica distintiva de la diabetes tipo 2 en humanos.

La actividad sérica de ALT es un biomarcador para varias enfermedades humanas, entre ellas diversas enfermedades hepáticas. El descubrimiento reciente de su relación con la diabetes tipo 2, abre nuevas perspectivas para el desarrollo de drogas y nuevas tecnologías biomédicas con el fin de realizar un diagnóstico más preciso y mejorar el tratamiento de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad ALT.

A pesar de la amplia utilización de la determinación de la actividad ALT en bioquímica clínica como marcador de patologías hepáticas, no hay suficientes estudios realizados sobre la funcionalidad de las isoformas ALT. Conocer los posibles efectos metabólicos derivados de la inhibición de ALT en peces puede ayudar a establecer nuevas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Así, en acuicultura, identificar qué efectos tendría la modulación de la actividad ALT sería de interés para conocer si es posible efectuar una sustitución parcial de las proteínas de la dieta por carbohidratos u otros nutrientes, a fin de reducir el coste de las dietas y disminuir la eutrofización del agua resultado de la acuicultura.

Previamente, nuestro grupo ha estudiado la actividad ALT en hígado y su papel como indicador del estado nutricional y de la utilización de proteínas en peces (Metón et al., 1999; Fernández et al., 2007). Recientemente, nuestro grupo clonó y mostró la localización subcelular de tres isoformas hepáticas de ALT en *S. aurata*: las isoformas citosólicas cALT1 y cALT2, y la isoforma mitocondrial mALT (Metón et al., 2004; Anemaet et al., 2008).

Asimismo, nuestro grupo ha clonado y caracterizado los promotores de los genes citosólicos y mitocondrial de ALT (Anemaet et al., 2010; Salgado et al., 2012). En esta tesis se abordó el estudio de las funciones metabólicas que desempeña ALT en dorada, para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos:

- I. Diseño y validación de siRNAs para silenciar la expresión de las isoformas de ALT.
- II. Silenciación génica de ALT *in vitro* e *in vivo*: siRNA, shRNAs y nanopartículas vehículo.

OBJETIVOS

- III.** Inhibición postraduccionaI de la actividad ALT *in vivo* e *in vitro* por aminooxiacetato.
- IV.** Detección mediante RMN de cambios en el metabolismo intermediario asociados a la inhibición de la actividad ALT por aminooxiacetato.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de este trabajo se han utilizado muestras biológicas procedentes de dorada (*Sparus aurata*). La dorada es un teleosteo que pertenece a la familia Sparidae, del orden de los Perciformes. Tiene el cuerpo en forma oval y comprimido, y se caracteriza por la presencia de una franja dorada, situada entre los ojos y una mancha oscura sobre el opérculo. Puede llegar a pesar más de 5Kg, y tener 70 cm de longitud.

La dorada es propia del Mediterráneo. Se encuentra también en el Mar Negro, Mar Rojo y las costas orientales del Atlántico, desde las islas británicas hasta Senegal.

Es una especie litoral, euriterma (5-35 °C de temperatura) y eurihalina (capaz de crecer en diferentes condiciones de salinidad). Generalmente se encuentran individuos solitarios o formando grupos reducidos, aunque cuando son jóvenes pueden reunirse en grupos más numerosos. Se encuentran a una profundidad que oscila entre los 30 y 150 m. Es de hábitos predadores, su dieta natural es preferentemente carnívora y consiste básicamente en la ingesta de proteína procedente de moluscos, crustáceos y peces pequeños.

Las doradas constituyen una especie hermafrodita proterándrica, que no se diferencia sexualmente hasta el primer año de vida; posteriormente, se comportan como machos durante 2-3 años y se diferencian finalmente de manera definitiva a hembras.

Es una especie muy apreciada en los países europeos del Mediterráneo, por lo cual la pesca y el cultivo de esta especie tiene un gran impacto económico y alimenticio en esta zona.

El cultivo de dorada en la acuicultura ha experimentado un gran incremento, pasando de menos de un millón de toneladas de dorada al inicio de los años 50, a 82,47 millones de toneladas en 2007. Durante 2008, la producción total de pescado destinado a consumo humano proveniente de la acuicultura fue del 50% a nivel mundial (*the state of world fisheries and aquaculture*, Food and agriculture organization, FAO, Rome, 2009).

3.2 MANIPULACIÓN DE LOS PECES Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las doradas utilizadas en la experimentación descrita en esta memoria proceden del centro de Tina Menor S.A., en Santander y de Piscimar en Burriana, Castellón; fueron transportadas al laboratorio en agua de mar insuflada con oxígeno puro. En el laboratorio, las doradas se mantuvieron en agua de mar aireada y filtrada en un circuito cerrado, a 20 °C, en acuarios de 260 litros de capacidad equipados con luz ultravioleta, y sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Las doradas tenían un peso inicial entre 3-10 g. Se alimentaron suministrándoles la dieta en estudio, en cantidades correspondientes al 5% del peso corporal dos veces al día hasta alcanzar aproximadamente los 20 g, momento a partir del cual las doradas fueron alimentadas una vez al día con cantidades de dieta correspondientes al 2 ó 3% del peso corporal promedio de cada acuario. Los peces se pesaron cada semana para ajustar periódicamente la cantidad de dieta suministrada.

Todas las manipulaciones se han realizado según las normas del Comité Ético de Experimentación con Animales de la Universidad de Barcelona (CEEAA-UB).

El protocolo seguido en el momento de tomar las muestras pretende que los peces estén sometidos a un estrés mínimo y ausencia de situaciones de anoxia. Antes de ser sacrificadas las doradas fueron anestesiadas con metasulfato de tricaina (MS-222, Sigma-Aldrich), disuelto en agua en una proporción de 70 mg/l (p/v).

PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS

A) Preparación

1. Preparar un acuario de capacidad adecuada al tamaño y número de peces a sacrificar, con agua de mar, provisto con un aireador. Disolver el agente anestésico MS-222 en una proporción de 70mg/l (p/v).
2. Retirar las doradas de los acuarios de experimentación e introducirlas inmediatamente, en grupos de 3-4 individuos como máximo, en el acuario con el anestésico.
3. Esperar hasta que los peces queden sedados (5-10 min).
4. Pesar cada dorada. Proceder a sacrificar y tomar las muestras o a inyectarlas con el compuesto en estudio.

B) Toma de muestras

1. Sacrificar cada dorada mediante un corte cervical.
2. Obtener la sangre con una pipeta Pasteur de vidrio previamente tratada con una solución de citrato sódico al 3%.
3. Abrir el pez ventralmente y extraer el hígado. Para eliminar restos de sangre o bilis, se lava el tejido sumergiéndolo en una solución de NaCl al 0.9%. Se congela inmediatamente por la técnica de *freeze clamping*, con pinzas previamente enfriadas en nitrógeno líquido. El hígado se mantiene a -80 °C hasta su utilización.
Para la extracción de otros órganos se realiza un procedimiento similar al descrito para la obtención del hígado.
4. La sangre obtenida se deja a temperatura ambiente 30 min aproximadamente, posteriormente se centrifuga a 6000 g a 4 °C, durante 10 min. Se recupera el suero y se mantiene congelado a -20 °C hasta su utilización.

3.2.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS HEPÁTICOS

El tejido hepático de dorada obtenido tal como se describe en el apartado 3.2.1 se pulverizó y congeló a -80 °C hasta el momento de su utilización. Para pesar la cantidad necesaria se utilizaron tubos de vidrio previamente tarados y enfriados en nitrógeno líquido, para evitar la descongelación de las muestras. La solución de homogeneización T se utilizó para obtener el extracto total y la solución de homogeneización A se utilizó para obtener fracciones subcelulares hepáticas. Todas las manipulaciones efectuadas para la obtención de los extractos crudos se realizaron a 4 °C.

PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HEPÁTICOS:

1. Pesar 50-100 mg de tejido hepático y agregar rápidamente la solución de homogeneización T a 4 °C en una relación 1:5 p/v (mg/μl).
2. Mantener las muestras en hielo y homogeneizarlas durante 30 segundos, utilizando un POLYTRON-PTA 7 en posición 3; se coloca el homogenado en tubos *ependorf*.
3. Centrifugar a 4 °C durante 30 min a 10000 g. para eliminar componentes sólidos insolubles.
4. Recoger los sobrenadantes y cuantificar la proteína total siguiendo el método de Bradford, descrito en el apartado 3.10.2.

Solución de homogeneización T

Tampón Tris HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	4 mM
NaF	50 mM
Sacarosa	250 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	1 mM
KCl*	100 mM

Esta solución se prepara 10X, sin sacarosa, PMSF o DTT, que se agregan en el momento de diluir la solución para utilizarla en la obtención de extractos crudos; se guarda a 4 °C. El PMSF se prepara 200 mM en n-propanol y se guarda en un frasco de color topacio, a temperatura ambiente.

*La adición de 100 mM de KCl se utilizó solo para la determinación de la actividad GK, ya que permite la estabilización de esta enzima.

PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES A PARTIR DE EXTRACTOS HEPÁTICOS:

1. Pesar 50-100 mg de tejido hepático y agregar rápidamente la solución de homogeneización A en una relación 1:5 p/v (mg/μl).
2. Mantener las muestras en hielo y homogeneizarlas manualmente, 40 ciclos, en un homogeneizador tipo *cell tissue douncer*; transferir el homogenado a tubos *ependorf*.
3. Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 500 g.
4. El sobrenadante se centrifuga 20 min a 9000 g. y el sobrenadante resultante se utiliza como fracción citosólica.
5. El sedimento se lava 2 veces con solución A y se utiliza como fracción mitocondrial.
6. Recoger los sobrenadantes y cuantificar la proteína total siguiendo el método descrito en el apartado 3.10.2.

<u>Solución de homogeneización A</u>	
Tampón Tris HCl pH 7,5	50 mM
EDTA	0,5 mM
NaF	50 mM
Sacarosa	70 mM
Manitol	200 mM
PMSF	0,5 mM
DTT	1 mM

Esta solución se prepara 10X, sin sacarosa, PMSF o DTT, que se agregan en el momento de diluir la solución para utilizarla para la obtención de extractos crudos; se guarda a 4 °C. El PMSF se prepara 200 mM en n-propanol y se guarda en un frasco de color topacio, a temperatura ambiente.

3.3 ANTICUERPOS

En la experimentación descrita en esta memoria se ha utilizado el anticuerpo anti ALT de dorada, obtenido mediante inoculación de conejos y empleado a una dilución 1:1000.

3.4 PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN EN EUCARIOTAS Y VECTORES REPORTEROS

pcDNA3: vector de expresión en células eucariotas *in vitro* e *in vivo*. Se utiliza para expresar proteínas *in vitro* a través del promotor T7 situado inmediatamente corriente arriba del sitio de clonación.

pcDNA3-cALT1: plásmido para expresar cALT1 de *S. aurata*. Obtenido mediante la digestión con HindIII y BamHI del producto de PCR obtenido utilizando JDAL16 y IMAL20 sobre cDNA de hígado de dorada.

pcDNA3-cALT2: plásmido para expresar cALT2 de *S. aurata*. Obtenido mediante la digestión con HindIII y BamHI del producto de PCR utilizando JDAL36 y IMAL20 sobre cDNA de hígado de dorada.

pcDNA3-mALT: plásmido para expresar mALT de *S. aurata*. Obtenido mediante la digestión con HindIII y BamHI del producto de PCR obtenido utilizando JDAL26 e IMAL24 sobre cDNA de hígado de dorada.

pCpG-siRNA: vector de expresión de shRNA en células eucariotas *in vitro* e *in vivo*. Se ha diseñado para la expresión de shRNA *in vivo*, ya que el vector no induce respuesta inflamatoria.

pCpG-si1sh1: vector que permite expresar el siRNA1 que tiene como diana el mRNA de cALT de hígado de *S. aurata*. Obtenido mediante la digestión del producto de hibridación de Jdsi1sh1cALT1S y Jdsi1sh1cALT1S digerido con HindIII y Acc65I e insertado en el vector pCpG-siRNA.

pCpG-scr: vector que permite expresar un shRNA con bajo grado de homología con secuencias conocidas. Cortesía del Doctor José C. Perales, Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona.

pCMV-β: plásmido utilizado para el control de eficiencia de transfección en los cultivos celulares, este plásmido expresa la β-galactosidasa en células eucariotas.

pGEM-Teasy: vector de tipo T que facilita la ligación de fragmentos de DNA obtenidos por amplificación por PCR cuando se utilizan polimerasas que produce fragmentos de DNA con extremos protuberantes por adición de una A en los extremos 5'.

3.5 INHIBIDORES DE mRNA

3.5.1 SHORT INTERFERENCE RNA (siRNA)

Se utilizaron diferentes siRNA diseñados para estudiar la silenciación génica de las isoformas cALT1, cALT2 y mALT de hígado de dorada. Los siRNA utilizados con el fin de inhibir la expresión de las isoformas cALT1 y mALT fueron diseñados por Bionova. Los siRNAs con las secuencias 5'-GAA GAG AGA UGG UGG AAU CTT-3' (siRNA1), 5'-GCA GAG AAG GCC AGG CUA ATT-3' (siRNA2) y 5'-CAA CAU GUU UCC AGA GGA UTT-3' (siRNA3), fueron diseñados para inhibir la expresión de la isoforma cALT1. Los siRNA con las secuencias 5'-CAG GGC GGA AAA CAA GAC ATT-3' (siRNA1m), 5'-GAA AUU AAC UCG UGU UCA TT-3' (siRNA2m), 5'-UCA GCU UGG UAC GAG AAA UTT-3' (siRNA3m), 5'-GAA AUU AAC UCG UGU GTT-3' (siRNA4m), 5'-CAG UCA GUG UAU UUG UAU ATT-3' (siRNA5m) y 5'-GAG AGA CUG UCC AUG AGA ATT-3' (siRNA6m), fueron diseñados para inhibir la expresión de la isoforma mALT. Los siRNA con secuencia 5'-CAG GGC GGA AAA CAA GAC ATT-3' (si1ALT2) y 5'-GAA AUU AAC UCG UGU UCA TT-3' (si2ALT2), fueron diseñados por Ambion para inhibir la expresión de la isoforma cALT2.

3.5.2 SHORT HAIRPIN RNA (shRNA)

Con el fin de expresar los siRNA tanto *in vivo* como *in vitro*, la secuencia siRNA1 que mostró efecto inhibitor se introdujeron en el vector pCpG-siRNA (Invivogen), que expresa el siRNA1 (pCpG-si1sh1), para este fin se diseñó el inserto correspondiente utilizando el *software* de la página web de Invivogen.

Para obtener el constructo pCpG-si1sh1, los cebadores sentido y antisentido fueron resuspendidos en TAE 1X a una concentración final de 25 mM, se mezclaron en proporciones iguales y se calentaron durante 1 min a 90 °C; tras este periodo se les dejó alcanzar lentamente la temperatura ambiente.

Tras obtener la estructura de doble cadena, se procedió al proceso de ligación del inserto (shRNA) en el plásmido pCpG-siRNA, como se indica en el apartado 3.9.8 para obtener el vector pCpG-si1sh1 que contiene la secuencia del siRNA1.

3.6 OLIGONUCLEOTIDOS

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')	Posición en el cDNA referido al CDS
JDAL16	GAAAGCTTAACATGTCCCACCAGGCGC	cALT, secuencia codificante
JDAL26	GAAAGCTTAACATGTCCGGTACAAGGATG	mALT, secuencia codificante
JDAL36	GAAAGCTTTTCATGTTTCAGATATCAGTCCAGAG	cALT2, secuencia codificante
JDAL46	GAAAGCTTGACAACCTGTCAAGTGAAGACG	cALT2, 5'UTR + secuencia codificante
JDRTPcmvbS	<u>CCATTACGGTCAATCCGC</u>	β-gal, 320-339
JDRTPcmvbAS	<u>ACAACCCGTCGGATTCTCC</u>	β-gal, 389-370
JDRtm1S	<u>CCAGGGTCCGCTCACTGAT</u>	mALT, 195-214
JDRtm1AS	<u>GTCGCGCTCACACTCGATAA</u>	mALT, 271-291
JDRtc1S	<u>TTACCCTGAACCTCTGAAAAGACAAC</u>	cALT, 390- 415
JDRtc1AS	<u>CCGCAGGCCTCGAGAATAC</u>	cALT, 443-462
Jdsilsh1cALT1S	GTACCTCGAAGAGAGATGGTGAATCTCAAGAGGATTCCAC CATCTCTCTCTTTTTGGAAA	Secuencia directa si1sh1shRNA
Jdsilsh1cALT1AS	AGCTTTTCCAAAAAGAAGAGAGATGGTGAATCCTCTTGAG ATCCACCATCTCTCTTCGAG	Secuencia reversa si1sh1shRNA
IMAL20	GAGGATCCCGTGAGAACTCTGTGTGAAGCG	cALT, 1595-1573
IMAL24	GAGGATCCCGTGAGAACTCTGTGTGAAGCG	mALT, 1766-1742
BA0199	GACAACGGATCCGGTATGTGC	β-actina <i>S. aurata</i> , 320-341
BA0299	GACCTGTCCGTCGGGCAGCTC	β - actina <i>S. aurata</i> , 810-831
JDRTBAs	<u>CGTGACATCAAGGAGAAGCTGT</u>	β -actina <i>S. aurata</i> , 1107-1125
JDpepalphas	ATGGACCCTGTTGTGCTGCAAAGG	Péptido alfa
JDpepalphasAS	TAGCTCAGGTTTACTTCTGGCACC	Péptido alfa
JDRTPHPRTs	CATTGTAGCCCTCTGTGTGCTC	Gen hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa Humana.
JDRTPHPRTas	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTT	Gen hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa Humana
RT18SS	<u>TTACGCCCATGTTGCTCTGAG</u>	Gen 18S, <i>S. aurata</i>
RT18SAS	<u>AGGATTCTGCATGATGGTACC</u>	Gen 18S, <i>S. aurata</i>

NOTA: En negrita se encuentran los lugares de corte para las enzimas de restricción *HindIII* o *BamHI*. Subrayado se indican los oligonucleótidos que se utilizaron para realizar qPCR.

Las condiciones en las que se realizó la PCR para clonar las isoformas de ALT fueron: 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, 30 s de hibridación a 60 °C y 3 min a 72 °C, para la síntesis de DNA, seguido de una extensión final de 7 min a 72 °C.

3.7 CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS Y TRANSFORMACIÓN

3.7.1 CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* UTILIZADAS

E. coli GT 115: F⁻ mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZDM15 DlacX74 recA1endA1 Ddcm, uiaD (MluI):pir-116, sbcC-sbcD. Esta cepa se utilizó para obtener el plásmido pCpG-siRNA y sus derivados utilizando el medio LB.

E. coli DH5α: sup E44, ΔlacU169 (90 lac ZDN15), hsd R17, rec A1, gyr A96, thi-1, rel A1. Esta cepa se utilizó para obtener los vectores pCMV, pGEM-Teasy, pCDNA3 y sus derivados utilizando el medio LB.

3.7.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS ESCHERICHIA COLI COMPETENTES

En condiciones normales, la eficiencia de transformación de *E. coli* es muy baja, ya que estas células no aceptan generalmente la entrada de DNA exógeno. Por eso previamente a la transformación, las células tienen que ser tratadas de modo tal que aumente la permeabilidad de la membrana bacteriana y por ende convertirse en células competentes, susceptibles de ser transformadas con eficacia. Entre los diversos protocolos existentes para obtener células competentes, en los experimentos realizados se ha seguido el procedimiento descrito por *Current Protocols in Molecular Biology* (1994-2008), que se basa en poner en contacto las células de *E. coli* con iones calcio, que alteran la permeabilidad celular.

PROTOCOLO:

1. Inocular 3 ml de medio LB con células *E. coli* y mantenerlas en agitación constante, a 37 °C, durante 12-15h.
2. Utilizar 0,5 ml del cultivo obtenido para inocular 50 ml de medio LB estéril.
3. Dejar las células a 37 °C, en agitación, unas 2-3 horas, hasta que la OD_{590 nm} alcance 0,7-0,8, lo que indica que el cultivo se encuentra en fase de crecimiento exponencial; no se debe dejar que la densidad llegue a 0,9.
4. Centrifugar las células a 2500 xg durante 10 min, para sedimentarlas.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 50 ml de MgCl₂ 100 mM a 4 °C.
6. Centrifugar nuevamente a 2500 xg durante 10 min, para lavar las células. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado, esta vez en 10 ml del mismo MgCl₂ 100 mM a 4 °C.
7. Agregar 100 ml de CaCl₂ 100 mM y mantener las células en hielo, durante 60-90 min.
8. Volver a centrifugar 10 min a 2500 xg y retirar el sobrenadante.
9. Resuspender las células en 12,5 ml de solución de resuspensión.
10. Realizar alícuotas de 200 µl de células y congelarlas inmediatamente a -80 °C.

<u>Medio LB</u>		<u>Solución de resuspensión</u>	
Triptona	1%	CaCl ₂	85 mM
Extracto de levaduras	0,5%	Glicerol	15%
NaCl	1%		
Se pesan los 3 componentes, se disuelven en H ₂ O mQ, se ajusta el pH a 7 con NaOH y se autoclava.		Se autoclava.	

3.7.3 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS *E. COLI* COMPETENTES

La transformación es una técnica para introducir DNA exógeno en células procariotas.

3.7.3.1 PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR SHOCK TÉRMICO.

La técnica de transformación se puede efectuar mediante diferentes métodos, que se basan en la alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana de las células competentes, con el objetivo de facilitar la entrada de DNA. Las transformaciones se efectuaron por el método del shock térmico.

PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR SHOCK TÉRMICO

1. Descongelar en hielo una alícuota de células competentes.
2. Mezclar las células y el DNA plasmídico en una proporción 10:1 (v/v), mantener la mezcla en hielo durante 10 min.
3. Incubar 3 min a 42 °C.
4. Mantener la mezcla 10 min en hielo.
5. Traspasar la mezcla a un tubo *ependorf* de 1.5 ml, agregar 800 µl de medio LB autoclavado e incubar 45 min, en agitación, a 37 °C. Durante este intervalo las células transformadas tienen tiempo de sintetizar las proteínas de resistencia codificadas por el plásmido que se les introdujo.
6. Centrifugar las células a 10000 xg durante 1 minuto, a T^a ambiente, en centrífuga de sobremesa. Retirar el sobrenadante, dejando 200 µl para resuspender el precipitado de bacterias obtenidas.
7. Extenderlas en las placas correspondientes e incubar posteriormente 37 °C, durante 12-15 horas.

Los plásmidos, como pcDNA3, pGEM-T o pGEM-T easy, presentan dianas de corte que interrumpen el gen lac-Z, permitiendo la selección por color de colonias blancas, a partir de placas de LB-agar con IPTG y X-gal. El fundamento de esta selección consiste en que las colonias azules que no contienen inserto presentan el gen lac-Z entero, mientras que las colonias blancas, en cambio, contienen un inserto que interrumpe el gen lac-Z.

Medio LB ampicilina

Se prepara medio LB siguiendo las pautas del apartado 3.7.2. Se agrega ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml antes de inocular la correspondiente colonia resistente que expresa los vectores, pcDNA3, pGEM-T, pGEM-T easy o alguno de sus derivados.

Medio LB Zeocina

Se prepara medio LB siguiendo las pautas del apartado 3.7.2. Se agrega zeocina a una concentración final de 25 µg/ml antes de inocular la correspondiente colonia resistente que expresa el vector pCpG-siRNA o sus derivados.

Ampicilina

Se prepara a concentración 100 mg/ml (1000 X) y se conserva en alícuotas y congelada a -20 °C.

Zeocina

Se prepara a concentración 100 mg/ml (4000 X) y se conserva en alícuotas y congelada a -20 °C.

<u>Placas de LB-agar</u>	
Triptona	1 %
Extracto de levaduras	0,5 %
NaCl	1 %
Bacto agar	1,5 %

Se pesa la triptona, los extractos de levadura y el NaCl, y se disuelven en H₂O mQ. Se ajusta el pH a 7 con NaOH, se agrega el agar bacteriológico y se autoclava.

Una vez autoclavada, la solución se deja enfriar el medio hasta que alcance 50 °C y se preparan las placas en la campana de flujo laminar; cuando el agar de las placas está solidificado, se mantienen una noche invertidas en una estufa a 37 °C, para secarlas y comprobar que no están contaminadas. Después, se guardan a 4 °C hasta ser utilizadas.

Placas TAXI (tetraciclina, ampicilina, X-gal, IPTG)

Se preparan como las placas de LB-agar, pero se debe agregar, antes de colocar la mezcla en las placas, y cuando el medio autoclavado está a 50 °C:

- 100 µg/ml ampicilina
- 15 µg/ml tetraciclina
- 40 µM IPTG
- 8 µg/ml X-gal

Las placas de LB-ampicilina se preparan siguiendo las mismas pautas, pero sin agregar tetraciclina, IPTG y X-gal.

Tetraciclina

Se prepara a concentración de 100 mg/ml y se guarda en alícuotas a -20 °C, protegida de la luz.

IPTG

Se prepara a concentración de 100 mM y se guarda en alícuotas a -20 °C, protegida de la luz.

X-gal

Se prepara a 50 mg/ml en DMF (dimetilfluoruro) y se conserva en alícuotas a -20 °C.

3.8 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS Y TRANSFECCIÓN

3.8.1 CONDICIONES Y TÉCNICAS

El mantenimiento de cultivos celulares se realiza en condiciones estériles. Se trabaja en una campana de flujo laminar con filtro HEPA. La sala de trabajo y la campana se irradia con luz ultravioleta durante el periodo que no son utilizadas. La superficie de trabajo de la campana de flujo laminar se descontamina con etanol al 70% y con otros productos como Virkon (Bayer) al inicio y al final del uso. Todo el material utilizado es previamente esterilizado. Los medios y soluciones se compran estériles o bien se esterizan mediante filtración, con filtro de 0,22 µm o con autoclave.

3.8.2 LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

Células HEK-293: (ATCC CRL-1573) línea celular derivada de riñón embrionario humano. Las células crecen y se mantienen en un medio MEM (Gibco) suplementado con 1 % de ampicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino a 37 °C en el incubador con un 5 % de CO₂.

Células HepG2: (ATCC CRL-10741) línea celular derivada de hígado humano. Las células crecen y se mantienen en medio de crecimiento Dulbecco MEM con 1 % de solución de glutamina 200 mM, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de ampicilina/estreptomicina y 10 % FBS (pH 6,8) a 37 °C en un incubador con un 5 % de CO₂.

3.8.3 MEDIOS Y REACTIVOS

Medio EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium. (Gibco).

FBS: Suero fetal bovino (Gibco). Se calienta a 50 °C durante 20 min antes de ser utilizado, para inactivar las proteínas del complemento.

Penicilina/estreptomicina: solución de 10000 U/ml penicilina y 5000 µg/ml estreptomicina (Gibco).

Glutamina: solución 200 mM (100 X). (Gibco).

Tripsina: tripsina-EDTA (1X), (Gibco).

<u>PBS 10X (pH 7,3)</u>		<u>TBS 10X</u>	
NaCl	137 mM	NaCl	1.4 M
KCl	2,7 mM	KCl	30 mM
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	4,3 mM	CaCl ₂	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM	MgCl ₂	5 mM

3.8.4 INICIO DEL CULTIVO CELULAR

Las células se mantienen congeladas a -80 °C por periodos cortos (meses) y para mantenerlas por periodos más largos (años) se mantienen congeladas dentro de criotubos en nitrógeno líquido.

PROTOCOLO:

1. Descongelar las células rápidamente a 37 °C
2. Traspasar el contenido del vial a un tubo Falcon con 7 ml de medio completo, adecuado para cada tipo celular.
3. Centrifugar a 2000 g durante 5 min.
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender el sedimento en un volumen adecuado de medio completo (10 ml para un Frasco de 75 cm²).
6. Introducir la mezcla en un frasco o placa, agitarlo suavemente, para que las células estén bien repartidas, colocar el recipiente en el incubador de células en las condiciones adecuadas para cada línea celular.
7. Cambiar el medio a las células y tripsinizarlas antes de que lleguen a estar confluentes.

3.8.5 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

La confluencia de las células en cultivo puede causar cambios en sus características bioquímicas y funcionales. La tripsinización permite separar las células de la superficie de la placa donde se encuentran adheridas para proceder a una dilución adecuada.

Para realizar la tripsinización, el cultivo celular se incuba con tripsina-EDTA 1X (Sigma) durante aproximadamente 5 min; este proceso rompe las uniones entre las células y la placa, sin comprometer la

integridad de las células. Se puede facilitar el desprendimiento de las células mediante pequeños golpes a las placas. Por último se recogen las células agregándoles medio completo, y seguidamente se efectúan las diluciones correspondientes.

PROTOCOLO:

1. Aspirar el medio de la placa de cultivo.
2. Lavar las células con 5 ml de PBS 1X. Aspirar el PBS.
3. Agregar 1 ml de tripsina y agitar suavemente la placa para que la tripsina se distribuya por toda la superficie.
4. Esperar el tiempo necesario para que las células se desprendan de la superficie de las placas. Durante este tiempo se golpea el frasco/tapa para facilitar el proceso. Se inspecciona a simple vista que las células se encuentran desprendidas.
5. Una vez que las células estén desprendidas, agregamos 9 ml de medio completo para inhibir la acción de la tripsina y se recogen las células.
6. Se realiza la dilución deseada repartiendo las células en suspensión en diferentes placas con una cantidad adecuada de medio completo.

La frecuencia de tripsinización depende de la velocidad de crecimiento de las líneas celulares y de la dilución inicial de la placa. Se debe lavar las células previamente a la adición de la tripsina ya que los restos de suero fetal bovino inactivan la tripsina.

3.8.6 ALMACENAJE DE CÉLULAS

PROTOCOLO:

1. Tripsinización de las células.
2. Se recogen las células en un Falcon con 10 ml de medio completo.
3. Se centrifugan las células a 500 xg a 4 °C.
4. Se resuspenden las células en medio completo con 20% de suero fetal bovino, y 10% de DMSO (crioprotector), y se alicuotan en criotubos.
5. Se congelan las muestras de forma progresiva en un recipiente con isopropanol a -80 °C, así se garantiza una disminución de 1 °C/minuto. Luego se procede a almacenarlas en nitrógeno líquido.

3.8.7 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS

La transfección es una técnica que permite introducir DNA exógeno en las células eucariotas. En el caso de que las células se sometan a un tratamiento que permita la integración del DNA al genoma celular, se trataría de una transfección estable. En el caso de la transfección transitoria el DNA no se integra en el genoma, de manera que no se replica en conjunto con las células y se pierde tras sucesivas replications celulares. Existen diversos protocolos para efectuar la transfección transitoria (*Current Protocols in Molecular Biology*, 2009), generalmente basados en una alteración transitoria de la permeabilidad de la membrana celular. Entre estos métodos podemos destacar: transfección por fosfato cálcico, transfección por DEAE-dextran-cloroquina, quitosán, electroporación y la transfección facilitada por complejos lipídicos (lipofectamina 2000, Fugene, etc). La elección de uno u otro método depende del tipo celular y también del tipo de material genético a introducir.

3.8.8 TRANSFECCIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DEL FOSFATO CÁLCICO

Este método se basa en la coprecipitación del DNA exógeno con fosfato cálcico, facilitando la penetración del DNA en la célula (Graham y Van der EB, 1973). La maquinaria de transcripción endógena permitirá expresar los genes transfectados.

Una vez que tengamos las células a un nivel de confluencia adecuado (50-70%) procedemos a la transfección.

PROTOCOLO:

1. Preparar la mezcla de DNA a transfectar.

Mezcla por cada 2 pocillo de 3 cm de diámetro (Utilizada en los experimentos de SOBREENPRESIÓN)

Constructo de interés	6 µg
pCMV β (control interno de transfección)	1 µg
H ₂ O mQ	c.s.p. 180 µl

MATERIALES Y MÉTODOS

Mezcla por cada 2 pocillo de 3cm de diámetro (Utilizada en los experimentos de INHIBICIÓN CON shRNA)

Construceto de interés	3 - 300 ng
Plásmido que codifica un shRNA	300 - 600 ng
pCMV β (control interno de transfección)	1 μ g
DNA portador (para igualar la cantidad de DNA)	0 – 597 ng
H ₂ O mQ	c.s.p. 180 μ l

Como DNA portador hemos utilizado un plásmido de expresión no eucariota (pBluescript).

2. Agregar a la mezcla 20 μ l de CaCl₂ 2,5 M y mezclar con vortex.
3. Agregar gota a gota 200 μ l de BBS 2 X al interior de un tubo *ependorf* que contiene la mezcla de DNA y CaCl₂, al mismo tiempo que se mezcla.
4. Antes de introducir la mezcla en cada pocillo se puede comprobar al microscopio de contraste de fase, con una gota de la mezcla en un porta-objetos, la formación de cristales (tiempo máximo 20 min).
5. Transfectar agregando 200 μ l de la mezcla a cada pocillo.
6. Tres o cuatro horas después de la transfección se realiza un shock durante 2 min con una solución de medio sin suero con 10 % con DMSO. Agregar nuevamente el medio completo.
7. Incubar las células transfectadas durante 16-24 horas para permitir la expresión de los plásmidos transfectados.
8. Recoger las células.

SOLUCIONES:

<u>BBS 2X</u>	
BES pH 7	100 mM
NaCl	5 M
Na ₂ HPO ₄	0,5 M
H ₂ O mQ	c.s.p. 50 ml
Corregir el pH y esterilizar por filtración.	

El pH adecuado para la formación de precipitados es aproximadamente 7,0. Se recomienda realizar pruebas en un rango de pHs con BBS 2X de entre 6,8 y 7,2. El pH del BBS es un parámetro crítico para la formación de un precipitado adecuado.

3.8.9 TRANSFECCIÓN FACILITADA POR COMPLEJOS LIPÍDICOS

Como método alternativo y para aquellas células que no poseen un alto nivel de transfección intrínseco o cuando se necesita transfectar material genético con una alta eficiencia, hemos utilizado el reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen). La lipofectamina 2000 es un reactivo formado por un conjunto de lípidos no liposomales que engloban el DNA/RNA y lo transportan al interior de la célula.

PROTOCOLO:

1. Una vez que tenemos las células a una confluencia del 60-70 % procedemos a la transfección. Este método tiene una elevada eficiencia de transfección.
2. Colocar en 2 tubos *ependorf* (A y B) 250 μ l de OptiMEM (invitrogen) por cada pozo (placas de 6 pocillos).
3. En el tubo A colocar el material genético a transfectar; mezcla de siRNA (10 nM a 100 nM), constructo reportero pCMV β y DNA portador, en el caso que se necesite. La cantidad de DNA dependerá de las células a transfectar, en este caso usamos una relación de lipofectamina 2000:DNA de 6:2
4. En el tubo B colocar 2 a 6 μ l de lipofectamina 2000, agitar y esperar 5 min.
5. Mezclar el tubo A con el tubo B y esperar 20 min.
6. Agregar la mezcla sobre las células en cultivo.
7. Recoger las células a los tiempos adecuados.

3.8.9.1 ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE LOS siRNA

Una vez transfretadas las células con un siRNA (50 mM) que contenga el fluoróforo FITC, se las incuban como se describe en el apartado 3.8.9 durante 6-17 horas, posteriormente se realizan 2 lavados con PBS 1X, y se recogen en PBS para analizarlas en un equipo de citometría de flujo provisto con un detector de FITC, (realizado en el servicio científico técnico de la Universitat de Barcelona).

3.9 TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.9.1 ELECTROFORESIS DE DNA

La separación de moléculas de DNA en función del tamaño se ha realizado por electroforesis en geles de agarosa al 0,8-2%, siguiendo la metodología descrita en el *Current Protocols in Molecular Biology* (1994-2008).

Se han utilizado como marcadores del tamaño de DNA, los fragmentos obtenidos por digestión del fago λ con las enzimas de restricción *EcoRI* e *HindIII* (λ /*EcoRI-HindIII*, Promega G1731); estos marcadores presentan tamaños entre 2100 y 125 pb. Alternativamente, se emplearon marcadores 1 Kb DNA ladder (Biotools) y 100 bp DNA Ladder (Gibco).

El tampón de carga, que se agrega al DNA antes de la electroforesis, consta de glicerol al 30% y un colorante, *Orange G*. La finalidad de éste tampón es, por un lado, dar densidad a las muestras y facilitar la carga en los pocillos del gel, y por otro lado, permitir el seguimiento del proceso electroforético, ya que el colorante tiene bajo peso molecular y migra con el frente de electroforesis.

La electroforesis tiene lugar a 60-80 V y a temperatura ambiente.

El DNA se puede visualizar con luz UV, gracias a la presencia de bromuro de etidio en el gel y en el tampón de electroforesis.

<u>Gel de electroforesis de DNA</u>	
TAE	1X
Agarosa	0,8-2 % (p/v)
Bromuro de etidio	50 μ g/100 ml

Para preparar el gel, la agarosa se disuelve en la solución de TAE 1X por calentamiento en microondas a 400 W; se deja a temperatura ambiente 10 min y se agrega el bromuro de etidio antes de colocarlo en el porta geles de las cubeta de electroforesis. Posteriormente se aplican las muestras.

<u>Bromuro de etidio</u>	<u>Tampón de electroforesis de DNA</u>	
Se prepara a una concentración de 10 mg/ml y se guarda a 4 °C en un envase hermético, protegido de la luz. Se debe de manipular con precaución, porque es un compuesto muy tóxico.	TAE	1X
	bromuro de etidio	50 μ g/100 ml

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN:

ESTADIO	TEMPERATURA	TIEMPO (min:sec)	REPETICIONES
Desnaturalización inicial	96 °C	2:00	1
Desnaturalización	96 °C	0:30	2-40 ciclos. Se especifica en cada ensayo
Hibridación	50-70 °C*	0:30	
Extensión	72 °C	1 min/1Kb	
Extensión final	72 °C	3:00	1

* La temperatura depende del oligonucleótido utilizado

Reacción de la PCR	
DNA molde	20-40 ng
Tampón de la Taq polimerasa	1X
MgCl₂	1-3 mM
dNTP	200 µM (de cada uno de los cuatro)
Oligonucleótido sentido	0.2 µM
Oligonucleótido antisentido	0.2 µM
Taq DNA polimerasa	1,5 U
H₂O mQ	c.s.p. 50 µl

3.9.3 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA EN SUSPENSIÓN

Para purificar los productos de PCR se ha utilizado el kit *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). El procedimiento se basa en la unión selectiva de DNA a fibras de vidrio, seguido de la realización de una serie de lavados que eliminan cadenas de DNA de medida inferior a 150 pb, nucleótidos y sales contaminantes. Finalmente se procede a la posterior elución del DNA de interés empleando una solución de bajo contenido en sales.

Para cuantificar el DNA, se debe de tener en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm, medida en cubeta de cuarzo de 1 ml, equivale a una concentración de DNA de 50 µg/ml:

$$\text{Concentración de DNA en } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260 \text{ nm}} \times 50X \text{ l} / V_{\text{muestra}} (\mu\text{l})$$

Alternativamente, se puede estimar la concentración de fragmentos linearizados de DNA por electroforesis utilizando un marcador de DNA que incluya fragmentos de diferentes tamaños y cantidades conocidas de DNA. La concentración problema se determina de forma comparativa, tras visualización a la luz UV.

SOLUCIONES:

TE 1X

Tris HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Se ajusta a pH 8 y se autoclava.

3.9.4 RT-PCR

Esta técnica implica una primera etapa, catalizada por la transcriptasa reversa (RT), que consiste en la síntesis de una cadena sencilla de DNA complementaria al RNA en estudio y una etapa posterior, en la que se efectúa la amplificación por PCR de una región determinada del DNA obtenido, utilizando dos cebadores que delimiten esta región.

