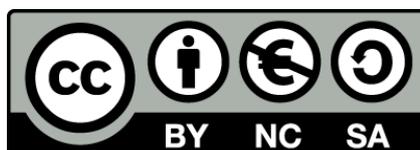




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Regulación nutricional de enzimas clave  
en la glucólisis-gluconeogénesis: expresión del  
gen 6-PF 2-K/FRU 2,6-P(2)ASA en hígado  
de *Sparus aurata***

Isidoro Metón Teijeiro



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

**REGULACION NUTRICIONAL DE ENZIMAS  
CLAVE EN LA GLUCOLISIS-GLUCONEOGENESIS:  
EXPRESION DEL GEN 6-PF 2-K/FRU 2,6-P<sub>2</sub>ASA  
EN HIGADO DE *SPARUS AURATA***

**ISIDORO METON TEIJEIRO**



*Memoria presentada por Isidoro Metón Teijeiro, licenciado en Ciencias Biológicas, para optar al grado de Doctor en Biología.*

*Esta tesis ha sido realizada en la Unidad de Bioquímica del Departamento de Ciencias Fisiológicas, Humanas y de la Nutrición de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección de la Dra. Isabel Vázquez Baanante.*

*Directora:*

*Autor:*

*Dra. Isabel Vázquez Baanante*

*Isidoro Metón Teijeiro*

*Junio de 1996  
Barcelona*



*La ciencia es una indisciplina en la cual el loco de esta generación puede ir más allá del punto alcanzado por el genio de la anterior.*

*Max Cluckman. Politics, Law and Ritual.*



*Deseo expresar mi agradecimiento más sincero a todas las personas que han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral:*

*A la Dra. Isabel Vázquez Baanante, quién además de haberme proporcionado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, me ha ofrecido su continuo apoyo y excelente dirección, que ha dado lugar a este trabajo.*

*A los Dres. Felipe Fernández y Jordi Guinea, así como al resto de compañeros de Biología, por las sugerencias y colaboración entusiasta que han prestado en el mantenimiento, manipulación y obtención de tejidos de los peces.*

*A los Dres. Albert Tauler, Guillermina Asins, Dolors Serra, Montse Arró, Albert Ferrer y Carlos Ciudad, por sus consejos y amable disposición a ayudar en cualquier momento.*

*A mis compañeras de laboratorio, especialmente al inagotable buen humor y constante aporte de ideas personificado en Bet, a Anna (y su "Manolo"), por soportar estoicamente mis consejos, y a Domi. Las animadas conversaciones que hemos mantenido en el laboratorio me han supuesto, sin duda, una gran fuente de inspiración.*

*A Gemma, Encarna, Toni, Angela, Manel, Diego, Teresa... y a todos los compañeros de la Unidad, que, en mayor o menor medida, han aportado algo en la realización de esta Tesis, y que, con su presencia, han propiciado un ambiente óptimo de trabajo.*

*A mis padres, familiares y amigos y, de forma muy especial, a Isabel, por su apoyo incondicional.*

*A la empresa Dalgeti España, S.A. por su colaboración en la realización de este trabajo.*

*No quisiera olvidar un ejercicio que considero de justicia, agradecer, aunque sé que nunca lo comprenderán, a las 1265 doradas que han donado sus órganos, sin los cuáles este trabajo no habría podido ser realizado.*



# ABREVIATURAS

Las abreviaturas empleadas en esta memoria son, además de las de uso común en la literatura bioquímica:

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADN <sub>c</sub>	Acido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina 5'-bisfosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMP <sub>c</sub>	Adenosina 3', 5'-monofosfato
ALT	Alanina amino transferasa (GPT)
ARN	Acido ribonucleico
ARN <sub>m</sub>	Acido ribonucleico mensajero
AST	Aspartato amino transferasa (GOT)
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
%C.V.	Porcentaje de coeficiente de variación
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotretiol
EDTA	Etilendiamino tetraacetato
EGTA	Etilenglicol-bis ( -aminoetil éter)-N,N-tetraacetato
Fru 6-P	Fructosa 6-fosfato
Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa	Fructosa 1,6-bisfosfatasa
Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa	Fructosa 2,6-bisfosfatasa
Fru 1,6-P <sub>2</sub>	Fructosa 1,6-bisfosfato
Fru 2,6-P <sub>2</sub>	Fructosa 2,6-bisfosfato
Glu 1-P	Glucosa 1-fosfato
Glu 6-P	Glucosa 6-fosfato
Glu 6-P DH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
Hepes	4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfato
IHS	Indice hepatosomático
MOPS	Acido 3-[N-morfolino] propanosulfónico
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfato
PEG	Polietilenglicol
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
6-PF 1-K	6-fosfofructo 1-quinasa
6-PF 2-K	6-fosfofructo 2-quinasa
6-PG DH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
PIPES	Acido 1,4-piperazina dietanosulfónico
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PP <sub>i</sub>	Tetra-sodio pirofosfato
PP <sub>i</sub> -6-PF 1-K	6-fosfofructo 1-quinasa dependiente de pirofosfato inorgánico

## ABREVIATURAS

---

RT-PCR	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UDP	Uridina 5'-bisfosfato

---

# INDICE

## 1. INTRODUCCION

1.1. El metabolismo intermediario en los peces	3
1.2. Indicadores del estado nutricional	5
1.3. Control del metabolismo de carbohidratos en hígado	5
1.3.1. Metabolismo del glucógeno	7
1.3.2. Vía de las pentosas fosfato	9
1.3.3. Glucólisis	10
1.3.4. Gluconeogénesis	12
1.4. Ciclos de sustrato y regulación del flujo glucolítico/gluconeogénico	14
1.4.1. Ciclo glucosa/Glu 6-P	16
1.4.2. Regulación del ciclo piruvato/fosfoenolpiruvato	16
1.4.2.1. Estructura de la enzima PK	17
1.4.2.2. Control de la expresión génica de PK en hígado	17
1.4.3. Regulación del ciclo Fru 6-P/Fru 1,6-P <sub>2</sub>	18
1.4.3.1. Estructura de la 6-PF 1-K	18
1.4.3.1.1. Activación por Fru 2,6-P <sub>2</sub>	19
1.4.3.1.2. Modificación covalente por fosforilación/defosforilación	20
1.4.3.2. Control de la expresión génica de 6-PF 1-K en hígado	21
1.4.3.3. Estructura de la Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa	21
1.4.3.3.1. Inhibición por Fru 2,6-P <sub>2</sub>	22
1.4.3.3.2. Modificación covalente por fosforilación/defosforilación	23
1.4.3.4. Control de la expresión génica de Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa	23

1.4.4. Regulación hormonal de los ciclos Fru 6-P/Fru 1,6-P <sub>2</sub> y piruvato/ fosfoenolpiruvato	24
1.5. Fru 2,6-P <sub>2</sub>	25
1.5.1. Papel de la Fru 2,6-P <sub>2</sub> en la regulación del metabolismo de carbohidratos en hígado	25
1.5.2. Efecto del estado nutricional sobre los niveles hepáticos de Fru 2,6-P <sub>2</sub>	26
1.5.3. Control hormonal de los niveles de Fru 2,6-P <sub>2</sub>	26
1.5.4. Fru 2,6-P <sub>2</sub> en <i>Sparus aurata</i>	28
1.5.5. Fru 2,6-P <sub>2</sub> en la evolución	29
1.6. 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa	31
1.6.1. Propiedades generales del dominio 6-PF 2-K en la enzima hepática	33
1.6.2. Propiedades generales del dominio Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa en la enzima hepática	34
1.6.3. Evidencia de dos <i>loci</i> catalíticos	35
1.6.4. Estructura de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa de hígado de rata	35
1.6.4.1. Regulación por fosforilación	35
1.6.4.2. Residuos importantes en el mecanismo de reacción del dominio quinasa	37
1.6.4.3. Residuos importantes en el mecanismo de reacción del dominio bisfosfatasa	38
1.6.5. Genes de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa	41
1.6.5.1. Control hormonal de la actividad 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa a corto plazo	42
1.6.5.2. Control hormonal de la expresión génica de 6-PF 2-K/ Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa	43
1.6.6. Evolución de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa	44
1.6.7. Diferencias entre la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa hepática de <i>Sparus aurata</i> y las de mamíferos	46