La síntesis de la cadena de cDNA a partir del molde de RNA, obtenido según se detalla en el apartado 3.9.11., tiene lugar por acción de la retrotranscriptasa (RT), una DNA polimerasa dependiente de RNA. Además del molde de RNA, la RT necesita dNTPs y cebadores (hexámeros aleatorios o poli adenina), que intervienen en la síntesis de la cadena de cDNA.

La reacción tiene lugar a 37 °C, durante 60 min. En las muestras de RNA se añadieron inhibidores de las RNAsas para evitar la degradación del RNA.

SOLUCIONES:

H₂O DEPC

DEPC 0,1 ml

H₂O mQ 100 ml

El DEPC (dietilpirocarbonato) se tiene que manipular en una campana de gases, porque es tóxico por inhalación. El H₂O_{DEPC} se autoclava dos veces.

El DEPC es un potente inhibidor de RNAsas; la cantidad que no queda disuelta en H₂O se degrada a CO₂ por acción del calor del autoclave.

Como inhibidor enzimático de las RNAsas se ha utilizado RNasin[®] 40 U/μl (Promega).

La MMLV-RT utilizada provenía de (Invitrogen) (Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase, 200 U/μl).

Condiciones de la reacción de la transcriptasa reversa

Tampón de la RT 5X (PROMEGA)	4 μl
dNTPs	10 μM
Hexámeros aleatorios	125 ng
Inhibidores enzimáticos de RNAsas	40 U
RNA total o poli(A)+	1 μg o 0,1 μg
MMLV-RT	200 U
H₂O DEPC	c.s.p. 20 μl

3.9.5 REAL-TIME PCR (qPCR)

Real-time Polymerase Chain Reaction (*real-time* PCR o qPCR) es una técnica que tiene la habilidad de monitorear en tiempo real el progreso de una PCR. A medida que se produce la amplificación, un fluorocromo se une a las dobles cadenas de DNA que se van sintetizando, emitiendo fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de DNA de doble cadena presente en la muestra.

La qPCR consta de los mismos componentes que una PCR semicuantitativa (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl, tampón 1x) más el fluorocromo (SYBR GREEN, Applied Biosystems). En esta tesis se han utilizado las polimerasas y mezclas de reacción de Applied Biosystems P/N 4309155. El instrumento utilizado es una real-time PCR (*ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection Systems*).

La secuencia de los cebadores utilizados depende de las regiones del DNA que se quiera amplificar; de manera general, los cebadores tienen que ser homólogos a la región con que se hibridan, deben que tener entre 19 y 22 nucleótidos, presentar un mínimo de 50% de residuos de G y C, no formar dímeros o estructuras secundarias y el amplicón debe tener un tamaño de entre 50 y 300 pb. Existen diversos programas informáticos de ayuda para el diseño de estos cebadores y el cálculo de sus temperaturas óptimas de hibridación. Se utilizó el programa Oligo explorer, v1.2, Gene Link.

En los ciclos iniciales del qPCR hay muy poco cambio en la señal de fluorescencia. Esto define la línea basal o ruido de fondo a considerar. Un incremento de la fluorescencia por encima de esta línea basal indica la acumulación del amplicón. El parámetro CT (ciclo de Partida) es definido como el número fraccional de ciclo en el cual la fluorescencia pasa el nivel umbral de detección.

Los datos son monitoreados de manera continuada durante el proceso. Esta reacción se caracteriza por registrar el momento en el que se visualiza la amplificación por primera vez, en vez de la cantidad de DNA

acumulado a un ciclo determinado como ocurre en el PCR tradicional. La cantidad de copias de DNA es directamente proporcional a la fluorescencia observada.

Una vez recogidos los datos, éstos se analizan mediante el método del ΔCT para la cuantificación relativa, en la cual se analiza la variación de la expresión de un gen determinado comparado con un gen endógeno (18s, β -actina, ect.), considerando que la eficiencia de amplificación de ambos genes es similar en nuestro modelo. Este método utiliza una fórmula aritmética para realizar una cuantificación relativa, que es:

$$\frac{X_{\text{muestra}}}{X_{\text{control}}} = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{(C_{T,X} - C_{T,R})_{\text{control}} - (C_{T,X} - C_{T,R})_{\text{muestra}}}$$

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN:

ESTADIO	TEMPERATURA	TIEMPO(min:sec)	REPETICIONES
1	50.0 °C	2:00	1
2	95.0 °C	10:00	1
3	95.0 °C	0:15	40
	62.0 °C	1:00	

Componentes de la mezcla de reacción	Volumen (μL) para 20- μL de reacción	Concentración final
2X SYBR Green PCR Master Mix	10	1X
Cebador <i>Forward</i> (10 mM)	0,6	300 nM
Cebador <i>Reverse</i> (10 mM)	0,6	300 nM
Molde	Variable	Variable
H ₂ O	Variable	Variable
Total	20	-

Al finalizar la reacción de amplificación se realiza una curva de disociación que resulta de aumentar gradualmente la temperatura de la reacción hasta conseguir la total desnaturalización del DNA. La lectura de la fluorescencia durante el proceso permite analizar la temperatura de disociación (T_m) de los fragmentos de DNA

en función de su tamaño lo que nos permite distinguir si se amplificaron secuencias inespecíficas de diferente tamaño al del amplicón deseado.

3.9.6 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA Y PURIFICACIÓN DE DNA

Para digerir los fragmentos de DNA se han utilizado enzimas de restricción, siguiendo las instrucciones de las casas comerciales y los tampones provistos para cada enzima. Para efectuar las digestiones, cada enzima requiere unas condiciones de fuerza iónica y temperatura específicas. De manera genérica se recomienda utilizar 1 Unidad (U) de enzima por cada μg de DNA, incubando durante 1 hora a la temperatura adecuada para la enzima. Generalmente, hemos realizado las digestiones en presencia de un exceso de enzimas de restricción (1-3 U por μg), sin que el volumen de la enzima supere el 10% del volumen total de la reacción.

3.9.7 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Para purificar los fragmentos de DNA, hemos utilizado el kit comercial *QIAEX II gel extraction kit* (QIAGEN), que permite recuperar de manera rápida y eficiente el DNA de soluciones acuosas o de geles de agarosa, separándolo de enzimas, nucleótidos y cebadores o de fragmentos de DNA de medida diferente.

3.9.8 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

De manera general, para las reacciones de digestión, precipitación, y obtención de fragmentos de DNA de extremos romos se ha empleado la metodología descrita por *Current Protocols in Molecular Biology* (1994-2008).

Las reacciones han tenido lugar siempre en presencia de un exceso de moléculas del inserto en relación a las de plásmido; este exceso oscila entre el doble (en el caso de insertos grandes) y 5 veces (cuando se trata de moléculas de inserto 10 a 15 veces más pequeñas que el plásmido en el cual se quieren clonar). La cuantificación del DNA se efectúa tal como se describe en el apartado 3.9.3. Para clonar con eficiencia fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR, se ha utilizado el plásmido pGEM-T easy (Promega), que presenta extremos directamente cohesivos con los productos de PCR que dejan polimerasas como la Taq Pol.

Las ligaciones se llevan a cabo en un volumen final de 20 μl con 5 μl de tampón de ligación (*Rapid Ligation Buffer 2X*, Promega), 2U de la enzima T4 DNA ligasa (2U/ μl , Promega), 10-500 ng de DNA de doble cadena y 50 ng de vector (pCpG-siRNA o pGEM-T easy). Se incuba la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora, y posteriormente a 4 °C durante 16 h.

Posteriormente, células bacterianas competentes son transformadas con el producto de la ligación como se describe en el apartado 3.7.3.1 y se aíslan las colonias obtenidas para obtener el plásmido de interés como se describe en el apartado 3.9.9. Se utilizan dos oligonucleótidos complementarios a la parte del

plásmido situada inmediatamente anterior y posterior a la del inserto. Finalmente se realiza la secuenciación del plásmido como se describe en el apartado 3.9.10.

3.9.9 OBTENCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para obtener DNA plasmídico libre de DNA genómico y otros contaminantes, se emplearon los kits *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma), el *GenElute Plasmid Midiprep Kit* (Sigma), el *Pure Yield Maxiprep System Kit* (Promega), *PureLink™ HiPure Plasmid Megaprep Kit* y *PureLink™ HiPure Plasmid Gigaprep Kit*. Se crece un cultivo de *E. coli* transformadas con el plásmido de interés en medio LB con antibióticos y se deja crecer toda la noche. Se recogen las células por centrifugación, se someten a lisis alcalina y se prosigue según el protocolo indicado en el kit utilizado.

3.9.10 SECUENCIACIÓN DEL DNA

La secuenciación del DNA se realizó mediante PCR utilizando el kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* versión 3.1 (Applied Biosystems). El kit consta de cuatro ddNTPs que se añaden a la mezcla de reacción de PCR; cada ddNTP está marcado con un fluoróforo que emite a diferentes longitudes de onda. El DNA, producto de la PCR se precipitó y se analizó por fluorimetría en el servicio de secuenciación de la Universitat de Barcelona.

Reacción de la PCR	
<i>Mix terminator</i>	1.5 µl
Oligonucleótidos (10 µM)	5 pmol
DNA molde	500 ng
H₂O mQ	c.s.p. 10 µl

Condiciones de amplificación:

ESTADIO	TEMPERATURA	TIEMPO (min:sec)	REPETICIONES
Desnaturalización	96 °C	1:30	30 ciclos
Hibridación	50 °C	0:30	
Extensión	60 °C	4:00	

3.9.11 AISLAMIENTO DE RNA

Para realizar la extracción de RNA total a partir de tejido pulverizado como se indica en el apartado 3.2.1, hemos utilizado el kit comercial Total Quick RNA Cell and Tissue (Talent).

Una vez finalizado el protocolo de extracción de RNA se efectúa la cuantificación y se examina la posible existencia de contaminantes a partir de la determinación de la absorbancia de las muestras a 260 nm y 280 nm. Adicionalmente, se comprueba su calidad visualizando el RNA ribosomal mediante una electroforesis en gel de agarosa. Las muestras de RNA se conservaron a -80 °C y se descongelaron lentamente en hielo cada vez que se utilizaron, evitando ciclos de congelado y descongelado.

Cuando se cuantifica el RNA se debe tener en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm, medida en una cubeta de cuarzo de 1cm de paso de luz, equivale a una concentración de 40 µg/ml:

$$\text{Concentración del RNA en } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260 \text{ nm}} \times 40 \times 1 / V_{\text{muestra}} (\mu\text{l})$$

Relaciones de Absorbancia $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ inferiores a 1,7 indican que el RNA podría estar contaminado con proteínas.

3.9.12 ELECTROFORESIS DE RNA

La electroforesis se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en el *Current Protocols in Molecular Biology* (1994-2008), en geles de agarosa al 1% y en condiciones desnaturalizantes. De manera general, el proceso de electroforesis se efectuó a 40 V y a temperatura ambiente, durante 3 ó 4 horas. Una vez finalizada la electroforesis, se comprobó en el transiluminador UV la migración y calidad del RNA.

3.9.12.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de RNA fueron diluidas en H₂O DEPC o TE/SDS 0,1 %. Se les adicionó el tampón de carga y se incubaron 10 min a 65 °C para eliminar posibles estructuras secundarias de las moléculas de RNA. El bromuro de etidio del tampón de carga permite visualizar los ácidos nucleicos a la luz UV.

SOLUCIONES:

<u>Tampón de carga de muestras de RNA</u>		<u>TE/SDS 0,1 %</u>	
MOPS 10X	21,6 % (v/v)	Tris HCl	10 mM
Formaldehido	17,5 % (v/v)	EDTA	1 mM
Formamida desionizada	48,6 % (v/v)	SDS	0,1 %
Azul de bromofenol saturado en glicerol al 50%	12,1 % (v/v)	Se ajusta el pH a 8, y se autoclava.	
Bromuro de etidio (10 mg/ml)	0,2 % (v/v)		
Se conserva 1 mes a 4° C.			

3.9.12.2 PREPARACIÓN DEL GEL

Para la electroforesis de RNA, las muestras se prepararon en condiciones desnaturalizantes (en presencia de formaldehido).

SOLUCIONES:

<u>Gel para electroforesis de RNA:</u>		
MOPS	1X	El formaldehido se agrega cuando la agarosa esta disuelta en MOPS 1X y a una temperatura de 50 °C.
Formaldehido	4,75 % (v/v)	
Agarosa	1 % (p/v)	

<u>Tampón de electroforesis de RNA:</u>		<u>MOPS 10X</u>	
MOPS 10X	35 ml	MOPS 0,4 M pH 7	250 ml
Formaldehido	24 ml	Acetato sódico 2 M	12,5 ml
Agua mQ	291 ml	EDTA 0,5 M pH 8	10 ml
Autoclavar la solución		Autoclavar la solución	

3.10 TÉCNICA DE WESTERN BLOT

3.10.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para implementar esta técnica se utilizaron extractos crudos de tejidos de dorada (apartado 3.2).

3.10.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA: MÉTODO DE BRADFORD

La determinación de la proteína total se realizó siguiendo el método de Bradford (1976), adaptado al autoanalizador COBAS MIRA S. El método se basa en la formación de complejos entre las proteínas y el colorante azul *Coomassie brilliant blue G-250*. Dado que estos complejos absorben a 600 nm, la absorbancia a esta longitud de onda será proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

El ensayo se llevó a cabo a 30 °C, mezclando 5 µl de extracto crudo con 200 µl del reactivo de Bio-Rad *Protein assay* (Bio-Rad 500-0006) previamente diluido 4 veces. Los valores de absorbancia a 600 nm se interpolaron en una recta patrón obtenida con una solución de albúmina sérica bovina a concentración entre 0,125 y 1 mg/ml.

3.10.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

La electroforesis de proteínas realizada en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) tiene como objetivo la separación de las proteínas en función del peso molecular. La técnica se basa en la acción del SDS que separa las posibles subunidades de las proteínas y las envuelve en carga negativa. Una vez tratadas las muestras con SDS (presente en el tampón de carga, en el gel y en el tampón de electroforesis), las proteínas se sometieron a la migración electroforética, desplazándose hacia el polo positivo en función de su peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo siguiendo las pautas de Laemmli et al., (1970).

3.10.3.1 PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURIZANTES (PAGE-SDS)

Los geles de PAGE-SDS para electroforesis de proteínas constan de dos partes, que se diferencian en la concentración de poliacrilamida y el pH.

La parte superior constituye el gel apilador y contiene una proporción baja de polímero (4%); su función no es separar las proteínas, sino permitir que éstas lleguen al gel separador de manera simultánea.

La parte inferior del gel, gel separador, presenta una concentración más elevada de poliacrilamida y tiene capacidad, como indica su nombre, de separar las diferentes proteínas en función de su peso molecular. Generalmente, se prepara al 7-20% de poliacrilamida, teniendo en cuenta que las concentraciones elevadas de polímero mejoran la resolución de muestras de peso molecular más bajo, mientras que los geles separadores de concentración baja favorecen la resolución de muestras de peso molecular más alto así como la posterior transferencia. Primero se deja polimerizar el gel separador, antes de agregar la mezcla correspondiente al gel apilador, utilizando vidrios y cubetas específicas para tal fin.

SOLUCIONES:

<u>Gel separador (10% acrilamida, pH 8,8)</u>		<u>Gel apilador (4 % acrilamida, pH 6,8)</u>	
Acrilamida/bisacrilamida	3,3 ml	Acrilamida/bisacrilamida	1,3 ml
Tampón B	2,5 ml	Tampó A	2,5 ml
SDS al 10%	100 µl	SDS al 10%	100 µl
H ₂ O	4 ml	H ₂ O	6 ml
Persulfato amónico al 10%	75 µl	Persulfato amónico al 10%	75 µl
TEMED	7,5 µl		

Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de acrilamida y bisacrilamida (“bis,” N,N'-metilen-bisacrilamida). La reacción es una polimerización por adición de grupos vinilos iniciado por un sistema generador de radicales libres (Chrambach 1985). El persulfato amónico es el encargado de generar estos radicales y el TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) se encarga de acelerar este proceso, lo que cataliza la polimerización; deben agregarse, por lo tanto, en el momento final de la preparación de cada una de las soluciones que componen las diferentes partes del gel. Las soluciones de persulfato amónico al 10%, de SDS al 10% y de TEMED se guardan en alícuotas a -20 °C, a temperatura ambiente y a 4 °C, respectivamente.

<u>Tampón A:</u> Tris HCl 0,5 M pH 6,8	<u>Acrilamida/bisacrilamida:</u> 30% acrilamida/Bis solution, 37,5:1 (Bio-Rad)
<u>Tampón B:</u> Tris HCl 1,5 M pH 8,8	

3.10.3.2 PROCESO DE ELECTROFORESIS

Una vez que se han preparado las muestras, se les debe agregar el tampón de carga de proteínas y someterlas a ebullición durante 5-10 min antes de efectuar la electroforesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Tampón de carga de proteínas 4X</u>		<u>Tampón de electroforesis</u>	
Tris HCl pH 6,8	0,25 M	Tris HCl pH 8,3	0,025 M
SDS	8 %	Glicina	0,192 M
glicerol	40 %	SDS	0,1 %
β -mercaptoetanol	20 %	Se prepara 10X y se conserva a temperatura ambiente.	
Azul de bromofenol	0,04 %		

El glicerol proporciona densidad a las muestras, mientras que el colorante azul de bromofenol nos permite visualizar la migración electroforética. El tampón de carga se prepara 4X y se conserva en alícuotas, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez preparadas y hervidas, las muestras se cargan en el gel y se lleva a cabo la electroforesis a temperatura ambiente. En el caso de un gel fino, de 0,75 mm de grosor, este proceso tuvo lugar a 15 mA durante la migración de las proteínas en el gel apilador y a 20 mA en el separador; cuando fueron de 1.5 mm de grosor, o bien cuando se corrieron 2 geles simultáneamente, la intensidad se aumentó a 30 y 40 mA, respectivamente. Se trata de un proceso de duración variable, en función de la concentración del gel separador y del tamaño de las proteínas en estudio; de manera general, el proceso finaliza cuando el frente de electroforesis llega a la parte inferior del gel. Después de la electroforesis, se procedió a la transferencia o bien a la tinción de proteínas.

3.10.4 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA

Las proteínas se transfirieron a membranas de nilón (Nytran 0,45 µm; Schleicher & Schuell) por electroelución, a 100 V, durante 1-2 horas, en tampón de transferencia.

PROTOCOLO:

1. El gel a transferir se deposita sobre un rectángulo de papel *gel blotting paper* (Schleicher & Schuell), encima de una esponja sobre el *cassette* de transferencia.
2. Sobre el gel se coloca una membrana de transferencia de nilón (Nytran 0,45 µm) a la cual se transferirán las proteínas, un segundo rectángulo de papel *gel blotting paper* (Schleicher & Schuell) encima y por último otra esponja, todo esto sin que se produzcan burbujas de aire.
3. Se cierra el *cassette* de transferencia, se introduce en la cubeta (Bio-Rad) y se establece el circuito eléctrico a 100 V. Este proceso tiene lugar a 4 °C, colocando la cubeta de transferencia en un soporte con hielo.
4. Una vez efectuada la transferencia, la membrana se guarda a 4 °C, en solución de *blotto* para bloquear todos los lugares de unión a proteína. Este tratamiento puede durar de 12 h hasta 1 semana, se recomienda renovar la solución de *blotto* periódicamente. El bloqueo logra reducir el ruido de fondo durante la inmunodetección.
5. Por otro lado, al finalizar la transferencia es conveniente realizar la tinción del gel con azul de *Comassie* para comprobar que el proceso de transferencia de proteínas se ha realizado correctamente o para usarlo como control de carga de proteína.

SOLUCIONES:

<u>Solución de <i>blotto</i></u>	<u>Tampón de transferencia de proteínas</u>
Leche descremada en polvo 10%	Tris HCl 0,025 M
TBS o PBS 1X	Glicina 0,192 mM
	Metanol 20 %
Se ha utilizado leche de la marca comercial Central Lechera Asturiana.	Se prepara en el momento de transferir, diluyendo un stock 10X con H ₂ O destilada fría.
PBS y TBS se preparan como se describe en el apartado 3.8.3.	

3.10.5 TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON AZUL DE COOMASSIE

El procedimiento de tinción se basa en la fijación del colorante azul de Coomassie a las proteínas. Se incuba el gel de electroforesis de proteínas con la solución de tinción y después, para eliminar el ruido de fondo, con la solución de lavado hasta distinguir las bandas de proteínas del fondo.

PROTOCOLO:

1. Incubar el gel en solución de tinción, durante un mínimo de 90 min.
2. Efectuar lavados sucesivos del gel con solución de lavado, hasta que se elimine la coloración inespecífica.

Una vez teñidos, los geles de acrilamida se pueden secar en un secador de geles conectado a una bomba de vacío. Antes de secarlos, los geles se tienen que colocar entre una lámina de papel de filtro y celofán embebido en solución de lavado. La desecación se realiza a una temperatura de 60-80 °C, durante 1 hora para geles de 0.75 mm de grosor y 2 horas para geles de 1.5 mm grosor.

SOLUCIONES:

<u>Solución de tinción</u>		<u>Solución de lavado</u>	
Metanol	40 %	Metanol	40 %
Ácido acético glacial	7 %	Ácido acético glacial	7 %
Azul de Coomassie	0,025 %		

3.10.6 INMUNODETECCIÓN

Para efectuar la inmunodetección, seguimos las pautas descritas por el proveedor del kit *ImmunoStar™ HRP Substrate Kit* (BIORAD). La técnica se basa en la incubación sucesiva de la membrana con dos anticuerpos.

El primero de los anticuerpos permite reconocer la proteína en estudio de manera específica.

El anticuerpo secundario es una anti-IgG, que reconoce el anticuerpo primario y lleva asociada una actividad peroxidasa de rábano. Esta enzima cataliza la oxidación del luminol en medio alcalino, a través de una reacción que emite una luminiscencia que puede ser captada por una película autoradiográfica. Así, la señal emitida por la enzima captada por la película indica la presencia de una cantidad de proteína cuantificable una vez que se revela la autoradiografía.

PROTOCOLO:

1. Incubar la membrana con una dilución adecuada de anticuerpo primario, en una bolsa de plástico sellada, durante 4-16 h a 4 °C en un agitador orbital. Alternativamente, se puede llevar a cabo la incubación durante 60 min a temperatura ambiente.
2. Retirar el anticuerpo primario y efectuar 3 lavados de la membrana, durante 10-15 min, con 100 ml de solución de lavado a temperatura ambiente.
3. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario a dilución 1/5000 durante 60 min con agitación suave y a temperatura ambiente.
4. Retirar el anticuerpo secundario y efectuar 3 lavados de la membrana, como se describe en el punto 2.
5. Proceder a la inmunodetección, siguiendo el protocolo del kit *Immun-Star™ HRP Substrate Kit* (BIORAD).

SOLUCIONES:

<u>Solución para diluir los anticuerpos</u>		<u>Solución de lavado</u>	
Leche descremada en polvo	5 %	PBS	1X
PBS	1X	Tween 20 (Sigma)	0,05 %
Tween 20 (Sigma)	0,05 %		

3.11 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y METABOLITOS

3.11.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

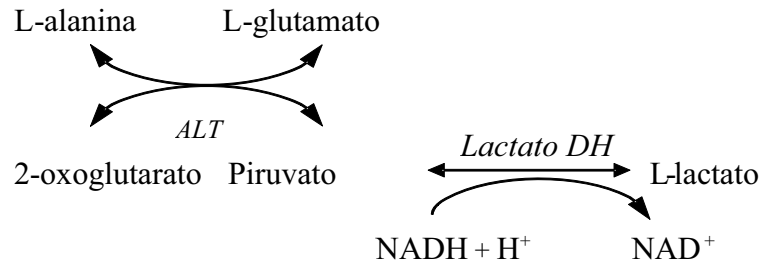
La actividad de las enzimas analizadas está expresada en actividad específica (U/g), Unidades/gramo de proteína total del extracto.

3.11.1.1 DETERMINACIÓN DE ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT)

La determinación de la actividad ALT fue llevada a cabo a través del uso de un kit de la compañía LINEAR CHEMICALS adaptado para su uso en el autoanalizador COBAS MIRA S. (Roche).

FUNDAMENTO:

Se determinó la actividad ALT a través de la reacción catalizada hacia la formación de piruvato y L-glutamato a partir de L-alanina y 2-oxoglutarato. El piruvato formado reacciona inmediatamente con la LDH (lactato deshidrogenasa), de modo que la velocidad de oxidación del NADH, observada a 340 nm, sea proporcional a la actividad ALT de la muestra.



CONDICIONES DE ENSAYO:

La mezcla final de reacción (191 μl) constaba de:

Tampón Tris-HCl, pH 7.5	100 mM
2-oxoglutarato	13.7 mM
NADH	0.18 mM
L-alanina	0.5 mM
LDH	21 mkat l ⁻¹

La reacción se realizó a 30 °C, siendo iniciada por la adición de 16 μl de muestra (obtenida según el apartado 3.2.1.) a 175 μl de la mezcla de reacción.

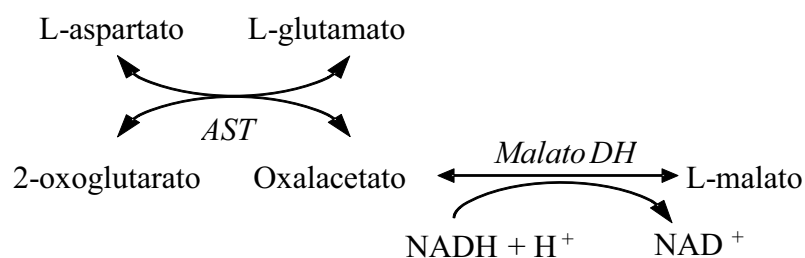
La unidad de actividad ALT se definió como la cantidad de enzima capaz de consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.11.1.2 DETERMINACIÓN DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST)

La determinación de la actividad AST fue llevada a cabo a través del uso de un kit de la compañía LINEAR CHEMICALS adaptado para su uso en el autoanalizador COBAS MIRA S. (Roche).

FUNDAMENTO:

La determinación de la reacción catalizada por AST se basó en la transformación de oxalacetato a malato con ayuda de la malato DH (malato deshidrogenasa), de modo que la velocidad de oxidación del NADH de esta reacción medida a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad AST en la muestra.



CONDICIONES DE ENSAYO:

La mezcla final de reacción (191 μl) constaba de:

Tampon Tris-HCl, pH 7.5	100 mM
2-oxoglutarato	12.6 mM
NADH	0.18 mM
L-aspartato	200 mM
Lactato DH	15 mkat l ⁻¹
Malato DH	10 mkat l ⁻¹

La reacción se realizó a 30 °C, siendo iniciada por la adición de 16 μl de muestra (obtenida según el apartado 3.2.1.) a 175 μl de la mezcla de reacción.

La unidad de actividad AST se define como la cantidad de enzima capaz de consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.11.1.3 DETERMINACIÓN DE GLUCOQUINASA (GK)

Los extractos para determinar la actividad GK se prepararon utilizando el protocolo descrito en el apartado 3.2.1, y el tampón de homogeneización T al que se le agregó KCl 100 mM. Los extractos crudos se filtraron utilizando una columna de Sephadex G-25, para eliminar metabolitos como glucosa o ATP que pueden interferir en la determinación de la actividad GK.

Previamente, se efectuó el calibrado previo de las columnas. La calibración se efectúa cargando la columna con una mezcla de dos colorantes (uno que resulta totalmente excluido de la columna, azul de dextrano,

y otro totalmente incluido, dicromato de potasio) de diferente masa molecular. Se centrifuga 1 minuto a 1000 rpm y se observa que esta solución se separa correctamente después de haber efectuado la centrifugación.

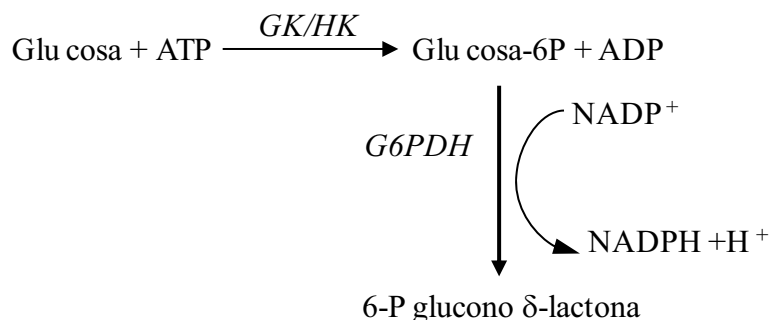
La determinación de la actividad GK se ha realizado en el autoanalizador COBAS MIRA S (Roche), adaptando el método descrito por (Davidson y Arion, 1987).

PROTOCOLO:

1. Hidratar la resina Sephadex G-25 en tampón de homogeneización T para GK y mantenerla a 4 °C.
2. Preparar columnas de filtrado introduciendo un poco de lana de vidrio en jeringas de insulina; colocar estas columnas en tubos de vidrio y llenarlas de resina hidratada.
3. Centrifugar a 4 °C, durante 1 minuto, a 1000 rpm, en centrífuga Beckmann. Volverlas a rellenar con más resina y repetir la centrifugación, hasta que la resina quede a 0,5 cm del límite superior de la jeringa.
4. Eliminar el eluido del tubo de vidrio.
5. Agregar a la columna 180-200 µl del extracto crudo y centrifugar nuevamente en las mismas condiciones.
6. Recoger el líquido eluido (muestra) y determinar la actividad GK.

FUNDAMENTO:

El fundamento del método se basa en transformar la glucosa-6P (producto de la reacción tanto de la GK como de la Hexoquinasa “HK”) en 6-fosfoglucono-δ-lactona, en una reacción catalizada por la G6PDH que promueve la formación de NADPH y, por lo tanto, un incremento en la absorbancia a 340 nm. Las actividades de GK y de HK se diferencian porque, mientras que la GK tiene baja afinidad por la glucosa y sólo actúa a concentraciones elevadas de este metabolito (100 mM), la HK presenta también actividad a 0,5 mM glucosa. De este modo, determinando la actividad de la fosforilación de glucosa a estas dos concentraciones de glucosa, se puede calcular la actividad GK por diferencia de la actividad determinada a 100 mM y 0,5 mM de glucosa, restando un tercio de la actividad GDH, ésta última medida en presencia de NADP⁺ y en ausencia de ATP y de G6PDH (Borrebaek et al., 1993).



CONDICIONES DE ENSAYO:

		<u>GK+ HK</u>	<u>HK</u>	<u>GDH</u>
Reactivo general R1	Tris HCl pH 7,75	100 mM	100 mM	100 mM
	MgCl ₂	7,5 mM	7,5 mM	7,5 mM
	KCl	100 mM	100 mM	100 mM
	DTT	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
	NADP ⁺	1 mM	1 mM	1 mM
Reactivo iniciador R2	G6PDH	1 mU/ml	1 mU/ml	1 mU/ml
	ATP	6 mM	6 mM	---
	Glucosa	100 mM	0,5 mM	---

La mezcla final de reacción, 200 µl, contenía:

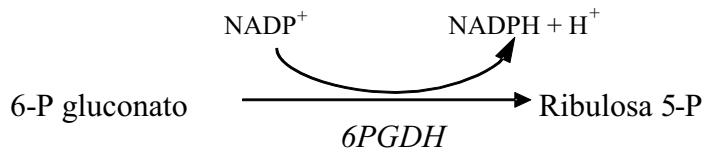
	GK+ HK	HK	GDH
Reactivo general (R1)	155 µl	165 µl	195 µl
Muestra	5 µl	5 µl	5 µl
Reactivo iniciador (R2)			
ATP	20 µl	20 µl	---
Glucosa 1M	20 µl	---	---
Glucosa 100 mM	---	10 µl	---

La muestra (5 µl) se incubó con el reactivo general R1 (155 µl, 165 µl y 195 µl para la determinación de GK+HK, HK y de la glucosa deshidrogenasa, respectivamente) durante 6 min 15 segundos. Posteriormente se agregó el reactivo iniciador R2 y se determinó la actividad GK, teniendo en cuenta que se forma un mol de NADPH por cada mol de glucosa fosforilada. Para expresar la actividad GK en U/g proteína, se cuantificó la proteína de los extractos hepáticos siguiendo el método de Bradford (apartado 3.10.2.).

3.11.1.4 DETERMINACIÓN DE 6-FOSFO-GLUCONATO DESHIDROGESANA (6PGDH)

El ensayo automatizado se basó en el método manual descrito por Möellering y Bergmeyer (1984).

FUNDAMENTO:



CONDICIONES DE ENSAYO:

La mezcla final de reacción, 200 µl, contenía:

Tampón Imidazol-HCl, pH 7,7	83 mM
MgCl ₂	3 mM
NADP	0,5 mM
6-P gluconato	2 mM

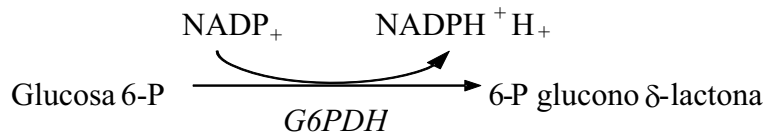
La reacción se llevó a cabo a 30 °C, siendo iniciada por la adición de 4 µl de muestra (obtenida según el apartado 3.2.1.) a 196 µl de mezcla de reacción. Se registró el incremento de absorbancia debido a la aparición de NADPH, a 340 nm.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de producir 1µmol de NADPH por minuto.

3.11.1.5 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH)

El ensayo automatizado se basó en el método manual descrito en Lee (1982).

FUNDAMENTO:



CONDICIONES DE ENSAYO:

La mezcla final de reacción, 200 µl, contenía:

Tampón Imidazol-HCl, pH 7,7	78 mM
MgCl ₂	5 mM
NADP	1 mM
Glucosa 6-P	1 mM

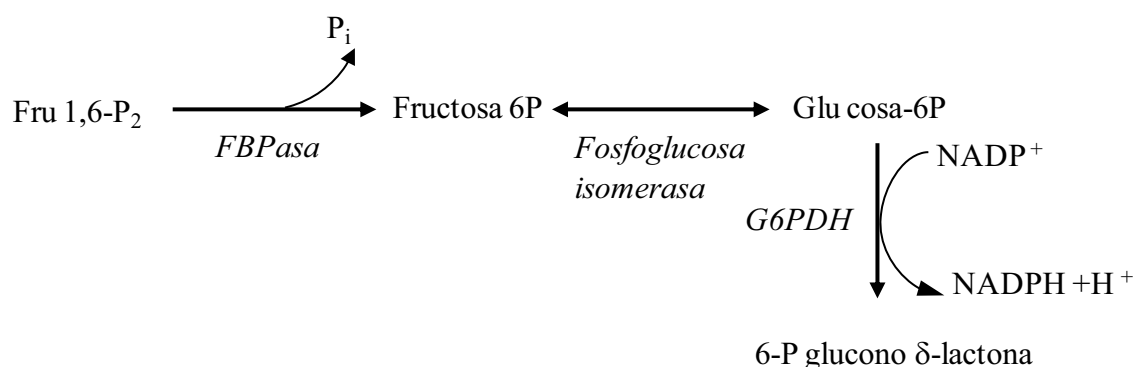
La reacción se llevó a cabo a 30 °C, siendo iniciada al adicionar 4 µl de muestra (obtenida según el apartado 3.2.1.) a 196 µl de mezcla de reacción. Se registró el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de producir 1 µmol de NADPH por minuto.

3.11.1.6 DETERMINACIÓN DE FRUCTOSA 1-6 BIFOSFATASA (FBPasa)

Se adaptó el método de Ekdahl y Ekmann (1985) al ensayo automatizado.

FUNDAMENTO:



CONDICIONES DE ENSAYO:

La mezcla final de reacción, 200 µl, contenía:

Tampón Imidazol-HCl, pH 7,7	85 mM
MgCl ₂	5 mM
NADP	0,5 mM
β-mercaptoetanol	12 mM
Fru 1,6-P ₂	0,05 mM
fosfoglucoisomerasa	2,5 Uml ⁻¹
G6PDH	0,48 Uml ⁻¹

Las enzimas auxiliares, disueltas en sulfato de amonio, no fueron desaladas previamente, ya que el amonio no interfiere en la reacción.

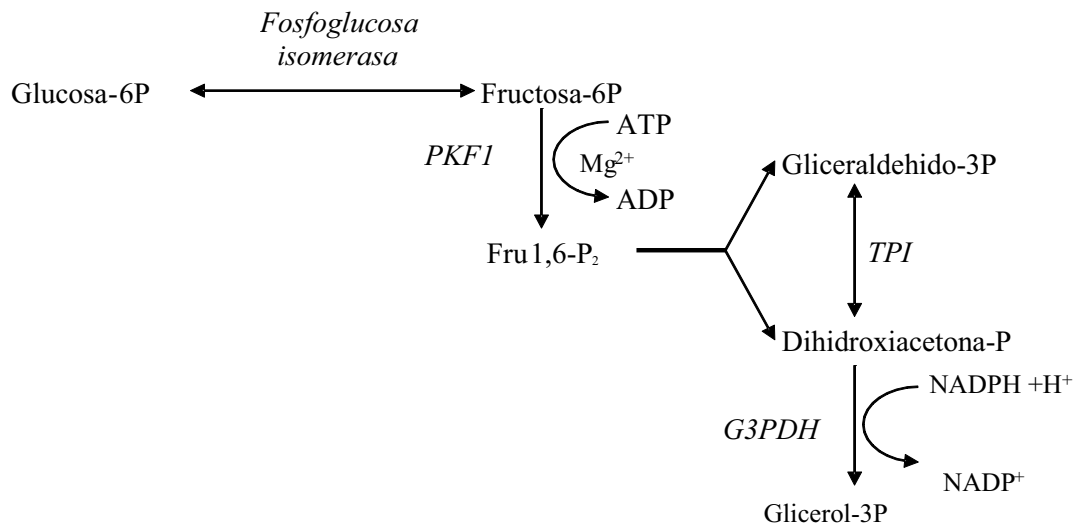
La reacción se llevó a cabo a 30 °C, siendo iniciada con la adición de 4 µl de muestra (obtenida según el apartado 3.2.1.) a 196 µl de mezcla de reacción. Se registró el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH.

Una unidad de actividad FBPasa se definió como la cantidad de enzima capaz de producir 1 μmol de NADPH por minuto.

3.11.1.7 DETERMINACIÓN DE FOSFOFRUCTOQUINASA (PFK1)

Se adaptó el método de Castaño et al. (1979) al ensayo automatizado.

FUNDAMENTO:



CONDICIONES DE ENSAYO:

La mezcla final de reacción, 200 µl, contenía:

R1:	Tampón Tris-HCl, pH 8,25	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
	KCl	50 mM
	NADH	0,15 mM
	Sulfato amónico	4 mM
	β-mercaptoetanol	12 mM
	Fructosa-6P	10 mM
	Glucosa-6P	30 mM
	Aldolasa	0,675 U ml ⁻¹
	TPI	5 U ml ⁻¹
	G3PDH	2 U ml ⁻¹
R2:	ATP	1 mM

Las enzimas auxiliares aldolasa, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (glicerol 3-P DH) y triosa-P-isomerasa fueron previamente desaladas, por centrifugación a 13.000 xg durante 3 min a 4 °C. Las enzimas sedimentadas se resuspendieron en 50 mM de tampón Tris-HCl pH 8,25.

La mezcla de ensayo contenía glucosa-6-fosfato (Glucosa-6P), la cual se isomeriza fácilmente a fructosa-6-fosfato (Fructosa-6P) por la glucosa isomerasa presente en el propio extracto crudo de la muestra, por este motivo no fue necesario agregar dicha enzima.

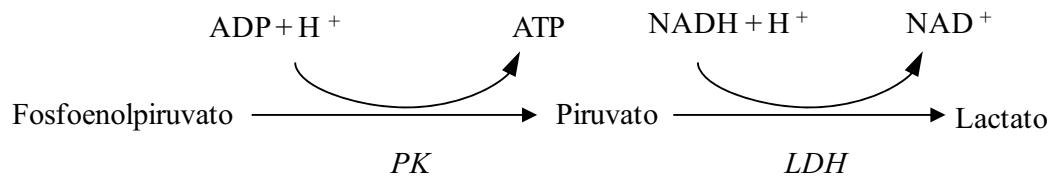
Tras haber atemperado la mezcla del componente de reacción R1 (176 µl) y los 4 µl de muestra (obtenida según apartado 3.2.1.) durante 2 min 55 segundos, se inicia la reacción con la adición de 20 µl de ATP (R2), el proceso se desarrolla a 30 °C y se registra el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NADH durante el curso de la reacción.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima para consumir 2 µmol de NADH por minuto.

3.11.1.8 DETERMINACIÓN DE PK

Este ensayo está basado en el de Staal et al. (1975), adaptado para su automatización en COBAS MIRA S.

FUNDAMENTO:



CONDICIONES DE ENSAYO:

La mezcla final de reacción, 200 μl , contenía:

R1:	Tampón glicilglicina, pH 7,4	70 mM
	MgCl ₂	10 mM
	KCl	100 mM
	NADH	0,15 mM
	Fosfoenolpiruvato	2,8 mM
	LDH	21 U ml ⁻¹
R2:	ADP	2,5 mM

La reacción llevada a cabo a 30 °C se inicio al añadir 20,7 μl de solución de ADP (R2). La mezcla del ensayo R1 (179,3 μl) fue previamente incubada con 2,5 μl de muestra (obtenida según apartado 3.2.1) durante 5 min. Se registró el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADH. La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue desalada previamente.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la actividad necesaria para consumir 1 μmol de NADH por minuto.

3.11.2 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

Para la determinación de glucosa, hemos utilizado el kit GLUCOSA (Linear Chemicals) adaptado a la determinación en COBAS MIRA S. El método se basa en la determinación de la formación de NADH con la oxidación de la β -D-glucosa de las muestras; el seguimiento de la reacción se efectuó por el incremento de la absorbancia a 340 nm. La glucosa en suero se determinó con muestras obtenidas como se detalla en el apartado 3.2. La cuantificación se efectuó interpolando los valores de absorbancia observados para las muestras en una recta de calibración obtenida mediante estándares de glucosa a concentraciones entre 6,25 y 200 mg/dl.

3.12 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Con el objetivo de cuantificar alanina, glucógeno y glutamato de tejido hepático de dorada, se realizó una extracción con ácido perclórico a partir de pools de 800 mg procedentes de 3-5 peces diferentes, siguiendo el método de Gribbestad et al. (1994). A los extractos secos se les añadieron 700 μl de $^2\text{H}_2\text{O}$ enriquecida al 99 %, y después de ser brevemente centrifugadas, se adicionaron 30 μl de un estándar interno que contiene 12 μmol de formiato de potasio. El espectro completo de ^1H RMN fue adquirido a 11,75 T Hz con un equipo Varian 500 de ancho de banda de 5 mm. Se utilizó un bloqueo de frecuencia de campo y se realizaron 5 adquisiciones después de presaturar la señal del agua, con un ángulo de pulso de 45 grados, un tiempo de adquisición de 3 s y un retraso del pulso de 40 s. Las muestras fueron aplicadas a una columna Dowex® 50WX8 hydrogen (Sigma-Aldrich) y los aminoácidos eluidos de la columna con 2M NH_4OH . Después de evaporar las muestras, a éstas se añadieron 700 μl de una mezcla de agua sin deuterio y 30 μl de un estándar interno con 45 μmol de ^1H -DMSO y 0,24 μmol de ^2H -DMSO disuelto en agua sin deuterio.

El espectro de protón desacoplado ^2H RMN fue adquirido a 50 °C sin bloqueo de frecuencia de campo con un ángulo de pulso de 90°, un tiempo de adquisición de 2 s y un retraso del pulso de 5 s. Se realizaron entre 3500-4500 escaneados para cada muestra, con un tiempo de colección de aproximadamente 6-8 h. El enriquecimiento en $^2\text{H}_2\text{O}$ del agua de los acuarios fue determinado de acuerdo con Jones et al., 2001. Todos los espectros de RMN fueron analizados utilizando la rutina de ajuste de curva suministrado con el programa de análisis espectral NUTS (Acorn RMN Inc., Fremont CA).

Los metabolitos seleccionados en las muestras tratadas con ácido perclórico fueron cuantificados a partir del espectro ^1H RMN y en base a la relación entre la señal del metabolito y a la señal del estándar de formiato corregida por la cantidad de formiato (12 μmol). Para la cuantificación de alanina, se determinó la señal del grupo metilo que tiene resonancia a 1,47 ppm y se dividió el área de la señal por 3 (hidrógenos por molécula). Para glutamato, se determinó la señal del pseudo-triple de metileno que tiene resonancia a 2,34 ppm y el área de la señal se dividió por 2 (hidrógenos por molécula). En el caso del glucógeno, se midió la señal del hidrógeno 1 que tiene resonancia a 5,40 ppm y su relación con el estándar de formiato se calculó directamente.

El enriquecimiento de ^2H en los hidrógenos del grupo metilo de alanina presentes la fracción aminoacídica fue calculado utilizando la señal del ^2H y ^1H del grupo metilo de la alanina y la señal del estándar interno de DMSO (Barosa et al 2010). La cantidad de ^2H (en μmol) fue calculada utilizando la relación entre la señal del grupo metilo de alanina y la señal del estándar interno DMSO en el espectro de ^2H RMN multiplicada por la cantidad de ^2H del estándar interno DMSO (0,24 μmol). La cantidad del isotopo ^1H (en μmol) fue calculada utilizando la relación entre señal del grupo metilo de la alanina y la señal del estándar interno DMSO en el espectro de ^1H RMN multiplicada por la cantidad de ^1H del estándar interno DMSO (45 μmol). El porcentaje de enriquecimiento en ^2H del grupo metilo de la alanina se calculó: $100 \times \mu\text{mol } ^2\text{H} / (\mu\text{mol } ^2\text{H} + \mu\text{mol } ^1\text{H})$. No hubo corrección para el ruido de fondo del enriquecimiento de ^2H . Las determinaciones de RMN se realizaron en el Centro de Neurociencias y Biología celular, DEpartamento de ciencias de la vida, Universidad de Coimbra bajo la supervisión de J. Jones e I. Viegas

3.13 TRATAMIENTOS A LOS QUE FUERON SOMETIDOS LOS PECES

3.13.1 TRATAMIENTO CON COMPUESTOS ORGÁNICOS INHIBIDORES DE ALT

3.13.1.1 PREPARACIÓN DE AMINOOXIACETATO

Se prepararon diferentes diluciones a partir de una solución tamponada a pH 7.5 de aminooxiacetato (0,823 M).

Se inyectaron 100 µl de las diluciones correspondientes de aminooxiacetato por cada 100 g de dorada, correspondiente a 1.45, 36.25, 72.5, 145 y 725 µg de AOA por cada Kg de pez.

A diferentes tiempos después a la inyección intraperitoneal se obtuvieron los tejidos como se detalla en el apartado 3.2.

Solución de aminooxiacetato

Tampón Tris HCl pH 7,5 50 mM

Aminooxiacetato 823 mM

La solución de AOA se ajusta a pH 7.5 NaOH 3M.

3.13.1.2 PREPARACIÓN E INCORPORACIÓN DE AMINOOXIACETATO EN LA DIETA

Se prepararon varias dietas con diferentes concentraciones de AOA; 24,2 mg/kg de pienso, 41,6 mg/kg de pienso, 100 mg/kg de pienso y 208,3 mg/kg de piens., Cantidades que corresponden en el pez a 750 µg de AOA/Kg de pez/día, 1250 µg de AOA/Kg de pez/día y 3000 µg de AOA/Kg de pez/día, respectivamente, cuando se alimentan las doradas diariamente con una cantidad de dieta equivalente al 3 % del peso de los peces. Para ello se utilizó la dieta comercial Dibaq como base. Alternativamente, se realizó una dieta experimental, con una composición diferente que incluye una mayor cantidad de carbohidratos.

Los peces fueron alimentados por un periodo de 6, 7 y 30 días con las dietas en presencia o en ausencia (control) de AOA. Tras este periodo de tiempo los peces fueron sacrificados. La toma de muestras se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.

Para la preparación de las dietas se utilizó el pienso Dibaq o ingredientes base para lograr la dieta experimental, previamente triturados y mezclados con la concentración correspondiente de AOA (disuelto en agua y ajustado a pH 7.5). Posteriormente, se procedió a elaborar, secar y triturar el pienso para obtener el tamaño adecuado para la ingesta de los peces.

Dieta (%) Compuesto	Dibaq	Experimental	P60	P45
Proteína	46	42	60	45,3
Carbohidratos	9,3	20	7.2	24,6
Lípidos	22	13,4	14,7	15,7
Humedad	11,5	3,13	2,3	1,7
Celulosa	1	1	1	1
Fósforo Total	1,3	1,3	1,3	1,3
Ceniza	8,9	16,1	14,6	11,2
AOA	variable*	variable*	variable*	variable*
Energía	20 (KJ/g)	18,7 (KJ/g)	21,3 (KJ/g)	21,2 (KJ/g)

*El porcentaje de AOA suministrado a los peces con la dieta se indica en cada experimento.

3.13.2 PREPARACIÓN DE COMPLEJOS shRNA-QUITOSÁN PARA INYECCIÓN INTRAPERITONEAL

El plásmido pCpG-siRNA y sus derivados pCpG-si1sh1 y pCpG-scr fueron obtenidos tal como se describe en el apartado 3.9.8. Posteriormente fueron digeridos con la enzima *SacI* y purificados mediante precipitación con acetato sódico 3M.

Una vez obtenidos, purificados y linearizados los plásmidos con la enzima *SacI* se procedió a su encapsulación en quitosán. Trescientos µg de plásmido se mezclaron con 3 ml de quitosán al 0.2% y 1.2 ml de tripolifosfato (TPP), esta mezcla se agitó durante 30 min a 14.000 rpm y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 15 °C. Finalmente se resuspendió el pellet en 2 ml de manitol al 2%. Se liofilizó y se guardó a 4 °C hasta ser utilizado. En el momento de inyectar el complejo plásmido-quitosán se resuspendió en 500 µl de solución salina estéril y se procedió a inyectar el equivalente a 100 µg de plásmido para cada 10 ó 15 g. de pez.

3.14 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El tratamiento estadístico de los resultados lo efectuamos con el programa Statview (SAS, 1998). El análisis estadístico de las diferencias entre las condiciones experimentales se determinó mediante el test de *Duncan multiple range test*.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESIÓN DE cALT1, cALT2 Y mALT DE *S. AURATA* EN CÉLULAS HEK293

Para poder identificar secuencias silenciadoras de mRNAs de las isoformas de ALT y previo a su aplicación *in vivo*, inicialmente se utilizaron células HEK293 por la facilidad que éstas presentan para ser transfectadas y expresar de forma transitoria genes exógenos.

Con este fin se cotransfectaron los vectores que expresan isoformas de ALT y las diferentes secuencias silenciadoras.

4.1.1 OBTENCIÓN DE LOS VECTORES pcDNA3-cALT1, pcDNA3-cALT2 y pcDNA3-mALT

Con el objetivo de subclonar las isoformas cALT1, cALT2 y mALT de hígado de *S. aurata* en el vector pcDNA3, se realizaron PCRs utilizando el cDNA preparado a partir de RNA total de hígado de *S. aurata* y oligonucleótidos específicos para amplificar cada una de las isoformas de ALT: JDAL16 e IMAL20 para amplificar cALT1, JDAL36 e IMAL20 para cALT2 y finalmente JDAL26 e IMAL24 para mALT (Apartado 3.6 de materiales y métodos). Posteriormente, se purificaron los productos de PCR y el vector pcDNA3. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas HindIII y BamHI, y se procedió a efectuar posteriormente la ligación.

Los plásmidos obtenidos, pcDNA3-cALT1, pcDNA3-cALT2 y pcDNA3-mALT, se utilizaron para la expresión de cALT1, cALT2 y mALT de *Sparus aurata* en células HEK293.

4.1.2 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ALT TRAS LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS cALT1, cALT2 Y mALT DE *S. AURATA*, EN CÉLULAS HEK293

La actividad ALT fue determinada en las fracciones citosólica y mitocondrial obtenidas a partir de extractos de células HEK293 tras la expresión de las isoformas mALT, cALT1 y cALT2.

A fin de determinar si las isoformas clonadas en pcDNA3 inducían la expresión de las isoformas de ALT de dorada en células eucariotas, se transfectaron células HEK293 con 6 µg de cada uno de los vectores pcDNA3-cALT1, pcDNA3-cALT2 y pcDNA3-mALT. A las 48 h se lisaron las células y se aislaron las fracciones citosólica y mitocondrial para determinar la actividad ALT. En la figura 5 se puede observar los incrementos de actividad específica ALT observados en las células transfectadas con los vectores de expresión para las distintas isoformas en relación al control (plásmido vacío, pcDNA3).

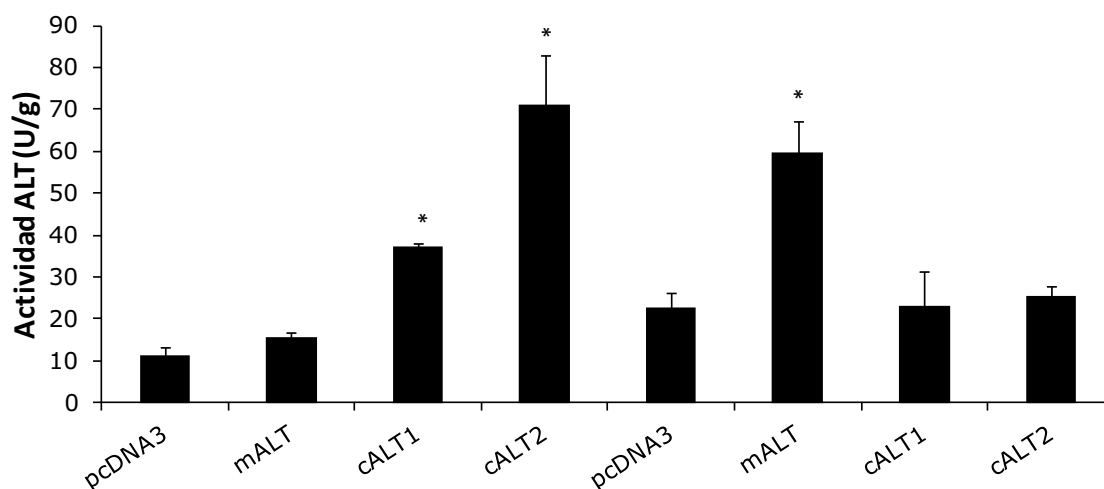


Figura 5. Expresión de cALT1, cALT2 y mALT de dorada en células HEK293. Células HEK293 fueron transfectadas, en placas de 6 pocillos, con 6 µg de pcDNA3 (control), pcDNA3-cALT1, pcDNA3-cALT2 y pcDNA3-mALT, mediante el método del fosfato cálcico, como se describe en el apartado 3.8.8 de materiales y métodos. Cuarenta y ocho horas postratamiento se obtuvo el extracto celular total y se procedió a la separación de las fracciones citosólica y mitocondrial en las que se determinó posteriormente la actividad ALT. La actividad ALT se ensayó siguiendo el método descrito en el apartado 3.11.1.1 de materiales y métodos. Los valores de la actividad ALT están expresados en U/g corresponden al valor de la media ± SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*).

Los valores de la actividad ALT observada en la fracción citosólica de las células transfectadas con los vectores que expresan las isoformas citosólicas cALT1 y cALT2 (pcDNA3-cALT1 y pcDNA3-cALT2) mostraron incrementos de aproximadamente 3.5 veces (cALT1) y 6 veces (cALT2) respectivamente en relación a los valores observados en la fracción citosólica aislada de células control. No se observó un efecto significativo en las células transfectadas con el vector pcDNA3-mALT. La actividad ALT determinada en la fracción mitocondrial en las células transfectadas con los vectores que expresaron las isoformas citosólica cALT1 y cALT2 (pcDNA3-cALT1 y pcDNA3-cALT2) y la isoforma mitocondrial mALT (pcDNA3-mALT) mostró incrementos de 2.6 veces tras la expresión de mALT, respecto a los valores observados en la fracción mitocondrial

de células control, mientras que las isoformas citosólicas (cALT1 y cALT2) no mostraron cambios significativos.

4.2 SILENCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS cALT1, cALT2 Y mALT DE *S. AURATA* MEDIANTE RNAi *IN VITRO*

La transfección de células HEK293 con plásmidos que expresan las isoformas de ALT de *S. aurata* nos permitió utilizar este sistema para poder validar *in vitro* siRNAs, que permitan estudiar posteriormente la silenciación de mRNA de las isoformas ALT *in vivo*. Pevio a la introducción de material genético en doradas, el primer objetivo fue diseñar siRNAs que permitieran silenciar los niveles de mRNA de ALT *in vitro*.

Se diseñaron diferentes siRNA contra las isoformas de la ALT de hígado de *Sparus aurata*. Se determinó la eficacia de transfección de los siRNAs en células HEK293, utilizadas como sistema para la validación de los siRNA diseñados. Para ello se realizaron ensayos de transfección con siRNA anti GAPDH marcado con fluoresceína (FITC).

En el ensayo se utilizaron 500.000 células HEK293 mantenidas en condiciones estándar de cultivo, como se describe en el apartado 3.8.5 de materiales y métodos. Se transfectaron las células con 50 nM de siRNA anti GAPDH, junto con 4 µl de lipofectamina 2000 como se describe en el apartado 3.8.9.

A las 14 h postransfección, se analizó el porcentaje de células transfectadas mediante citometría de flujo, en el servicio científico técnico del Parque Científico de la Universidad de Barcelona.

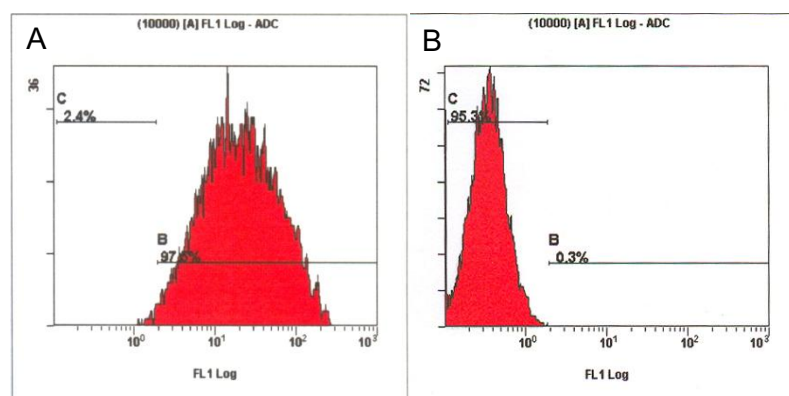


Figura 6. Eficiencia de transfección de un siRNA anti GAPDH marcado con FITC en células HEK293. Células HEK293 fueron transfectadas, en placas de 6 pocillos, con 50 nM de siRNA anti GAPDH y 4 µl de lipofectamina 2000 (A). Células control en presencia de lipofectamina 2000 (B). A las 14 h postratamiento se determinó mediante citometría de flujo, el porcentaje de células transfectadas respecto al control.

Un 97.5% de células transfectadas con el complejo siRNA marcado con FITC y lipofectamina 2000 mostraron fluorescencia. Como control se analizaron células en presencia de lipofectamina 2000 y ausencia de siRNA (Figura 6).

Para identificar potenciales secuencias de siRNA que ejerzan efecto silenciador de la expresión de cALT1, se diseñaron siRNAs utilizando los algoritmos de las casas comerciales Ambion y Bionova (apartado 3.5.1).

Una vez diseñados diferentes siRNA contra cALT1, se procedió a validarlos, determinando los niveles de mRNA de cALT1 en células HEK293 transfectadas con 20 nM del siRNA en estudio (siRNA1, siRNA2, siRNA3 y siRNA4) y 30 ng de pcDNA3-cALT1. A las 24 h de la transfección se cuantificó el efecto silenciador de cada uno de los siRNA diseñados sobre los niveles de mRNA de cALT1.

Para este experimento, se cotransfectaron el plásmido reportero pCMV- β , pcDNA3-cALT1 y los siRNAs correspondientes. A las 24 h postratamiento se cuantificó el efecto de silenciación de los diferentes siRNA determinando los niveles de mRNA de cALT1 mediante qPCR (Figura 7).

El siRNA1 mostró un efecto inhibitor significativo en la expresión de cALT1, disminuyendo los niveles de mRNA hasta un 62% de los valores de expresión observados en el control (células transfectadas con 30 ng de pcDNA3-cALT1 en ausencia de siRNA). El siRNA3 promovió una disminución de los niveles de mRNA hasta un 63% de los observados en el control. Los otros siRNAs analizados no mostraron efecto silenciador sobre los niveles de expresión de cALT1.

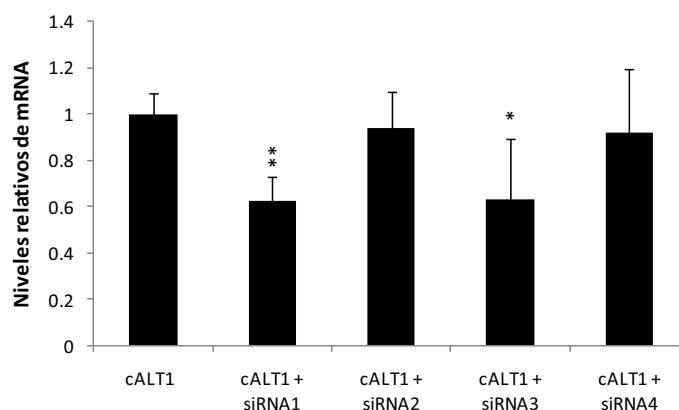


Figura 7. Silenciación génica de cALT1 de dorada expresada en células HEK293, mediante siRNA. Células HEK293 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng de plásmido reportero pCMV- β , 30 ng de pcDNA3-cALT1 (cALT1) y (20 nM) del siRNA en estudio mediante el uso de lipofectamina 2000. Se ensayaron 4 siRNAs diferentes diseñados contra cALT1 (apartado 3.5.1.). Tras 24 h de tratamiento se aisló el RNA total de células control (transfectadas con pcDNA3-cALT1 en ausencia de siRNA) y el de las células transfectadas con pcDNA3-cALT1 y los diferentes siRNA (siRNA1, siRNA2, siRNA3 y siRNA4). La expresión de cALT1 se determinó mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos JDRTc1S y JDRTc1AS. Se utilizaron también oligonucleótidos específicos para HPRT (JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs), utilizada como gen control de la expresión constitutiva y para β -galactosidasa (JDRTpcmvbS y JDRTpcmvbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT1 normalizados con β -galactosidasa y β -actina. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores de la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**).

Una vez detectado el oligonucleótido que causaba una mayor silenciación de cALT1, se estudió su efecto cuando las células se transfectaban con diferentes concentraciones del plásmido que expresa cALT1. Para ello se transfectaron células HEK293 con el plásmido reportero pCMV- β y con 20 nM de siRNA1 en presencia de 3 ng, 30 ng y 300 ng de pcDNA3-cALT1. A las 24 h se analizó la expresión de cALT1 mediante qPCR (Figura 8).

En células transfectadas con 3 ng de pcDNA3-cALT1, no se observó silenciación significativa de la expresión de cALT1 en comparación con las células control (células transfectadas con 3 ng de pcDNA3-cALT1 en ausencia de siRNA). En las células transfectadas con 30 ng de pcDNA3-cALT1 y siRNA (20 nM), la expresión de cALT a nivel de mRNA descendió hasta un 62% del valor correspondiente al control. Finalmente, utilizando 300 ng de pcDNA3-cALT1 el efecto silenciador del siRNA1 redujo los niveles de mRNA de cALT1 hasta un 77% comparado con el control. La razón por la cual no se observó un efecto inhibitor al utilizar 3 ng de pcDNA3-cALT1 con siRNA1 puede deberse a que la cantidad de mRNA que se analiza está en el umbral mínimo de detección.

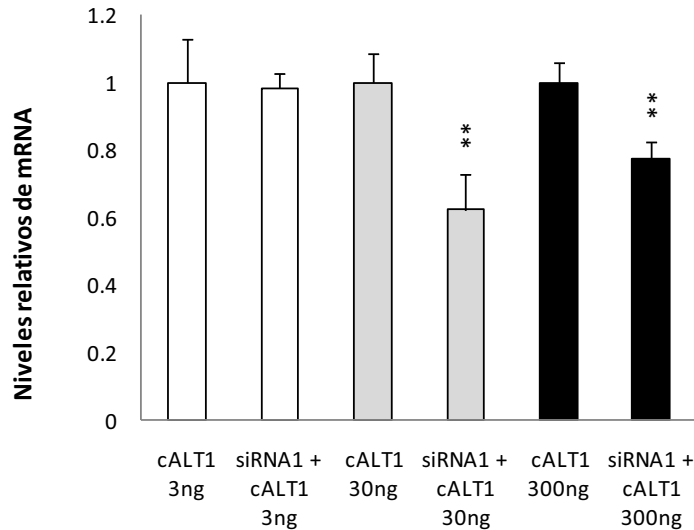


Figura 8. Efecto de siRNA1 en células HEK293 transfectadas con diferentes cantidades de pcDNA3-cALT1. Células HEK293 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng de plásmido reportero pCMV- β , diferentes cantidades de pcDNA3-cALT1 (cALT1) y siRNA1 (20 nM) utilizando lipofectamina 2000. A las 24 h postratamiento se aisló el RNA total de: células control (transfectadas con pcDNA3-cALT1 en ausencia de siRNA) y células transfectadas con diferentes concentraciones de pcDNA3-cALT1: 3 ng (barras blancas), 30 ng (barras grises) y 300 ng (barras negras). La expresión de cALT1 se determinó mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos JDRTc1S y JDRTc1AS. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para HPRT (JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs), gen control de la expresión constitutiva y para β -galactosidasa (JDRTpcmvbS y JDRTpcmvbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT1 normalizados con β -galactosidasa y β -actina. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores de la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.01$ (**).

Una vez comprobado que el oligonucleótido siRNA1 era el que mostraba mayor silenciamiento, y que 30 ng era la concentración óptima de plásmido pcDNA3-cALT1 para validar los siRNAs, se analizó el efecto del tiempo postransfección. Para ello se transfectaron células HEK293 con 20 nM de siRNA1 y 30 ng de pcDNA3-cALT1. A diferentes tiempos postransfección se cuantificó el efecto de siRNA1 sobre la expresión de cALT1 a nivel de mRNA (Figura 9).

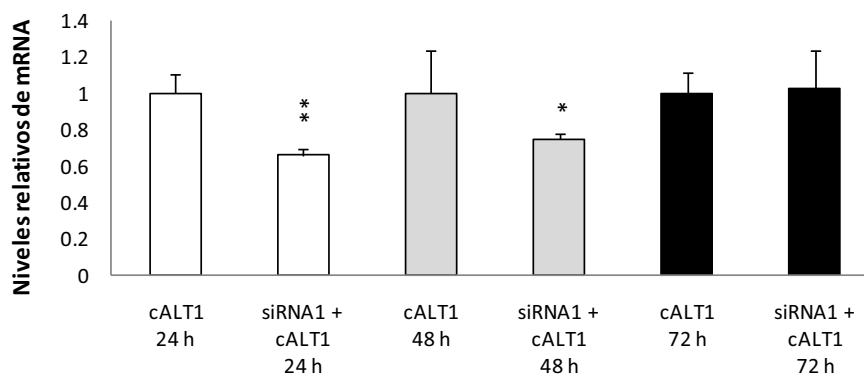


Figura 9. Efecto silenciador de siRNA1 sobre la expresión de cALT1 de dorada expresada en células HEK293 a diferentes tiempos postransfección. Células HEK293 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng de plásmido reportero pCMV- β , 30 ng de pcDNA3-cALT1 y siRNA1 (20 nM) utilizando 4 μ l de lipofectamina 2000 como se describe en materiales y métodos. Tras 24 h (barras blancas), 48 h (barras grises) y 72 h (barras negras), se aisló el RNA total de las células. La expresión de cALT1 se determinó mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos JDRTc1S y JDRTc1AS. Se utilizaron también oligonucleótidos específicos para HPRT (JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs), utilizada como gen control de la expresión constitutiva, y β -galactosidasa (JDRTpcmvbS y JDRTpcmvbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT1 normalizados con β -galactosidasa y β -actina. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores de la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**).

A las 24 h se observó un efecto silenciador significativo. La expresión de cALT1 fue un 66% de la observada en células control (células transfectadas con pcDNA3-cALT1 en ausencia de siRNA). A las 48 h postransfección los niveles de mRNA disminuyeron hasta un 75% del control. El efecto silenciador del siRNA disminuyó gradualmente, de tal manera que a las 72h, no se observó efecto sobre la expresión de cALT1.

Asimismo, con el fin de determinar la concentración óptima de siRNA para silenciar la expresión de cALT1 de dorada en células HEK293, se procedió a analizar el efecto de la concentración de siRNA1. Para ello se transfectaron células HEK293 con pCMV- β , pcDNA3-cALT1 y siRNA a concentración 20 y 100 nM. La expresión de cALT1 de *S. aurata* en células HEK293 se cuantificó mediante qPCR (Figura 10).

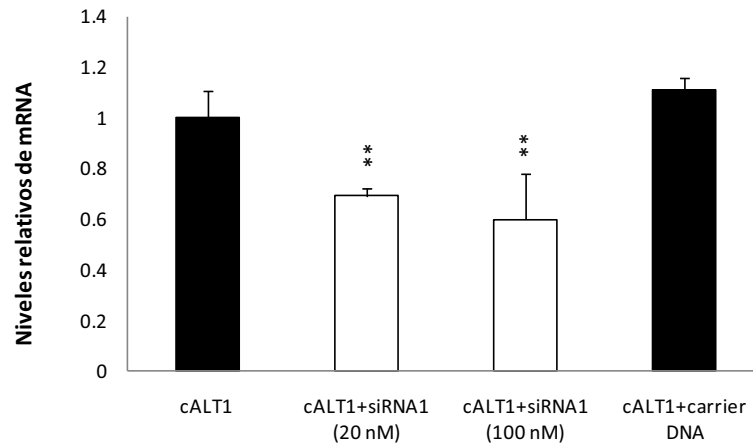


Figura 10. Efecto de la concentración de siRNA1 sobre la cALT1 de dorada expresada de en células HEK293. Células HEK293 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng de plásmido reportero pCMV- β , 30 ng de pcDNA3-cALT1 (cALT1), siRNA1 (20 nM ó 100 nM), 30 ng de pBluescript como DNA *carrier* y utilizando lipofectamina 2000. A las 24 h postratamiento se aisló el RNA total de: células control (transfectadas con pcDNA3-cALT1 en ausencia de siRNA o pcDNA3-cALT1 en presencia de 30 ng de pBluescript como DNA *carrier*) y el de las células tranfectadas con pcDNA3-cALT1 y siRNA1 (20 nM ó 100 nM). La expresión de cALT1 se determinó mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos JDRTc1S y JDRTc1AS. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para HPRT (JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs), gen control de la expresión constitutiva, y β -galactosidasa (JDRTpcmvbS y JDRTpcmvbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT1 normalizados con β -galactosidasa y β -actina. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores de la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.01$ (**).

Tras 24 h se observó un efecto silenciador significativo a ambas concentraciones de siRNA1 (20 y 100 mM). Los valores de mRNA de cALT1 descendieron hasta un 68% y 58%, a 20 y 100 mM respectivamente, de los observados en las células control (células transfectadas con pcDNA3-cALT1). No se observó diferencia significativa entre los niveles de mRNA de cALT1 observados en presencia de 20 nM ó 100 nM siRNA1.

Tras haber comprobado que en presencia de siRNA1 se producía la disminución significativa de los niveles de mRNA de cALT1 de dorada expresada en células HEK293, se diseñó un shRNA, en base a la secuencia del siRNA1, como se detalla en el apartado 3.5.2 de materiales y métodos. El constructo, pCpG-si1sh1, permite la transfección de siRNA1 en el núcleo y el posterior procesado en el citoplasma por Dicer para originar un siRNA maduro. El siRNA se incorpora al complejo RISC, el cual induce el silenciamiento génico. A fin de determinar la concentración óptima de pCpG-si1sh1 que permita disminuir los niveles de mRNA de cALT1 de dorada se transfectaron células HEK293 con 30, 300 ó 600 ng de pCpG-si1sh1 y 30 ng de pcDNA3-cALT1, y posteriormente se determinó la expresión de cALT1 por qPCR (Figura 11).

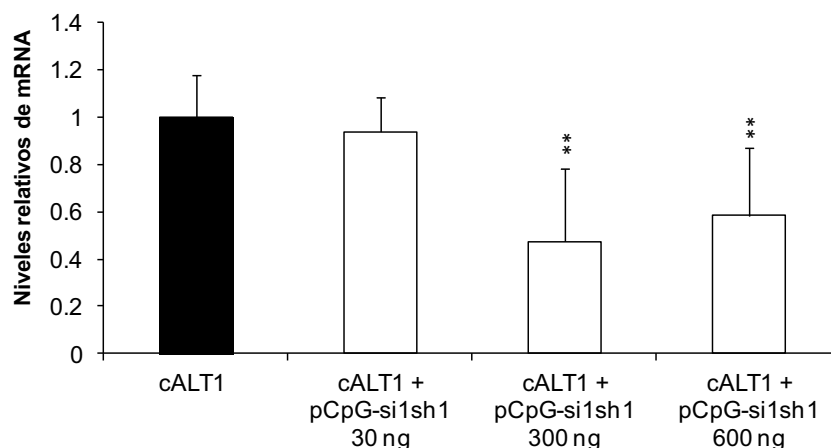


Figura 11. Efecto de pCpG-si1sh1 sobre la expresión cALT1 de dorada expresada en células HEK293. Células HEK293 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng de plásmido reportero pCMV- β , 30 ng de pcDNA3-cALT1 (cALT1) y 30, 300 ó 600 ng de pCpG-si1sh1 mediante la técnica de fosfato cálcico (apartado 3.8.8 de materiales y métodos). A las 48 h postratamiento se aisló el RNA total de: células control (transfectadas con pcDNA3-cALT1 en ausencia de pCpG-si1sh1) y de las tratadas con 30, 300 ó 600 ng de pCpG-si1sh1. La expresión de cALT1 se determinó mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos JDRTc1S y JDRTc1AS. Se utilizaron también oligonucleótidos específicos para HPRT (JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs), utilizada como gen control de la expresión constitutiva y β -galactosidasa (JDRTpcmbS y JDRTpcmbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT1 normalizados con β -galactosidasa y β -actina. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores de la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.01$ (**).

Después de 48 h del tratamiento de las células, se observó que pCpG-si1sh1 ejercía un efecto silenciador significativo, tanto si la concentración utilizada era 300 ó 600 ng de pCpG-si1sh1. La expresión de cALT1 de *S. aurata* se redujo hasta un 48% y un 58% de la observada en las células control (células transfectadas solo con pcDNA3-cALT1 en ausencia de pCpG-si1sh1 utilizando 300 ó 600 ng de plásmido, respectivamente). No se observó silenciamiento de los niveles de mRNA de cALT1 en las células transfectadas con 30 ng de pCpG-si1sh1.

Una vez comprobado que pCpG-si1sh1 nos permitía efectuar de manera significativa la silenciamiento de la isoforma cALT1 de hígado de *S. aurata*, nos propusimos obtener constructos adecuados para proceder a la disminución de la expresión de las otras isoformas ALT de dorada, mALT y cALT2.

Para analizar la silenciación de la expresión de las isoformas mALT y cALT2 de dorada, se procedió al diseño y validación de 6 siRNAs específicos para la isoforma mALT y 2 para la isoforma cALT2.

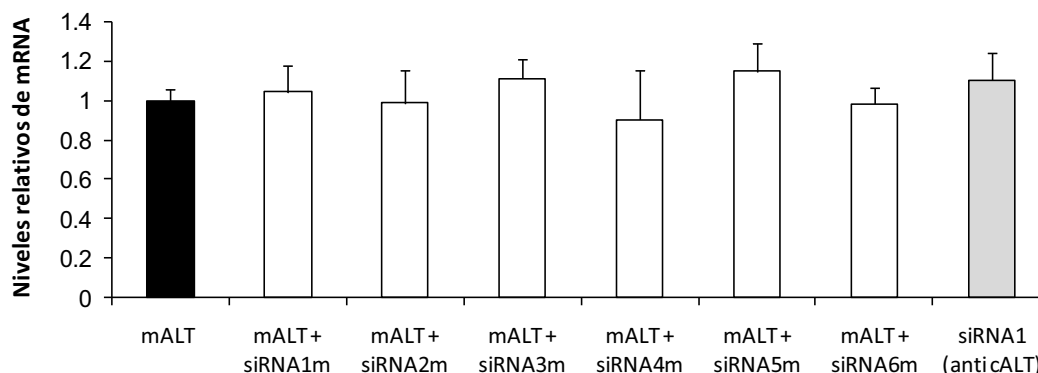


Figura 12. Efecto de diferentes siRNAs sobre la expresión de mALT de dorada en células HEK293.

Células HEK293 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng de plásmido reportero pCMV- β , 30 ng de pcDNA3-mALT (mALT), y 6 siRNAs diseñados contra mALT (siRNA1m, siRNA2m, siRNA3m, siRNA4m, siRNA5m, siRNA6m) y un siRNA diseñado contra cALT1 (siRNA1, 50 nM) utilizando 4 μ l de lipofectamina 2000 como se describe en materiales y métodos. Tras 24 h se aisló el RNA total de: células control (transfectadas con pcDNA3-mALT en ausencia de siRNA) y células transfectadas con pcDNA3-mALT y siRNA. La expresión de mALT se determinó mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos JDRTm1S y JDRTm1AS. Se utilizaron también oligonucleótidos específicos para HPRT (JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs), como gen control de la expresión constitutiva y para β -galactosidasa (JDRTpcmvbS y JDRTpcmvbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de mRNA de mALT normalizados con β -galactosidasa y β -actina. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores de la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

Para realizar este estudio se transfectaron células HEK293, en placas de 6 pocillos, con 30 ng de pcDNA3-mALT, 50 nM del siRNA para la isoforma mALT y 300 ng del plásmido reportero pCMV- β . Tras 24 h se cuantificó la expresión de mALT mediante qPCR. Tal como se observa en la figura 12, ninguno de los siRNA utilizados, a la concentración indicada, promovió una silenciación significativa de los niveles de mRNA de mALT. Cabe destacar que siRNA1, que promueve la silenciación de cALT1, no muestra un efecto *off-target* frente a mALT.

Por otra parte, para estudiar la silenciación de cALT2 (figura 13), se transfectaron células HEK293 en placas de 6 pocillos con 30 ng de pcDNA3-cALT2, 50 nM de los siRNA diseñados para silenciar la expresión de cALT2 y 300 ng del plásmido reportero pCMV- β . A las 24 h postratamiento se cuantificaron los niveles de mRNA de cALT2 mediante qPCR para analizar la posible silenciación de cALT2 de dorada.