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Animales utilizados en la experimentación	51
2.2. Toma de muestras	51
2.3. Preparación de los extractos hepáticos	52
2.3.1. Obtención de extractos crudos de hígado para la determinación de proteína total y de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST	52
2.3.2. Obtención de extractos para la determinación de actividad e inmunodetección de 6-PF 2-K	53
2.3.3. Obtención de extractos para la determinación de glucógeno	54
2.3.4. Obtención de extractos alcalinos para la determinación de Fru 2,6-P <sub>2</sub>	54
2.3.5. Obtención de extractos ácidos para la determinación de Glu 6-P y Fru 6-P	54
2.4. Adaptación de técnicas espectrofotométricas manuales a la determinación automatizada	55
2.5. Determinación de metabolitos y de actividades enzimáticas	55
2.5.1. Determinación de proteína	55
2.5.2. Determinación de glucógeno	56
2.5.3. Determinación de Glu 6-P y Fru 6-P	56
2.5.4. Determinación de glucosa	57
2.5.5. Determinación de lactato	58
2.5.6. Determinación de Fru 2,6-P <sub>2</sub>	59
2.5.6.1. Adaptación de la cuantificación de Fru 2,6-P <sub>2</sub> al sistema automatizado	60
2.5.6.2. Purificación de PP <sub>i</sub> -6-PF 1-K	64
2.5.6.3. Ensayo de actividad PP <sub>i</sub> -6-PF 1-K	65
2.5.7. Determinación de la actividad 6-PF 2-K	66
2.5.8. Determinación de la actividad 6-PF 1-K	68

2.5.9. Determinación de actividad PK	69
2.5.10. Determinación de la actividad Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa	70
2.5.11. Determinación de la actividad Glu 6-P DH	71
2.5.12. Determinación de la actividad 6-PG DH	72
2.5.13. Determinación de la actividad ALT	72
2.5.14. Determinación de la actividad AST	73
2.6. Análisis de la presencia de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa inmunodetectable por <i>Western blot</i>	74
2.7. Técnicas de Biología molecular	76
2.7.1. Obtención de células de <i>Escherichia coli</i> competentes	76
2.7.2. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	77
2.7.3. Electroforesis de ADN	77
2.7.4. Aislamiento de ADN plasmídico	78
2.7.4.1. Preparación de pequeñas cantidades de ADN plasmídico	78
2.7.4.2. Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico	79
2.7.5. Purificación de fragmentos lineales de ADN a partir de geles de agarosa	79
2.7.6. Aislamiento de ARN	80
2.7.7. Obtención de ARN poli (A+)	81
2.7.8. Análisis de la expresión génica de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa por <i>Northern blot</i>	81
2.7.9. Cuantificación por densitometría de películas autorradiográficas	83
2.7.10. Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos	84
2.7.11. RT-PCR	84
2.7.12. Clonaje del ADN <sub>c</sub> amplificado por RT-PCR	85
2.7.13. Selección de las células transformadas de <i>Escherichia coli</i>	86
2.7.14. Secuenciación de ADN	86
2.8. Análisis estadístico	86

3. RESULTADOS

3.1. Efecto del ayuno y de la realimentación	91
3.1.1. Efecto del ayuno y de la realimentación sobre el índice hepatosomático	91
3.1.2. Respuesta al ayuno y a la realimentación de glucosa y lactato en suero, y de Fru 2,6-P <sub>2</sub> , glucógeno, Fru 6-P y Glu 6-P en hígado	92
3.1.3. Modificaciones en las actividades enzimáticas hepáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH como consecuencia del ayuno y de la realimentación	93
3.1.4. Variaciones en la actividad enzimática, cantidad de enzima y expresión de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa en hígado de dorada, como efecto del ayuno y de la realimentación	96
3.2. Efecto del tipo de dieta	99
3.2.1. Influencia de la composición de la dieta en el índice hepatosomático	100
3.2.2. Efecto del tipo de dieta sobre la glucemia y los niveles hepáticos de Fru 2,6-P <sub>2</sub> y glucógeno	101
3.2.3. Respuesta de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, AST y ALT a la alimentación con dietas de diferente composición en hígado de dorada	103
3.2.4. Efectos de la composición de la dieta sobre la actividad, cantidad y expresión de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa en hígado de dorada	106
3.3. Efecto de la cantidad de dieta	111
3.3.1. Variaciones en el crecimiento y en el índice hepatosomático a consecuencia de la alimentación con diferentes cantidades de dieta	111
3.3.2. Efecto de la alimentación con diferentes porcentajes de dieta sobre los valores séricos de glucosa y lactato	113
3.3.3. Efecto de la alimentación con distintas cantidades de dieta sobre los niveles hepáticos de Fru 2,6-P <sub>2</sub> y glucógeno	114
3.3.4. Variaciones en las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, AST y ALT en hígado de dorada como consecuencia de la alimentación con diferentes cantidades de dieta	116
3.3.5. Cambios en la actividad, cantidad de proteína y mensajero de la	

enzima hepática 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa como consecuencia de la alimentación con diferentes cantidades de dieta	121
3.4. Secuencia nucleotídica del fragmento de ADN <sub>c</sub> clonado de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa de hígado de dorada	125
3.4.1. Obtención de una sonda homóloga de ADN <sub>c</sub> por RT-PCR para la detección de los niveles de mensajero de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa en hígado de <i>Sparus aurata</i>	125
3.4.2. Comparación de la secuencia del fragmento clonado con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas para la forma hepática de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa de otros organismos	127
4. DISCUSION	
4.1. Regulación nutricional del metabolismo de carbohidratos en hígado de dorada	135
4.1.1. Regulación nutricional de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa	135
4.1.2. Regulación nutricional de las vías glucolítica y gluconeogénica	137
4.1.3. Regulación nutricional de la vía de las pentosas fosfato	140
4.1.4. Regulación nutricional del metabolismo de aminoácidos	141
4.1.5. Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre glucólisis, gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato y metabolismo de aminoácidos	142
4.2. Homología entre las secuencias hepáticas de otras 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa conocidas y el fragmento clonado de hígado de dorada	144
4.2.1. Mensajeros de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa en hígado de dorada	146
5. CONCLUSIONES	151
6. BIBLIOGRAFIA	157

## PRESENTACION Y OBJETIVOS

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido conocer cómo afecta el estado nutricional a la expresión génica de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado del pez teleósteo *Sparus aurata*, comúnmente conocido como dorada.

La importancia de los procesos moduladores de las actividades de la enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, estriba en el papel que juega en el control del metabolismo intermediario, a través de la síntesis y degradación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. Este metabolito es el principal estimulador de la glucólisis, vía activación alostérica de la actividad enzimática 6-PF 1-K, y, simultáneamente, inhibidor de la gluconeogénesis por su acción sobre la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa.

A este objetivo nos hemos aproximado a partir del diseño de experimentos de ayuno y realimentación, uso de dietas con diferente composición de nutrientes y mediante el suministro de diferentes cantidades de dieta. Las determinaciones de factores somáticos, de metabolitos y de actividades enzimáticas, han mostrado en muchos casos su idoneidad como indicadores del estado nutricional de los peces, y nos han ayudado en el esclarecimiento de los procesos de regulación y ajuste fino del metabolismo.

La determinación de la actividad 6-PF 2-K, la inmunodetección de la enzima bifuncional por la técnica de *Western blot*, así como la detección de su expresión génica gracias al uso de la técnica de *Northern blot*, han permitido establecer la relación existente entre los niveles de ARN<sub>m</sub>, cantidad de proteína y actividad enzimática, en doradas sometidas a diferentes condiciones nutricionales. Para la realización de los ensayos de *Northern blot*, ha sido necesario la obtención de una sonda homóloga capaz de hibridar con el mensajero de la enzima bifuncional de hígado. Para ello hicimos uso de la técnica de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias descritas de ADN<sub>c</sub> en otros vertebrados para el mensajero hepático de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.

Los resultados obtenidos nos han llevado a concluir que el uso de dietas de elevado contenido en carbohidratos y bajo en proteína, promueven un incremento de la actividad 6-PF 2-K, a través de un incremento en los niveles de proteína inmunodetectable y de su ARN<sub>m</sub>. Este hecho, junto a cambios en paralelo en otras actividades implicadas en el metabolismo intermediario hepático, indican una

adaptación metabólica en la dorada, que permite la utilización de los carbohidratos de la dieta, pudiendo sustituir, en parte, a los aminoácidos, principal componente de la dieta natural de los peces.