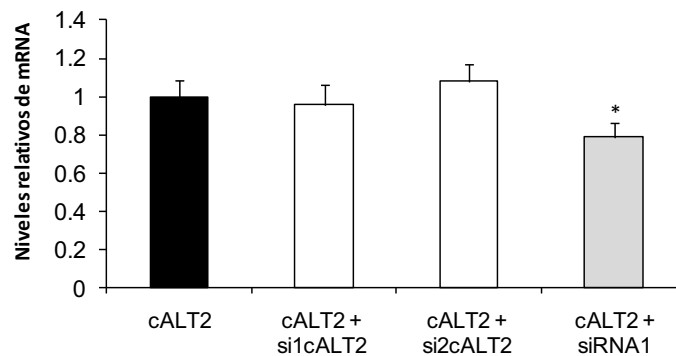


Figura 13. Efecto de diferentes siRNA sobre la expresión cALT2 de dorada en células HEK293. Células HEK293 fueron cotransfectadas, en placas de 6 pocillos, con 300 ng de plásmido reportero pCMV- β , 30 ng de pcDNA3-cALT2 y el siRNA en estudio a concentración 50 nM, utilizando 4 μ L de lipofectamina 2000 como se describe en materiales y métodos. Se ensayaron 2 siRNAs diferentes diseñados contra cALT2 (si1cALT2, si2cALT2) y un siRNA contra cALT1 (siRNA1). Tras 24 h se aisló el RNA total de: células control (transfectadas con pcDNA3-cALT2 en ausencia de siRNA) y células transfectadas con pcDNA3-cALT2 y los diferentes siRNA. La expresión de cALT2 se determinó mediante qPCR utilizando los oligonucleótidos JDRTc2S y JDRTc2AS. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para HPRT (JDRTHPRTs y JDRTHPRTAs), como gen control de la expresión constitutiva, y β -galactosidasa (JDRTpcmvbS y JDRTpcmvbAS), como control interno de transfección. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT2 normalizados con β -galactosidasa y β -actina. Los valores correspondientes a los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden a los valores de la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*).

Ninguno de los siRNA ensayados produjo disminución significativa en los niveles de mRNA de cALT2 en células HEK293 transfectadas con pcDNA3-cALT2 y los diferentes siRNAs diseñados para silenciar la expresión de cALT2. Sin embargo, se observó una disminución de un 22% en los niveles de mRNA de cALT2 utilizando siRNA1, esta disminución es menor a la observada para la isoforma cALT1 utilizando el mismo siRNA. Dado que la única diferencia entre cALT1 y cALT2 se limita a la presencia de un exón adicional en cALT2, no se pudieron identificar otras secuencias que pudieran tener un efecto silenciador adicional a las que se ensayaron.

4.3 EXPRESIÓN DEL VECTOR pCpG-siRNA EN HÍGADO DE *S. AURATA*

Conocer si es posible efectuar la silenciación génica de ALT *in vivo*, los vectores necesarios y las implicaciones metabólicas de la silenciación resulta de gran interés tanto desde el punto de vista biotecnológico como biomédico.

El vector pCpG-siRNA podría resultar adecuado para promover silenciación génica *in vivo* e *in vitro* ya que permite que los shRNAs se expresen de forma eficiente dentro de la célula.

Quitosán es el nombre dado a un grupo de polímeros catiónicos lineales de glucosamina y N-acetilglucosamina de diferente tamaño que derivan de biopolímeros naturales de quitina por un proceso de desacetilación (Skaugrud. 1989). Ramos et al. (2005) reportaron la transferencia de genes en peces utilizando quitosán y el vector pCMV SPORT- β gal, que expresa el gen de la β -galactosidasa. Estos investigadores administraron los complejos de quitosán-DNA por vía oral, intraperitoneal o incorporándolos en la dieta suministrada a tilapias (*Oreochromis niloticus*) y analizaron la expresión de β -galactosidasa en estómago, bazo y agallas.

Previamente indicamos que un siRNA (siRNA1) y un shRNA expresado por el constructo pCpG-silsh1 permiten silenciar las isoformas cALT de *S. aurata in vitro* en células HEK293 transfectadas con pcDNA3-cALT1 y pcDNA3-cALT2 (apartado 4.2). Con el fin de analizar *in vivo* la silenciación de cALT en hígado de *S. aurata*, como paso previo se inyectó el vector pCpG-siRNA, que expresa el péptido alfa (aminoácidos 10-85 de la β -galactosidasa de *E. coli*) acompañado con quitosán.

Los peces se inyectaron intraperitonealmente con un complejo formado por 6.67 μ g del pCpG-siRNA y quitosán por gramo de pez (apartado 3.13.2 de materiales y métodos). A las 24 h posinyección se aisló el hígado de las doradas y posteriormente se extrajo el RNA total para determinar la presencia del mRNA correspondiente al péptido alfa bacteriano. Se realizó un PCR semicuantitativo con oligonucleótidos específicos para analizar la expresión del péptido alfa (JDpepalphas y JDpepalphas) y β -actina (BA0199 y BA0299). Las condiciones de PCR fueron 3 min a 95 °C, 20 a 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, 68 °C durante 30 s de hibridación, a 72 °C durante 1 min la síntesis de DNA y una extensión final de 7 min a 72 °C. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 2%.

Como se observa en la figura 14, en las condiciones indicadas los peces control (inyectados con quitosán) no expresaron el mRNA del péptido alfa bacteriano. Sin embargo, en todos los peces tratados con el complejo pCpG-siRNA-quitosán se detectó el péptido alfa. El nivel de expresión del péptido alfa en los peces tratados con el complejo pCpG-siRNA-quitosán mostró una amplia

variabilidad interindividual. Este hecho puede ser atribuido a diferencias entre los peces en cuanto a la eficiencia de transfección de células hepáticas de *S. aurata*.

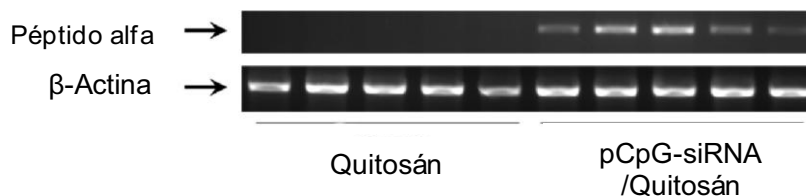


Figura 14. Detección de mRNA correspondiente al péptido alfa bacteriano en hígado de dorada. Ensayo representativo realizado sobre RNA total aislado de hígado de peces control (inyectados con quitosán y ausencia de vector pCpG-siRNA) y de peces tratados (inyectados con el complejo pCpG-siRNA-quitosán). Después de un periodo de 24 h, se analizó la expresión del péptido alfa mediante RT-PCR semicuantitativo, utilizando los oligonucleótidos JDpepalphaS, JDpepalphaAS para detectar la expresión del péptido alfa, y BA0199 y BA0299 para analizar a expresión de β-actina, como gen de expresión constitutiva. Los peces fueron alimentados con la dieta Dibaq.

4.4.1 SILENCIACIÓN DE LAS ISOFORMAS cALT DE *S. AURATA*, *IN VIVO*

La transfección de células HEK293 con el vector pCpG-si1sh1 permitió observar una disminución de los niveles de mRNA de cALT1 de dorada *in vitro*. Por otra parte se observó la expresión génica del péptido alfa bacteriano en hígado de doradas inyectadas con el vector pCpG-siRNA acompañado a quitosán. En base a estos resultados, se acompañó el pCpG-si1sh1 o pCpG-scr, que expresa una secuencia aleatoria que no presenta homología con ninguna secuencia de humanos o peces, con quitosán y se inyectaron 6.67 µg de plásmido por gramo de pez. El plásmido utilizado fue previamente linearizado por la acción de la enzima SacI. En este trabajo se linearizó el vector ya que se ha mostrado que los plásmidos linearizados se expresan mejor en *S. aurata* (García-Pozo et al., 1998). El efecto silenciador se cuantificó en hígado de dorada determinando los niveles de mRNA de cALT (cALT1 + cALT2) y cALT2 a las 24, 48 y 72 h de la administración intraperitoneal del complejo DNA-quitosán.

En los peces inyectados con pCpG-si1sh1 o pCpG-scr acompañados con quitosán se analizó la expresión de cALT y cALT2 mediante qPCR (Figura 15).

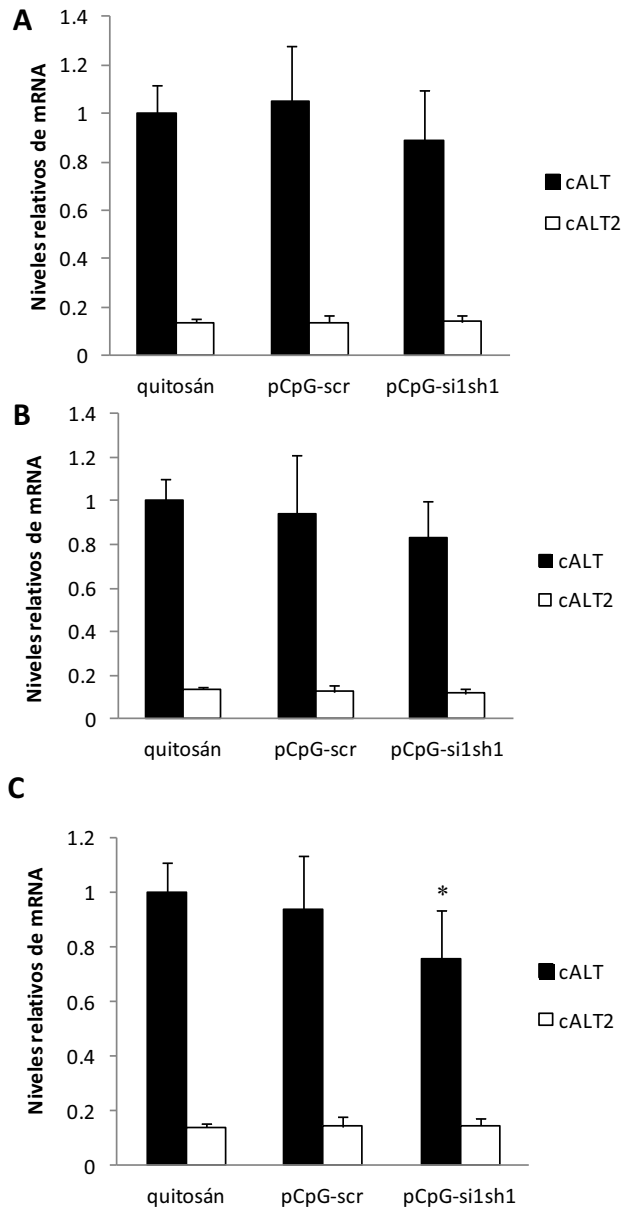


Figura 15. Efecto de pCpG-si1sh1 sobre la expresión de cALT (cALT1 + cALT2) y cALT2 hepáticas en dorada. Los peces fueron inyectados con un complejo de pCpG-si1sh1-quitosán, pCpG-scr-quitosán y quitosán no acompañado como control, utilizando 6.67 µg de pCpG-si1sh1 o pCpG-scr por cada gramo de pez. Tras 24 h (A), 48 h (B) y 72 h (C) se extrajeron los hígados y se aisló el RNA total de los peces control (solo quitosán), tratados con nanopartículas del complejo de pCpG-si1sh1-quitosán, y con pCpG-scr-quitosán. Se analizó la expresión de cALT y cALT2 mediante qPCR, utilizando los oligonucleótidos para cALT JDRTc1S y JDRTc1AS, y los oligonucleótidos específicos para cALT2 JDRTc2S, JDRTc2AS. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para β-actina (JDRTBAs y BA0299), como gen control de la expresión constitutiva. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT y cALT2 normalizados con β-actina. Los controles se ajustaron a 1. Los resultados corresponden al valor de la media ± SD (n=4). La significación estadística en relación al control se indica por: *P* < 0.05 (*). Los peces fueron alimentados con la dieta Dibaq.

A las 24 h y 48 h no se observó silenciamiento significativa de ninguna de las isoformas de cALT con respecto a los peces control (quitosán solo). Tal como se observa en la figura 15, a las 72 h se encontró una diferencia significativa en los niveles de mRNA de cALT en los peces tratados, en los que la expresión descendió hasta un 75% del valor observado en los peces control. Dado que no se observó un efecto silenciador significativo sobre la expresión de cALT2, el descenso observado sobre los niveles de cALT se debe esencialmente a una silenciamiento de cALT1.

Posteriormente se estudió el efecto del incremento de la concentración del plásmido acompañado con quitosán pCpG-si1sh1, que expresa el siRNA silenciador, hasta 10 µg por gramo de pez. Los peces fueron inyectados intraperitonealmente y los niveles de mRNA de cALT se determinaron en el hígado de las doradas después de 72 h del tratamiento (Figura 16).

Se observó una silenciación significativa de los niveles de mRNA de cALT, los valores descendieron hasta un 62% de los observados en los peces control. Sin embargo no se observó disminución en los niveles de mRNA de la isoforma cALT2, por lo que la disminución observada de los niveles de mensajeros total de cALT es atribuible esencialmente a un descenso en la expresión de cALT1.

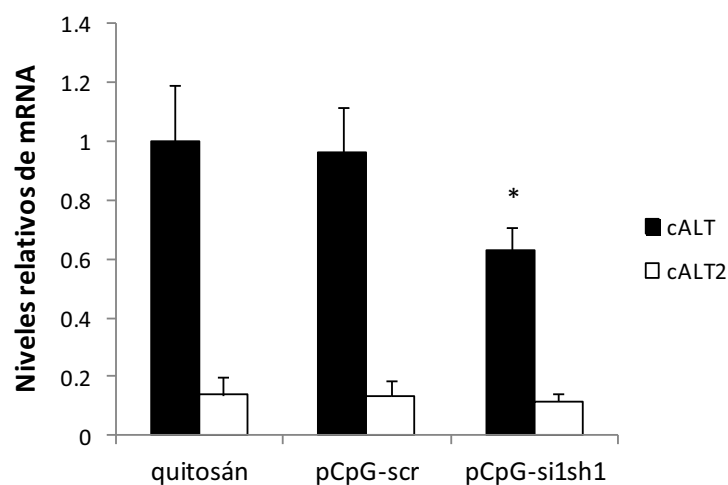


Figura 16. Efecto del incremento de la concentración de pCpG-si1sh1 sobre la expresión de cALT1 en hígado de dorada. Los peces fueron inyectados con un complejo pCpG-si1sh1-quitosán, un complejo pCpG-scr-quitosán o quitosán no acompañado como control, utilizando 10 µg de pCpG-si1sh1 o pCpG-scr por cada gramo de pez. Tras 72 h se extrajeron los hígados y se aisló RNA total de peces control (solo quitosán), tratados con nanopartículas del complejo de pCpG-si1sh1-quitosán, y con pCpG-scr-quitosán. Se analizó la expresión de cALT1 y cALT2 mediante qPCR, utilizando oligonucleótidos específicos para cALT (JDRTc1S y JDRTc1AS), cALT2 (JDRTc2S y JDRTc2AS), β-actina (JDRTBAs y BA0299), como gen control de la expresión constitutiva. Se muestran los niveles relativos de mRNA de cALT1 normalizados con β-actina. Los controles se ajustaron a 1. Los resultados están expresados como el valor de la media ± SD (n=6). La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*). Los peces fueron alimentados con la dieta Dibaq.

4.4.2 EFECTO DE LA SILENCIACIÓN DE ALT SOBRE LA ACTIVIDAD ALT EN HÍGADO DE *S. AURATA*

En los peces tratados con 6.67 μg de pCpG-si1sh1 acompañado con quitosán por gramo de pez, se produjo una disminución significativa de los niveles de mRNA de cALT. Los valores de mRNA descendieron hasta un 75% de los observados en los peces control. A fin de determinar si las actividades ALT y AST se veían afectadas como consecuencia de la silenciaci3n de cALT, se analiz3 la actividad de dichas enzimas tras 24, 48 y 72 h de la inyecci3n intraperitoneal con las nanop3rticulas de DNA-quitos3n. A las 24 y 48 h no se detect3 modificaci3n de las actividades, mientras que a las 72 h se observ3 una disminuci3n de un 30 % de la actividad ALT en relaci3n a la de los peces control (Figura 17).

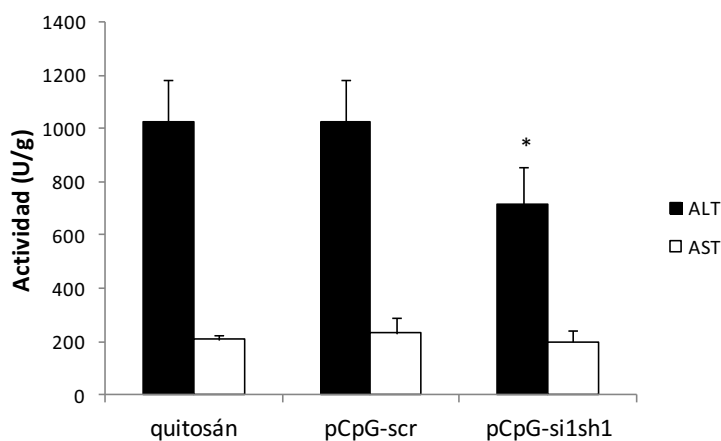


Figura 17. Efecto de pCpG-si1sh1 sobre las actividades ALT y AST en h3gado de dorada. Los peces fueron inyectados intraperitonealmente con: un complejo pCpG-si1sh1-quitos3n, un complejo de pCpG-scr-quitos3n o con quitos3n no acompañado como control. Se utilizaron 6.67 μg de pCpG-si1sh1 o pCpG-scr por cada gramo de pez. Tras 72h se extrajeron los h3gados y se prepar3 el extracto crudo a partir de h3gado de peces control (inyectados con quitos3n), de peces tratados con pCpG-si1sh1, y peces tratados con pCpG-scr. Las actividades de ALT y AST se determinaron en los extractos obtenidos a partir de los homogeneizados de h3gado como se indica en materiales y m3todos (apartado 3.11.1). Los valores representados corresponden a la actividad espec3fica de ALT y AST, expresada como el valor de la media \pm SD (n=4). La significaci3n estadística en relaci3n al control se indica por: $P < 0.05$ (*). Los peces fueron alimentados con la dieta Dibaq.

Mediante *Western blot* se determinaron los niveles de prote3na ALT en h3gado de peces control y en los tratados con nanop3rticulas de DNA-quitos3n que suministraban 6.67 μg de pCpG-si1sh1 por gramo de pez (pCpG-si1sh1 y pCpG-scr). Como se muestra en la figura 18, los valores de prote3na ALT observados en los peces tratados con pCpG-si1sh1-quitos3n son un 42% inferiores que en los peces control.

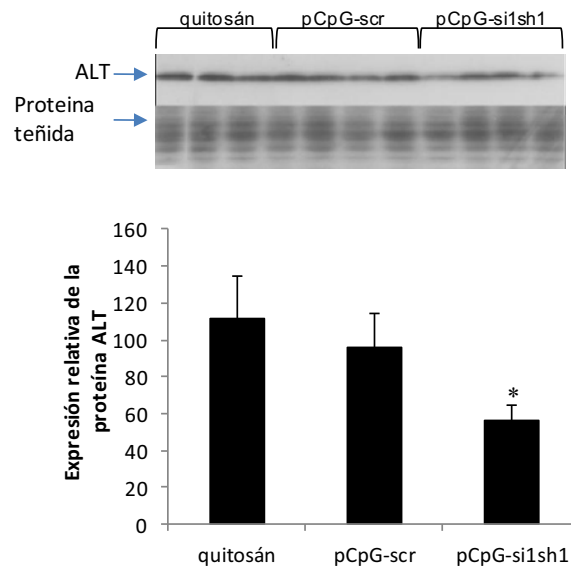


Figura 18. Efecto de la administración intraperitoneal de pCpG-si1sh1-quitosán sobre los niveles de proteína ALT en hígado de dorada. La parte superior de la figura corresponde a los niveles representativos de ALT inmunodetectable en extractos hepáticos después de 72 h de la inyección de los peces con el complejo pCpG-si1sh1-quitosán, con pCpG-scr-quitosán (pCpG-scr) y quitosán no acomplexado (control). En los peces tratados con el shRNA se inyectaron 6.67 μg de pCpG-si1sh1 o pCpG-scr por cada gramo de pez. En la parte inferior de la figura se representa la densitometría correspondientes a las bandas ALT detectadas en presencia de anticuerpo (apartado 3.10) normalizadas con la proteína total en el gel teñida con *Coomassie Blue*. Los niveles de proteína ALT están expresados en unidades arbitrarias. Los resultados representan el valor de la media \pm SD (n=4). La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*). Los peces fueron alimentados con la dieta Dibaq.

4.5 INHIBICIÓN POSTRADUCCIONAL DE LAS ISOFORMAS CITOSÓLICAS Y MITOCONDRIAL DE ALT DE *S. AURATA*

En este trabajo también se decidió ensayar la actividad de las diferentes isoformas de ALT en presencia de diferentes compuestos descritos como inhibidores de la actividad ALT (oxamato, hidroxilamina, maleato y aminoxiacetato). Bajo nuestras condiciones de ensayo, compuestos como hidroxilamina, oxamato o maleato no mostraron efecto inhibitor de la reacción “directa” catalizada por la ALT presente en extractos crudos de hígado de dorada. Por el contrario, si se observó efecto inhibitor de la actividad ALT de dorada en presencia de aminoxiacetato.

4.5.1 INHIBICIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ALT DE HÍGADO DE *S. AURATA* MEDIANTE AMINOOXIACETATO (AOA)

El AOA (Figura 19) es un derivado de la hidroxilamina que puede reaccionar químicamente con el piridoxal fosfato y bloquear reacciones de transaminación (Wallach, 1961; Baxter & Roberts, 1961; Wu, 1976; Yonaha et al., 1975; Beeler & Churchich, 1976; Rognstad & Clark, 1974; Longshaw et al., 1972; Williamson et al., 1971; Cornell et al., 1984).

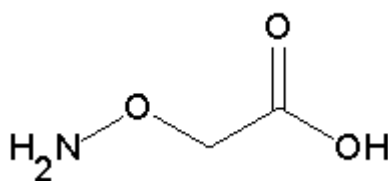


Figura 19. Estructura química del aminooxiacetato.

A fin de estudiar el efecto del aminooxiacetato en hígado de dorada, se ensayó la actividad ALT en extracto crudo así como en las fracciones citosólicas y mitocondriales obtenidas a partir de hígado de dorada. Las concentraciones de AOA utilizadas en el ensayo estaban comprendidas entre 0 y 4.5 mM. En la figura 20 se muestra que el AOA a partir de 10 μ M ejerce una inhibición significativa de la actividad ALT presente en las fracciones citosólica y mitocondrial. El efecto inhibitor del AOA sobre la actividad AST se observó, por el contrario, a concentraciones iguales o superiores a 0.4 mM.

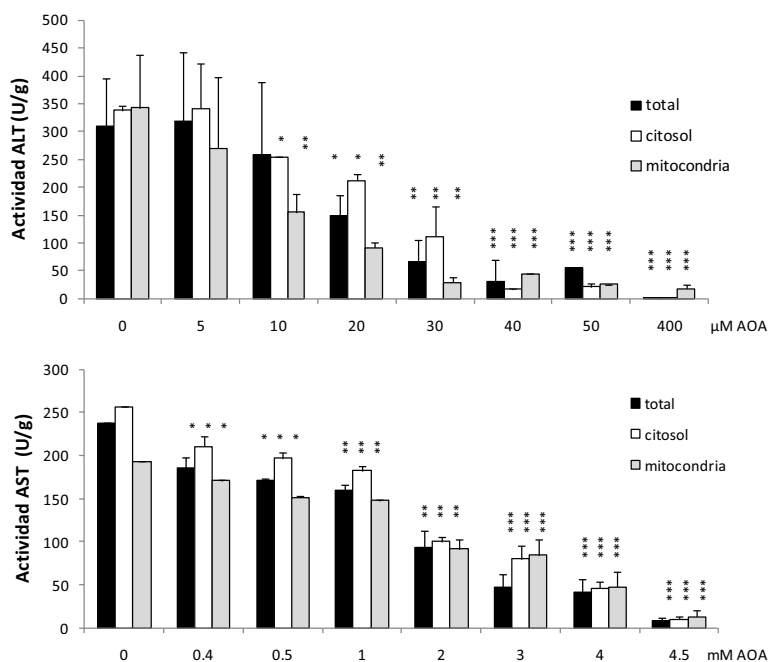


Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de AOA sobre las actividades ALT (A) y AST (B) en extractos hepáticos de *S. aurata*. Los extractos hepáticos fueron tratados con diferentes concentraciones de AOA: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 y 4500 μM. Se ensayaron las actividades ALT y AST en extractos crudos de hígado de dorada alimentadas con la dieta Dibaq en ausencia (0) o presencia de las concentraciones de AOA indicadas. Los resultados están expresados como el valor de la media ± SD de al menos 2 experimentos independientes realizados por duplicado. La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

El AOA produjo una inhibición significativa de la actividad ALT presente en el extracto hepático. Las inhibiciones de la actividad ALT observadas respecto al control (extracto sin inhibidor) oscilaron desde un 19% (10 μM) hasta un 100% (500 μM). En el caso de la AST, el AOA produjo una menor inhibición de la actividad. La inhibición de la actividad respecto al control varió desde un 25% (400 μM) hasta el 96% (4.5 mM).

4.5.2 INHIBICIÓN *IN VIVO* DE LAS ISOFORMAS ALT HEPÁTICAS DE *S. AURATA* POR AOA INCORPORADO EN LA DIETA

Con el fin de discriminar el efecto inhibitor del AOA sobre las isoformas hepáticas de ALT, los hígados de peces alimentados con 725 μg AOA/Kg de pez/día, por un periodo de 6 días, se procesaron para obtener las fracciones total, citosólica y mitocondrial, como se detalla en el apartado 3.2.1 de materiales y métodos. Posteriormente se ensayaron las actividades ALT y AST.

Tal como se muestra en la figura 21, la actividad ALT presente en el extracto total y en la fracción citosólica mostró una inhibición significativa en los peces alimentados con la dieta que contiene AOA. La actividad ALT se redujo hasta un 37% en el extracto total y hasta un 45% en la fracción citosólica en relación al control de cada fracción (peces alimentados con dieta sin AOA). La actividad AST resultó inhibida significativamente en el extracto total y citosólico. La actividad específica AST se redujo a un 60% en el extracto total y hasta un 61% en la fracción citosólica en relación a los controles de cada fracción (alimentados con dietas sin AOA). Sin embargo, las actividades ALT y AST de la fracción mitocondrial no resultaron inhibidas en los peces alimentados con AOA (Figura 21).

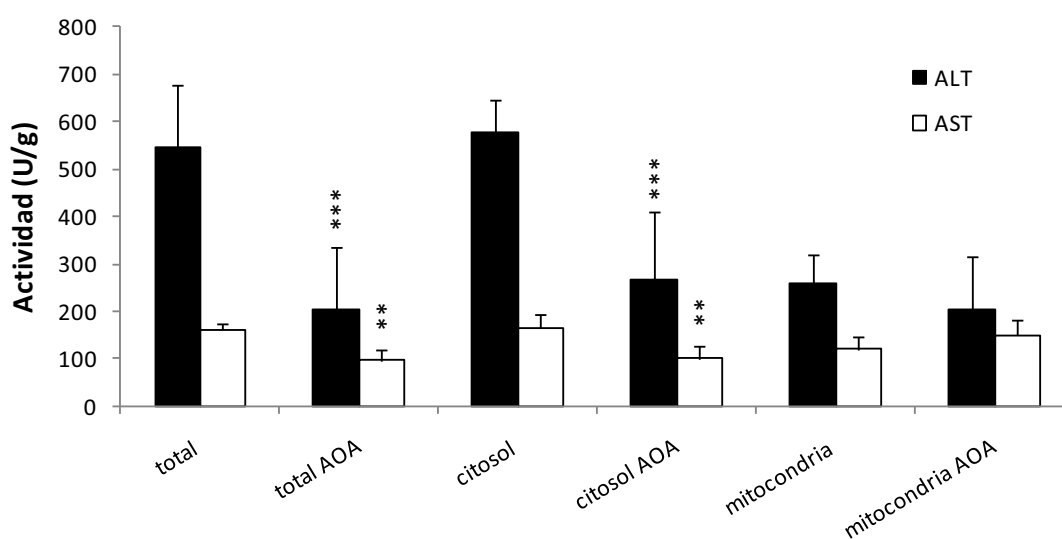


Figura 21. Efecto de la administración de 725 µg de AOA/ Kg de pez/día incluido en la dieta, durante 6 días, sobre las actividades ALT y AST de las fracciones total, citosólica y mitocondrial de hígado de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados con una dieta que contenía 725 µg de AOA/Kg de pez/día durante 6 días. Se extrajeron los hígados, se obtuvieron las fracciones total, citosólica y mitocondrial y se determinaron las actividades ALT y AST en relación al control (alimentados con dieta en ausencia de AOA). Los resultados están expresados como media ± SD (n=6). La significación estadística referida al control se indica por: $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

Al no observar inhibición de la actividad ALT en la fracción mitocondrial aislada de los peces alimentados con dietas que contienen AOA, mientras que la actividad ALT presente en la fracción total y citosólica si resultaban inhibidas nos planteamos estudiar el efecto del AOA sobre la actividad ALT presente en extractos de levadura obtenidos tras la sobre-expresión de mALT de dorada en *S. cerevisiae*.

Los extractos de *S. cerevisiae* que expresan mALT, previamente desalados, se ensayaron en presencia o ausencia de AOA (2 mM) a pH 7.5. En la Figura 21 se puede apreciar una disminución significativa de la actividad ALT en comparación con el control.

El AOA a concentración 2 mM produjo una inhibición de la actividad ALT. Los valores de actividad descendieron hasta un 7,5% de los observados en el control (extractos sin inhibidor).

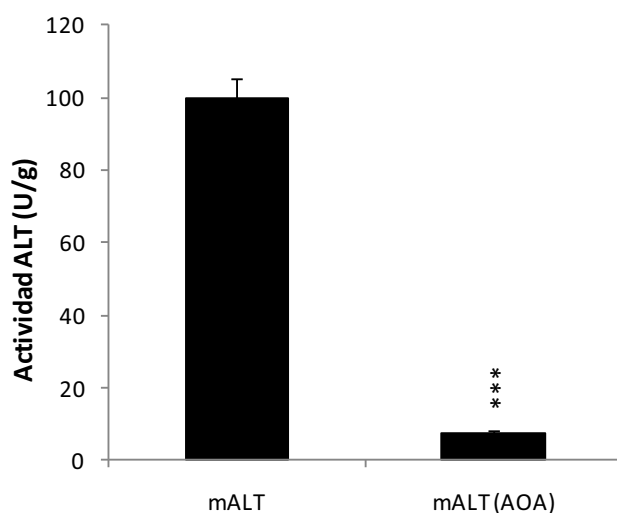


Figura 22. Efecto del AOA sobre mALT de hígado de dorada sobre-expresada en *S. cerevisiae*. Los extractos de *S. cerevisiae* que expresan mALT de *S. aurata*, previamente desalados, se ensayaron en presencia o ausencia de AOA (2 mM) tamponado a pH 7.5. Los resultados de actividad ALT, están expresados como la media \pm SD (n=4). La significación estadística referida al control se indica por: $P < 0.001$ (***)

Se puede observar que el AOA produce la inhibición de la actividad mALT en extractos de *S. cerevisiae* (Fig. 22), sin embargo no se apreció disminución de la actividad mALT en la fracción mitocondrial de hígado de peces tratados con AOA, aunque si en la fracción total y citosólica (Fig. 21). Este efecto puede deberse a que el AOA no sea capaz de atravesar la membrana mitocondrial interna, por lo que *in vivo* este compuesto no podría ejercer el efecto inhibitor sobre mALT.

4.5.3 INHIBICIÓN DE ALT DE CORAZÓN EN *S. AURATA* MEDIANTE AMINOOXIACETATO SUMINISTRADO CON LA DIETA

Previamente hemos indicado que el AOA administrado con la dieta se comporta como inhibidor de la actividad ALT presente en el extracto total y en la fracción citosólica hepática de dorada. Recientemente Anemaet et al. (2008), demostraron que cALT2 es la isoforma mayoritaria en la fracción citosólica de corazón de dorada, mientras que cALT1 lo es en hígado. A fin de estudiar si el efecto del AOA en hígado, donde la isoforma citosólica mayoritaria de ALT es cALT1, también se produce en un tejido donde cALT2 es la isoforma citosólica mayoritaria, como es el corazón, se analizó la actividad ALT en extractos de corazón aislados de peces alimentados, durante 7 días, con la

dieta Dibaq con AOA a 1250 y a 6250 μg AOA/Kg de pez/día, o con la dieta Dibaq sin AOA, como control.

Después de 7 días de tratamiento, se aislaron los corazones, se procesaron y se determinaron las actividades ALT y AST.

La actividad ALT resultó significativamente inhibida a las concentraciones mencionadas después de 7 días de tratamiento. De manera similar a la que acontece en hígado, la actividad ALT en corazón de dorada, atribuible mayoritariamente a cALT2, se redujo hasta un 60% (1250 μg AOA/Kg de pez/día) y un 43% (6250 μg AOA/Kg de pez/día) respecto al valor encontrado en los peces control. La actividad AST se redujo hasta un 70% (1250 μg AOA/Kg de pez/día) y un 43% (6250 μg AOA/Kg de pez/día) respecto al control (Figura 23).

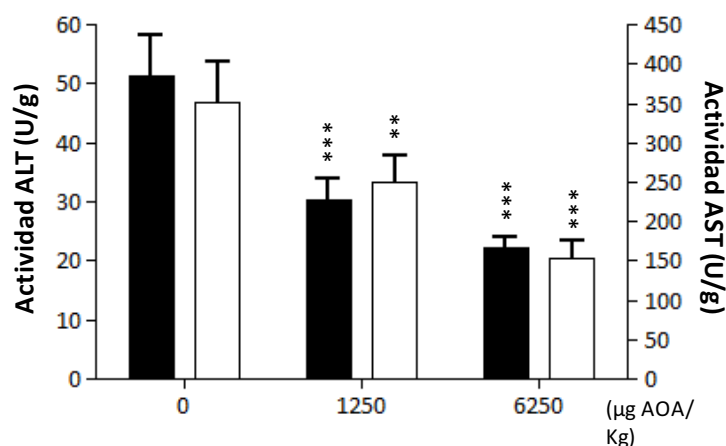


Figura 23. Efecto de 1250 y 6250 μg de AOA/ Kg de pez/día suministrados con la dieta, durante 7 días, sobre las actividades ALT y AST en extractos de corazón de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados durante 7 días con la dieta Dibaq con 1250 y 6250 μg de AOA/Kg de pez/día o en ausencia de AOA. Se extrajeron los corazones y en los extractos se determinaron las actividades ALT y AST. Los resultados están expresados como media \pm SD (n=4). La significación estadística referida al control se indica por: $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)

El efecto del AOA sobre la isoforma cALT2 en corazón de dorada, donde es la isoforma mayoritaria, produce una inhibición similar a la observada en extractos de hígado en donde la isoforma cALT1 es la mayoritaria. Se puede concluir que el efecto de AOA sobre las isoformas cALT1 y cALT2 es similar.

4.5.4 INHIBICIÓN *IN VIVO* DE ALT DE *S. AURATA* MEDIANTE ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE AOA

Los resultados de experimentos anteriores indicaban que el AOA inhibe la actividad ALT citosólica presente en extractos crudos de hígado de *S. aurata*. A fin de comprobar la acción del AOA en el hígado de *S. aurata*, se efectuó la administración intraperitoneal de AOA.

Doradas distribuidas en 5 acuarios, con 7 peces en cada uno, fueron inyectadas con una dosis única de diferentes concentraciones de AOA disuelto en solución salina y tamponado a pH 7.5. Las dosis utilizadas de AOA fueron: 1.45, 36.25, 72.5 y 145 µg/Kg de pez. Los peces del acuario restante se inyectaron con solución salina (peces control).

Seis horas después del tratamiento se extrajo el hígado y sangre de los peces. Las muestras se procesaron y almacenaron a -80°C, hasta el momento de ser utilizadas para determinar las actividades ALT y AST en extractos hepáticos y los niveles de glucosa en suero. En los peces tratados con AOA, la actividad específica ALT disminuyó hasta un 41% (145 µg/Kg de pez), 49% (72.5 µg/Kg de pez) y 60% (36.25 µg/Kg de pez) respecto al valor de los peces control. La actividad AST disminuyó hasta un 60% (145 µg/Kg de pez) y 71% (72.5 µg/Kg de pez) respecto al control. Los niveles de glucosa no variaron de forma significativa (Figura 24).

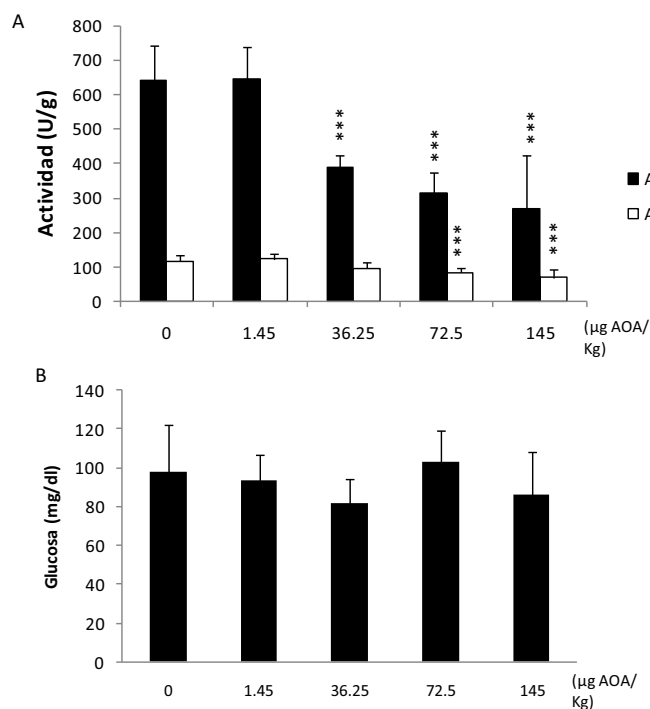


Figura 24. Efecto de la administración intraperitoneal de diferentes concentraciones de AOA sobre las actividades ALT y AST (A) y glucosa en suero (B). Los peces fueron sometidos a inyección intraperitoneal con diferentes dosis de AOA (1.45, 36.25, 72.5 y 145 µg/Kg de pez) o solución salina (0). A las 6 h se extrajeron los hígados y se obtuvieron muestras de sangre. Se determinaron las actividades ALT y AST en extractos hepáticos y se determinó la glucosa en suero de peces control y tratados con AOA. Los resultados están expresados como el valor de la media ± SD (n=7). La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

Una vez comprobado que el AOA inyectado intraperitonealmente, a las 6 h de tratamiento, ejerce una inhibición significativa de la actividad ALT se procedió a estudiar el efecto de una dosis única, 145 µg AOA/ Kg de pez, a diferentes tiempos postratamiento (3, 6, 9, 24, 48 y 96 h).

Para ello se distribuyeron 7 peces por acuario, 3 acuarios para peces control y 3 acuarios para peces tratados con AOA. Los peces de los acuarios control fueron inyectados con solución salina.

A las 3, 6, 9, 24, 48 y 96 h postratamiento se extrajo el hígado y la sangre de peces. Posteriormente se procedió a determinar las actividades ALT y AST en las muestras hepáticas y los niveles de glucosa en suero. La actividad ALT resultó significativamente inhibida en las muestras de los peces inyectados con 145 µg de AOA/Kg de pez a las 3, 6, 9 y 24 h postratamiento, mientras que a 48 y 96 h no se observó un descenso significativo de los niveles de actividad. La actividad ALT descendió hasta un 35% (3 h), 35% (6 h), 35% (9 h) y a un 44% (24 h) respecto al control. La actividad AST resultó significativamente inhibida a la concentración en estudio a las 3, 6, 9 y 24 h postratamiento. Sin embargo a 48 y 96 h postratamiento tampoco se observó descenso significativo en los niveles de actividad AST. La actividad AST descendió hasta un 62% (3 h), 52% (6 h), 54% (9 h) y a un 52% (24 h) respecto al control. La glucosa en suero no varió de forma significativa a los tiempos ensayados (Figura 25).

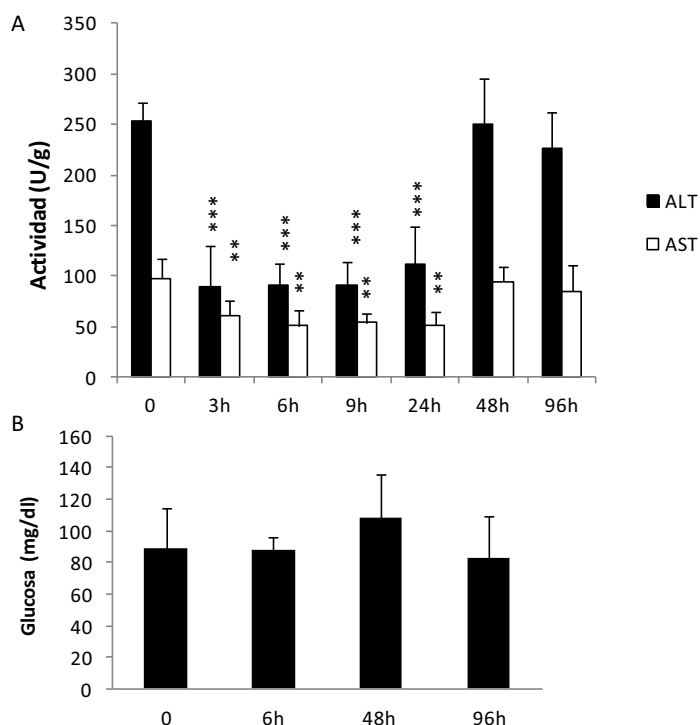


Figura 25. Efecto del tiempo tras administración intraperitoneal de AOA sobre las actividades ALT y AST (A) y la glucosa en suero (B). A los peces se les administró intraperitonealmente 145 µg de AOA/Kg de pez o solución salina (control). A las 3, 6, 9, 24, 48 y 96 h se extrajeron los hígados y se obtuvieron muestras de sangre. Posteriormente se determinaron las actividades ALT y AST en los extractos hepáticos y los niveles de glucosa en suero. Los resultados están expresados como el valor de la media ± SD (n=6). La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

4.5.5 EFECTO EN EL TIEMPO DEL AMINOOXIACETATO SUMINISTRADO CON LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD ALT DE HÍGADO DE *S. AURATA*.

Los experimentos en los que se les administró AOA intraperitonealmente, indicaban que el AOA ejerce *in vivo* un efecto inhibitor sobre la actividad ALT hepática de *S. aurata*.

Con el objetivo de analizar los efectos de la inhibición por la administración continuada de AOA y poder observar los cambios metabólicos asociados a la inhibición de la actividad ALT por AOA, se elaboró una dieta utilizando como base la dieta comercial Dibaq y a la que se le añadió AOA

disuelto en solución salina a pH 7.5. Los peces control, se alimentaron con dieta Dibaq sin adición de AOA.

Los peces se alimentaron suministrándoles, una vez al día, una cantidad de dieta equivalente al 2% de su peso corporal para lograr que en base al peso de los peces, éstos reciban una dosis de AOA de 725 µg/Kg de pez/día.

Las doradas se distribuyeron en 3 acuarios para los peces control y 3 acuarios para los peces con tratamiento (5 peces por acuario). Los peces se alimentaron diariamente de forma ininterrumpida durante 1, 3 y 6 días, con dieta que contenía AOA o con la dieta Dibaq en ausencia de AOA.

Tras 1, 3 y 6 días de tratamiento, se extrajo el hígado y la sangre de los peces. La actividad ALT en los extractos hepáticos de los peces tratados con AOA mostró una inhibición significativa con respecto a la de los peces control a los 3 y 6 días postratamiento. En las muestras hepáticas tomadas tras 1 día de tratamiento no se observó un descenso significativo de los niveles de actividad ALT respecto a la de los peces control. La actividad ALT se redujo hasta un 50% (3 días) y un 51% (6 días) respecto al control. Por otra parte, la actividad AST no resultó inhibida en ninguna de las muestras hepáticas. Los niveles de glucosa no disminuyeron de manera significativa, salvo a los 6 días de tratamiento en donde los valores de glucemia de las muestras control mostraron valores más elevados (Figura 26). En la figura 27 se muestran los estudios de *Western blot* para la detección de proteína ALT en los extractos hepáticos de los peces alimentados durante 6 días con la dieta con AOA. Los resultados obtenidos indican que no se observa variación significativa de los niveles de proteína ALT en los peces tratados con AOA en relación a los peces control, lo que indica que el efecto inhibitor de AOA sobre ALT es un efecto postraduccional.

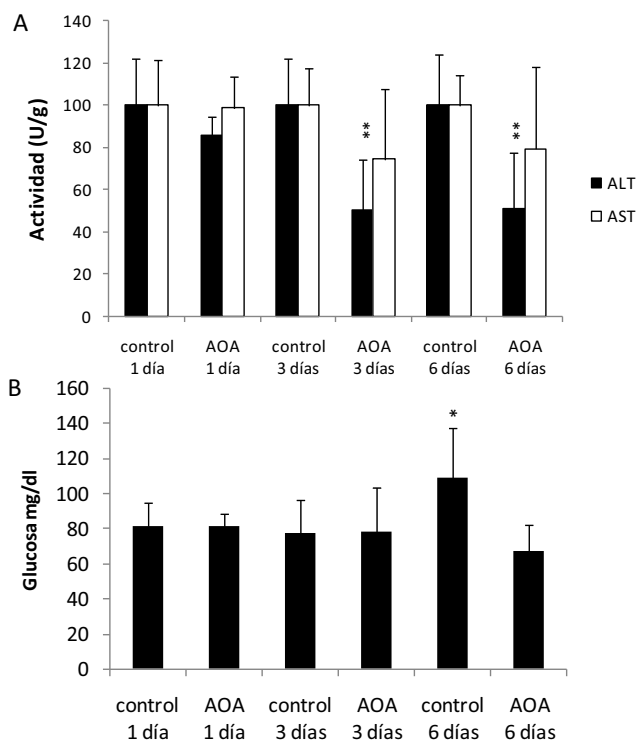
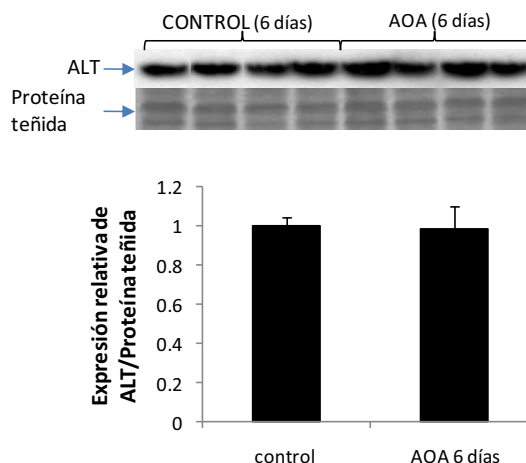


Figura 26. Administración de 725 µg del AOA AOA/ Kg de pez/día con la dieta: Efecto del tiempo sobre la actividades ALT y AST hepáticas (A) y los niveles de glucosa en suero (B). Los peces fueron alimentados durante 1, 3 y 6 días con una dieta que suministró 725 µg de AOA/Kg de pez/día y otra sin AOA (control). A los tiempos indicados se extrajeron los hígados de los peces tratados y control. Se determinaron las actividades ALT y AST en extractos hepáticos de los peces tratados con AOA y peces control (dieta sin AOA) y se determinó la glucosa en suero. Los resultados están expresados como el valor de la media ± SD (n=5). La significación estadística en relación al control se indica por: $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**).

Figura 27. Efecto de la administración de AOA 725 µg de AOA/ Kg de pez/día suministrados con la dieta: Efecto del tiempo sobre la cantidad de proteína ALT presente en extractos hepáticos de dorada. Se muestran los niveles representativos de proteína ALT inmunodetectada en extractos hepáticos de peces alimentados durante 6 días con una dieta que aporta 725 µg de AOA/Kg de pez/día y otra con ausencia de AOA (control). En la parte inferior de la figura se representa la densitometría de las bandas correspondientes a ALT detectadas en presencia de anticuerpo (apartado 3.10). Se efectuó la normalización con la proteína total en el gel teñida con *Coomassie Blue*. Los niveles ALT están expresados en unidades arbitrarias. Los resultados están expresados como valor de la media ± SD (n=4).



Con el objetivo de observar si la ingesta de la dieta que contenía AOA producía algún efecto sobre la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, se procedió a determinar la actividad de enzimas hepáticas que participan en la vía de la glucólisis (PFK-1), vía de la gluconeogénesis (FBPasa), y vía de las pentosas fosfato (6PGDH y G6PDH). Estas actividades se ensayaron la en extractos hepáticos de peces tratados y se compararon con las observadas en peces control.

Los valores de las actividades PFK-1, FBPasa, G6PDH y 6PGDH en los peces tratados con AOA no variaron de forma significativa en comparación con la de los peces control (Figura 28).

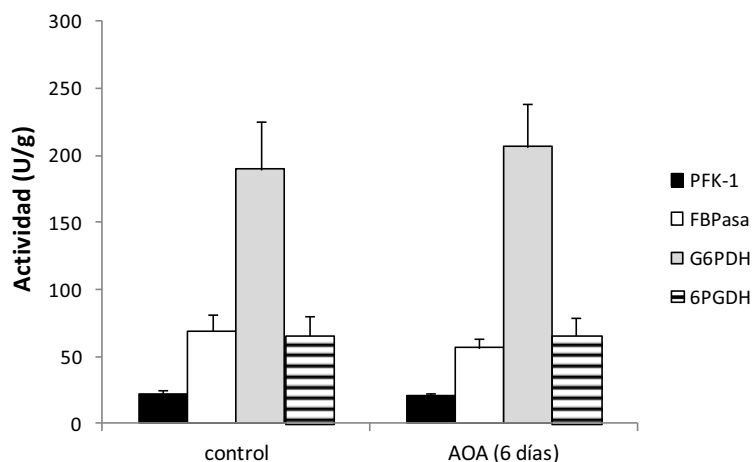


Figura 28. Efecto del AOA administrado con la dieta sobre las actividades PFK-1, FBPasa, G6PDH y 6PGDH hepáticas de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados durante 6 días con una dieta que proporciona 725 μg de AOA/Kg de pez/día. En hígado de peces tratados y peces control (dieta en ausencia de AOA) se determinaron las actividades PFK-1, FBPasa, G6PDH y 6PGDH en relación al control. Las actividades se determinaron según se indica en el apartado 3.11 de materiales y métodos. Los resultados están expresados como valor de la media \pm SD (n=5).

Después de observar que en los peces alimentados durante 3 y 6 días con una dieta que contiene AOA se produce una inhibición significativa de la actividad ALT y con el objetivo de determinar la si el efecto inhibitor de AOA se seguía observando si se administraba cada 48 h, se realizó un experimento en el que los peces fueron alimentados, los días pares, con una dieta que suministraba 725 μg de AOA/Kg de pez, mientras que los días impares los peces se alimentaron con una dieta sin AOA. Este estudio se realizó con el objetivo de determinar si el efecto del AOA perdura durante más de 24 h después de la administración o es degradado o eliminado del organismo.

Tras 7 días con este tratamiento, se extrajo el hígado y la sangre de los peces. Las actividades ALT y AST de extractos hepáticos no mostraron inhibición significativa, si bien se observó una ligera tendencia de inhibición. Los niveles de glucosa no se vieron modificados respecto a los de los peces control (Figura 29). Este estudio mostró que para que se produzca una inhibición en la actividad ALT más efectiva, el AOA necesita ser administrado diariamente a los peces.

Con el objetivo de incrementar la inhibición de ALT y analizar el comportamiento de otras enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario, se prepararon y administraron dietas que contenían una concentración superior de AOA, 1250 μg y 6250 μg de AOA/Kg de pez/día. Se alimentaron 4 peces por condición: dieta control (en ausencia de AOA), dieta que aporta 1250 μg AOA/Kg de pez/día y dieta que suministra 6250 μg AOA/Kg de pez/día. Los peces se alimentaron

con una cantidad de dieta que aporta el equivalente a 2% de peso corporal. La dieta utilizada en ausencia o tras la adición del AOA fue la dieta comercial Dibaq.

Después de 7 días del tratamiento, se extrajeron los hígados, se procesaron y se determinaron las actividades ALT, AST, PFK-1, FBPasa y PK.

La actividad ALT de hígado de dorada resultó inhibida tras 7 días de tratamiento. La actividad ALT se redujo hasta un 68% (1250 µg AOA/Kg de pez/día) y a un 26% (6250 µg AOA/Kg de pez/día) respecto a los valores observados en los peces control. Por otra parte, la actividad AST también disminuyó, si bien, en menor proporción que la actividad ALT. La actividad AST se redujo hasta un 87% (1250 µg AOA/Kg de pez/día) y un 41% (6250 µg AOA/Kg de pez/día) respecto a la observada en peces control (Figura 30).

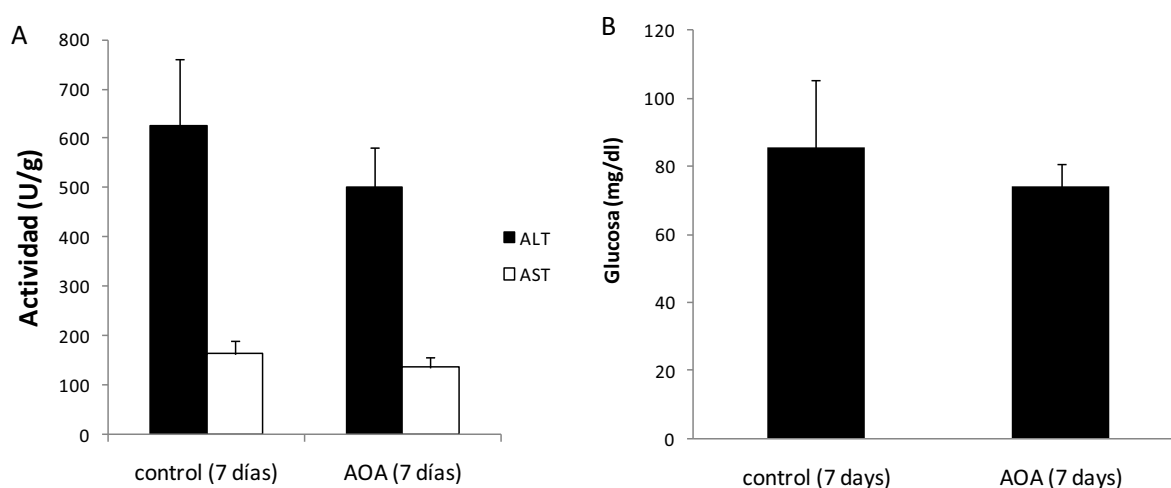


Figura 29. Efecto de la administración de 725 µg de AOA/ Kg de pez/día, suministrados cada 2 días con la dieta, sobre la actividad ALT y AST (A) y sobre los niveles de glucosa en suero (B). Los peces fueron alimentados durante 7 días con una dieta Dibaq que contenía AOA para administrar 725 µg de AOA/Kg de pez/día los días pares mientras que los días impares los peces fueron alimentados con la dieta Dibaq sin AOA. A los 7 días de tratamiento se extrajeron los hígados de los peces tratados y control, se determinaron las actividades ALT y AST en extractos hepáticos y se midieron los niveles de glucosa en suero. Los resultados están expresados como valor de la media ± SD (n=5).

Adicionalmente, después de 7 días de tratamiento se procedió a determinar la actividad de otras enzimas hepáticas relacionadas con la vía de glucólisis y gluconeogénesis, PK, PFK-1 y FBPasa en extractos hepáticos de doradas alimentadas con dietas que aportaban 1250 ó 6250 µg de AOA/Kg de pez /día o dieta sin AOA (control) con el fin de analizar otros efectos metabólicos del AOA.

Como se presenta en la figura 31, no se observaron diferencias significativas en los valores de las actividades de PK, PFK-1 y FBPasa tras 7 días de tratamiento. No obstante, se pudo apreciar una

tendencia al aumento en la actividad PK en los peces alimentados con la concentración más elevada de AOA.

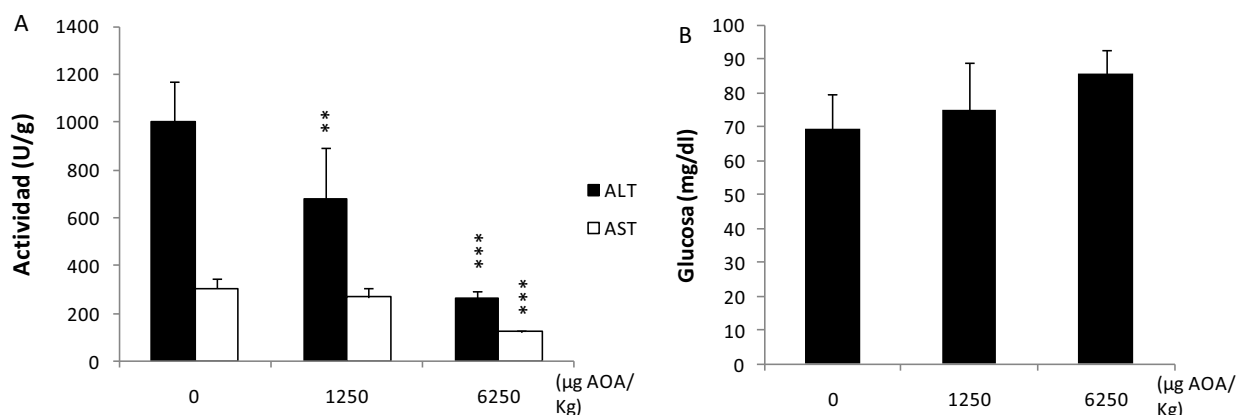


Figura 30. Efecto de la administración de 1250 y 6250 µg de AOA/Kg de pez/día sobre la actividad ALT y AST (A) y sobre los niveles de glucosa en suero (B). Los peces fueron alimentados con una dieta Dibaq que aporta 1250 ó 6250 µg de AOA/Kg de pez/día o una dieta Dibaq sin AOA, durante 7 días. Se extrajeron los hígados y se determinaron las actividades ALT y AST en los extractos hepáticos, tal como se indica en el apartado 3.11. Los resultados están expresados como media \pm SD (n=4). La significación estadística referida al control se indica de la siguiente manera: $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***)

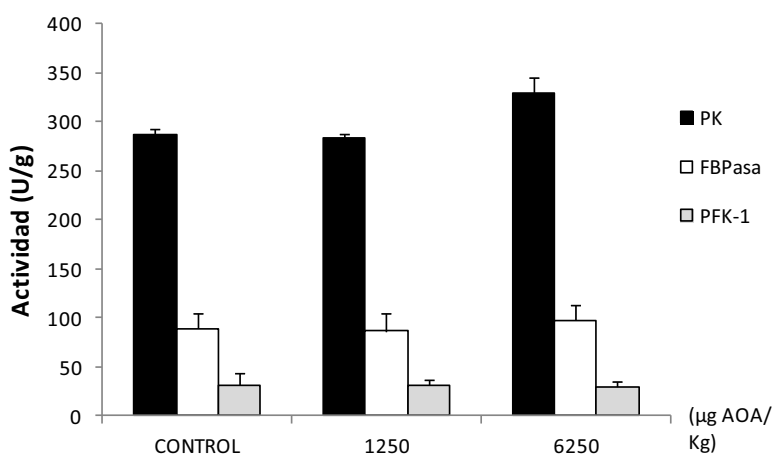
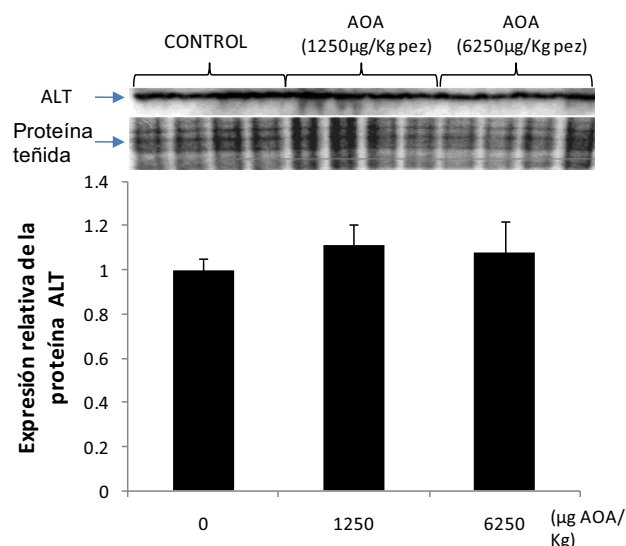


Figura 31. Efecto de la administración de 1250 y 6250 µg de AOA/ Kg de pez /día en la dieta durante 7 días sobre las actividades PFK-1, FBPasa y PK en extractos hepáticos de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados durante 7 días con una dieta Dibaq que aporta 1250 ó 6250 µg de AOA/Kg de pez /día. Se extrajeron los hígados y se determinaron las actividades PK, PFK-1 y FBPasa de los peces alimentados con las dietas que contenían AOA y los alimentados en ausencia de AOA. Los resultados están expresados como valor de la media \pm SD (n=4).

En la figura 32 se muestra la inmunodetección de proteína ALT en extractos hepáticos de peces alimentados durante 7 días con la dieta que aporta 1250 ó 6250 µg de AOA/Kg de pez/día y la dieta carente de AOA (control). Los valores están normalizados con la proteína del gel teñida con

Coomassie blue. Como se puede observar los resultados indican que no se produjo variación significativa de los niveles de proteína ALT en los peces tratados con 1250 ó 6250 μg de AOA/Kg de pez/día en relación a los controles.

Figura 32. Efecto de la administración de AOA, 1250 ó 6250 μg de AOA/ Kg de pez/día, en la dieta durante 7 días sobre la expresión de proteína ALT en hígado de dorada. La parte superior de la figura corresponde a niveles representativos de proteína ALT inmunodetectada en los extractos hepáticos de peces que fueron alimentados durante 7 días con dieta Dibaq en presencia de AOA (dieta de 1250 ó 6250 μg de AOA/Kg de pez/día) o ausencia de AOA (control). En la parte inferior de la figura se representa la densitometría de las bandas correspondientes a ALT detectadas en presencia de anticuerpo y normalizadas con la proteína total en el gel teñida con *Coomassie Blue*, los niveles ALT están expresados en unidades arbitrarias. Los resultados están expresados como valor de la media \pm SD (n=4).



Con el fin de estudiar los efectos del suministro de AOA por un periodo de tiempo más prolongado sobre el metabolismo hepático de las doradas, se prepararon 2 dietas diferentes en la composición de nutrientes (dieta Dibaq y dieta Experimental).

Una de las dietas fue preparada con el pienso Dibaq (46% de proteína, 22% lípidos y 9.3% de carbohidratos) y la otra contenía una concentración de hidratos de carbono más elevada, que se denominó dieta experimental (42% de proteína, 13.4% lípidos y 20% de carbohidratos), según se describe en el apartado 3.13.1.2 de materiales y métodos. Cada dieta se estudió con adición de AOA a concentración de 3000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de pez/día y sin adición de AOA. Durante 30 días, 60 peces distribuidos en 12 acuarios fueron alimentados con las diferentes dietas (3 acuarios para la dieta Dibaq, 3 acuarios para la dieta Dibaq + AOA, 3 acuarios para la dieta experimental y 3 acuarios para la dieta experimental + AOA).

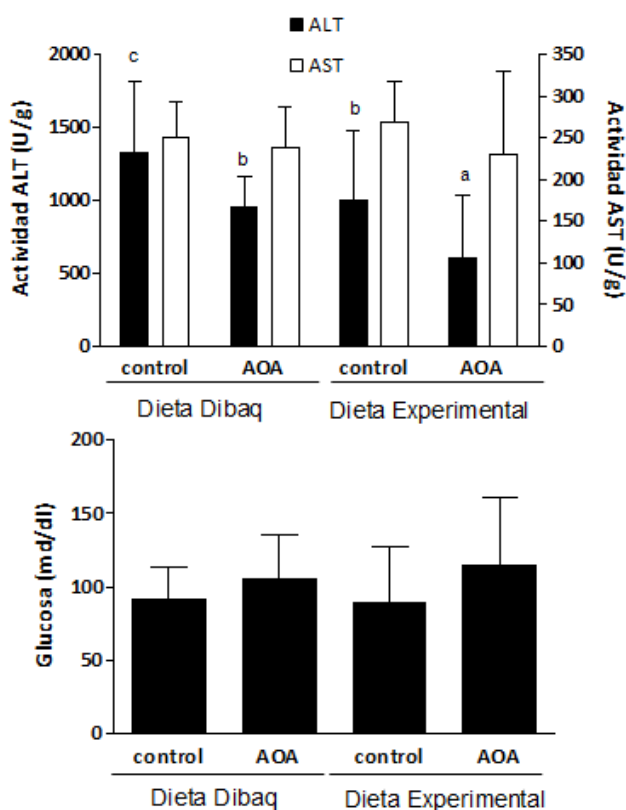


Figura 33. Efecto de la administración de 3000 μg de AOA/ Kg de pez/día, con las dietas Dibaq y experimental durante 30 días, sobre las actividades ALT y AST y los niveles de glucosa en suero. Los peces fueron alimentados con una dieta Dibaq y otra dieta experimental en presencia o en ausencia de 3000 μg de AOA/Kg de pez/día durante 30 días. Se determinó la glucosa en suero se extrajeron los hígados y se determinaron las actividades ALT y AST en relación al control (alimentados con dieta en ausencia de AOA). Los resultados están expresados como media \pm SD (n=5). ^{a,b,c}. La significación estadística referida al control se indica de la siguiente manera: $P < 0.05$.

Tras 30 días de tratamiento, se extrajo el hígado y la sangre de los peces. La actividad específica ALT en extractos hepáticos de los peces alimentados con las dietas que contenían AOA se redujo hasta un 68% de la observada en los peces control en el caso de dieta Dibaq + AOA y hasta un 60% para la dieta experimental con AOA. Sin embargo, no se observó inhibición de la actividad AST en ninguno de los tratamientos respecto a sus respectivos controles. Los niveles de glucosa en suero no variaron de forma significativa en los peces alimentados con las dietas ensayadas (Figura 33).

En la figura 34 se muestra la inmunodetección de proteína ALT en los peces alimentados durante 30 días con las dietas Dibaq y experimental en presencia o ausencia de 3000 μg de AOA/Kg de pez/día, los valores están normalizados con la proteína teñida con *Coomassie blue* en el gel de acrilamida. Como se puede observar los resultados indican que no hay variación significativa de los

niveles de ALT total en los peces tratados con AOA en relación a los controles en ninguno de los casos.

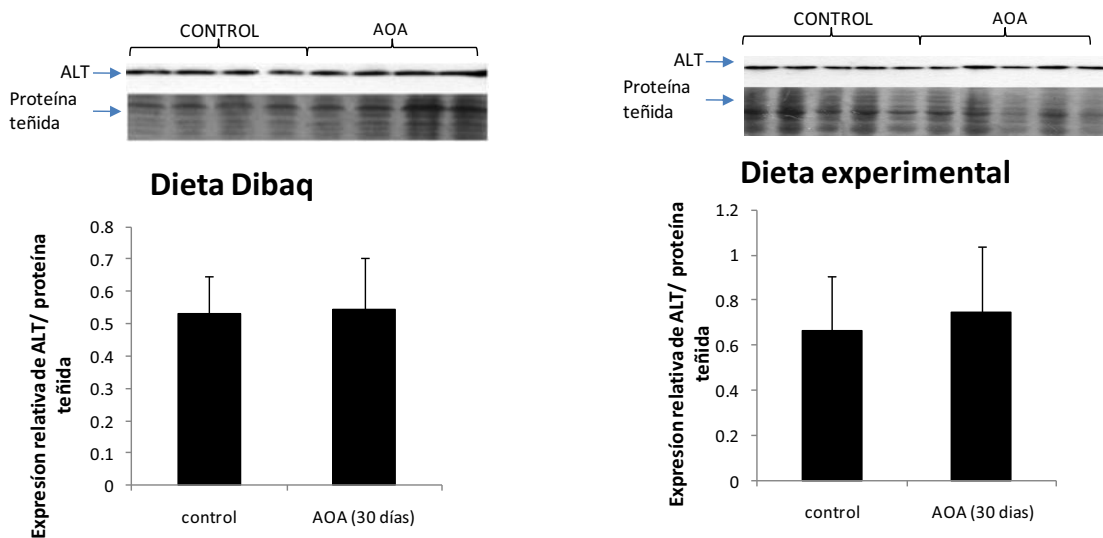


Figura 34. Efecto de la administración de 3000 µg de AOA/ Kg de pez/día con las dietas Dibaq y experimental, durante 30 días, sobre la expresión relativa de la proteína ALT en hígado de dorada alimentadas con AOA. Los peces fueron alimentados durante 30 días con la dieta Dibaq y la dieta experimental en presencia o ausencia de 3000 µg de AOA/Kg de pez/día. La parte superior de la figura corresponde a niveles representativos de proteína ALT inmunodetectable en extractos hepáticos de peces. En la parte inferior de la figura se representa la densitometría correspondientes a las bandas correspondientes a ALT detectadas en presencia de anticuerpo normalizadas con la proteína total en el gel teñida con *Coomassie Blue*. Los niveles de ALT están expresados en unidades arbitrarias. Los resultados están expresados como valor de la media ± SD (n=5).

A los 30 días postratamiento se observó una inhibición significativa en los niveles de actividad ALT, posteriormente se determinó la proteína ALT en los extractos totales de hígado de dorada y se pudo apreciar que no hubo una variación significativa en los niveles de proteína ALT en los peces tratados con respecto a los peces control para ambas dietas (Dibaq y experimental). Estos resultados indican que tras 30 días de alimentación continuada con una dieta con AOA no se alteran los niveles de proteína ALT para compensar la disminución de la actividad promovida por el inhibidor AOA.

Con el fin de determinar si una exposición prolongada de los peces al AOA influía en otras enzimas relacionadas con el metabolismo de hidratos de carbono, se analizó la actividad de otras enzimas hepáticas relacionadas con la vía de glucólisis-gluconeogénesis, PK, PFK-1, GK y FBPasa, y la vía de las pentosas fosfato, G6PDH y 6PGDH, en hígado de doradas tratadas con las dietas Dibaq y experimental en presencia o ausencia (control) de AOA.

RESULTADOS

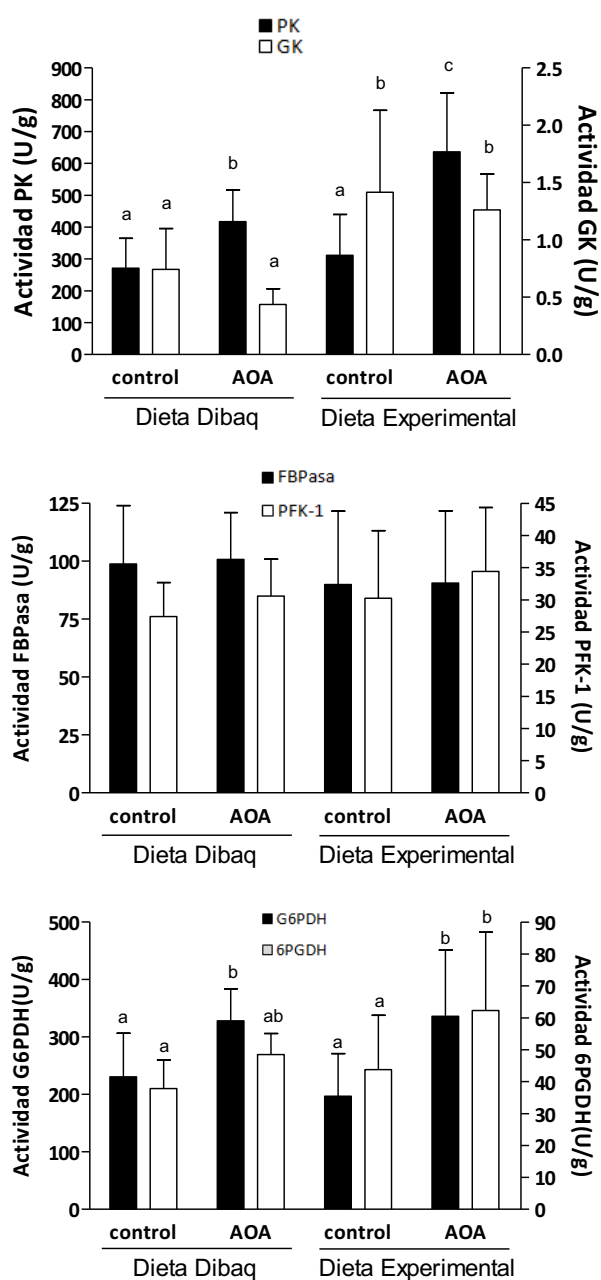


Figura 35. Efecto de la administración de 3000 μg de AOA/ Kg de pez/día con las dietas Dibaq y experimental durante 30 días sobre las actividades PFK-1, FBPasa, PK, GK, G6PDH y PGDH en hígado de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados con la dieta Dibaq o Experimental en presencia o en ausencia de 3000 μg de AOA/Kg de pez /día durante 30 días. Se extrajeron los hígados y se determinaron las actividades PK, GK, PFK-1, FBPasa, G6PDH y 6PGDH. Los resultados están expresados como media \pm SD (n=6). ^{a,b,c}La significación estadística referida al control se indica de la siguiente manera: $P < 0.05$.

La actividad específica de PK mostró un aumento significativo en hígado de peces alimentados con la dieta experimental o dieta Dibaq cuando contenían AOA. La actividad PK incrementó hasta un 154% (dieta Dibaq + AOA), o un 204% (dieta experimental + AOA) en relación

con el control de cada dieta. La actividad GK no resultó afectada significativamente en los peces alimentados con la dieta experimental o Dibaq con AOA, si bien se observó una tendencia a disminuir en los peces alimentados con la dieta Dibaq en presencia de AOA. Por otra parte, las actividades correspondientes a la PFK-1 y FBPassa no se vieron afectadas en relación a sus controles en los peces alimentados con las diferentes dietas estudiadas. La actividad G6PDH aumentó significativamente en hígado de peces alimentados con la dieta experimental o dieta Dibaq cuando contenían AOA, hasta un 142% (dieta Dibaq + AOA), o un 170% (dieta experimental + AOA) en relación con el control de cada dieta. Sin embargo, no se observó un aumento significativo de la actividad 6PGDH en hígado de peces alimentados con la dieta Dibaq pero si un incremento de hasta un 143% en hígado de peces alimentado con la dieta experimental con AOA (Figura 35).

Para analizar los cambios moleculares asociados al efecto del AOA sobre las actividades enzimáticas de ALT, AST, GK, PFK-1, GK, FPBasa, PK, G6PDH y 6PGDH y sobre los niveles de compuestos importantes en el metabolismo intermediario en el hígado de dorada (alanina, glutamato y glucógeno) y el nivel de enriquecimiento de alanina en ^2H , se alimentaron las doradas con 2 dietas isoenergéticas (21,3 KJ/g) de diferente composición: dieta P60 (60% de proteínas y 7,2 % de carbohidratos), y dieta P45 (45 % de proteínas y 24,6 % de carbohidratos).

Durante 30 días se alimentaron 96 peces distribuidos en 12 acuarios (2 acuarios para la dieta P60, 2 acuarios para la dieta P60 + AOA, suministrado a concentración de 5 mg /Kg de pez/día, 2 acuarios para la dieta P60 + AOA, de 15 mg /Kg de pez/día, 2 acuarios para la dieta P45, 2 acuarios para la dieta P45 + AOA, de 5 mg /Kg de pez/día y 2 acuarios para la dieta P45 + AOA, de 15 mg /Kg de pez/día).

La actividad ALT en extractos hepáticos mostró una inhibición, después de 30 días de tratamiento con las dietas que contienen AOA, en relación a sus controles. La actividad ALT disminuyó hasta el 55% y 49% en los peces alimentados con la dieta P60 en presencia de AOA a concentración de 5 mg /Kg de pez/día y 15 mg /Kg de pez/día, respectivamente. En los peces alimentados con la dieta P60 conteniendo AOA a 5 mg /Kg de pez/día y 15 mg /Kg de pez/día, la actividad AST disminuyó hasta el 71% y 65% respectivamente. En los peces alimentados con la dieta P45, la actividad ALT disminuyó hasta el 26% y 40% en los peces alimentados con AOA adicionado a 5 mg /Kg de pez/día y 15 mg /Kg de pez/día, respectivamente. La actividad AST, en los peces alimentados con la dieta P45 con AOA a 5 mg /Kg de pez/día y 15 mg /Kg de pez/día, disminuyó hasta el 35% y 46% de los valores obtenidos en los peces control alimentados con las dietas P45. Los niveles de glucosa en suero no variaron de forma significativa (Figura 36).

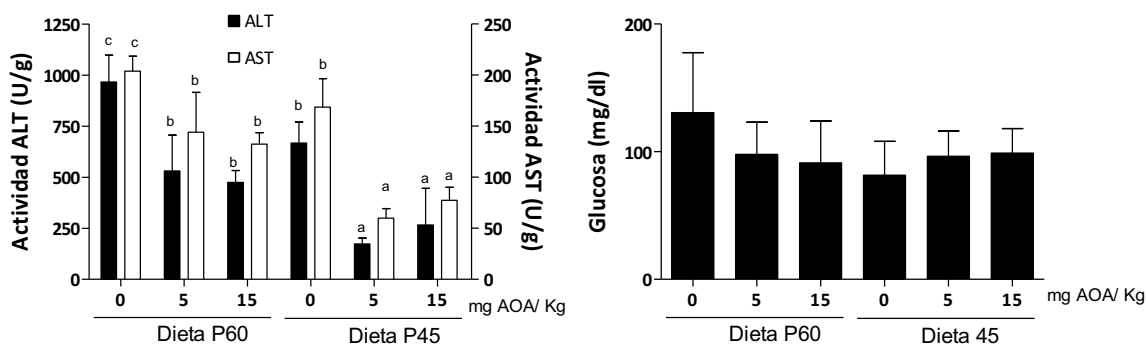


Figura 36. Efecto de la administración de 5 y 15 mg de AOA/ Kg de pez/día con las dietas P60 y P45 sobre las actividades ALT y AST (A) y sobre los niveles de glucosa en suero (B). Los peces fueron alimentados con las dietas P60 y las dietas P45 en presencia o en ausencia de 5 o 15 mg de AOA/Kg de pez/día durante 30 días. Se extrajeron los hígados y se determinaron las actividades ALT y AST en relación al control (alimentados con dieta sin adición de AOA). Los resultados están expresados como media \pm SD (n=6). ^{a,b,c} La significación estadística referida al control se indica de la siguiente manera: $P < 0.01$ (***)

En la figura 37 se muestra la inmunodetección de la proteína ALT en extractos hepáticos de peces alimentados durante 30 días con las dietas P60 en presencia o ausencia de 5 y 15 mg de AOA/Kg de pez/día. Los valores están normalizados con la proteína teñida con *Coomassie blue* en el gel de acrilamida. Como se puede observar, los resultados indican que no hay variación de los niveles de proteína ALT en los peces alimentados con la dieta P60 o P45 con AOA en relación a los controles, independientemente de las dosis administradas de AOA administradas.