Este conocimiento permitirá profundizar en la comprensión del metabolismo de los peces, y ayudar en el diseño de dietas comerciales, a fin de compatibilizar un crecimiento óptimo con un buen estado de salud general de los peces en cultivo, optimizando el costo y el aprovechamiento de los nutrientes de la dieta.

# **1. INTRODUCCION**



## 1.1. EL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN LOS PECES

Todos los seres vivos requieren un aporte constante de energía de sustento. Esta energía la obtienen a partir de los componentes suministrados por la dieta, en base a la capacidad de asimilación de sus ingredientes, o bien a partir de los almacenados en el propio organismo. Los peces se encuentran entre los animales que con mayor eficacia convierten los nutrientes de la dieta en crecimiento corporal, dado su bajo requerimiento en energía de mantenimiento (Smith, 1989).

Las rutas metabólicas consisten en el acoplamiento lineal o circular de series interconectadas de reacciones químicas, cuyo fin constituye el aprovechamiento de los nutrientes aportados con la dieta, fundamentalmente proteínas, lípidos y carbohidratos. Las proteínas se catabolizan a aminoácidos, que son utilizados para la síntesis de nuevas proteínas, así como para la obtención de energía. Los lípidos se degradan a ácidos grasos, que se utilizan asimismo con fines energéticos o biosintetizadores. La catabolización de los lípidos es, generalmente, más lenta que la de las proteínas. En cuanto a los carbohidratos, éstos suelen consumirse en forma de moléculas complejas, como almidón o celulosa. Esta última no es, en general, digerida por los peces, quienes si pueden, en cambio, degradar el almidón para generar glucosa, que es utilizada como precursor de biosíntesis o de energía (De Silva y Anderson, 1995). Aminoácidos, ácidos grasos y azúcares se degradan mediante rutas catabólicas específicas sometidas a diferentes procesos de regulación. Muchas de estas vías metabólicas fueron inicialmente descritas a partir de estudios realizados en mamíferos, siendo poca la información al respecto disponible en relación a lo que ocurre en peces teleósteos. Las vías centrales del metabolismo son, en general, comunes a todos los vertebrados, aunque su regulación específica puede diferir según el caso particular en función del hábitat en que vive cada organismo.

En el caso de los peces, el ambiente marino engloba una mayoría de especies carnívoras. En éstas, aparentemente, se establece una clara relación entre los componentes de su dieta natural, pobre en carbohidratos y rica en proteínas, y la poca capacidad que presentan para metabolizar azúcares, siendo la respuesta metabólica variable en función de la especie estudiada. Los peces de hábitos

omnivoros, como la carpa (*Cyprinus carpio*) (Furuichi y Yone, 1981), presentan una mayor capacidad de metabolización de la glucosa en comparación con la que presentan los peces carnívoros, aunque sensiblemente menor que la presentada por los mamíferos.

La poca capacidad de utilización de carbohidratos en los peces, se relaciona con un bajo poder de asimilación de glucosa, característica que ha sido bien ilustrada a través de experimentos conocidos como tests de tolerancia a glucosa. La administración de elevadas cantidades de glucosa dan lugar a valores anormalmente elevados de glucemia tanto en mamíferos como en peces, pero mientras en mamíferos los valores retornan a la normalidad 1 ó 2 horas después de la administración, en peces la recuperación es mucho más lenta, superando las 7 horas en trucha (Palmer y Ryman, 1972).

Bever *et al.* (1977) y Lin *et al.* (1978), a través del uso de glucosa marcada radioactivamente con <sup>14</sup>C, mostraron que el recambio de glucosa en el serránido *Paralabrax sp.* y en salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) es del orden del 5-10% en comparación con el nivel observado en los mamíferos omnívoros, así como que la utilización de glucosa es un 10% de la observada en aves o mamíferos omnívoros.

Por otra parte, Ince y Thorpe (1977) han demostrado que, en peces, la glucosa es una señal menos efectiva que algunos aminoácidos para liberar insulina. Así, aminoácidos como la arginina (precursor de gluconeogénesis) y la lisina (precursor de cuerpos cetónicos) estimulan la secreción de insulina de forma más intensa que la provocada por la glucosa en los peces teleósteos (Suarez y Mommsten, 1987). Por otra parte, la administración de insulina incrementa el rango de incorporación de glicina en proteína muscular (Ince y Thorpe, 1976), de lisina en proteína de hepatocitos de salmón (Plisetskaya *et al.*, 1984) y reduce los niveles de aminoácidos en suero de truchas alimentadas con dietas ricas en proteína (Cowey *et al.*, 1977b). Se ha comprobado que de la composición de las dietas es un factor importante en la manutención del ritmo diario de secreción de insulina (Gutiérrez *et al.*, 1984; Zanuy *et al.*, 1993).

Todos estos datos en conjunto, han llevado a considerar que la insulina desempeña un papel preponderante en el control del metabolismo de aminoácidos en los peces, quedando como secundario su papel en la regulación de la glucemia y del metabolismo de carbohidatos. Este ejemplo ilustra el hecho de que los peces presenten una fisiología específica adaptada a su medio, con mecanismos hormonales diferentes de los encontrados en los mamíferos (Plisetskaya, 1990).

## 1.2. INDICADORES DEL ESTADO NUTRICIONAL

Factores somáticos, como el crecimiento corporal y hepático, y metabólicos, como la determinación de metabolitos y actividades enzimáticas, se utilizan como indicadores del estado nutricional de los peces.

La utilización de las proteínas de la dieta conduce, en los peces, a un aumento en la tasa de crecimiento, que se ha correlacionado con un incremento del metabolismo oxidativo y de la tasa de síntesis proteica, por estimulación hormonal y, probablemente, por la presencia de aminoácidos libres resultado de la digestión (Houlihan *et al.*, 1994).

El tamaño y la composición del hígado depende de la cantidad y composición de la dieta suministrada, existiendo una correlación positiva entre el IHS y la tasa de crecimiento (Brauge *et al.*, 1994). Este hecho refleja el papel del hígado como un tejido de almacén de energía (Pelletier *et al.*, 1995).

Se ha encontrado una fuerte relación entre los niveles de actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo energético y la tasa de crecimiento en peces. En dorada (*Sparus aurata*), el contenido hepático de metabolitos como glucógeno o Fru 2,6-P<sub>2</sub>, señal clave para la activación de glucólisis e inhibición de gluconeogénesis, así como el nivel de la actividad de enzimas clave en el metabolismo de carbohidratos, como 6-PF 1-K (6-fosfofructo 1-quinasa, EC 2.7.1.11), PK (piruvato quinasa, EC 2.7.1.40), 6-PF 2-K (6-fosfofructo 2-quinasa, EC 2.7.1.105), Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (fructosa 1,6-bisfosfatasa, EC 3.1.3.11) o Glu 6-P DH (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, EC 1.1.1.49), parecen ser buenos indicadores del estado nutricional en peces (Bonamusa *et al.*, 1989). En músculo de bacalao atlántico (*Gadus morhua*) se ha observado, asimismo, una correlación entre las actividades glucolíticas, PK y 6-PF 1-K, y la tasa de crecimiento (Pelletier *et al.*, 1994). Estos autores demuestran además, que enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos, como ALT (alanina amino transferasa, EC 2.6.1.2), AST (aspartato amino transferasa, EC 2.6.1.1) y glutamato deshidrogenasa, incrementan su actividad cuando la tasa de crecimiento es elevada. De esta forma, como consecuencia del crecimiento se produce un incremento de la masa hepática, a partir de la energía procedente del aumento del catabolismo de aminoácidos.

## 1.3. CONTROL DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN HIGADO

El control de la glucemia es una de las funciones básicas del hígado en mamíferos. En ayuno, la glucosa se forma primariamente en este órgano a partir de las reservas de glucógeno y precursores gluconeogénicos (Newgard *et al.*, 1983). La

alimentación, en cambio, conlleva la presencia de un exceso de glucosa, que el hígado invierte en la formación de reservas de glucógeno y de lípidos.