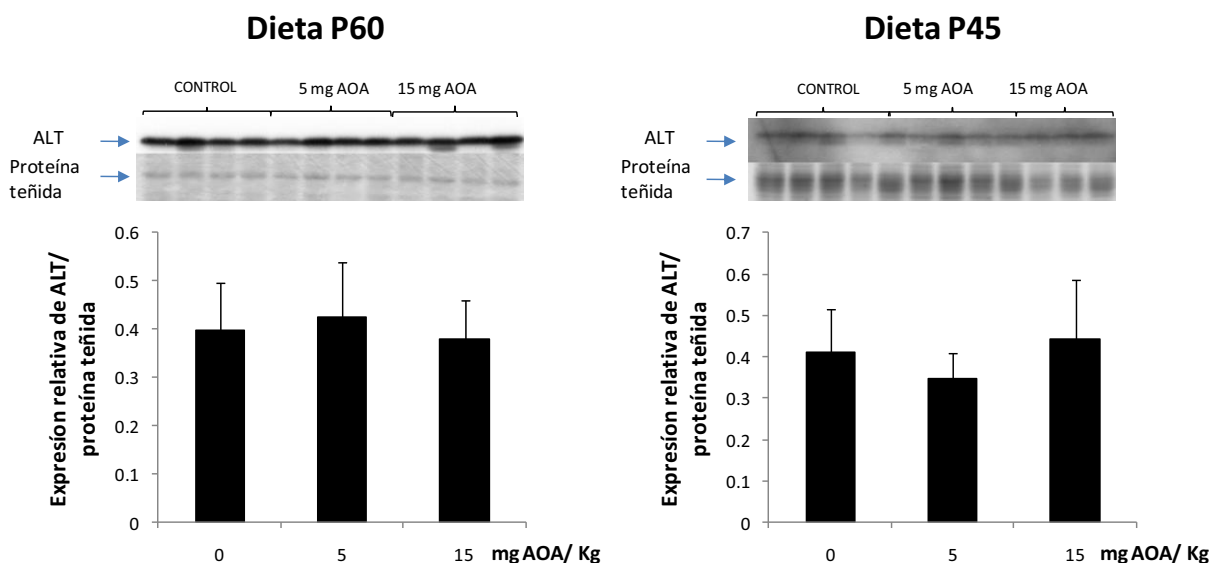


Figura 37. Efecto de la administración de 5 y 15 mg de AOA/ Kg de pez/día con las dietas P60 y P45, durante 30 días sobre la expresión relativa de proteína ALT en hígado de dorada. Los peces fueron alimentados durante 30 días con la dieta P60 y la dieta P45 con presencia o en ausencia de 5 y 15 mg de AOA/Kg de pez/día. La parte superior de la figura corresponde a niveles representativos de proteína ALT inmunodetectable en extractos hepáticos de peces que fueron alimentados en presencia o ausencia (control) de AOA en cada dieta. En la parte inferior de la figura se representa la densitometría de las bandas correspondientes a ALT detectadas en presencia de anticuerpo y normalizadas con la proteína del gel teñida con *Coomassie Blue*, los niveles ALT están expresados en unidades arbitrarias como valor de la media \pm SD (n=6).

Con el fin de determinar si una exposición prolongada de los peces a AOA influía en otras enzimas relacionadas con el metabolismo de hidratos de carbono, se analizó la actividad de enzimas hepáticas de la vía de glucólisis y gluconeogénesis, PK, FBPasa, PFK-1, GK y de las pentosas fosfato, G6PDH y 6PGDH, en el hígado de doradas tratadas con las dietas P60 y P45 en presencia o ausencia (control) de 5 mg de AOA /Kg de pez/día y 15 mg de AOA /Kg de pez/día.

En la figura 38 se observa que la actividad PK mostró un aumento significativo en hígado de peces alimentados con la dieta P60 o P45 cuando contenían AOA. La actividad PK en la dieta P60 incrementó hasta un 183% (dieta con AOA a 5 mg de AOA/Kg de pez/día), y hasta un 198% (dieta con AOA a 15 mg /Kg de pez/día) en relación con el control. Con la dieta P45 la actividad PK incrementó hasta un 159% (dieta con AOA a 5 mg de AOA/Kg de pez/día), y hasta un 165% (dieta con AOA a 15 mg /Kg de pez/día) en relación con el control de cada dieta. Sin embargo, la actividad GK no se vió afectada por el AOA en los peces alimentados con las dietas mencionadas. Las actividades PFK-1, FBPasa, G6PDH y 6PGDH no resultaron afectadas en relación a sus controles pero sus valores son mas elevados en los peces alimentados con la dieta de mayor contenido en carbohidratos (P45).

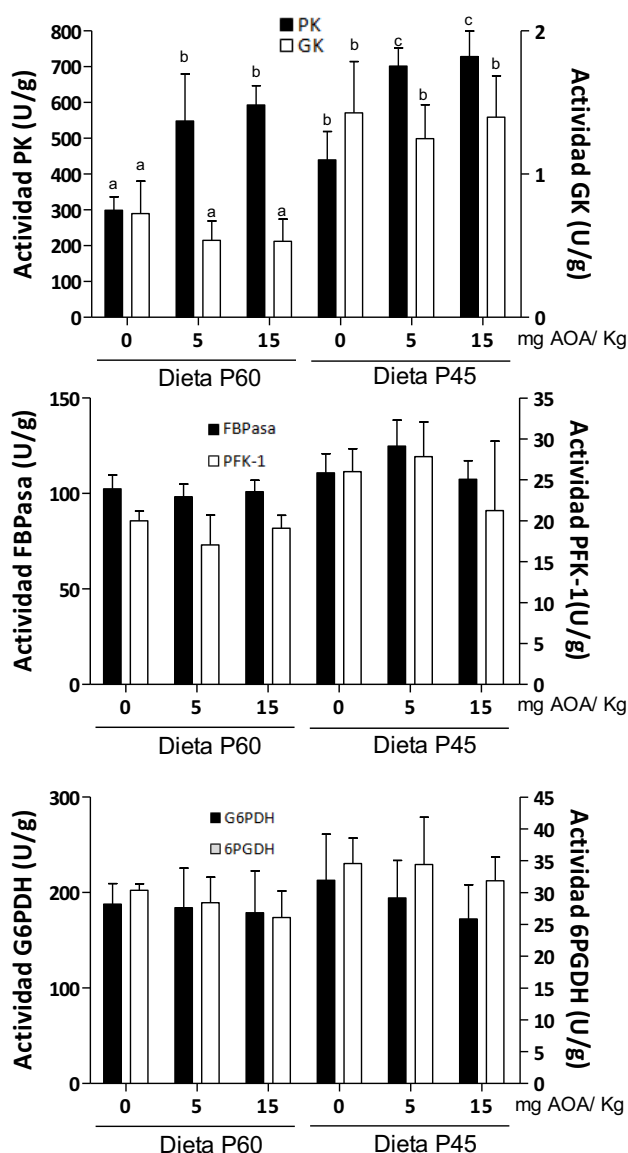


Figura 38. Efecto de la administración de 5 ó 15 mg de AOA/ Kg de pez/día con las dietas P60 y dieta P45 durante 30 días sobre las actividades PFK-1, FBPasa, PK, GK, G6PDH y PGDH de hígado de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados con la dieta P60 y P45 en presencia o en ausencia de 5 y 15 mg de AOA/Kg de pez /día durante 30 días. Se extrajeron los hígados y se determinaron las actividades PK, GK, PFK-1, FBPasa, G6PDH y PGDH en peces tratados y peces control (alimentados con las dietas sin AOA). Los resultados están expresados como media \pm SD (n=6). ^{a,b,c}La significación estadística referida al control se indica de la siguiente manera: $P < 0.001$ (***)

Para poder determinar el efecto de las dietas P60 y P45 en presencia o ausencia (control) de 5 mg AOA/Kg de pez/día y 15 mg AOA/Kg de pez/día, sobre los niveles de alanina, glucógeno y glutamato en hígado de dorada, se determinaron los niveles de metabolitos mediante ¹H-RMN.

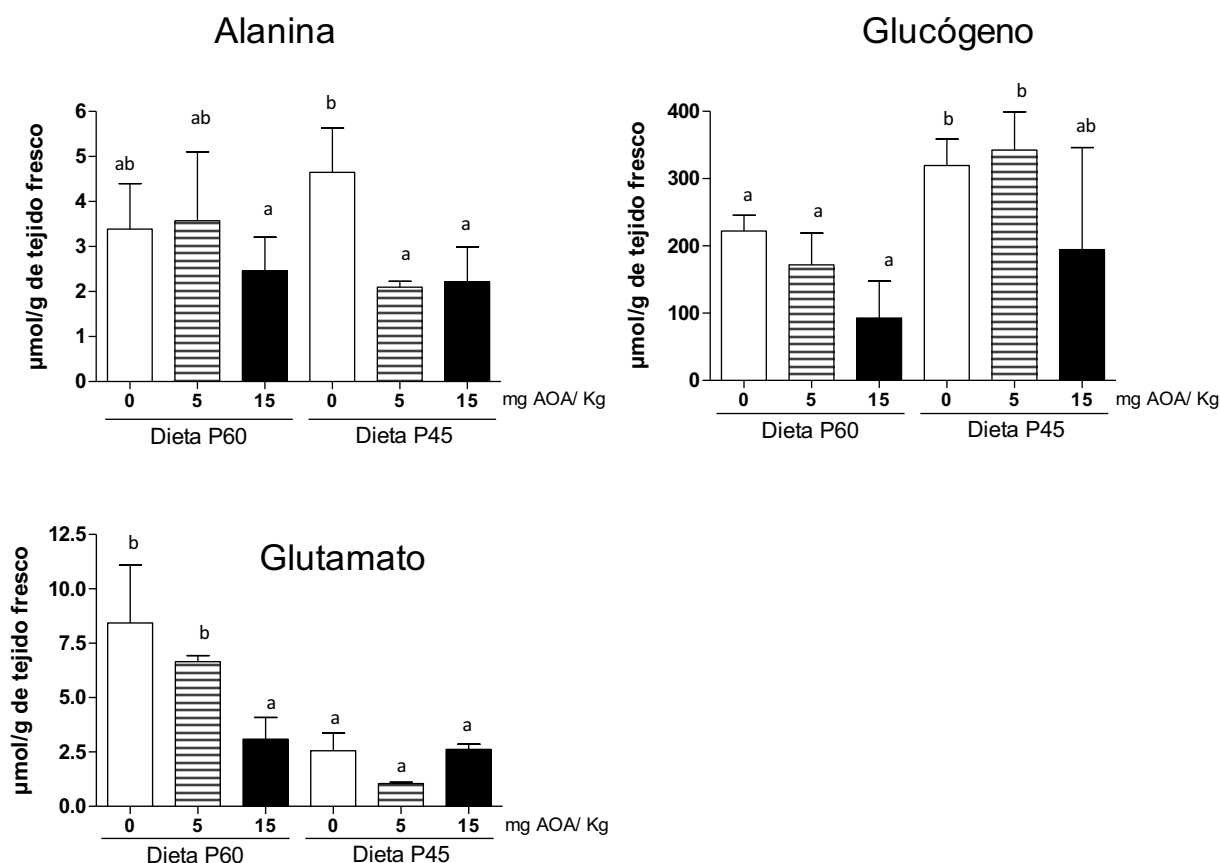


Figura 39. Efecto de la administración durante 30 días de 5 ó 15 mg de AOA/ Kg de pez/día con las dietas P60 y P45 sobre los niveles de alanina, glucógeno y glutamato en hígado de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados con las dietas P60 y P45 en presencia o en ausencia de 5 y 15 mg de AOA/Kg de pez /día durante 30 días. Se extrajeron los hígados y se determinaron los niveles de alanina, glucógeno, y glutamato en peces tratados y peces control (alimentados con las dietas sin AOA). Los resultados están expresados como media \pm SD (n=3). ^{a,b,c}La significación estadística referida al control se indica de la siguiente manera: $P < 0.05$.

Dichos metabolitos fueron analizados mediante RMN, como se indica en el apartado 3.12 de materiales y métodos. En la figura 39 se observa que los niveles de alanina en los peces alimentados con la dieta P60 y AOA a 5 mg /Kg de pez/día o 15 mg /Kg de pez/día no mostraron diferencias respecto a los peces control (alimentados con la dieta P60 sin AOA). Por otro lado, los niveles de alanina en hígado de peces alimentados con la dieta P45 con AOA disminuyen aproximadamente un 58% con respecto a los niveles de alanina observados en los peces alimentados en ausencia de AOA. En los peces alimentados con la dieta P45 y AOA a 5 mg /Kg de pez/día o 15 mg /Kg de pez/día no hubo variación significativa en los niveles de glucógeno y glutamato. Por el contrario, se observó una disminución significativa de un 63.4% en los niveles de glutamato en los peces alimentados con 15 mg de AOA/Kg de pez/día administrado con la dieta P60. Para la dieta P45, en los peces alimentados con 5 mg de AOA/Kg de pez/día, los niveles de glutamato mostraron una tendencia a disminuir, aunque de manera no significativa.

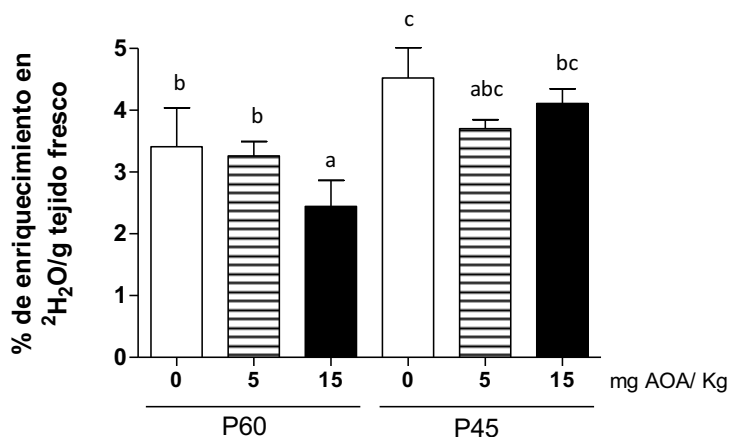


Figura 40. Efecto de la administración de 5 ó 15 mg de AOA/ Kg de pez/día con las dietas P60 y P45, durante 30 días, sobre el enriquecimiento de alanina en ²H en hígado de *S. aurata*. Los peces fueron alimentados con las dietas P60 y P45 en presencia o ausencia de 5 y 15 µg de AOA/Kg de pez /día durante 30 días. Se extrajeron los hígados y se determinó el porcentaje de enriquecimiento de alanina en ²H en peces tratados y peces control (alimentados con las dietas sin AOA). Los resultados están expresados como media ± SD (n=3). ^{a,b,c}La significación estadística referida al control se indica de la siguiente manera: $P < 0.05$.

En la figura 40 se puede observar el enriquecimiento de alanina en ²H en el hígado de los peces alimentados con AOA a 5 mg /Kg de pez/día o 15 mg /Kg de pez/día. Se observó una disminución de un 31.5% de enriquecimiento de alanina en ²H en hígado de dorada alimentadas con la dieta P60 con 15 mg AOA/Kg de pez/día pero no se observó disminución con la dosis más baja. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en los niveles de enriquecimiento de alanina en ²H en peces alimentados con la dieta P45 en presencia de AOA a 5 mg /Kg de pez/día y 15 mg /Kg de pez/día. El porcentaje de enriquecimiento de alanina en ²H en hígado de peces alimentados con la dieta P45 sin AOA fue mayor comparado con los hígados de peces alimentados con la dieta P60 sin AOA.

5 DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 SILENCIACIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS ALT

El hígado participa en el control de los niveles de la mayoría de los metabolitos presentes en la sangre. Se han identificado más de 500 funciones vitales relacionadas con el hígado, entre las que se incluyen: la producción de determinadas proteínas del plasma sanguíneo la conversión del exceso de glucosa en glucógeno para su almacenamiento y la regulación de los niveles sanguíneos de glucosa, aminoácidos, colesterol y ácidos grasos.

En el hígado, la ALT desempeña un papel fundamental en el metabolismo intermediario para obtener energía y proveer sustratos gluconeogénicos y es un biomarcador para diferentes patologías humanas.

En dorada, se han realizado diversos estudios sobre la respuesta de esta enzima a diferentes estados nutricionales y hormonales. Sin embargo, actualmente son pocos los trabajos dedicados a abordar las funciones moleculares de ALT en peces. Por este motivo, nos dedicamos a estudiar la regulación de la expresión de ALT.

En esta tesis, a través del análisis de la silenciación génica mediante siRNAs y shRNAs y la inhibición postraduccional de la actividad ALT, mediante el uso de aminoxiacetato, nos propusimos avanzar en el conocimiento de la función y los mecanismos que controlan esta enzima en *S. aurata* y sus efectos metabólicos.

En células humanas, los siRNAs expresados a partir de plásmidos, como shRNA o vectores virales, se han utilizado ampliamente para estudios de la funcionalidad génica. Sin embargo, hasta la fecha son pocos los trabajos que han abordado la silenciación génica mediada por secuencias de RNA de interferencia en peces.

A lo largo de los últimos 15 años se han desarrollado una gran variedad de sistemas no virales para la introducción de material génico en células eucariotas (Li S. and Huang 1997, Lustig and Redman 1980, Niidome and Huang 2002, Wong et al. 1997, Wu J. et al. 2002). Los liposomas y los polímeros catiónicos son los más utilizados como sistema de transporte no viral de material génico. De los diferentes polímeros catiónicos utilizados destaca el uso del quitosán como un sistema de transporte de material génico, ya que forma complejos con el DNA. Debido a su solubilidad puede ser modificado químicamente originando diferentes formas y presentaciones: fibras, película, cápsulas y recubrimientos (Borchard and Junginger 2001, Van der Lubben et al. 2001). El quitosán es un

polisacárido natural biodegradable, biocompatible, de baja toxicidad y un excelente formador de películas (filmógeno). Su campo de aplicación es amplio, desde su utilización en el tratamiento de aguas residuales hasta la producción de sustancias especiales de aplicación en medicina. La utilización de este polímero es remarcable por la ventaja de ser biodegradable y presentar poca toxicidad. Sin embargo, la utilización de siRNAs o shRNA podría provocar una respuesta inmune adaptativa (Seferian and Martinez 2000).

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la función metabólica de ALT en hígado de *S. aurata*, en esta tesis nos propusimos silenciar la expresión de las isoformas citosólicas de ALT de dorada y comprobar el efecto de la silenciación génica en el metabolismo intermediario.

Para validar la utilización de quitosán para la preparación de nanopartículas transportadoras de vectores plasmídicos se utilizó el vector de expresión de shRNA pCpG-siRNA, vector que expresa el péptido alfa de la β -galactosidasa de *E. coli* bajo el control del promotor H1 humano. El vector se acompañó con quitosán y se administró a juveniles de dorada mediante inyección intraperitoneal. Mediante PCR semi-cuantitativo se detectó la expresión de péptido alfa en hígado de dorada después de 24 h. Nuestros resultados indican que en el hígado de todos los peces tratados con el complejo pCpG-siRNA-quitosán se observó la presencia del péptido alfa mediante PCR semi-cuantitativo. Si bien se produjo una amplia variabilidad interindividual en los peces tratados, efecto que también ha sido reportado en otros estudios (Mao et al. 2001, Ramos et al. 2005). Los resultados presentados en esta tesis demuestran que es posible la utilización de nanopartículas de DNA-quitosán como método de introducción de DNA exógeno en juveniles de dorada.

Para nuestros estudios *in vitro* las secuencias correspondientes a las isoformas cALT1, cALT2 y mALT de hígado de dorada se introdujeron en el vector de expresión pcDNA3 a fin de obtener los plásmidos pcDNA3-cALT1, pcDNA3-cALT2 y pcDNA3-mALT, que permiten la expresión de las isoformas ALT de dorada en células eucariotas. Experimentos realizados con células HEK293 indicaron la concentración de vector adecuada para observar la expresión de las isoformas ALT. Posteriormente, a las 48 h postransfección se determinó la expresión de dichas isoformas en las fracciones citosólica y mitocondrial de células HEK293. Estos estudios indicaban que tras la transfección se producía la expresión de las isoformas de hígado de dorada en las células humanas y se determinó que la actividad transaminasa se encontraba incrementada significativamente en los extractos obtenidos a partir de estas células. Previamente a la utilización *in vivo* de shRNAs encapsulados con quitosán, se ensayaron diferentes siRNA para identificar aquéllos que producían mayor silenciación.

Para lograr la silenciación de las isoformas cALT1, cALT2 y mALT, se diseñaron siRNAs contra las diferentes isoformas clonadas de hígado de *S. aurata* utilizando los algoritmos de Ambion y

Bionova. La funcionalidad de estos siRNA se ensayó en células HEK293 que sobreexpresaban de forma transitoria las isoenzimas ALT de dorada en estudio.

Mediante qPCR se observó que siRNAs diseñados específicamente contra cALT1 promovían una silenciación significativa de la expresión de la isoforma cALT1. Los niveles de silenciación *in vitro* alcanzaron un 38% en células HEK293 transfectadas con el siRNA1 y el vector de expresión de cALT1 (pcDNA3-cALT1). Para la validación de las secuencias siRNA diseñadas, se ensayaron diferentes condiciones de tiempo postranfección, concentración de siRNA y concentración del plásmido de expresión de cALT. Por otra parte, se estudió si el siRNA1 promovía un silenciamiento de los niveles de mRNA de cALT2 y mALT. La expresión de mRNA de mALT *in vitro* no se vió afectada por el siRNA1 diseñado para silenciar cALT1, pero los niveles de mRNA de cALT2, disminuyeron en un 22%.

Posteriormente, el siRNA1 anti-cALT1 se clonó en el vector pCpG-siRNA para expresar siRNA1 como shRNA. A las 48 h postranfección de las células HEK293 con el constructo shRNA (pCpG-si1sh1), se observó una silenciación de cALT1, de un 48%. Esta disminución en los valores de mRNA es mayor a la observada al utilizar el siRNA sintético (38% de disminución) a partir del cual se generó el shRNA, resultados que indicaban la posibilidad de utilización de este vector *in vivo*. El hecho de que el plásmido utilizado (pCpG-siRNA) contenga un promotor constitutivo permitiría una mayor expresión de shRNA, que a su vez da lugar a un siRNA por la acción de Dicer.

A fin de silenciar la expresión de cALT2 se diseñaron 2 secuencias siRNA específicas correspondientes a la región del exón extra presente en esta isoforma y ausente en cALT1. Sin embargo, los estudios realizados *in vitro* con estas secuencias no produjeron disminución de los niveles de mRNA de cALT2.

El exón extra que posee cALT2, en relación con cALT1, tiene una longitud de 85 pb, que no es lo suficientemente extenso como para encontrar secuencias de siRNA alternativas a las ensayadas que, en teoría, pudieran causar la silenciación de cALT2.

De los 6 siRNA utilizados para silenciar la isoformas mALT ninguno presentó un efecto silenciador sobre los niveles de mRNA de mALT. En nuestros estudios, los siRNA fueron diseñados a partir de la región terminal 3'-UTR, la cual presenta baja homología entre las isoformas mALT y las cALT. En estudios futuros se podrían diseñar nuevas secuencias a partir de otras regiones del cDNA, aunque podrían generar efectos *off-target* en las demás isoformas de ALT dada su posible elevada homología.

Zenke et al. (2008) observaron que plásmidos con un promotor U6 de *Takifugu rubripes* resultaban adecuados para la expresión de un shRNA en diversas líneas celulares de peces (BF-2

derivadas de *Lepomis macrochirus*, GF derivadas de aleta de *Haemulon sciurus*, CHSE derivadas de embriones de *Oncorhynchus tshawytscha*). Posteriormente Zenke et al. (2009) observaron que podían expresar un gen exógeno (EGFP) e inhibirlo en la misma línea celular mediante un shRNA contra EGFP por dos métodos diferentes, introduciendo dentro de un mismo vector la secuencia que codifica para EGFP y la del shRNA que inhibe al EGFP, o bien realizando una co-transfección del vector que exprese la EGFP conjuntamente con otro que exprese de manera independiente el shRNA. Los resultados cuando utilizaban un único vector que expresa de forma simultánea EGFP y el shRNA indican que la silenciación de la expresión es menor que cuando se cotransfectan los dos vectores. Finalmente, Zenke et al. (2010) construyeron un vector más eficaz que el basado en el promotor Fugu U6, a través de la obtención de un vector fundamentado en el promotor de la β -actina de *Oplegnathus fasciatus*. Este nuevo vector, permitió silenciar de forma significativa a la EGFP y que células transfectadas con este vector, que contiene un siRNA contra una proteína de la cápside del *rock bream iridovirus* (RBIV), mostraran *in vitro* mayor resistencia frente al RBIV. Nuestros estudios para la validación de pCpG-silsh1 realizados en células eucariotas y utilizando los vectores pCpG-silsh1 y pcDNA3-cALT1, que expresa cALT1 de dorada, muestran una silenciación del mensajero de cALT1 del 48% a las 72 h, disminución similar a la indicada por Zenke et al. (2009, 2010) cuando utilizaban vectores independientes.

Nuestros estudios *in vitro*, realizados en células HEK293, indicaron que es posible observar la silenciación de cALT1 de *S. aurata* mediante siRNA o shRNA. En el caso del siRNA sintético la concentración óptima es 20 nM para promover una silenciación entorno al 38%, a las 24 h postransfección. Utilizando 300 μ g del vector pCpG-silsh1 y 30 μ g del vector que expresa cALT1 se logró una silenciación significativa de un 48%.

En relación a los estudios realizados para determinar la silenciación de la expresión génica de las isoformas citosólicas de ALT *in vivo*, hemos utilizado nanopartículas preparadas con el polímero quitosán para la introducción de DNA exógeno en *S. aurata*. En nuestros estudios se ensayó *in vivo* un shRNA acompañado a quitosán en doradas, de aproximadamente 10 g de peso, para expresar como shRNA el siRNA1, que previamente mostró un efecto de silenciación significativa de la expresión de cALT1 y cALT2 en células HEK293.

Tras comprobar que el promotor H1 humano del plásmido pCpG-siRNA es funcional en dorada, dado que se observó la presencia del péptido alfa bacteriano que codifica el vector pCpG-siRNA, se procedió a silenciar el gen cALT utilizando el shRNA correspondiente validado previamente en células HEK293 contra la isoforma cALT1 de hígado de dorada. Anteriormente otros autores han utilizado vectores plasmídicos en peces con fines de inmunización (Ramos et al. 2005); en dicho estudio, también se utilizó quitosán como vehículo de transfección. Para poder verificar los efectos silenciadores del silshRNA en dorada, se acompañó el vector con quitosán a una

concentración de un 0.2% y con un tamaño final del complejo de 143 ± 1 nm. La obtención del complejo quitosán-pCpG-si1sh1 fue realizada por el grupo de la Dra. Montserrat Miñarro, del Dept. Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona.

En nuestro trabajo se observó una disminución de un 25% de los niveles de mRNA de cALT1, isoforma mayoritaria en hígado de dorada, a las 72 h post inyección intraperitoneal con el complejo quitosán-pCpG-si1sh1. El descenso en los niveles de mRNA observados para cALT1 en hígado de dorada se correspondía con una disminución de los niveles de actividad enzimática y de los niveles de proteína ALT. Se observó una silenciación en los niveles de mRNA, proteína y actividad enzimática del 25%, 30% y 42%, respectivamente. Estos resultados muestran la efectividad tanto del RNAi como del complejo quitosán-vector.

Nuestros resultados muestran por primera vez la silenciación de un gen que codifica para una enzima del metabolismo intermediario en peces de interés comercial mediante el uso de tecnología de RNAi. A partir de este punto, el objetivo fue conocer si la silenciación de ALT podía verse reflejada en otros parámetros del metabolismo intermediario en dorada. Las potenciales aplicaciones del uso de RNAi son relevantes tanto en el campo de la ciencia básica como en el campo industrial por sus posibles aplicaciones para mejorar el crecimiento de peces en cultivo.

En futuros experimentos se podría utilizar los vectores acomplejados con quitosán para observar el efecto que producen sobre el crecimiento de dorada y el metabolismo intermediario relacionado con la silenciación génica de ALT. Estudios de modificación química del quitosán podrían ayudar a incrementar los niveles de expresión de shRNA y la silenciación del mRNA.

En conclusión, nuestros resultados muestran que es posible silenciar el mRNA correspondiente a la cALT hepática de dorada: la utilización de si/shRNAs es efectiva para silenciar a cALT1 y cALT2 *in vitro* e *in vivo*. La silenciación de la isoforma cALT1 de dorada en células HEK293 nos muestra una silenciación significativa de los niveles de cALT1 hasta un 48%, resultados comparables con los obtenidos por Zenke et al. (2008), en los cuales muestran un descenso de la actividad de su proteína diana *in vitro* hasta un 59.2%. La formación del complejo pCpG-si1sh1-quitosán y la posterior inyección vía I.P. produjo, *in vivo*, una silenciación del gen cALT en hígado de *S. aurata*. Futuros experimentos en los que se lograra una silenciación de cALT más eficiente que la alcanzada, nos permitirían comparar los cambios metabólicos producidos en la dorada y alcanzar un mayor conocimiento molecular para la potencial aplicación en acuicultura.

5.2 INHIBICIÓN POSTRADUCCIONAL DE LA ACTIVIDAD DE LAS ISOFORMAS ALT

Con el objetivo de inhibir la actividad ALT y estudiar los efectos de la inhibición de la actividad transaminasa sobre el metabolismo intermediario de *S. aurata*, en este trabajo se utilizaron varios compuestos que han sido descritos como inhibidores de transaminasas en diferentes organismos (Lustig and Redman 1980; Noguchi et al. 1977; Novoa et al. 1959; Parrilla et al. 1986; Wilkinson et al., 1972; Wong et al. 1997; Rej et al., 1979; Thornburg et al., 2008; Lustig et al., 1980). De los inhibidores utilizados, aminooxiacetato (AOA), maleato, oxamato e hidroxilamina, el AOA fue el único que, en las condiciones ensayadas, causó un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad ALT hepática.

El AOA se ha utilizado en diferentes especies con el fin de observar los cambios que este compuesto produce en el metabolismo y procesos celulares (Hotta (1968), Parrilla et al. (1974), Rognstad et al. (1974) y Cornell et al. (1984)). Así, Cornell et al. (1984) además de la disminución de la actividad ALT, observaron que el AOA causaba disminución de la actividad AST en hepatocitos aislados de rata, si bien el porcentaje de inhibición era menor que el que ejercía sobre la actividad ALT. Vedavathi et al. (2006) analizaron el efecto del AOA sobre la ALT en extractos de hígado de rata preincubados con AOA, observando una disminución significativa de la actividad ALT a una concentración de 2.5 mM.

En nuestros estudios *in vitro* utilizando extractos crudos de hígado de dorada, observamos que el AOA a concentración de 10 μ M o superior, pero muy inferiores a las descritas por Vedavathi et al. (2006), ejercía inhibición significativa de la actividad ALT presente en las fracciones citosólicas y mitocondriales de extractos hepáticos. La actividad AST de extractos hepáticos de dorada también resultó inhibida por el AOA, sin embargo, se necesitaron concentraciones superiores de AOA (400 μ M) para lograr una inhibición significativa.

Con el fin de determinar si la inhibición de ALT en los peces alimentados con dietas que contenían AOA afectaba por igual a las diferentes isoformas de la enzima, se separaron las fracciones citosólicas y mitocondriales de extractos totales de hígado de doradas alimentadas durante 6 días con una dieta suplementada con 725 μ g de AOA/Kg de pez. La actividad ALT de la fracción citosólica, obtenida a partir de extractos hepáticos de los peces tratados con AOA, resultó inhibida en un 45%. Esta inhibición se correlaciona con el efecto causado por el AOA sobre las isoformas cALT *in vitro*. Por otra parte, no se observó inhibición de la actividad ALT en la fracción mitocondrial aislada de extractos hepáticos de peces tratados con AOA. La falta de inhibición de la actividad ALT en la

fracción mitocondrial *in vivo* puede deberse a diferentes factores. Podría ser que mALT no se viese inhibida directamente por acción del AOA o que el AOA no se internalizase en las mitocondrias.

Para determinar si la mALT aislada resultaba inhibida por acción del AOA, *in vitro*, se procedió a estudiar el efecto de este compuesto sobre mALT de dorada sobreexpresada en *S. cerevisiae*. Se determinó el efecto del AOA cuando se adicionaba a extractos mitocondriales lisados obtenidos de cultivos de levadura que sobre-expresaban mALT de dorada. En presencia de 2 mM AOA, se pudo observar un descenso en la actividad ALT hasta valores de un 7.5% en relación al control, lo que indica que el AOA es capaz de actuar como inhibidor de la isoforma mALT *in vitro*, aunque no *in vivo* probablemente por la incapacidad del AOA de atravesar la membrana mitocondrial interna.

Por otra parte, para estudiar el efecto inhibidor del AOA sobre cALT2, isoforma citosólica generada por procesamiento alternativo del gen cALT y minoritaria en hígado de doradas alimentadas, se utilizaron extractos de corazón de dorada, donde predominantemente se expresa cALT2 (Anemaet et al., 2008). Los niveles de actividad ALT de extractos de corazón de dorada mostraron un patrón de inhibición similar al observado en los extractos de hígado, donde la isoforma mayoritaria es cALT1. Estos resultados sugieren que el AOA ejerce un efecto similar sobre ambas isoformas citosólicas.

En conjunto, estos resultados indican que el AOA puede utilizarse *in vivo* como un inhibidor efectivo de las isoformas citosólicas del gen cALT, y de manera específica la isoforma cALT1 en hígado de dorada, en donde esta isoforma es mayoritaria en condiciones de alimentación.

Adicionalmente, para comprobar el efecto del AOA sobre el metabolismo intermediario en dorada, se estudió la modulación de enzimas clave en la glucólisis, gluconeogénesis y en la vía de las pentosas fosfato en hígado de dorada. Estudios previos de nuestro grupo indicaban que la actividad de enzimas clave en estas vías del metabolismo intermediario, GK, PFK-1, PK, G6PDH, 6PGDH y FBPasa, están fuertemente reguladas en doradas sometidas a diversas condiciones nutricionales como ayuno, realimentación tras situación de ayuno y por cambios en la composición de la dieta (Metón et al. 2004a, Metón et al. 2003b). A fin de estudiar los efectos del AOA sobre enzimas claves en el metabolismo intermedio, incluimos la determinación de la actividad de estas enzimas en peces tratados con AOA.

Se han realizado diferentes estudios que relacionan la ingesta de carbohidratos en peces y las enzimas que controlan el flujo de sustratos en hígado de peces (Cowey y Walton, 1989; Wilson, 1994; Panserat et al., 2002; Iynedjian et al., 2008). Nuestro grupo demostró que dietas con un alto contenido en carbohidratos y bajo contenido de proteína, promovían un aumento en la actividad de GK, PFK-1, PK mientras que la FBPasa resultó menos sensible. Además, en estos estudios se observó que la ALT

resultaba más sensible que la AST a cambios en la relación proteína/carbohidratos de la dieta suministrada a las doradas (Metón et al., 1999a; Caseras et al., 2002; Fernández et al., 2007).

En nuestros estudios, después de observar que el AOA se comportaba como un inhibidor de la actividad ALT en extractos crudos de hígado de dorada, consideramos de interés analizar su efecto *in vivo* administrando el compuesto por vía intraperitoneal o con la dieta suministrada a los peces. Tras la administración I.P. de AOA, las actividades ALT y AST resultaban inhibidas en hígado de dorada. El efecto inhibitorio, observado 6 h después de la administración, era dependiente de la cantidad de AOA suministrada.

Puesto que para observar un efecto inhibitorio del AOA sobre la actividad AST, se necesitó una dosis muy superior a la necesaria para inhibir la ALT, nuestros resultados sugieren que la actividad AST de hígado de dorada es menos sensible al efecto de este compuesto. Esta diferencia de efecto inhibitorio del AOA sobre ambas transaminasas nos permitió realizar estudios en los que a la concentración utilizada se inhibía la actividad ALT y se afectaba de menor manera AST. Así, mientras que la inhibición de ALT en peces inyectados con 145 µg AOA/ Kg de pez desciende hasta un 41%, la actividad AST lo hace hasta un 60% de la observada en los peces control.

El AOA produce una reacción de condensación con el fosfato de piridoxal, cofactor tanto de la AST como de la ALT, por lo que es posible que el efecto del AOA sobre AST se viese disminuido por la tasa de recambio que tienen las enzimas y el fosfato de piridoxal. Actualmente no se conoce la tasa de recambio de ALT o AST, ni la del fosfato de piridoxal y asimismo se desconoce la estabilidad del AOA en el tiempo, por lo que no podemos concluir si en este caso la menor inhibición de AST en hígado de dorada se debe a la tasa de recambio de AST, fosfato de piridoxal o a la estabilidad del AOA en el hígado de dorada. Por otra parte Yang et al., (2008) mostraron que el AOA puede formar aductos con el piruvato, α -cetoglutarato y oxalacetato y así, interferir con las actividades de las transaminasas. Sin embargo, para obtener resultados concluyentes se debería conocer con más detalle el mecanismo por el cual el AOA ejerce su efecto inhibitorio sobre la ALT y la AST. Esto aportaría información adicional a los experimentos que hemos realizado y suministraría mayor información sobre otros efectos observados en presencia de AOA y que podrían verse reflejados en diferentes vías del metabolismo intermediario en dorada y otros organismos.

Tras observar que el AOA causa una disminución de la actividad ALT hepática en los peces inyectados con AOA, analizamos la duración del efecto inhibitorio. En peces inyectados con 145 µg AOA/ Kg de pez, se determinó la actividad ALT a diferentes tiempos. La actividad ALT hepática descendía hasta aproximadamente un 40% de los valores control a las 3-6 h posinyección y permaneció con valores similares hasta las 24 h post tratamiento, lo que indica que el efecto del AOA perdura al menos 24 h. A partir de las 24 h, en que el efecto inhibitorio es máximo, se observa una recuperación de la actividad ALT, que alcanza valores similares a observados en los controles a partir

de las 48 h. Entre las posibles causas de pérdida de inhibición después de 24 h deben considerarse la metabolización, degradación o secreción del compuesto inhibidor AOA. Sin embargo, actualmente la causa resulta desconocida. Los niveles de glucosa no variaron de manera significativa después del tratamiento en relación al control, a los diferentes tiempos analizados.

Por otra parte los niveles de actividad AST disminuyeron en los peces tratados con AOA durante 24 h a un 60% de los valores observados en los peces control. Los niveles de actividad AST después de 48 h de la administración de AOA recuperaron unos valores de actividad AST similar a las de los controles.

Si bien la administración intraperitoneal de AOA resulta efectiva para lograr una inhibición de la actividad ALT a corto plazo, para poder analizar los efectos metabólicos de la exposición a AOA durante periodos de tiempos superiores a 24 h se debería utilizar un método alternativo a la inyección repetida en periodos de tiempo tan cortos.

Una aproximación experimental para lograr una inhibición significativa de la actividad ALT, que perdurase por un tiempo superior a 24 h, fue la incorporación del AOA en la dieta que se le suministra a los peces diariamente. De esta manera los peces no tendrían que sufrir inyecciones continuadas de AOA, que podrían suponer un factor de estrés que podría afectar la expresión de genes y enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario en hígado de dorada.

Para determinar si el AOA incorporado en la dieta, resultaba eficaz para inhibir los niveles de la actividad ALT por un tiempo superior a 24 h, los peces fueron alimentados con 725 µg de AOA/Kg de pez/día, durante 3 y 6 días. Se observó un 50% de disminución de la actividad ALT determinada en los controles (alimentados con dieta sin adición de AOA). Dado que en el hígado de los peces tras 1 día de tratamiento no se observó inhibición significativa de la actividad ALT en hígado de dorada, estos resultados sugieren que el AOA suministrado con la dieta necesita un tiempo superior a 24 h para su incorporación en los hepatocitos de dorada y producir el efecto inhibidor sobre ALT. Por otra parte, la actividad AST no mostró inhibición significativa en ninguno de los tiempos ensayados. De hecho, en los estudios previos realizados en hígado de peces tras la administración de una dosis única de AOA, se observó que la actividad ALT resultó ser más afectada que la AST.

La inhibición de actividad ALT, observada después de alimentar a los peces durante 6 días con dietas que contienen AOA, no mostró correlación con cambios en los niveles de proteína ALT. Estos resultados sugieren que en los peces alimentados durante 6 días con una dieta con presencia de AOA no se induciría la expresión de ALT para compensar la disminución de actividad causada por el inhibidor.

Con el fin de comprender si la inhibición que ejerce el AOA sobre ALT tenía otros efectos sobre el metabolismo intermediario en hígado de dorada, se procedió a determinar la actividad de enzimas clave en la gluconeogénesis (FBPasa), glucólisis (PFK-1), y vía de las pentosas fosfato (G6PDH y 6PGDH). Nuestros estudios muestran que la administración de AOA durante 6 días no produjo ningún efecto sobre las actividades de estas enzimas. Dado que un periodo de 6 días podría no ser suficiente para observar un efecto a largo plazo, se sometió a los peces a periodos más prolongados de tratamiento y a aumentar la dosis de AOA para determinar un posible efecto del AOA o la inhibición de ALT sobre las enzimas mencionadas.

Para determinar si dosis superiores podrían causar algún efecto en el metabolismo intermediario de los peces, además de una inhibición parcial de la ALT, se estudió el efecto de concentraciones de AOA superiores a las ensayadas con anterioridad. Se alimentaron doradas con dietas control (en ausencia de AOA), y dietas con 1250 µg y 6250 µg AOA/Kg/ de pez/día, durante un periodo de 7 días. A ambas concentraciones se observó inhibición de actividad ALT, sin embargo la actividad AST solo se inhibió en presencia de AOA a la concentración más elevada, resultados que confirmaban que la AST es menos sensible a la inhibición por AOA que la ALT.

Si bien no se apreció ninguna variación significativa en los niveles de glucosa en sangre, sí se observó una tendencia a aumentar. Esta tendencia puede ser debida a un estrés inducido por altas concentraciones de AOA, más que como consecuencia de la inhibición de las transaminasas. Por otra parte, en los peces tratados no hubo una variación significativa en los niveles de proteína ALT, determinada por *Western Blot*, lo que indica que tras 7 días de administración de AOA, no se produjeron cambios en la cantidad de proteína ALT inmunodetectable.

Asimismo, no se observaron variaciones significativas en los niveles de actividad de PFK-1, PK, FBPasa, G6PDH y 6PGDH en los extractos crudos obtenidos de hígado de peces alimentados con AOA en relación a los peces control. Estos resultados indican que 7 días no fue tiempo suficiente para generar cambios apreciables en el metabolismo intermediario en el hígado de doradas que recibieron 1250 µg AOA/Kg de pez/día y 6250 µg AOA/Kg de pez/día.

Para estudiar el efecto del AOA y la inhibición postraduccionaL de ALT a tiempos más largos y determinar si la composición de la dieta influye en el efecto que ejerce el compuesto inhibidor sobre las transaminasas y otras enzimas clave en el metabolismo intermediario y metabolitos en hígado de dorada, se suministraron a los peces 2 dietas, durante 30 días, con diferente nivel de proteína y energía (la dieta comercial Dibaq y una dieta experimental con menor contenido en proteína y mayor en carbohidratos), a las que se incorporó 3000 µg de AOA/Kg de pez/día. En estas condiciones, observamos una inhibición de la actividad ALT del 32% en los extractos hepáticos de los peces alimentados con la dieta Dibaq y de un 40% en el caso de los alimentados con la dieta experimental. Sin embargo, en ninguno de los casos se observó disminución de la actividad AST. En la dieta

experimental el efecto inhibitor del AOA sobre la actividad ALT fue mayor, lo que indica que el AOA podría estar ejerciendo un efecto adicional al de la inhibición de la ALT, y que en consecuencia se podría observar un efecto en otras enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. Para comprobar esta hipótesis se ensayaron las actividades de las enzimas PFK-1, FBPasa, PK, G6PDH, 6PGDH y GK en extractos de hígado de doradas alimentadas con las dietas de diferente composición en presencia y ausencia de AOA. En los peces alimentados con ambos tipos de dieta, cuando éstas contenían AOA observamos un incremento de actividad PK, mientras que no se apreciaron variaciones significativas en la actividad de las enzimas PFK-1, GK y FBPasa hepáticas en los peces alimentados con las dietas suplementadas con AOA. También se observó un incremento significativo en las enzimas G6PDH y 6PGDH en peces alimentados con la dieta experimental en presencia de AOA y un incremento significativo en la actividad de G6PDH en peces alimentados con la dieta Dibaq en presencia de AOA y, por tanto, una relación de la inhibición de ALT con la actividad de las enzimas de la vía de las pentosas fosfato. Los niveles de glucemia no sufrieron una variación significativa, lo que nos indica que la glucosa en los hepatocitos podría entrar en dos rutas alternativas de oxidación en el hepatocito ya que se ve un aumento significativo en la actividad PK y en la vía de las pentosas fosfato (G6PDH y 6PGDH).

A fin de confirmar si el efecto de la administración de AOA dependía además de la composición de la dieta que se suministraba, se efectuó un estudio en el que los peces fueron alimentados con una dieta de alto contenido en proteína y bajo contenido en carbohidratos, dieta P60 (60% de proteína, 7,2% de HC y 14,7% de lípidos) y otra con alto contenido de carbohidratos y bajo contenido proteico, dieta P45 (45% de proteína, 24,6% de HC y 15,7% de lípidos) a las que se le incorporó AOA para que los peces recibieran 5 y 15 mg de AOA/Kg de pez/día.

Después de 30 días de alimentación observamos una disminución significativa de las actividades ALT y, aunque menor de la AST, tanto en los peces alimentados con la dieta P60 como con la dieta P45. La inhibición de ALT fue mayor en el hígado de los peces alimentados con la dieta P45, tanto en los peces que recibieron una dosis de AOA de 5 mg de AOA/Kg pez/día como los que fueron tratados con 15 mg de AOA/Kg pez/día. Estudios previos de nuestro grupo mostraron que la actividad ALT hepática es sensible a la composición y cantidad de dieta con que se alimentan las doradas (Metón et al. 1999a, Fernández 2007), siendo menor en doradas alimentadas con dietas de alto contenido en carbohidratos y bajo contenido proteico. De forma similar, en nuestros estudios, los peces alimentados con la dieta P45 (alto contenido de carbohidratos y bajo contenido proteico) mostraron una actividad ALT menor a la observada en los peces alimentados con la dieta P60, el mayor efecto de la misma dosis de AOA en peces alimentados con la dieta P45 podría estar relacionado con la menor actividad ALT basal a inhibir. Por otra parte, no se observó un efecto resultante de la utilización de AOA sobre los niveles de glucosa en los experimentos *in vivo*.

Para estudiar si las diferencias observadas en la inhibición que promovía el AOA sobre ALT, en peces alimentados con dietas que diferían en la composición de nutrientes, podían asociarse con diferencias en la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, se ensayaron las actividades de PFK-1, FBPaasa, PK, G6PDH, 6PGDH y GK en hígado de dorada. En los peces alimentados con la dieta P45 sin AOA la actividad PK era superior a la de los peces alimentados con la dieta P60, efecto que podría deberse a que la dieta P45 tiene mayor contenido de carbohidratos. Por otra parte, al ser el glutamato un inhibidor de la actividad PK (Turner y Plaxton, 2000), una disminución en la concentración de este metabolito en la dieta con menor contenido proteico podría ser la causa del aumento en actividad PK. Los peces alimentados con las dietas P45 y P60 suplementadas con AOA mostraron un incremento en la actividad PK en relación a sus respectivos controles (dietas sin AOA). Estos resultados apuntaban a que los incrementos de actividad PK se pudieran deber a que la concentración de glutamato y/o alanina sea menor en presencia de AOA, ya que ambos aminoácidos se comportan como inhibidores de la actividad PK. Por tanto, conocer la concentración de glutamato y alanina hepáticas en dichas condiciones ayudaría a justificar esta hipótesis sobre los aumentos de actividad PK. Por otra parte, no se apreció una variación significativa en las actividades PFK-1, FBPaasa, G6PDH, 6PGDH o GK hepáticas en los peces alimentados con las dietas que contenían AOA. Por otra parte, los resultados obtenidos para las enzimas G6PDH y 6PGDH son sorprendentemente diferentes a los obtenidos en los peces alimentados con las dietas Dibaq y experimental, en los que se observaron cambios significativos en las actividades G6PDH y 6PGDH. Esta diferencia se puede deber a que los peces alimentados con las dietas Dibaq y experimental tenían un peso promedio de aproximadamente 200 g, mientras que los peces alimentados con las dietas P45 y P60 eran de 20 g, además de diferencias intrínsecas de la composición de las dietas.

En los experimentos *in vivo* en los que se utilizó AOA los niveles de glucosa no mostraron variaciones significativas, a pesar de que se observaron cambios en los niveles de ALT, AST y PK. Sin embargo, no se observaron cambios en la actividad de las demás enzimas ensayadas, por lo que no se puede concluir de este estudio que el AOA promueve variaciones en la glucemia de las doradas.

Mediante estudios de espectrometría ^1H RMN, determinamos las concentraciones de alanina, glucógeno y glutamato en hígado de los peces alimentados con las dietas de diferente composición de nutrientes, en presencia o ausencia de AOA.

Al determinar la concentración de alanina en peces alimentados con las dietas P60 y P45 (sin AOA) se pudo observar que la concentración de alanina era un 30% mayor en los peces que ingerían la dieta P45 que en los alimentados con la dieta P60. El incremento de alanina detectado en hígado de los peces alimentados con la dieta P45 podría deberse a una mayor síntesis *de novo*, lo que compensaría la menor cantidad de proteína de la dieta P45. Cuando el AOA se incorporaba en la dieta

P45 la concentración de alanina disminuía hasta un 46% de los valores obtenidos en ausencia de AOA, a cualquiera de las concentraciones de AOA suministrada. El descenso en la concentración de alanina no fue significativo si el AOA se suministraba con la dieta P60, siendo además necesaria una concentración más elevada de AOA para observar una tendencia a disminuir.

La concentración de glutamato en el hígado de los peces alimentados con la dieta P45 fue inferior a la de los peces alimentados con la dieta P60. La menor concentración de glutamato podría estar relacionada con la menor cantidad de proteína de la dieta P45 y podría ser responsable del incremento de actividad PK observado en los peces alimentados con esta dieta, como ya se indicó previamente. Por otra parte, en el hígado de los peces alimentados con la dieta P60 suplementada con 15 mg de AOA/Kg de pez/día, se observó un descenso significativo de glutamato que podría deberse a la inhibición de ALT. Sin embargo, los niveles de glutamato en el hígado de los peces alimentados con la dieta P45, en presencia o en ausencia de AOA, no resultaron significativamente diferentes. Los niveles de glutamato en los peces alimentados con la dieta P45 probablemente son de por sí muy bajos y no se aprecia el efecto inhibidor de AOA.

Resultados previos de nuestro grupo habían mostrado que el contenido de glucógeno en hígado de dorada correlaciona con el de carbohidratos en la dieta (Metón et al., 2003a; Metón et al., 2004a; Metón et al., 1999a; Metón et al., 2003b). Consistentemente, los valores de glucógeno en el hígado de peces alimentados con la dieta P45 fueron un 34% más elevados que en los de los peces que ingerían la dieta P60. El elevado contenido en carbohidratos de la dieta P45 podría ser la causa de este incremento. En las doradas alimentadas con las dietas P60 y P45, la presencia de AOA no produjo una variación significativa en los niveles de glucógeno hepático en relación a los valores observados en ausencia del inhibidor. No obstante, se observó que los niveles de glucógeno tienden a disminuir de forma más evidente cuando se les suministraron a los peces 15 mg de AOA/Kg de pez/día. Este efecto podría estar asociado a un aumento de la actividad PK en conjunto con una disminución de la actividad ALT más pronunciada al utilizar la concentración más elevada de AOA.

Para comprobar si en hígado de los peces tratados con AOA se estaba sintetizando una mayor cantidad de alanina, se incubaron los peces en un acuario en presencia de $^2\text{H}_2\text{O}$ durante 48 h y se analizaron los niveles en enriquecimiento de alanina en ^2H . Nuestros estudios muestran que los niveles de enriquecimiento de alanina fueron mayores en los peces alimentados con la dieta P45 respecto a aquellos alimentados con la dieta P60, lo que significa un aumento de la síntesis *de novo*. En los peces alimentados con la dieta P45 suplementada con 5 y 15 mg de AOA/Kg de pez/día se produjo una tendencia a la disminución del enriquecimiento de alanina. El mayor efecto se produjo, de manera significativa, en los peces alimentados con la dieta P60 en presencia de 15 mg de AOA/Kg de pez/día (disminución del enriquecimiento de alanina en H^2 de un 31,5%).

El hecho de que la síntesis *de novo* de alanina disminuya como resultado de la adición de AOA en la dieta P60 podría estar contribuyendo a que se observen valores de actividad ALT más bajos en el hígado de peces alimentadas con dietas con altos niveles de proteína.

En conclusión, nuestros resultados muestran la acción inhibitoria del AOA sobre la actividad ALT tanto *in vitro* como *in vivo*. Nuestros estudios *in vitro* indican que el AOA es capaz de inhibir las isoformas citosólicas y mitocondrial de ALT. La administración I.P. y la incorporación de AOA en diferentes dietas produjo una inhibición de la actividad ALT en citosol, *in vivo*, aunque no de mALT. La inhibición de la actividad ALT hepática de *S. aurata* fue dependiente de la dosis y pudo observarse independientemente de la composición de la dieta suministrada a los peces. La inhibición de ALT mediada por AOA promovió un incremento en la actividad PK, posiblemente debido al descenso en los niveles de glutamato. Sin embargo, no afectó de manera significativa la actividad de otras enzimas clave en glucólisis/gluconeogénesis (GK, PFK-1 y FBPasa). En conjunto estos resultados indican que la inhibición de ALT citosólica podría ayudar a incrementar la utilización de los carbohidratos procedentes de la dieta.

6 CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Mediante herramientas informáticas se identificaron y validaron secuencias de siRNA con capacidad para silenciar, *in vitro*, las isoformas cALT1 y cALT2 de hígado de *Sparus aurata*. Se diseñó un siRNA (siRNA1) con capacidad de silenciar en un 32% a la isoforma cALT1 y un 22% a la isoforma cALT2.
2. La inyección intraperitoneal con el complejo pCpG-siRNA-quitósán permitió detectar en hígado de dorada la presencia del mRNA de un gen exógeno (péptido alfa de la β -galactosidasa de *E. coli*), lo que indica que el promotor H1 utilizado resulta adecuado para impulsar la transcripción y expresión de siRNA en *Sparus aurata*.
3. La utilización del plásmido pCpG-si1sh1 resultó eficaz para silenciar la expresión de cALT1 *in vitro*. En células HEK293 que expresaban cALT1 de dorada la silenciación observada fue de un 52%.
4. El quitósán resultó un vehículo adecuado para introducir *in vivo* DNA exógeno en células hepáticas de *Sparus aurata in vivo*. La inyección intraperitoneal de nanopartículas de pCpG-si1sh1-quitósán promovió la silenciación de cALT1 en un 25-30%.
5. El aminoociacetato (AOA) se comporta como inhibidor, *in vitro*, de la actividad ALT presente en extractos hepáticos de *S. aurata*; una concentración 400 μ M promovió una inhibición del 100%. *In vivo*, la administración intraperitoneal de AOA causó una inhibición máxima del 59% de la actividad hepática ALT. El AOA suministrado a los peces con la dieta causó una inhibición máxima de actividad ALT del 74% en hígado. La actividad mALT *in vivo* no se vio afectada por el AOA. En hígado de dorada la inhibición observada recae esencialmente en la isoforma cALT1, mayoritaria en este tejido en condiciones de alimentación. En extractos de corazón de *Sparus aurata*, en los que predomina la isoforma cALT2, la actividad ALT resultó inhibida por el AOA de manera similar a la isoforma cALT1.
6. En peces alimentados, durante 30 días, con dietas que difieren en su contenido de hidratos de carbono y proteínas (dieta Dibaq y dieta experimental). La inclusión en la dieta de 3000 μ g AOA/Kg de pez/día promovió una inhibición de la actividad ALT del 32% (dieta Dibaq, 9.3% de hidratos de carbono) y el 40% (dieta experimental, 20% de hidratos de carbono). La actividad PK aumentó un 154% y un 204%, respectivamente, en peces alimentados con las dietas Dibaq y experimental. La actividad 6PGDH aumentó un 143% en peces alimentados con la dieta Dibaq en presencia AOA, mientras que las actividades 6PGDH y G6PDH

aumentaron un 142% y 170%, respectivamente, en peces alimentados con la dieta experimental en presencia de AOA.

7. En doradas alimentadas, durante 30 días, con dietas de diferente composición de hidratos de carbono y proteína (P60 y P45) en presencia de 5 y 15 mg AOA/Kg de pez/día, se observó una inhibición de la actividad ALT de un 45% y 51%, respectivamente para la dieta P60. En el caso de los peces alimentados con la dieta P45 la inhibición de ALT fue del 74% y 60%, respectivamente. La actividad PK aumentó un 183% y 198%, respectivamente, en peces alimentados con la dietas P60 en presencia de 5 y 15 mg AOA/Kg de pez/día. En el caso de los peces alimentados con la dieta P45 los valores de la actividad PK aumentaron un 159% y 165%, respectivamente.
8. En peces alimentados con la dieta P60 en presencia de 15 mg AOA/Kg de pez/día, los niveles de glutamato en hígado disminuyeron un 63.4% en relación a los valores observados en los peces alimentados con la misma dieta y en ausencia de AOA. Los niveles de alanina en hígado de peces alimentados con la dieta P45 en presencia de 5 y 15 mg AOA/Kg de pez/día descendieron en un 58% en ambos casos respecto al control.
9. Las doradas alimentadas con dietas con alto contenido de proteínas (dieta P60) presentan una tasa de recambio de alanina un 31.5% inferior cuando la dieta está suplementada con 15 mg de AOA/Kg de pez/día.

7 REFERENCIAS

7 REFERENCIAS

A

Alexis MN, Papaparaskeva-Papoutsoglou E. 1986. Aminotransferase activity in the liver and white muscle of *Mugil capito* fed diets containing different levels of protein and carbohydrate. *Comp Biochem Physiol B* 83: 245-249.

Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, Leong JA. 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)p against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5: 114-122.

Anemaet IG, Metón I, Salgado MC, Fernández F, Baanante IV. 2008. A novel alternatively spliced transcript of cytosolic alanine aminotransferase gene associated with enhanced gluconeogenesis in liver of *Sparus aurata*. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2833-2844.

Anemaet IG, Gonzalez JD, Salgado MC, Giralt M, Fernandez F, Baanante IV, Meton I. 2010. Transactivation of cytosolic alanine aminotransferase gene promoter by p300 and c-Myb. *J Mol Endocrinol* 45: 119-132.

Arion WJ, Wallin BK, Lange AJ, Ballas LM. 1975. On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol Cell Biochem* 6: 75-83.

B

Baanante IV, Garcia de Frutos P, Bonamusa L, Fernández F. 1991. REgulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6 P2 and PFK-2. *comp Biochem Physiol* 100b: 11-17.

Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. 1994. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 107: 1103-1109.

- Ballantyne J. 2001. Amino acid metabolism. In *Fish Physiology*, Vol. 20, Nitrogen Excretion (Wright PA, Anderson PM eds) New York: Academic Press: 77-107.
- Baltimore D. 1988. Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature* 335: 395-396.
- Barosa C, Almeida M, Caldeira MM, Gomes F, Jones JG. 2010. Contribution of proteolytic and metabolic sources to hepatic glutamine by $(2)H$ RMN analysis of urinary phenylacetylglutamine $(2)H$ -enrichment from $(2)H(2)O$. *Metab Eng* 12: 53-61.
- Baxter CF, Roberts E. 1961. Elevation of gamma-aminobutyric acid in brain: selective inhibition of gamma-aminobutyric-alpha-ketoglutaric acid transaminase. *J Biol Chem* 236: 3287-3294.
- Beaton GH, Curry DM, Veen MJ. 1957. Alanine-glutamic transaminase activity and protein metabolism. *Arch Biochem Biophys* 70: 288-290.
- Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for RMN spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2: 2692-2703.
- Beeler T, Churchich JE. 1976. Reactivity of the phosphopyridoxal groups of cystathionase. *J Biol Chem* 251: 5267-5271.
- Begum N, Datta A. 1991. Effect of glucagon and some other alpha and beta adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase of perfused rat liver. *Mol Cell Biochem* 105: 7-13.
- Begum, NA. Datta, AG.. 1992. Effect of adrenergic agonists and antagonists on alanine amino transferase, fructose-1:6-bisphosphatase and glucose production in hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 113: 93-103.
- Begum T, Oliver MR, Kornberg AJ, Dennett X. 2000. Elevated aminotransferase as a presenting finding in a patient with occult muscle disease. *J Paediatr Child Health* 36: 189-190.
- Bederman IR, Dufner DA, Alexander JC, Previs SF. 2006. Novel application of the "doubly labeled" water method: measuring CO₂ production and the tissue-specific dynamics of lipid and protein in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1048-1056.
- Belloto E, Diraison F, Basset A, Allain G, Abdallah P, Beylot M. 2007. Determination of protein replacement rates by deuterated water: validation of underlying assumptions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1340-1347.
- Benko M, Elo P, Ursu K, Ahne W, LaPatra SE, Thomson D, Harrach B. 2002. First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* 76: 10056-10059.

- Bentley DL. 2005. Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* 17: 251-256.
- Beranek M, Drsata J, Palicka V. 2001. Inhibitory effect of glycation on catalytic activity of alanine aminotransferase. *Mol Cell Biochem* 218: 35-39.
- Bergot F. 1979. Carbohydrate in rainbow trout diets: effects of the level and source of carbohydrates and the number of meals on growth and body composition. *Aquaculture* 18: 157-167.
- Bergot F, Breque J. 1983. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake leves. *Aquaculture* 34: 203-212.
- Bernards A, Paskind M, Baltimore D. 1988. Four murine c-abl mRNAs arise by usage of two transcriptional promoters and alternative splicing. *Oncogene* 2: 297-304.
- Bever K, Chenoweth M, Dunn A. 1981. Amino acid gluconeogenesis and glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax sp.*). *Am J Physiol* 240: R246-252.
- Blair JB, Cimbala MA, Foster JL, Morgan RA. 1976. Hepatic pyruvate kinase. Regulation by glucagon, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate, and insulin in the perfused rat liver. *J Biol Chem* 251: 3756-3762.
- Bonamusa L, García de Frutos P, Fernández F, Baanante IV. 1992. Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1: 113-125.
- Bondini S, Kallman J, Wheeler A, Prakash S, Gramlich T, Jondle DM, Younossi ZM. 2007. Impact of non-alcoholic fatty liver disease on chronic hepatitis B. *Liver Int* 27: 607-611.
- Borchard G. 2001a. Chitosan for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 52: 145-150.
- Borchard G, Junginger HE. 2001b. Modern drug delivery applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 52: 103.
- Borrebaek B, Waagbo R, Christophersen B, Tranulis M, Hemre G. 1993. Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol* 106B: 833-836.
- Braunstein AE. 1957. [Principal ways of assimilation & dissimilation of nitrogen in animals.]. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 19: 335-389.
- Brodersen P, Voinnet O. 2009. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 141-148.

- Brosnan JT. 2003. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* 133: 2068S-2072S.
- Buck L, Brill R, Hochchka P. 1992. Gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the skipjack tuna (*Katsuwonua pelamis*). *Can J Zool* 70: 1254-1257.
- Burchard J, Jackson AL, Malkov V, Needham RH, Tan Y, Bartz SR, Dai H, Sachs AB, Linsley PS. 2009. MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *RNA* 15: 308-315.
- Burke CV, Buettger CW, Davis EA, McClane SJ, Matschinsky FM, Raper SE. 1999. Cell-biological assessment of human glucokinase mutants causing maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2) or glucokinase-linked hyperinsulinaemia (GK-HI). *Biochem J* 342 (Pt 2): 345-352.
- Busch R, et al. 2006. Measurement of protein turnover rates by heavy water labeling of nonessential amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1760: 730-744.

C

- Caceres JF, Kornbliht AR. 2002. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 18: 186-193.
- Campbell JW, Aster PL, Vorhaben JE. 1983. Mitochondrial ammoniogenesis in liver of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Am J Physiol* 244: R709-717.
- Capilla E, Medale F, Navarro I, Panserat S, Vachot C, Kaushik S, Gutierrez J. 2003. Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul Pept* 110: 123-132.
- Capilla E, Diaz M, Albalat A, Navarro I, Pessin JE, Keller K, Planas JV. 2004. Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E348-357.
- Capecchi MR. 1989. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5: 70-76.

- Carreno-Gomez B, Duncan R. 1997. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume , Number 2, 28 March 1997 148: 231-240.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.
- Caseras A, Metón I, Fernández F, Baanante IV. 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim Biophys Acta* 1493: 135-141.
- Caseras A, Metón I, Vives C, Egea M, Fernández F, Baanante IV. 2002. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 88: 607-614.
- Castano JG, Nieto A, Feliu JE. 1979. Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 254: 5576-5579.
- Castric J. 1984. Obtention et etude de quelques caracteristiques d'une lignee cellulaire du bar (*Linne*) Memoire. Faculte de sciences de Brest, Université de Bretagne Occidentale.
- Chan K, Hargrove J. 1993. Effects of dietary protein on gene expression. In: *Nutrition and Gene Expression* (Berdanier CD and Hargrove JL eds.),. 353-375. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Chang Y, Ryu S, Sung E, Jang Y. 2007. Higher concentrations of alanine aminotransferase within the reference interval predict nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Chem* 53: 686-692.
- Chen SH, Giblett ER. 1971. Polymorphism of soluble glutamic-pyruvic transaminase: a new genetic marker in man. *Science* 173: 148-149.
- Cheng Z, Hady R, Usry J. 2003. Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture* 215: 255-265.
- Cheung PY, Fong CC, Ng KT, Lam WC, Leung YC, Tsang CW, Yang M, Wong MS. 2003. Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes. *J Biochem* 134: 731-738.
- Chrambach A. 1985. *The practice of quantitative gel electrophoresis*. Deerfield Beach, FL, USA: VCH.
- Churchich JE, Lee YH. 1976. Nanosecond emission anisotropy of interacting enzymes aspartate aminotransferase glutamate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 68: 409-416.

Collie N, Ferrari R. 1995. Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In "Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Volumen 4, Metabolic Biochemistry" (Hochachka PW, Mommsen TP eds): 221-239.

Corbeil S, Kurath G, LaPatra SE. 2000. Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish Shellfish Immunol* 10: 711-723.

Cornell NW, Zuurendonk PF, Kerich MJ, Straight CB. 1984. Selective inhibition of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in rat hepatocytes. *Biochem J* 220: 707-716.

Correa CF, de Aguiar LH, Lundstedt LM, Moraes G. 2007. Responses of digestive enzymes of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic inferences. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147: 857-862.

Cowey CB, Walton MJ. 1989. Intermediary metabolism. *Fish Nutrition* ed. J.E. Halver: 259-329.

Cowey CB, Knox D, Walton MJ, Adron JW. 1977. The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr* 38: 463-470.

Cullen BR. 2005. RNAi the natural way. *Nat Genet* 37: 1163-1165.

Dave G, Johansson-Sjoberg ML, Larsson A, Lewander K, Lidman U. 1975. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. I. Carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 52: 423-430.

D

Dash BC, Rethore G, Monaghan M, Fitzgerald K, Gallagher W, Pandit A. 2010. The influence of size and charge of chitosan/polyglutamic acid hollow spheres on cellular internalization, viability and blood compatibility. *Biomaterials* 31: 8188-8197.

Davenport J. 2003. *Aquaculture : the ecological issues*. Malden, MA, USA: Blackwell Science.

Davidson A, Arion W. 1987 Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts - physiological implications of higher cellular-activity. *Archives of biochemistry and biophysics* 253 156-167

Davis EA, Cuesta-Munoz A, Raoul M, Buettger C, Sweet I, Moates M, Magnuson MA, Matschinsky FM. 1999. Mutants of glucokinase cause hypoglycaemia- and hyperglycaemia syndromes and their

analysis illuminates fundamental quantitative concepts of glucose homeostasis. *Diabetologia* 42: 1175-1186.

De Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Bellido D. 2008. Influence of insulin resistance and adipocytokines on elevated serum alanine aminotransferase in obese patients. *Arch Med Res* 39: 110-114.

DeRosa G, Swick RW. 1975. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. *J Biol Chem* 250: 7961-7967.

DeRosa G, Burk T, Swick R. 1979. Isolation and characterization of mitochondrial alanine aminotransferase from porcine tissue. *Biochem Biophys Acta* 567: 116-124.

Diaz M, Capilla E, Planas JV. 2007. Physiological regulation of glucose transporter (GLUT4) protein content in brown trout (*Salmo trutta*) skeletal muscle. *J Exp Biol* 210: 2346-2351.

Dieterle P, Brawand F, Moser UK, Walter P. 1978. Alanine metabolism in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 88: 467-473.

Drakenberg K, Sara VR, Falkmer S, Gammeltoft S, Maake C, Reinecke M. 1993. Identification of IGF-1 receptors in primitive vertebrates. *Regul Pept* 43: 73-81.

Draper RP, Waterfield CJ, York MJ, Timbrell JA. 1994. Studies on the muscle toxicant 2,3,5,6-tetramethyl p-phenylenediamine: effects on various biomarkers including urinary creatine and taurine. *Arch Toxicol* 69: 111-117.

Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. 2000. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 46: 2027-2049.

E

Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Flynn CM, Wang TF, Pickart MA, Grindle SM, Ekker SC, Verfaillie CM. 2005. Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish. *PLoS Biol* 3: e254.

Egea M, Metón I, Baanante IV. 2007. Sp1 and Sp3 regulate glucokinase gene transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Mol Endocrinol* 38: 481-492.

Egea M, Metón I, Cordoba M, Fernández F, Baanante IV. 2008. Role of Sp1 and SREBP-1a in the insulin-mediated regulation of glucokinase transcription in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol* 155: 359-367.

Eichhorn ME, et al. 2007. Cationic lipid complexed camptothecin (EndoTAG-2) improves antitumoral efficacy by tumor vascular targeting. *Cancer Biol Ther* 6: 920-929.

Ekdahl KN, Ekman P. 1985. Fructose-1,6-bisphosphatase from rat liver. A comparison of the kinetics of the unphosphorylated enzyme and the enzyme phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 260: 14173-14179.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.

Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. 2008. Hepatic glucokinase and glucose-6-phosphatase responses to dietary glucose and starch in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles reared at two temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 149: 80-86.

Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. 1998. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 15: 1332-1339.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. 2008. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132: 9-14.

Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.

F

Fauconneau B, Tesseraud S. 1990. Measurement of plasma leucine flux in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) using osmotic pump. Preliminary investigation of diet. *Fish Physiol Biochem* 8: 29-44.

Felig P. 1975. Amino acid metabolism in man. *Annu Rev Biochem* 44: 933-955.

Fernández F, Miquel AG, L.R C, Guinea J. 1998. Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparua aurata*): effect of diet composition and ration size. *Aquaculture* 166: 67-84.

Fernández F, Miquel AG, L.R C, Guinea J, Ros E. 1996. comparisons of faecal collection methods for digestibility determinations in gilthead sea bream. *J Fish Biol* 49: 735-738.

- Fernández F, Miquel AG, Córdoba M, Varas M, Metón I, Caseras A, Baanante IV. 2007. Effects of diets with distinct protein to carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 343: 1-10.
- Ferraris R, Ahearn G. 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A: 397-413.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Fitzpatrick SM, Cooper AJ, Duffy TE. 1983. Use of beta-methylene-D,L-aspartate to assess the role of aspartate aminotransferase in cerebral oxidative metabolism. *J Neurochem* 41: 1370-1383.
- Foster G, Moon T. 1991. Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*); a study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. *Physiol Zool*: 259-275.
- Freedland RA. 1967. Effect of progressive starvation on rat liver enzyme activities. *J Nutr* 91: 489-495.
- French CJ, Mommsen TP, Hochachka PW. 1981. Amino acid utilisation in isolated hepatocytes from rainbow trout. *Eur J Biochem* 113: 311-317.
- Froguel P, et al. 1992. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 356: 162-164.
- Fromm PO. 1963. Studies on Renal and Extra-Renal Excretion in a Freshwater Teleost, *Salmo Gairdneri*. *Comp Biochem Physiol* 10: 121-128.
- Furuichi M, Yone Y. 1980. effect of dietary dextrin levels on the growth and feed efficiency, the chemical composition of liver and dorsal muscle, and the absorption of dietary protein and dextrin in fishes. *Bull jpn Soc Sci fish* 46: 255-229.
- Furuichi, M. Yone, Y. 1981. Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerance test. *Bull jpn Soc Sci fish*: 761-764.
- Furuichi, M. Yone, Y. 1982. Effect of insuline on blood sugar levels of fishes. *Bull jpn Soc Sci fish* 48: 1289-1291.
- Fynn-Aikins F, Hughes S, Vanderberg G. 1995. Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comp Biochem Physiol* 111A: 163-170.

G

Galan M, Vincent O, Roncero I, Azriel S, Boix-Pallares P, Delgado-Alvarez E, Diaz-Cadorniga F, Blazquez E, Navas MA. 2006. Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. *Biochem J* 393: 389-396.

Galvão M, Yamanaka N, Fenerich-verani N, Pimentel C. 1997. Estudos preliminares sobre enzimas proteolíticas da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880, (Osteichthyes mugilidae)

durante as fases larval i juvenil. *Bol Inst Pesca* 24: 101-110.

Garcia-Herrero CM, Galan M, Vincent O, Flandez B, Gargallo M, Delgado-Alvarez E, Blazquez E, Navas MA. 2007. Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity. *Diabetologia* 50: 325-333.

Garcia de Frutos P, Baanante IV. 1994. 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in liver of the teleost *Sparus aurata*. *Arch Biochem Biophys* 308: 461-468.

Garcia de Frutos P, Baanante I. 1995. The muscle isoform of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase of the teleost *Sparus aurata*: relationship with the liver isoform. *Arch Biochem Biophys* 321: 297-302.

Garcia de Frutos P, Bonamusa L, Fernández F, Baanante IV. 1991. Metabolic changes in fish during the starved-to-fed transition. *Comp Biochem Physiol B98*: 329-331.

Garcia-Pozo S, Bejar J, Shaw M, Alvarez MC. 1998. Effect of exogenous DNA microinjection on early development response of the seabream (*Sparus aurata*). *Mol Mar Biol Biotechnol* 7: 248-258.

Gasier HG, Riechman SE, Wiggs MP, Previs SF, Fluckey JD. 2009a. A comparison of 2H₂O and phenylalanine flooding dose to investigate muscle protein synthesis with acute exercise in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E252-259

Gasier HG, Previs SF, Pohlenz C, Fluckey JD, Gatlin DM, 3rd, Buentello JA. 2009b. A novel approach for assessing protein synthesis in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 154: 235-238.

Gavosto F, Pileri A, Brusca A. 1957. Increased transaminase activity in the liver after administration of cortisone. *Biochim Biophys Acta* 24: 250-254.

- Georgopoulos GB, Conines AJ. 1999. Study on the effects of dietary starch on growth, food conversion and digestibility of adult gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac Trop* 14: 143-152.
- Glinghammar B, Rafter I, Lindstrom AK, Hedberg JJ, Andersson HB, Lindblom P, Berg AL, Cotgreave I. 2009. Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med* 23: 621-631.
- Goldstein L, Forster RP, Fanelli GM, Jr. 1964. Gill Blood Flow and Ammonia Excretion in the Marine Teleost, *Myoxocephalus Scorpius*. *Comp Biochem Physiol* 12: 489-499.
- Gomez-Milan E, Cardenete G, Sanchez-Muros MJ. 2007. Annual variations in the specific activity of fructose 1,6-bisphosphatase, alanine aminotransferase and pyruvate kinase in the *Sparus aurata* liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147: 49-55.
- Gómez-Requeni P, et al. 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220: 749-767.
- Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ. 1990. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 11: 690-698.
- Gray S, et al. 2007. Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metab* 5: 305-312.
- Gribbestad IS, Petersen SB, Fjosne HE, Kvinnsland S, Krane J. 1994. ¹H RMN spectroscopic characterization of perchloric acid extracts from breast carcinomas and non-involved breast tissue. *RMN Biomed* 7: 181-194.
- Groen AK, Sips HJ, Vervoorn RC, Tager JM. 1982. Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur J Biochem* 122: 87-93.
- Guang Liu W, De Yao K. 2002. Chitosan and its derivatives--a promising non-viral vector for gene transfection. *J Control Release* 83: 1-11.
- Gubern G, Imperial S, Busquets M, Cortes A. 1990. Subcellular distribution of alanine aminotransferase activity in human liver. *Biochem Soc Trans* 18: 1287-1288.
- Gutiérrez J, Asgard T, Fabbri E, Plisetskaya E. 1991. Insulin receptor binding in skeletal muscle of trout. *Fish Physiol Biochem* 9: 351-360.
- Gutierrez J, Plisetskaya EM. 1991. Insulin binding to liver plasma membranes of coho salmon during smoltification. *Gen Comp Endocrinol* 82: 466-475.

Gutiérrez J, Párrizas M, Carneiro N, Maestro M, Plana JL. 1993. Insulin and IGF-I receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive cycle. *Fish Physiol Biochem* 11.

H

Hall JR, Short CE, Driedzic WR. 2006. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: Developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J Exp Biol* 209: 4490-4502.

Hall JR, MacCormack TJ, Barry CA, Driedzic WR. 2004. Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Exp Biol* 207: 4697-4706.

Hall JR, Richards RC, MacCormack TJ, Ewart KV, Driedzic WR. 2005. Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia. *Biochim Biophys Acta* 1730: 245-252.

Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Jr., Kempf J, Zinman B, Haffner SM. 2004. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 53: 2623-2632.

Hannon GJ. 2002. RNA interference. *Nature* 418: 244-251.

Hansen E, Fernández K, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK, Chang KC. 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett* 290: 73-76.

Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC, O'Rahilly S, Watkins PJ, Wainscoat JS. 1992. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 339: 1307-1310.

Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A. 2001. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *aquaculture Nutrition* 7: 1-20.