La producción y utilización de glucosa por el hígado están controladas por enzimas cuya actividad se modula a corto y a largo plazo a través de mecanismos reguladores específicos (Pilkis y Claus, 1991). A corto plazo, el flujo glucolítico/gluconeogénico se controla, entre otros mecanismos, a través de la regulación alostérica de las enzimas 6-PF 1-K y Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa por Fru 2,6-P<sub>2</sub>, así como por hormonas, mediante procesos de fosforilación-defosforilación de enzimas clave, la PK y la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa (6-fosfofructo 2-quinasa, EC 2.7.1.105 / fructosa 2,6-bisfosfatasa, EC. 3.1.3.46). Las hormonas también ejercen efectos a largo plazo, a través de la variación de los niveles de síntesis enzimática, mediante cambios en la transcripción de ARN<sub>m</sub> y, en ocasiones, afectando el grado de degradación de proteína y/o mensajeros específicos.

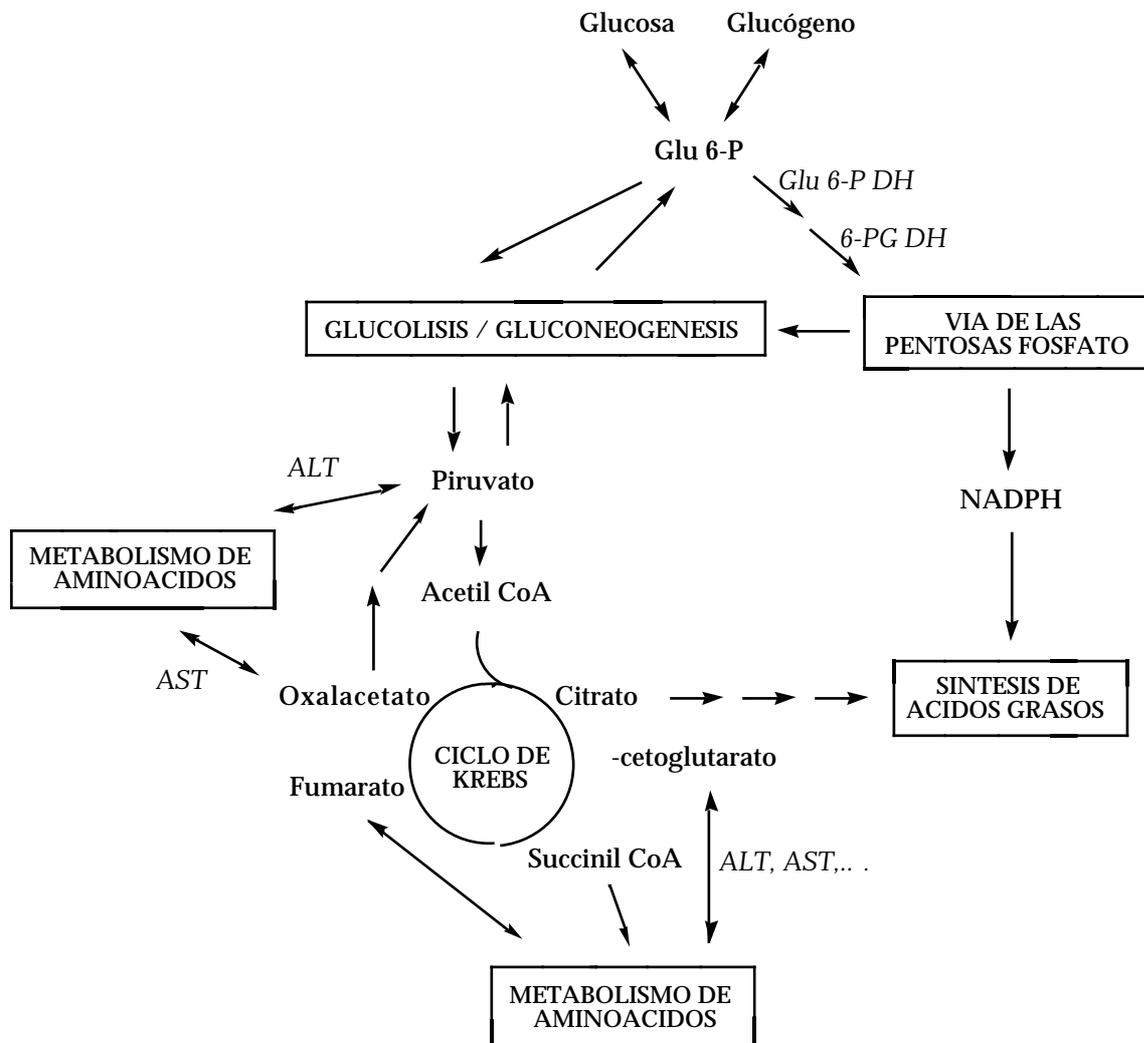


Figura 1.1 . Interrelación entre el metabolismo de carbohidratos y el de lípidos y proteínas.

Diabetes y ayuno promueven a largo plazo un aumento de la ruta gluconeogénica. Este aumento es debido al incremento de los niveles de sustrato y, fundamentalmente, a cambios en la concentración de enzimas, resultado de la disminución en los niveles de insulina y/o de los elevados valores de AMP<sub>c</sub>. Después de la realimentación o de la administración de insulina, se recuperan en pocas horas la expresión de glucoquinasa, PK y 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, y se inhiben la de PEPCK y Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (Pilkis y Claus, 1991; Lemaigre y Rousseau, 1994).

En la figura 1.1 se puede observar un esquema de la interrelación entre el metabolismo de carbohidratos y el de lípidos y proteínas.

### **1.3.1. METABOLISMO DEL GLUCOGENO**

En la mayoría de mamíferos el glucógeno es rápidamente movilizado cuando se requiere glucosa (Roach, 1986). La degradación del glucógeno está regulada a través del control de la actividad glucógeno fosforilasa, enzima que cataliza la formación de Glu 1-P a partir de glucógeno y P<sub>i</sub>. Esta actividad se inhibe por niveles altos de ATP, glucosa, Glu 6-P y se activa por AMP. En condiciones de alimentación se reponen los niveles de glucógeno, pudiendo derivar el exceso de glucosa hacia la formación de ácidos grasos. La adición de UDP-glucosa a la molécula de glucógeno, paso catalizado por la actividad glucógeno sintasa, es el punto sobre el que se regula la síntesis de glucógeno. ATP, Glu 6-P y glucosa activan alostéricamente a la glucógeno sintasa, mientras que el AMP la inhibe. El nivel de activación de la sintasa y de la fosforilasa, depende del estado de fosforilación de ambas enzimas, de forma que la fosforilación estimula la actividad fosforilasa e inhibe la sintasa, mientras que la defosforilación promueve los efectos opuestos (Roach, 1986; Lawrence, 1992; De Silva y Anderson, 1995).

De esta forma, la regulación hormonal y alostérica coordinada de la glucógeno sintasa y de la glucógeno fosforilasa hace posible a la mayoría de organismos la inversión del exceso de glucosa en glucógeno, así como la degradación de éste cuando es necesario.

Muchas especies de peces presentan la capacidad de sobrevivir a largos periodos de ayuno, en general relacionados con procesos de migración o reproducción. Para ello utilizan las reservas lipídicas y de glucógeno. La movilización de glucógeno es diversa entre las diferentes especies de teleósteos estudiadas. En dorada, (*Sparus aurata*) (García de Frutos *et al.*, 1990), las reservas de glucógeno hepático disminuyen significativamente tras 8 días de ayuno, llegando a alcanzar niveles mínimos a los 20 días. Análogamente, Hickling y March (1982) han

observado que el contenido de glucógeno en hígado disminuye significativamente tras un corto periodo de ayuno en la trucha arco iris. En *Salmo trutta fario*, Navarro *et al.* (1992) también aprecian en hígado una disminución significativa tras 8 días de ayuno, aunque el glucógeno muscular no disminuye significativamente hasta pasado un periodo de 30 días.