Hickling DR, March BE. 1982. A comparative study of trout and chicks regarding dietary effects on glycogen concentration in liver and muscle during feeding and subsequent to feed withdrawal. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 72: 115-123.

Hilton J, Plisetskaya E, JF. L. 1987. Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)? *Fish Physiol Biochem* 4: 113-120.

- Hochachka P, Somero G. 1984. Biochemical adaptation. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Holme H, Hagen A, Dornish M. 2000. Influence of chitosan on permeability of human intestinal epithelial (Caco-2) cells: the effect of molecular weight, degree of deacetylation and exposure time. *Adv Chitin Sci* 4.
- Hopper S, Segal HL. 1962. Kinetic studies of rat liver glutamicalanine transaminase. *J Biol Chem* 237: 3189-3195.
- Hotta SS. 1968. Oxidative metabolism of isolated brain mitochondria: changes caused by aminooxyacetate. *Arch Biochem Biophys* 127: 132-139.
- Houlihan D, Marthers E, Foster E. 1993. Biochemical correlates of growth rate in fish. In: *Fish Ecophysiology*, (Rankin JC and Jensen, eds) pp 45-71. Chapman Hall, London.
- Howard KA. 2009b. Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 710-720.
- Howard KA, Paludan SR, Behlke MA, Besenbacher F, Deleuran B, Kjems J. 2009a. Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF-alpha knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model. *Mol Ther* 17: 162-168.
- Howard KA, et al. 2006. RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther* 14: 476-484.
- Hutvagner G, Simard MJ. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 22-32.
- Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. 2003. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J* 373: 1-18.

I

- Iacobellis G, Moschetta A, Buzzetti R, Ribaldo MC, Baroni MG, Leonetti F. 2007. Aminotransferase activity in morbid and uncomplicated obesity: predictive role of fasting insulin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 442-447.

Ince BW, Thorpe A. 1976. The in vivo metabolism of ¹⁴C-glucose and ¹⁴C-glycine in insulin-treated northern pike (*Esox lucius* L.). *Gen Comp Endocrinol* 28: 481-486.

Ince BW, Thorpe A. 1997. Plasma insulin and glucose responses to glucagon and catecholamines in the European silver eel (*Anguilla Anguilla* L.). *Gen Comp Endocrinol* 33: 453-459.

Ishiguro M, Suzuki M, Takio K, Matsuzawa T, Titani K. 1991a. Complete amino acid sequence of rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochemistry* 30: 6048-6053.

Ishiguro M, Takio K, Suzuki M, Oyama R, Matsuzawa T, Titani K. 1991b. Complete amino acid sequence of human liver cytosolic alanine aminotransferase (GPT) determined by a combination of conventional and mass spectral methods. *Biochemistry* 30: 10451-10457.

Ishii T, Okahata Y, Sato T. 2001. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514: 51-64.

Iynedjian P. 2008. Molecular physiology of mammalian glucokinase. Review. *Cell Mol Life Sci*.

Iynedjian PB, Ucla C, Mach B. 1987. Molecular cloning of glucokinase cDNA. Developmental and dietary regulation of glucokinase mRNA in rat liver. *J Biol Chem* 262: 6032-6038.

Iynedjian PB, Gjinovci A, Renold AE. 1988. Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem* 263: 740-744.

Iynedjian PB, Pilot PR, Nospikel T, Milburn JL, Quaade C, Hughes S, Ucla C, Newgard CB. 1989. Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7838-7842.

Iynedjian PB, Marie S, Gjinovci A, Genin B, Deng SP, Buhler L, Morel P, Mentha G. 1995. Glucokinase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the human liver. Regulation of gene expression in cultured hepatocytes. *J Clin Invest* 95: 1966-1973.

J

Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, Linsley PS. 2006b. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12: 1179-1187.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21: 635-637.

Jackson AL, et al. 2006a. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12: 1197-1205.

Jadhao SB, Yang RZ, Lin Q, Hu H, Anania FA, Shuldiner AR, Gong DW. 2004. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. *Hepatology* 39: 1297-1302.

Jaillon O, et al. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431: 946-957.

Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. 2001a. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev* 47: 83-97.

Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A, Fabra A, Alonso MJ. 2001b. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J Control Release* 73: 255-267.

Jeoung K, Takeuchi T, Watabe T. 1991. Improvement of nutritional quality of carbohydrates ingredients by extrusion process in diets of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*: 1543-1549.

Ji AM, Su D, Che O, Li WS, Sun L, Zhang ZY, Yang B, Xu F. 2009. Functional gene silencing mediated by chitosan/siRNA nanocomplexes. *Nanotechnology* 20: 405103.

John RA, Charteris A. 1978. The reaction of amino-oxyacetate with pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochem J* 171: 771-779.

Jones JG, Merritt M, Malloy C. 2001. Quantifying tracer levels of (2)H(2)O enrichment from microliter amounts of plasma and urine by (2)H RMN. *Magn Reson Med* 45: 156-158.

Jürss K, Bastrop R. 1995. Amino acid metabolism in fish. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Editors Hochachka K and Mommsen TP. 4, Elsevier, Amsterdam: 159-189.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48: 2129-2139.

K

Karmen A. 1955. A note on the spectrometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 34: 131-133.

Katunuma N, Mikumo K, Matsuda M, Okada M. 1962. Differences between the transaminases in mitochondria and soluble fraction. I. Glutamic-pyruvic transaminase. *J Vitaminol (Kyoto)* 8: 68-73.

Kenyon AJ. 1967. The role of the liver in the maintenance of plasma proteins and amino acids in the eel, *Anguilla anguilla* L., with reference to amino acid deamination. *Comp Biochem Physiol* 22: 169-175.

Kerner A, Avizohar O, Sella R, Bartha P, Zinder O, Markiewicz W, Levy Y, Brook GJ, Aronson D. 2005. Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein: possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 193-197.

Kim E, Magen A, Ast G. 2007. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 35: 125-131.

Kirchner S, Kaushik S, Panserat S. 2003. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr* 133: 2561-2564.

Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogues G. 2004. Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10: 1489-1498.

Krakoff J, Clark JM, Crandall JP, Wilson C, Molitch ME, Brancati FL, Edelstein SL, Knowler WC. 2010. Effects of metformin and weight loss on serum alanine aminotransferase activity in the diabetes prevention program. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1762-1767.

Krasnov A, Teerijoki H, Molsa H. 2001. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* 1520: 174-178.

L

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lan F, et al. 2007. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* 449: 689-694.

- Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kalhan SC. 1996. Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest* 98: 378-385.
- Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, Seiliez I, Skiba-Cassy S. 2010. Integration of insulin and amino acid signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39: 801-810.
- Lansard M, Panserat S, Plagnes-Juan E, Dias K, Seiliez I, Skiba-Cassy S. 2011. L-leucine, L-methionine, and L-lysine are involved in the regulation of intermediary metabolism-related gene expression in rainbow trout hepatocytes. *J Nutr* 141: 75-80.
- Lee CY. 1982. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse. *Methods Enzymol* 89 Pt D: 252-257.
- Lee M, Nah JW, Kwon Y, Koh JJ, Ko KS, Kim SW. 2001. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm Res* 18: 427-431.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2009. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Lehr C, Bouwstra J, EH. S, HE. J. 1992. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other neutral polymers. *Int. J. Pharm.* 78: 43-48.
- Leklem J. 1991. *Handbook of vitamins*.
- Lenartowicz E, Wojtczak AB. 1988. Significance of the alanine aminotransferase reaction in the formation of alpha-ketoglutarate in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 260: 309-319.
- Leung LY, Woo NY. 2010. Effects of growth hormone, insulin-like growth factor I, triiodothyronine, thyroxine, and cortisol on gene expression of carbohydrate metabolic enzymes in sea bream hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 157: 272-282.
- Li D, Da L, Tang H, Li T, Zhao M. 2008. CpG methylation plays a vital role in determining tissue- and cell-specific expression of the human cell-death-inducing DFF45-like effector A gene through the regulation of Sp1/Sp3 binding. *Nucleic Acids Res* 36: 330-341.
- Li P, Mai K, Trushenski J, Wu G. 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37: 43-53.
- Li S, Huang L. 1997. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* 4: 891-900.
- Li YF, Morcos PA. 2008. Design and synthesis of dendritic molecular transporter that achieves efficient in vivo delivery of morpholino antisense oligo. *Bioconjug Chem* 19: 1464-1470.

Like AA, Rossini AA. 1976. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193: 415-417.

Lindblom P, Rafter I, Copley C, Andersson U, Hedberg JJ, Berg AL, Samuelsson A, Hellmold H, Cotgreave I, Glinghammar B. 2007. Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum--differential tissue expression using novel antibodies. *Arch Biochem Biophys* 466: 66-77.

Liu D, Ren T, Gao X. 2003. Cationic transfection lipids. *Curr Med Chem* 10: 1307-1315.

Liu L, et al. 2008. Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in High-five insect cells. *Protein Expr Purif* 60: 225-231.

Longshaw ID, Bowen NL, Pogson CI. 1972. The pathway of gluconeogenesis in the cortex of guinea-pig kidney. Use of aminooxyacetate as a transaminase inhibitor. *Eur J Biochem* 25: 366-371.

Lu JJ, Langer R, Chen J. 2009. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Mol Pharm* 6: 763-771.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55: 434-438.

Lundstedt LM, Melo JF, Moraes G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137: 331-339.

Lupiáñez J, Sánchez-Lozano M, García-Rejón L, DE la Higuera M. 1989. Long-term effect of a high-protein non carbohydrate diet on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 79: 91-101.

Lustig V, Redman LW. 1980. Improved serum-initiated aspartate aminotransferase assay by inhibition of lactate dehydrogenase with oxamate. *Clin Chem* 26: 831-834.

M

Ma C, Fan L, Ganassin R, Bols N, Collodi P. 2001. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2461-2466.

MacDonald M, Neufeldt N, Park B, Berger M, Rudeman N. 1976. Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat. *Am J Physiol* 231: 619-626.

- MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP. 1998. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release* 56: 259-272.
- Magnuson MA, Andreone TL, Printz RL, Koch S, Granner DK. 1989. Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4838-4842.
- Mambrini M, Kaushik S. 1995. Indispensable amino acid requirements of fish: Correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue protein. *J Appl Ichthyol* 11: 240-247.
- Maniatis T, Reed R. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416: 499-506.
- Mao S, Sun W, Kissel T. 2009. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*.
- Matschinsky F, Magnuson M. 2004. Glucokinase and Glycemic Disease: From Basic to Novel Therapeutics. *Front Diabetes, Basel, Karger* 16: 360-378.
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. 2002a. RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-39.
- McCaffrey AP, Ohashi K, Meuse L, Shen S, Lancaster AM, Lukavsky PJ, Sarnow P, Kay MA. 2002b. Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol Ther* 5: 676-684.
- Melo JFB, Lundstedt L, Metón I, Baanante IV, Moraes G. 2006. Dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of jundia (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol A145*: 181-187.
- Mendes-Mourao J, Halestrap AP, Crisp DM, Pogson CI. 1975. The involvement of mitochondrial pyruvate transport in the pathways of gluconeogenesis from serine and alanine in isolated rat and mouse liver cells. *FEBS Lett* 53: 29-32.
- Mendez E, Smith A, Figueiredo-Garutti ML, Planas JV, Navarro I, Gutierrez J. 2001. Receptors for insulin-like growth factor-I (IGF-I) predominate over insulin receptors in skeletal muscle throughout the life cycle of brown trout, *Salmo trutta*. *Gen Comp Endocrinol* 122: 148-157.
- Merdan T, Kopecek J, Kissel T. 2002. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 715-758.
- Merrill AH, Jr., Henderson JM, Wang E, McDonald BW, Millikan WJ. 1984. Metabolism of vitamin B-6 by human liver. *J Nutr* 114: 1664-1674.

- Metón I, Fernández F, Baanante IV. 2003a. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*: 99-107.
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante IV. 2000a. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Biochim Biophys Acta* 1491: 220-228.
- Metón I, Caseras A, Fernández F, Baanante I. 2004a. Molecular cloning of hepatic glucose-6-phosphatase catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138: 145-153.
- Metón I, Caseras A, Mediavilla D, Fernández F, Baanante IV. 1999b. Molecular cloning of a cDNA encoding 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from liver of *Sparus aurata*: nutritional regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* 1444: 153-165.
- Metón I, Caseras A, Canto E, Fernández F, Baanante IV. 2000b. Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regularly-fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Nutr* 130: 757-760.
- Metón I, Egea M, Fernández F, Eraso MC, Baanante IV. 2004b. The N-terminal sequence directs import of mitochondrial alanine aminotransferase into mitochondria. *FEBS Lett* 566: 251-254.
- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F, Baanante IV. 2006. Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology* 147: 3446-3456.
- Metón I, Mediavilla D, Caseras A, Canto E, Fernández F, Baanante IV. 1999a. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br J Nutr* 82: 223-232.
- Metón I, Egea M, Baanante IV. 2003b. New insights into the regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Recent Research Developments in Biochemistry* (Pandalay SG).
- Miller SP, Anand GR, Karschnia EJ, Bell GI, LaPorte DC, Lange AJ. 1999. Characterization of glucokinase mutations associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY-2): different glucokinase defects lead to a common phenotype. *Diabetes* 48: 1645-1651.
- Misteli T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128: 787-800.

- Möellering H, Bergmeyer H. 1984. D-Gluconate (D-glucono- δ -lactone) and D-gluconate 6-phosphate In: H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer and M. Graßl, Editors, *Methods in enzymatic analysis* Vol. 6, Verlag Chemie, Weinheim 220-227.
- Mok H, Park TG. 2009. Functional polymers for targeted delivery of nucleic Acid drugs. *Macromol Biosci* 9: 731-743.
- Mommsen T. 1984. Metabolism of the fish gill. . *Fish Physiol* (Hoar WS. Randall DJ. eds) XB: 203-238. Academic Press, NY.
- Mommsen T, French C, Honochachka P. 1980. Sites and patterns of protein and aminoacid utilization during the spawning migration of salmon. *Can J Zool* 58: 1785-1799.
- Mommsen TP, Plisetskaya E. 1991. Insulin in fish and agnathans: History, structure and metabolic regulation. *Rev Aquat Sci* 4: 225-259.
- Mommsen TP, Moon TW, Plisetskaya EM. 2001. Effects of arginine on pancreatic hormones and hepatic metabolism in rainbow trout. *Physiol Biochem Zool* 74: 668-678.
- Moon TW. 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 243-249.
- Moraes G, Polez VL. 2004. Ureotelism is inducible in the neotropical freshwater *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). *Braz J Biol* 64: 265-271.
- Morata P, Vargas AM, Sanchez-Medina F, Garcia M, Cardenete G, Zamora S. 1982. Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B* 71: 65-70.
- Morrey JD, Motter NE, Taro B, Lay M, Fairman J. 2008. Efficacy of cationic lipid-DNA complexes (CLDC) on hepatitis B virus in transgenic mice. *Antiviral Res* 79: 71-79.
- Moulton JD, Jiang S. 2009. Gene knockdowns in adult animals: PPMOs and vivo-morpholinos. *Molecules* 14: 1304-1323.
- Mumper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H, Rolland AP. 1996. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res* 13: 701-709.

N

Nagayama F, Ohshima H. 1974. studies on the enzyme system of carbohydrates metabolism in fish. Properties of liver hexokinase. Bull jpn Soc Sci fish 40: 285-290.

Nakashima K, Yakabe Y. 2007. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. Biosci Biotechnol Biochem 71: 1650-1656.

Nasevicius A, Ekker SC. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. Nat Genet 26: 216-220.

Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. 2005. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. Hepatology 41: 380-382.

Navarro I, Gutierrez J, Planas J. 1992. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. Comp Biochem Physiol Comp Physiol 102: 401-407.

Newsholme E, Leech A. 1983. Biochemistry for the Medical Science.

Niidome T, Huang L. 2002. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. Gene Ther 9: 1647-1652.

Noguchi T, Takada Y, Kido R. 1977. Glutamate-glyoxylate aminotransferase in rat liver cytosol. Purification, properties and identity with alanine-2-oxoglutarate aminotransferase. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 358: 1533-1542.

Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. 1999. Regulation of glucose production by the liver. Annu Rev Nutr 19: 379-406.

Novoa WB, Winer AD, Glaid AJ, Schwert GW. 1959. Lactic dehydrogenase. V. Inhibition by oxamate and by oxalate. J Biol Chem 234: 1143-1148.

Nusslein-Volhard C. 1994. Of flies and fishes. Science 266: 572-574.

O

O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K. 2002. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. Lab Anim 36: 313-321.

O'Brien RM, Granner DK. 1996. Regulation of gene expression by insulin. *Physiol Rev* 76: 1109-1161.

Okada M, Sogo A, Ohnishi N. 1994. Glycation reaction of aspartate aminotransferase by various carbohydrates in an in vitro system. *J Nutr Biochem* 5: 485-489.

Okada M, Murakami Y, Miyamoto E. 1997. Glycation and inactivation of aspartate aminotransferase in diabetic rat tissues. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 43: 463-469.

Orphanides G, Reinberg D. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108: 439-451.

Overturf K, LaPatra S, Reynolds PN. 2003. The effectiveness of adenoviral vectors to deliver and express genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 26: 91-101.

P

Palmer T, Ruaman B. 1972. Studies on glucose intolerance in fish. *J Fish Biol* 4: 311-319.

Panserat S, Plagnes-Juan E, Kaushik S. 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 204: 2351-2360.

Panserat S, Plagnes Juan E, Kaushik S. 2002. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biochim Biophys Acta* 1579: 35-42.

Panserat S, Medale F, Breque J, Plagnes-Juan E, Kaushik S. 2000a. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr Biochem* 11: 22-29.

Panserat S, Blin C, Medale F, Plagnes-Juan E, Breque J, Krishnamoorthy J, Kaushik S. 2000b. Molecular cloning, tissue distribution and sequence analysis of complete glucokinase cDNAs from gilthead seabream (*Sparus aurata*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim Biophys Acta* 1474: 61-69.

Panserat S, Medale F, Blin C, Breque J, Vachot C, Plagnes-Juan E, Gomes E, Krishnamoorthy R, Kaushik S. 2000c. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1164-1170.

- Parama A, Luzardo A, Blanco-Mendez J, Sanmartin ML, Leiro J. 2005. In vitro efficacy of glutaraldehyde-crosslinked chitosan microspheres against the fish-pathogenic ciliate *Philasterides dicentrarchi*. *Dis Aquat Organ* 64: 151-158.
- Parrilla R, Okawa K, Lindros KO, Zimmerman UJ, Kobayashi K, Williamson JR. 1974. Functional compartmentation of acetaldehyde oxidation in rat liver. *J Biol Chem* 249: 4926-4933.
- Parrizas M, Plisetskaya EM, Planas J, Gutierrez J. 1995. Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen Comp Endocrinol* 98: 16-25.
- Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20: 505-508.
- Pearson T, Black K. 2001. The environmental impact of marine cage culture. In: Black K.D. (ed.) *Environmental Impacts of Aquaculture* 1-31.
- Pei Y, Tuschl T. 2006. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* 3: 670-676.
- Pequin L, Serfaty A. 1963. [the Excretion of Ammonia by a Fresh Water Teleost: *Cyprinus Carpio* L.]. *Comp Biochem Physiol* 10: 315-324.
- Peres H, Olivia-Teles A. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205: 287-299.
- Peres H, Olivia Teles A. 2006. Proteins and energy metabolism of european Seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles and estimation of maintenance requirements. *Fish Physiol Biochem* 31: 23-31.
- Pickart MA, et al. 2006. Genome-wide reverse genetics framework to identify novel functions of the vertebrate secretome. *PLoS One* 1: e104.
- Plagnes-Juan E, Lansard M, Seiliez I, Medale F, Corraze G, Kaushik S, Panserat S, Skiba-Cassy S. 2008. Insulin regulates the expression of several metabolism-related genes in the liver and primary hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 211: 2510-2518.
- Planas JV, Capilla E, Gutierrez J. 2000. Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS Lett* 481: 266-270.
- Plisetskaya E, Bhattacharya S, Dickhoff W, Gorbman A. 1984. The effect of insulin on amino acid metabolism and glycogen content in isolated liver cells of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp Biochem Physiol* 78: 773-778.

Polakof S, Miguez JM, Soengas JL. 2007. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147: 363-374.

Polez VL, Moraes G, Santos Neto C. 2003. Different biochemical strategies of two neotropical fish to cope with the impairment of nitrogen excretion during air exposure. *Braz J Med Biol Res* 36: 279-285.

Previs SF, Fatica R, Chandramouli V, Alexander JC, Brunengraber H, Landau BR. 2004. Quantifying rates of protein synthesis in humans by use of $^2\text{H}_2\text{O}$: application to patients with end-stage renal disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E665-672.

Q

Quistorff B, Grunnet N. 1987. Dual-digitonin-pulse perfusion. Concurrent sampling of periportal and perivenous cytosol of rat liver for determination of metabolites and enzyme activities. *Biochem J* 243: 87-95.

R

Rainbow AJ, Zacal NJ. 2008. Expression of an adenovirus encoded reporter gene and its reactivation following UVC and oxidative damage in cultured fish cells. *Int J Radiat Biol* 84: 455-466.

Rajamohan F, Nelms L, Joslin DL, Lu B, Reagan WJ, Lawton M. 2006. cDNA cloning, expression, purification, distribution, and characterization of biologically active canine alanine aminotransferase-1. *Protein Expr Purif* 48: 81-89.

Ramos EA, Relucio JL, Torres-Villanueva CA. 2005. Gene expression in tilapia following oral delivery of chitosan-encapsulated plasmid DNA incorporated into fish feeds. *Mar Biotechnol (NY)* 7: 89-94.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. 2009. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 746-759.

Regost C, Arzel J, Kaushik S. 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot, *Psetta maxima*. *Aquaculture* 180: 90-117.

Rej R. 1977. Aminoxyacetate is not an adequate differential inhibitor of aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clin Chem* 23: 1508-1509.

Rej R. 1979. Measurement of aspartate aminotransferase activity: effects of oxamate. *Clin Chem* 25: 555-559.

Remesy C, Demigne C, Aufrere J. 1978. Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rat fed on high-carbohydrates or high-protein diets. *Biochem J* 170: 321-329.

Reshkin SJ, Vilella S, Cassano G, Ahearn GA, Storelli C. 1988. Basolateral amino acid and glucose transport by the intestine of the teleost, *Anguilla anguilla*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 91: 779-788.

Richardson SC, Kolbe HV, Duncan R. 1999. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int J Pharm* 178: 231-243.

Robinson HL, Torres CA. 1997. DNA vaccines. *Semin Immunol* 9: 271-283.

Rognstad R, Clark DG. 1974. Effects of aminoxyacetate on the metabolism of isolated liver cells. *Arch Biochem Biophys* 161: 638-646.

Rosen F, Roberts NR, Budnick LE, Nichol CA. 1959. Corticosteroids and transaminase activity: the specificity of the glutamic-pyruvic transaminase response. *Endocrinology* 65: 256-264.

Rosen F, Harding HR, Milholland RJ, Nichol CA. 1963. Glucocorticoids and Transaminase Activity. Vi. Comparison of the Adaptive Increases of Alanine- and Tyrosine-Alpha-Ketoglutarate Transaminases. *J Biol Chem* 238: 3725-3729.

Ruhl CE, Everhart JE. 2003. Determinants of the association of overweight with elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 124: 71-79.

S

Sabapathy U, Teo L. 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus Canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *J Fish Biol*: 595-602.

- Saha N, Ratha B. 1998. Ureogenesis in Indian air-breathing teleost: adaptation to environmental constraints. *Comp Biochem Physiol*: 195-208.
- Saier MH, Jr., Jenkins WT. 1967. Alanine aminotransferase. II. The basis for substrate specificity. *J Biol Chem* 242: 101-108.
- Sakagishi Y. 1995. [Alanine aminotransferase (ALT)]. *Nippon Rinsho* 53: 1146-1150.
- Salgado MC, Metón I, Egea M, Baanante IV. 2004. Transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase catalytic subunit promoter by insulin and glucose in the carnivorous fish, *Sparus aurata*. *J Mol Endocrinol* 33: 783-795.
- Salgado MC, Meton I, Anemaet IG, Gonzalez JD, Fernandez F, Baanante IV. 2012. Hepatocyte nuclear factor 4alpha transactivates the mitochondrial alanine aminotransferase gene in the kidney of *Sparus aurata*. *Mar Biotechnol (NY)* 14: 46-62.
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Garcia-Salguero L, de la Higuera M, Lupianez JA. 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 55-63.
- Sato T, Ishii T, Okahata Y. 2001. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 22: 2075-2080.
- Sattar N, McConnachie A, Ford I, Gaw A, Cleland SJ, Forouhi NG, McFarlane P, Shepherd J, Cobbe S, Packard C. 2007. Serial metabolic measurements and conversion to type 2 diabetes in the west of Scotland coronary prevention study: specific elevations in alanine aminotransferase and triglycerides suggest hepatic fat accumulation as a potential contributing factor. *Diabetes* 56: 984-991.
- Savorani F, Picone G, Badiani A, Fagioli P, Capozzi F, Engelsen SB. 2010. Metabolic profiling and aquaculture differentiation of gilthead sea bream by ¹H RMN metabonomics. *Food Chemistry* 120: 907-914.
- Schatzlein AG, Zinselmeyer BH, Elouzi A, Dufes C, Chim YT, Roberts CJ, Davies MC, Munro A, Gray AI, Uchegbu IF. 2005. Preferential liver gene expression with polypropylenimine dendrimers. *J Control Release* 101: 247-258.
- Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. 2006. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 437-443.

- Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ, Diamant M. 2007. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* 191: 391-396.
- Seiliez I, Panserat S, Skiba-Cassy S, Polakof S. 2011. Effect of acute and chronic insulin administrations on major factors involved in the control of muscle protein turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 172: 363-370.
- Seferian PG, Martinez ML. 2000. Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine* 19: 661-668.
- Seglen PO, Solheim AE. 1978. Effects of aminooxyacetate, alanine and other amino acids on protein synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 520: 630-641.
- Seoane J, Trinh K, O'Doherty RM, Gomez-Foix AM, Lange AJ, Newgard CB, Guinovart JJ. 1997. Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J Biol Chem* 272: 26972-26977.
- Sherman KE. 1991. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. *Arch Intern Med* 151: 260-265.
- Shiau S. 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish - with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 151: 79-96.
- Shigemasa Y, Matsuura H, Sashiwa H, Saimoto H. 1996. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *Int J Biol Macromol* 18: 237-242.
- Shimeno S, Ming D, Takeda M. 1993. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*: 827-833.
- Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, Medale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. Fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects of non-specific defence mechanisms and oxidative stress. *Aquaculture* 249: 387-400 (2005)
- Skaugrud O. 1989. Chitosan makes the grade. *Manuf. Chem.* 60: 31-35.
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317: 230-234.
- Snell EE. 1990. Vitamin B6 and decarboxylation of histidine. *Ann N Y Acad Sci* 585: 1-12.

- Sohocki MM, Sullivan LS, Harrison WR, Sodergren EJ, Elder FF, Weinstock G, Tanase S, Daiger SP. 1997. Human glutamate pyruvate transaminase (GPT): localization to 8q24.3, cDNA and genomic sequences, and polymorphic sites. *Genomics* 40: 247-252.
- Song JJ, Joshua-Tor L. 2006. Argonaute and RNA--getting into the groove. *Curr Opin Struct Biol* 16: 5-11.
- Srivastava AS, Oohara I, Suzuki T, Shenouda S, Singh SN, Chauhan DP, Carrier E. 2004. Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137: 197-207.
- Staal GE, van Berkel TJ, Nijessen JG, Koster JF. 1975. Normalisation of red blood cell pyruvate kinase in pyruvate kinase deficiency by riboflavin treatment. *Clin Chim Acta* 60: 323-327.
- Steffens W. 1989. Principles of fish nutrition. Chichester EnglandNew York: E. Horwood; Halsted Press.
- Stirchak EP, Summerton JE, Weller DD. 1989. Uncharged stereoregular nucleic acid analogs: 2. Morpholino nucleoside oligomers with carbamate internucleoside linkages. *Nucleic Acids Res* 17: 6129-6141.
- Stoffel M, et al. 1992. Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7698-7702.
- Stone D, Allan G, Anderson A. 2003. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Michell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquac Res* 34: 123-134.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293-296.
- Su J, Zhu Z, Xiong F, Wang Y. 2008b. Hybrid cytomegalovirus-U6 promoter-based plasmid vectors improve efficiency of RNA interference in zebrafish. *Mar Biotechnol (NY)* 10: 511-517.
- Su J, Zhu Z, Wang Y, Xiong F, Zou J. 2008a. The cytomegalovirus promoter-driven short hairpin RNA constructs mediate effective RNA interference in zebrafish in vivo. *Mar Biotechnol (NY)* 10: 262-269.
- Suárez M, Hidalgo M, García Gallego M, Sanz A, de la Higuera M. 1995. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of european eel. *Comp Biochem Physiol* 111A: 421-428.

- Suárez R, Mommsen T. 1987. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can J Zool* 65: 1869-1882.
- Sulaiman Z, Chan, RHM, Simanjuntak, PM, and Jami, YHA 2000. Gene transfer in food fish and prawn. Paper presented at Presented at the 7th ASEAN Food Conference; November 19–22.
- Summerton J. 1999. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1489: 141-158.
- Sung KC, Ryan MC, Wilson AM. 2009. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with increased cardiovascular risk in a large cohort of non-obese Asian subjects. *Atherosclerosis* 203: 581-586.
- Swick RW, Barnstein PL, Stange JL. 1965. The Metabolism of Mitochondrial Proteins. I. Distribution and Characterization of the Isozymes of Alanine Aminotransferase in Rat Liver. *J Biol Chem* 240: 3334-3340.

T

- Tacon A, CB. C. 1985. Protein and amino acid requirements of animal. In "Fish Energetics. New Perspectives" (Tyler P. Calow P eds): 155-183.
- Tanase S, Kojima H, Morino Y. 1979. Pyridoxal 5'-phosphate binding site of pig heart alanine aminotransferase. *Biochemistry* 18: 3002-3007.
- Teerijoki H, Krasnov A, Pitkanen TI, Molsa H. 2000. Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta* 1494: 290-294.
- Teerijoki H, Krasnov A, Pitkanen T, Molsa H. 2001a. Monosaccharide uptake in common carp (*Cyprinus carpio*) EPC cells is mediated by a facilitative glucose carrier. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128: 483-491.
- Teerijoki H, Krasnov A, Gorodilov Y, Krishna S, Molsa H. 2001b. Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos. *J Exp Biol* 204: 2667-2673.

Thakran S, Salimuddin, Baquer NZ. 2003. Oral administration of orthovanadate and *Trigonella foenum graecum* seed powder restore the activities of mitochondrial enzymes in tissues of alloxan-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 247: 45-53.

Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. 1986. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 44: 419-428.

Thomas MC, Chiang CM. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41: 105-178.

Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, Eaton JW, Telang S, Chesney J. 2008. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res* 10: R84.

Thorpe A, Ince BW. 1976. Plasma insulin levels in teleost determined by a charcoal-separation radioimmunoassay technique. *Gen Comp Endocrinol* 30: 332-339.

Thulin P, et al. 2008. PPARalpha regulates the hepatotoxic biomarker alanine aminotransferase (ALT1) gene expression in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 231: 1-9.

Tolia NH, Joshua-Tor L. 2007. Slicer and the argonauts. *Nat Chem Biol* 3: 36-43.

Tranulis MA, Christophersen B, Borrebaek B. 1997. Glucokinase in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) brockmann bodies. *Comp Biochem Physiol*: 367-370.

Tranulis MA, Dregni O, Christophersen B, Krogdahl A, Borrebaek B. 1996. A glucokinase-like-enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114: 35-39.

Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. 1996. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2: 545-550.

Turner WL, Plaxton WC. 2000. Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from banana fruit. *Biochem J.*: 875 - 882.

V

- Valentine BA, Blue JT, Shelley SM, Cooper BJ. 1990. Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. *J Vet Intern Med* 4: 140-143.
- Van de Werve G, Lange A, Newgard C, Méchin MC, Li Y, Berteloot A. 2000. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose-6-phosphatase system. *Eur J Biochem* 267: 1533-1549.
- Van den Thillart G, Van Raaij M. 1995. Endogenous fuels; noninvasive versus invasive. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Metabolic Biochemistry* (Hochachka PW, Mommsen TP eds). 4, Elsevier, Amsterdam
- Van der Lubben IM, Verhoef JC, van Aelst AC, Borchard G, Junginger HE. 2001. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22: 687-694.
- Van Waarde A, Kesbeke F. 1982. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.) activities of amidases and amide synthetases in goldfish tissues. *Comp Biochem Physiol B* 71: 599-603.
- Vedavathi M, Girish KS, Kumar MK. 2004. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. *Mol Cell Biochem* 267: 13-23.
- Vedavathi M, Girish K, Kumar M. 2006. A novel low molecular weight alanine aminotransferase from fasted rat liver. *Biochemistry (Mosc)* 71 Suppl 1: S105-112.
- Velho G, Froguel P, Gloyn A, Hattersley A. 2004. Maturity onset diabetes of the young type 2.
- Venou B, Alexis M, Fountoulaki E, Nengas I, Apostolopoulou M, Castritsi-Cathariou I. 2003. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 225: 207-223.
- Vinogradov SV, Bronich TK, Kabanov AV. 2002. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 135-147.
- Vinogradov SV, Batrakova EV, Kabanov AV. 2004. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem* 15: 50-60.
- Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. 2002. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 1889-1895.

W

- Wallach DP. 1961. Studies on the GABA pathway. II. The lack of effect of pyridoxal phosphate on GABA-KGA transaminase inhibition induced by amino-oxyacetic acid. *Biochem Pharmacol* 8: 328-331.
- Walton M. 1985. Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. In: *Nutrition and Feeding Fish* (Cowey CB, MAckie AM, Bell JG, eds): 47-67.
- Walton M, Cowey C. 1977. Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol* 62B: 497-499.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, Whincup PH. 2005. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 28: 2913-2918.
- Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. 1999. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 156-161.
- Watford M. 1994. Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three-carbon products in isolated enterocytes. *Biochim Biophys Acta* 1200: 73-78.
- Weber J, Zwingelstein G. 1995. Circulatory substrate fluxes and their regulation. In *Metabolic Biochemistry*, vol. 4 (Hochachka PW, Mommsen TP eds). pp. 15-32. Amsterdam: Elsevier Science.
- West J, Brousil J, Gazis A, Jackson L, Mansell P, Bennett A, Aithal GP. 2006. Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *QJM* 99: 871-876.
- Westerbacka J, Corner A, Tiikkainen M, Tamminen M, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Fredriksson J, Yki-Jarvinen H. 2004. Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia* 47: 1360-1369.
- Wilkinson JH, Walter SJ. 1972. Oxamate as a differential inhibitor of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme* 13: 170-176.
- Wilson GL, Leiter EH. 1990. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol* 156: 27-54.
- Wilson R. 1989. Amino acids and proteins. In: *Fish Nutrition*, Halver JF (ed), 2nd Edn. Academic Press Inc, New York: 111-151.

- Wilson, R. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124: 67-80.
- Wilson R, Poe W. 1987. Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono and disaccharides as energy sources. *J Nutr* 117: 280-285.
- Wilson RP. 2002. Wilson, Amino acids and proteins. In: J.E. Halver and R.W. Hardy, Editors,.
- Winegar RA, Monforte JA, Suing KD, O'Loughlin KG, Rudd CJ, Macgregor JT. 1996. Determination of tissue distribution of an intramuscular plasmid vaccine using PCR and in situ DNA hybridization. *Hum Gene Ther* 7: 2185-2194.
- Winter A, Alzinger A, Fries R. 2004. Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine DGAT1. *Genomics* 83: 172-180.
- Wong C, Rodriguez-Paez L, Noguera B, Perez A, Baeza I. 1997. Selective inhibition of the sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme-C4 by N-isopropyl oxamate. *Biochim Biophys Acta* 1343: 16-22.
- Wood C. 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Ewans, DH (Ed). *Physiology of Fishes*. CRC Press Boca Raton: 379-425.
- Wood, C. 2001. Influence of feeding, exercise, and temperature on nitrogen metabolism and excretion. In *Fish Physiology*, vol. 20, Nitrogen Excretion (Wright PA, Anderson PM eds). 201-238. San Diego Academic Press.
- Wood C, Aumil, Rt P, Wright P. 1995. Ammonia and urea metabolism in relation to gill function and acid-base balance in a marine elasmobranch, the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J Exp Biol* 198: 1545-1558.
- Wright JR, Jr., O'Hali W, Yang H, Han XX, Bonen A. 1998. GLUT-4 Deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 111: 20-27.
- Wu A, Slavin G, Levi AJ. 1976. Elevated serum gamma-glutamyl-transferase (transpeptidase) and histological liver damage in alcoholism. *Am J Gastroenterol* 65: 318-323.
- Wu B, Li Y, Morcos PA, Doran TJ, Lu P, Lu QL. 2009. Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Mol Ther* 17: 864-871.
- Wu G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* 128: 1249-1252.
- Wu J, Nantz MH, Zern MA. 2002. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. *Front Biosci* 7: d717-725.

Y

- Yamamoto H, Aikawa T, Matsutaka H, Okuda T, Ishikawa E. 1974. Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats. *Am J Physiol* 226: 1428-1433.
- Yang L, Kombu RS, Kasumov T, Zhu SH, Cendrowski AV, David F, Anderson VE, Kelleher JK, Brunengraber H. 2008. Metabolomic and mass isotopomer analysis of liver gluconeogenesis and citric acid cycle. I. Interrelation between gluconeogenesis and cataplerosis; formation of methoxamates from aminooxyacetate and ketoacids. *J Biol Chem* 283: 21978-21987.
- Yang RZ, Blaileanu G, Hansen BC, Shuldiner AR, Gong DW. 2002b. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* 79: 445-450.
- Yang RZ, Park S, Reagan WJ, Goldstein R, Zhong S, Lawton M, Rajamohan F, Qian K, Liu L, Gong DW. 2009. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology* 49: 598-607.
- Yang S, Liou C, Liu f. 2002a. Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 213: 363-372.
- Yonaha K, Misono H, Yamamoto T, Soda K. 1975. D-amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. Enzymologic and spectrometric properties. *J Biol Chem* 250: 6983-6989.
- Yu AC, Schousboe A, Hertz L. 1982. Metabolic fate of ¹⁴C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* 39: 954-960.
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6047-6052.
- Yuan CL, Sharma N, Gilge DA, Stanley WC, Li Y, Hatzoglou M, Previs SF. 2008. Preserved protein synthesis in the heart in response to acute fasting and chronic food restriction despite reductions in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E216-222.

Z

Zawadzki JK, Wolfe RR, Mott DM, Lillioja S, Howard BV, Bogardus C. 1988. Increased rate of Cori cycle in obese subjects with NIDDM and effect of weight reduction. *Diabetes* 37: 154-159.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR. 2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 24: 138-148.

Zenke K, Kim KH. 2008. Novel fugu U6 promoter driven shRNA expression vector for efficient vector based RNAi in fish cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 480-483.

Zenke K, Nam YK, Kim KH. 2009. Development of siRNA expression vector utilizing rock bream beta-actin promoter: a potential therapeutic tool against viral infection in fish. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Zenke K, Nam YK, Kim KH. 2010. Development of siRNA expression vector utilizing rock bream beta-actin promoter: a potential therapeutic tool against viral infection in fish. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Zhang Z, Wu RS, Mok HO, Wang Y, Poon WW, Cheng SH, Kong RY. 2003. Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Eur J Biochem* 270: 3010-3017.

8 ANEXOS