Otras especies de peces requieren periodos de ayuno más prolongados para que se pueda apreciar una disminución del glucógeno hepático. French *et al.* (1983) mostraron que en salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) el contenido en glucógeno disminuía poco después de efectuar migraciones superiores a 100 Km, aún cuando durante este periodo no se alimentaban. Sin embargo, en músculo e hígado las concentraciones de glucógeno aumentaban en épocas previas a la reproducción, fundamentalmente por aporte gluconeogénico. En carpa, periodos superiores a 100 días de ayuno no son suficientes para agotar los niveles de glucógeno hepático (Nagai e Ikeda, 1971). La anguila (Larsson y Lewander, 1973) y el bacalao (Hemre *et al.*, 1990), también requieren periodos largos de ayuno para que se aprecie una disminución de sus reservas de glucógeno. Morata *et al.* (1982) observaron que en trucha, tras 20 días de ayuno, el contenido disminuyó sólo un 20%, valor que no sólo no siguió disminuyendo al prolongar el periodo de ayuno, sino que incluso aumentó ligeramente. Este efecto también ha sido observado en trucha por Navarro *et al.* (1992), y ha sido atribuido a la formación de glucógeno a partir de precursores de gluconeogénesis. Asimismo, en carpa, tanto el glucógeno hepático como el muscular, disminuyen poco después de 50 días de ayuno (Blasco *et al.*, 1992).

El comportamiento encontrado en los peces contrasta con el de rata, cuyos niveles de glucógeno caen a valores mínimos tras 24 horas de ayuno (Bois-Joyeux *et al.*, 1986; Minassian *et al.*, 1994). La rápida degradación de glucógeno que en condiciones de ayuno presentan los mamíferos está relacionada con el mantenimiento de la glucemia, mucho menos controlada en los peces. Murat *et al.* (1978) han descrito que, en carpa, el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre, procede en mayor medida de la síntesis *de novo* por gluconeogénesis que de la movilización de glucógeno.

En mamíferos la glucemia se mantiene, bajo control hormonal, a partir de la regulación de la síntesis y degradación del glucógeno hepático. Catecolaminas y glucagón estimulan la glucógenolisis, mientras que la insulina provoca síntesis de glucógeno (Frieden y Lipner, 1971). En peces, la administración de insulina conduce a un aumento del glucógeno hepático (Plisetskaya *et al.*, 1984; Foster y Moon,

1990b). Foster y Moon (1990b) apoyan la idea de que la insulina actúa directamente sobre la síntesis de glucógeno, promoviendo una pérdida de actividad glucógeno fosforilasa. La adición de glucagón o GLPs (glucagon-like peptides) a hepatocitos aislados conduce a un incremento de la tasa de degradación de glucógeno, activando la glucógeno fosforilasa, probablemente a través de fosforilación vía AMP<sub>c</sub> (Mommsen y Moon, 1990; Foster y Moon, 1990b). Asimismo, se ha observado, en salmón, un efecto estimulador de la glucógeno fosforilasa por adición de catecolaminas, por activación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y aumento de AMP<sub>c</sub> y Ca<sup>2+</sup> en el citosol (Sheridan y Muir, 1988; Michelsen y Sheridan, 1990).

### **1.3.2. VIA DE LAS PENTOSAS FOSFATO**

En una primera fase de esta vía, la Glu 6-P se oxida en dos pasos sucesivos, dando lugar a NADPH, poder reductor útil en la formación de ácidos grasos. Posteriormente se produce una fase de intercambio de azúcares fosfato con el fin de obtener ribosa 5-P (precursor de ácidos nucleicos) o, cuando ésta no es necesaria, se puede regenerar la producción de hexosas fosfato vía gluconeogénesis, continuando así la producción de NADPH. La regulación de la vía se produce fundamentalmente mediante el control de las reacciones de oxidación, catalizadas por Glu 6-P DH, enzima que efectúa la conversión de Glu 6-P a 6-fosfogluconato  $\gamma$ -lactona, y por 6-PG DH (6-fosfogluconato deshidrogenasa, EC 1.1.1.43), que cataliza la transformación de 6-fosfogluconato a ribulosa 5-P (Kletzien y Berdanier, 1993).

En peces el conocimiento de la regulación de esta vía es escaso. Los primeros trabajos (Brown y Tappel, 1959; Hochachka, 1961) concedían un papel poco relevante a la ruta de las pentosas fosfato en la catabolización de glucosa. En cambio, más recientemente, otros autores tienden a indicar a esta vía como fundamental en la degradación de glucosa en los peces (Cowey y Walton, 1989). En hígado de rata, el ayuno provoca un descenso en la actividad Glu 6-P DH (Iritani, 1992; Kletzien y Berdanier, 1993). En peces, las actividades Glu 6-P DH y 6-PG DH se han encontrado asimismo disminuidas en hígado de *Salvelinus fontinalis* (Yamauchi *et al.*, 1975), *Sparus aurata* (Bonamusa *et al.*, 1992), carpa (*Cyprinus carpio*) (Bastrop *et al.*, 1991) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Barroso *et al.*, 1993) como consecuencia del ayuno. La realimentación promueve, una vez recuperados los niveles de glucógeno y de síntesis proteica, una recuperación tardía

de los niveles de actividad Glu 6-P DH, a fin de promover el acúmulo de lípidos en carpa (Böhm *et al.*, 1994).

Likimani y Wilson (1982) mostraron que una dieta rica en carbohidratos promueve el aumento de los niveles hepáticos de las actividades Glu 6-P DH y 6-PG DH en el pez gato, actividades que disminuyen con el uso de dietas ricas en contenido lipídico, como también ocurre, aunque en menor medida, en salmón plateado (Lin *et al.*, 1977). Nuestro grupo observó, en dorada, que las actividades de las dos deshidrogenasas se elevan como consecuencia de la alimentación con dietas de elevado contenido en carbohidratos o proteínas (ambos buenos precursores lipogénicos), mientras que el suministro de dietas de elevado contenido lipídico, conduce a bajos niveles en las dos actividades, al ser en este caso menor el requerimiento de NADPH para la síntesis de ácidos grasos (Bonamusa *et al.*, 1992). Similares resultados en la actividad Glu 6-P DH se han obtenido en anguila por Suárez *et al.* (1995). Iritani (1992) indica, en hígado de rata, un efecto análogo que además se correlaciona con el nivel de transcripción y de ARN<sub>m</sub> para la enzima Glu 6-P DH. Stapleton *et al.* (1993) han observado asimismo un aumento de la actividad Glu 6-P DH correlacionado con acúmulo de su ARN<sub>m</sub> y una estimulación de la lipogénesis en hepatocitos de rata tratados con insulina.

### **1.3.3. GLUCOLISIS**

La glucólisis es la vía principal de catálisis de glucosa en los mamíferos. A través de ella se convierte la glucosa a piruvato, obteniendo así, la célula, energía en forma de ATP. Las reacciones catalizadas por hexoquinasa/glucoquinasa (fosforilación de glucosa a Glu 6-P), 6-PF 1-K (fosforilación de Fru 6-P a Fru 1,6-P<sub>2</sub>) y PK (defosforilación de fosfoenolpiruvato a piruvato), son las únicas reacciones alejadas del equilibrio en esta vía, siendo los pasos limitantes del sistema y los puntos principales de regulación (Lemaigre y Rousseau, 1994). En mamíferos, son bien conocidos los procesos reguladores, en función de la carga energética, estado nutricional y estado hormonal del organismo. En peces la información acerca de la regulación es escasa.

Eilers *et al.* (1993) han observado en ratas ayunadas un descenso de la actividad glucoquinasa, enzima encargada en hígado de fosforilar la glucosa, correlacionado con bajos niveles de ARN<sub>m</sub>. Los niveles de mensajero se recuperaron tras la realimentación. La importancia de la regulación de la actividad glucoquinasa se hace patente en algunas líneas celulares de hepatoma de rata, en las que este

paso es el limitante de la glucólisis (Valera y Bosch, 1994). La escasa capacidad de control de la glucemia observada en los peces, es debida, al menos en parte, a la poca o nula capacidad que presentan para fosforilar la glucosa en hígado (Christiansen y Klungsøyr, 1987). Este paso parece ser, por tanto, el limitante en la utilización de los carbohidratos por los peces. Cowey *et al.* (1977b) fueron incapaces de obtener cambios en la actividad hexoquinasa, así como de detectar actividad glucoquinasa en hígado de truchas alimentadas con dietas ricas en carbohidratos. En cambio, Fideu *et al.* (1983) han observado un aumento en la actividad hexoquinasa en truchas alimentadas con dietas ricas en carbohidratos. Borrebaek *et al.* (1995) han detectado, tras alimentación con dietas de alto contenido en carbohidratos, niveles mínimos de actividad glucoquinasa en hígado de salmón. Esta actividad no parece, por tanto, relevante en los peces, lo que no es de extrañar dada la escasa presencia de carbohidratos en su dieta natural. Curiosamente, en gato (mamífero carnívoro), la actividad glucoquinasa también está ausente (Christiansen y Klungsøyr, 1987).

En lo que se refiere a la regulación nutricional de otras actividades glucolíticas, en rata, las actividades hepáticas 6-PF 1-K y PK disminuyen en condiciones de ayuno o diabetes, recuperándose ambas actividades enzimáticas por realimentación con dietas de elevado contenido en carbohidratos y por administración de insulina (Dunaway *et al.*, 1978; Pilkis y Claus, 1991).

En dorada, el ayuno promueve un descenso en ambas actividades enzimáticas, valores que se recuperan por realimentación, (Bonamusa *et al.*, 1992). En general, en peces, la alimentación con dietas de elevado contenido proteico promueve una disminución de la actividad enzimática 6-PF 1-K (Fideu *et al.*, 1983). La alimentación con dietas ricas en carbohidratos promueven incrementos en las actividades hepáticas 6-PF 1-K y PK de dorada (Bonamusa *et al.*, 1992) y en la PK de *Anguilla anguilla* (Suárez *et al.*, 1995). En cambio, Lupiáñez *et al.* (1989) han detectado niveles elevados en ambas actividades en truchas alimentadas con dietas ricas en proteínas. Foster *et al.* (1989) han indicado que la actividad 6-PF 1-K resulta estimulada por un incremento en los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, en hepatocitos aislados de anguila tratados con insulina.

En otras especies de peces, como trucha (Guderley y Cardenas, 1980; Hilton y Atkinson, 1982) y *Anguilla rostrata* (Roberts y Anderson, 1985), no se ha encontrado regulación nutricional de la actividad PK, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos.

### **1.3.4. GLUCONEOGENESIS**

Está claro que la glucosa juega un papel central en el metabolismo, tanto como fuente de energía como precursor estructural de biomoléculas. Su almacén en el organismo en forma de glucógeno es limitado, por lo que la necesidad de una vía rápida generadora de glucosa es evidente. Este papel lo desempeña fundamentalmente la gluconeogénesis (Lemaigre y Rousseau, 1994).

La gluconeogénesis, proceso inverso de la glucólisis, genera glucosa a partir de piruvato, que puede provenir de lactato, alanina, glicerol, metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs o aminoácidos como glutamato, prolina, aspartato, treonina o metionina. Las enzimas que participan en esta vía son las mismas que las glucolíticas con la excepción de las que catalizan los tres puntos reguladores. En el sentido gluconeogénico, el piruvato se convierte en oxalacetato, por la actividad piruvato carboxilasa y éste en fosfoenolpiruvato, por la actividad PEPCK. La piruvato carboxilasa se activa por acetil CoA y oxalacetato. Por su parte, la PEPCK, cuya actividad aumenta al elevarse los niveles de oxalacetato, ve aumentar su expresión en ratas sometidas a ayuno, volviendo a los niveles normales tras realimentación con dietas ricas en carbohidratos (Lemaigre y Rousseau, 1994).

El segundo punto de control de la vía reside en la conversión de Fru 1,6-P<sub>2</sub> a Fru 6-P, catalizado por la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, enzima que es inhibida tanto por Fru 2,6-P<sub>2</sub> como por AMP y que resulta activada por 3-P glicerato y citrato.

El último paso de la vía está catalizado por la glucosa 6-fosfatasa (defosforilación de Glu 6-P a glucosa), reacción que transcurre mayoritariamente en hígado.

En mamíferos, existe la posibilidad de síntesis indirecta de glucógeno en hígado a partir de compuestos de tres carbonos, procedentes de tejidos extrahepáticos, vía gluconeogénesis (Newgard *et al.*, 1983; Pilkis *et al.*, 1985; Kuwajima *et al.*, 1986). A fin de mantener activa la gluconeogénesis, se mantiene bajo el nivel de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, evitándose de este modo la inhibición ejercida por el metabolito sobre la enzima gluconeogénica Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (Katz y McGarry, 1984; Kurland y Pilkis, 1989).

La gluconeogénesis juega un papel importante en los peces, como proveedor de glucosa en organismos en cuya dieta natural escasean los carbohidratos. Cowey

et al. (1977a) ya sugirió que esta vía sería la principal de síntesis *de novo* de glucosa en peces carnívoros, en los que el aporte glucídico con la dieta es muy bajo. En los peces la movilización del glucógeno es muy lenta, de forma que la mayor parte de glucosa requerida en un momento dado se abastece por vía gluconeogénica. Aunque la mayoría de teleósteos utilizan con más facilidad la alanina que el lactato como precursor de gluconeogénesis, los sustratos utilizados por los peces varían según la especie estudiada (Suarez y Mommsen, 1987). Walton y Cowey (1979), en estudios *in vitro*, observaron que la incorporación de precursores marcados a glucosa tenía lugar fundamentalmente a partir de lactato y, en menor medida, a partir de alanina y piruvato. En cambio French *et al.* (1981) han atribuido a la serina, y no a la alanina, el ser el principal sustrato aminoacídico gluconeogénico en peces. En éstos, la metabolización de la serina transcurre gracias a la actividad serina piruvato aminotransferasa (Rausell *et al.*, 1979), como tiene lugar en el gato (carnívoro) (Beliveau y Freedland, 1982), y a diferencia de lo que ocurre en rata, donde la actividad serina deshidratasa es la encargada de dicha función. Buck *et al.* (1992) atribuyen a la diferente compartimentación de la actividad PEPCK entre citosol y mitocondria, la variabilidad en la utilización de sustratos por diferentes especies de peces.

El ayuno prolongado produce cambios en la actividad de las enzimas gluconeogénicas en los peces. Morata *et al.* (1982) observaron aumentos en las actividades Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PEPCK en trucha tras dos meses de ayuno. En cambio, en lenguado (*Pleuronectes platessa*), después de cuatro meses de ayuno sólo se detecta aumento en la actividad PEPCK (Moon y Johnston, 1980).

En dorada, nuestro grupo ha comprobado, en extractos crudos de hígado, que el ayuno promueve un incremento en la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (Bonamusa *et al.*, 1992). Al someter dichos extractos a un proceso de gel filtración en Sephadex G-25 y determinar la actividad enzimática, el resultado, no obstante, no se diferencia del valor obtenido en peces alimentados, por lo que se ha sugerido que el incremento de actividad sería fundamentalmente debido a la presencia de factores inhibidores, papel que se ha adjudicado a la Fru 2,6-P<sub>2</sub>. En rata este efecto se acompaña además de un aumento en la cantidad total de enzima (El-Maghrabi *et al.*, 1991). Asimismo se detectó un aumento en la actividad en doradas alimentadas con dietas de elevado contenido en carbohidratos, aunque globalmente las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa aumentaron, indicando un predominio de la ruta glucolítica sobre la gluconeogénica.

La actividad gluconeogénica aumenta además con el uso de dietas con elevado contenido proteico en trucha (Cowey *et al.*, 1977b), mostrando una

correlación negativa con el contenido en carbohidratos en anguila (Suárez *et al.*, 1995).

En cuanto a la regulación hormonal de la vía en peces, la información es escasa. En trucha, como ocurre en rata, el flujo de la vía disminuye tras inyección de insulina (Cowey *et al.*, 1977a). Plisetskaya *et al.* (1989) señalan el efecto estimulador del glucagón y de las GLPs sobre la gluconeogénesis hepática en salmónidos, por inactivación por fosforilación de la PK. En trucha arco iris, tras un ayuno de 6 semanas, se ha observado un aumento en la relación glucagón y GLPs a insulina, que se ha relacionado con el incremento de la tasa gluconeogénica, a través de la estimulación de las actividades PEPCK y Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (Moon *et al.*, 1989). Foster y Moon (1990a) han observado un incremento de la gluconeogénesis por adición de glucagón a hepatocitos aislados del teleósteo *Hemirhamphus americanus*, a través de la activación de PEPCK, disminución de la afinidad de PK por fosfoenolpiruvato, disminución de los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y aumento de la sensibilidad de la 6-PF 1-K a la inactivación por ATP.

#### **1.4. CICLOS DE SUSTRATO Y REGULACION DEL FLUJO GLUCOLITICO/GLUCONEOGENICO**

El sentido anabólico o catabólico de los flujos glucolítico/gluconeogénico en hígado está controlado a través de la regulación de tres ciclos de sustrato, glucosa/Glu 6-P, Fru 6-P/Fru 1,6-P<sub>2</sub> y fosfoenolpiruvato/piruvato (Pilkis y Claus, 1991) (figura 1.2).

Newsholme y Start (1973) han sugerido que la actividad enzimática se puede modular muy finamente en los ciclos de sustrato por cambios en la concentración de efectores, de forma que, cuando el ritmo del ciclo es muy superior al propio de la vía, pequeños cambios en los niveles de efectores modificarían enormemente el flujo global.

Katz y Rongstad (1978) han demostrado el funcionamiento simultáneo de los ciclos de sustrato en uno y otro sentido con la degradación de ATP como fin fundamental. El posible sentido fisiológico de este efecto es la termogénesis.

Condiciones favorables a gluconeogénesis (elevados niveles de glucagón en plasma, así como de catecolaminas y glucocorticoides, a la vez que bajos niveles de insulina) dan lugar al incremento en las actividades PEPCK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y glucosa 6-fosfatasa, de forma coordinada con la disminución de las actividades opuestas, PK, 6-PF 1-K y glucoquinasa. La presencia de insulina, en cambio, provoca los cambios

recíprocos en dichas actividades enzimáticas, favoreciendo la vía glucolítica. El ciclo Fru 6-P/Fru 1,6-P<sub>2</sub> es a su vez controlado por otro ciclo, Fru 6-P/Fru 2,6-P<sub>2</sub>, el cual se modula a través de la regulación de la enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. De esta forma, la regulación hormonal coordina las actividades de estas 7 enzimas, determinando si el hepatocito va a consumir o producir glucosa bajo unas condiciones determinadas (Pilkis y Claus, 1991).

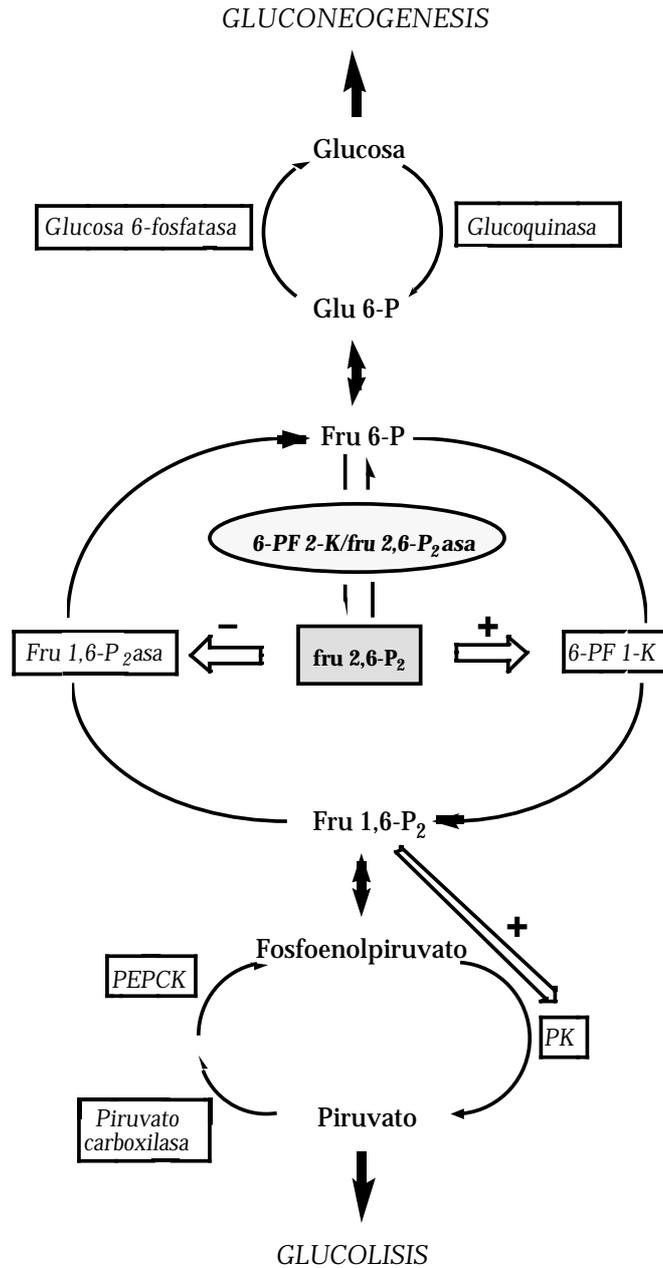


Figura 1.2 . Papel de la regulación de los ciclos de sustrato en la glucólisis/gluconeogénesis.

La regulación de los ciclos de sustrato, junto con la de la síntesis y degradación de glucógeno son factores de gran relevancia en el metabolismo hepático.

#### **1.4.1. CICLO GLUCOSA/GLU 6-P**

Como ha sido comentado anteriormente (apartado 1.3.3.), los peces presentan una baja capacidad de fosforilación de la glucosa en hígado, dado el nulo o bajo nivel de actividad glucoquinasa presente en este tejido (Cowey *et al.*, 1977b; Christiansen y Klungsøyr, 1987).

La mayor parte de glucosa libre es originada por gluconeogénesis en hígado, a partir de la defosforilación de Glu 6-P, paso que cataliza la actividad enzimática glucosa 6-fosfatasa. En rata, se han observado elevados niveles de actividad glucosa 6-fosfatasa en condiciones de ayuno y diabetes (Pilkis y Claus, 1991).

#### **1.4.2. REGULACION DEL CICLO PIRUVATO/FOSFOENOLPIRUVATO**

Las actividades hepáticas PK, catalizadora de la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, y PEPCK, que cataliza la formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato, desempeñan un papel central en la regulación de este ciclo, encontrándose sometidas en mamíferos a regulación nutricional coordinada a nivel transcripcional (Lemaigre y Rousseau, 1994). En rata, la PK es fosforilada en una serina por una reacción catalizada por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (Engstrom *et al.*, 1987). La fosforilación eleva la K<sub>m</sub> para fosfoenolpiruvato, hace a la enzima más sensible a la inhibición por alanina y ATP, y reduce la capacidad activadora por parte de Fru 1,6-P<sub>2</sub>. El nivel de fosforilación de la enzima está influenciado por efectores alostéricos. La Fru 1,6-P<sub>2</sub> y el fosfoenolpiruvato inhiben el grado de fosforilación, proceso que es revertido por la presencia de alanina. De esta forma, cuando la PK está inhibida es un sustrato más accesible a fosforilación que cuando está activa (El-Maghrabi *et al.*, 1983).

La proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina puede igualmente fosforilar a la PK, inhibiendo su actividad también por aumento de la K<sub>m</sub> para fosfoenolpiruvato. Esta fosforilación tiene lugar en dos puntos, en una treonina y en la serina que es fosforilada también por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (Soderling *et al.*, 1986).

En lenguado, Sand (1988) ha observado activación de la PK purificada de hígado por Fru 1,6-P<sub>2</sub>, como ocurre en mamíferos. En cambio, en otras especies de

peces, como *Mugil lisa* y *Chaetoditerus faber* (Ocampos *et al.*, 1987), no se ha apreciado un efecto estimulador de la Fru 1,6-P<sub>2</sub> sobre la actividad PK de hígado.

En otros organismos marinos, como los moluscos bivalvos, la fosforilación de la PK, por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, conduce a activación de la enzima, en claro contraste con lo que ocurre en mamíferos. Este efecto se relaciona, en estos organismos, con una fisiología adaptada a procesos anaeróbicos (Hakim *et al.*, 1985; Holwerda *et al.*, 1989).

#### 1.4.2.1. ESTRUCTURA DE LA ENZIMA PK

La PK hepática de rata consta de cuatro subunidades idénticas, cuyo peso molecular es de 57 kDa (Leff, S.E. *et al.*, 1986). En mamíferos se han encontrado cuatro isoformas: L, L', M1 y M2 (Marie, J. *et al.*, 1983). Las isoformas L y L', que se expresan fundamentalmente en hígado y eritrocitos respectivamente, son codificadas por el mismo gen, mientras que las formas M son codificadas por un gen diferente (Noguchi *et al.*, 1986; Takanaku *et al.*, 1989). M1 es la isoforma mayoritaria de músculo esquelético, corazón y cerebro en organismos adultos, mientras que M2, presente también en tejidos adultos, es la única detectada durante el desarrollo fetal. Los ARN<sub>m</sub> de L y L' están sujetos a regulación a través de secuencias promotoras distintas (Cognet *et al.*, 1987; Noguchi *et al.*, 1987). Las isoformas M, a diferencia de las isoformas L y L', no presentan dominios fosforilables, y son reguladas básicamente por efectores alostéricos. La isoforma L' consta de 574 aminoácidos, 31 más que L y 44 más que M1 y M2.

#### 1.4.2.2. CONTROL DE LA EXPRESION GENICA DE PK EN HIGADO

En hígado de rata, tanto la actividad enzimática de la PK como los niveles de su ARN<sub>m</sub>, están sujetos a regulación nutricional y hormonal. Ambos descienden en ayuno y diabetes, recuperándose por realimentación con dietas ricas en carbohidratos y por administración de insulina (Noguchi y Tanaka, 1993). El glucagón, vía AMP<sub>c</sub>, inhibe la expresión tanto *in vitro* (Decaux *et al.*, 1989) como *in vivo* (Vaulont *et al.*, 1986), así como afecta negativamente a la estabilidad del ARN<sub>m</sub>, contrariamente a la acción de glucosa/insulina. La realimentación con carbohidratos estimula la transcripción y el acúmulo del ARN mensajero (Noguchi *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 1993), pudiendo desempeñar en ello un papel fundamental las hormonas tiroideas y los glucocorticoides (Vaulont *et al.*, 1986).

La expresión génica de las formas hepáticas está controlada por factores generales y específicos que se unen a la región promotora y a secuencias corriente arriba moduladoras de la transcripción (Lemaigre y Rousseau, 1994). El uso de líneas de animales transgénicos con delecciones específicas ayudará en la identificación funcional y detallada de los elementos reguladores en *cis* y en *trans*, y la modulación de éstos, quizás por fosforilación/defosforilación o por efectores de bajo peso molecular, consecuencia del estado nutricional y hormonal.

### **1.4.3. REGULACION DEL CICLO FRU 6-P/FRU 1,6-P<sub>2</sub>**

6-PF 1-K y Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, enzimas de glucólisis y gluconeogénesis respectivamente, controlan los niveles de Fru 1,6-P<sub>2</sub>. Ambas son sustrato de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>. Inicialmente se pensó que la fosforilación era el principal mecanismo de regulación de sus actividades. De todas formas, cambios significativos en las actividades enzimáticas como consecuencia de la fosforilación *in vitro*, eran difíciles de discernir. Por otra parte se vió que la inhibición de 6-PF 1-K desaparecía tras purificación parcial de los extractos, indicando cambios debidos a la presencia de un efector de bajo peso molecular (Claus *et al.*, 1980). El descubrimiento de este efector, Fru 2,6-P<sub>2</sub>, ha permitido una explicación alternativa para la regulación tanto de la actividad 6-PF 1-K como de la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa.

La regulación hormonal y nutricional del ciclo de sustrato tiene lugar tanto a nivel del mecanismo implicado en la síntesis como en el de la degradación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa (Pilkis *et al.*, 1995).

#### **1.4.3.1. ESTRUCTURA DE LA 6-PF 1-K**

Subunidades de 82 kDa constituyen el homotetrámero en hígado de rata, que presenta cooperatividad positiva respecto al sustrato Fru 6-P (Brand y Söling, 1974).

Las propiedades reguladoras de la 6-PF 1-K, se atribuyen a la presencia de diversos puntos de unión a ligandos (Kemp y Marcus, 1990). En cada monómero se presentan cuatro zonas de unión de efectores orgánicos, además de un número indefinido para activadores inorgánicos, fosfato inorgánico, potasio y amonio. Ensayos de unión a moléculas efectoras, estudios cinéticos y de observación de cambios conformacionales por presencia de ligandos, han llevado a la caracterización de cuatro lugares diferentes de unión a efectores orgánicos:

1. **Unión a MgATP.** Se produce en un *locus* independiente del catalítico, dando lugar a un cambio conformacional que disminuye la afinidad de la enzima por Fru 6-P, a la vez que aumenta la sensibilidad a proteólisis. Aunque la afinidad por MgATP es elevada, el ATP libre también es un fuerte inhibidor. El aumento del pH de 6.5 a 8.0 provoca una disminución de la capacidad inhibitoria del ATP, capacidad que se ve potenciada por la presencia de citrato.

2. **Unión a citrato** favorecida por presencia de MgATP, ayuda al cambio conformacional descrito anteriormente, además de reducir la susceptibilidad a la fosforilación por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>.

3. **Unión a AMP y ADP** activa la enzima, al parecer a través de una conformación con mayor afinidad para la Fru 6-P. El efecto se ve favorecido por la presencia de AMP<sub>c</sub>.

4. **Unión a Fru 2,6-P<sub>2</sub>.** Es el punto crucial en la activación, al que también pueden unirse otros azúcares bisfosfato, como Fru 1,6-P<sub>2</sub> y glucosa 1,6-bisfosfato. El *locus* de unión es diferente al catalítico, aunque favorece la unión a Fru 6-P, y produce un cambio en la conformación que evita proteólisis, fosforilación y reactividad de los grupos tiol frente a diversos agentes. Además, promueve la formación de grandes agregados de la enzima.

#### 1.4.3.1.1. Activación por Fru 2,6-P<sub>2</sub>

En ausencia de efectores la enzima de rata presenta baja afinidad, además de cooperatividad positiva, respecto a Fru 6-P. La presencia de Fru 2,6-P<sub>2</sub> incrementa la afinidad en relación al sustrato sin modificar la actividad máxima (Hers y Hue, 1983; Pilkis y Claus, 1991), revierte la inhibición por ATP y potencia la activación por AMP. Asimismo protege a la enzima de la inactivación por calor, bajo pH o 6-PF 1-K fosfatasa (Söling *et al.*, 1981; Uyeda *et al.*, 1981).

Bonamusa (1991) ha comprobado el efecto estimulador de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> sobre la actividad 6-PF 1-K en extractos crudos de hígado de dorada, mostrando la enzima cinéticas similares a las descritas para mamíferos con respecto a Fru 6-P, ATP o citrato. La diferencia fundamental estriba en los elevados niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> que se encuentran en condiciones fisiológicas en hígado de dorada, en comparación con los observados en rata, de forma que aún en condiciones normales, la actividad 6-PF 1-K sería susceptible de encontrarse constantemente estimulada.

Tan sólo en condiciones de ayuno, cuando los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> son bajos, otros metabolitos, como el sustrato Fru 6-P, pasarían a tener un papel regulador de la actividad. En manto de moluscos bivalvos, Villamarín *et al.* (1990) han comprobado asimismo el efecto estimulador de Fru 2,6-P<sub>2</sub> sobre la enzima 6-PF 1-K.

Para la isoenzima muscular se ha visto que la unión con Fru 2,6-P<sub>2</sub> presenta cooperatividad negativa, indicando que el lugar de unión es el mismo que para Fru 1,6-P<sub>2</sub> (Pilkis y Claus, 1991).

Se ha propuesto que la estructura terciaria de la 6-PF 1-K de mamíferos, presenta dos dominios, unidos por 30 residuos, cada uno de ellos con similitud a la enzima bacteriana (insensible a Fru 2,6-P<sub>2</sub>), sería resultado de una duplicación génica (Poorman *et al.*, 1984).

A partir de la cristalización y caracterización de los *loci* catalítico y alostéricos de la enzima procariótica, se ha establecido qué residuos son importantes en la unión a sustrato y efectores en mamíferos (Evans y Hudson, 1979), asumiendo que se conserva la estructura tridimensional de los dos dominios. Se ha sugerido que en uno de los monómeros, el punto de unión al sustrato, Fru 6-P, ha dado lugar por mutación al *locus* de unión a Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Poorman *et al.*, 1984). Estudios de mutagénesis dirigida han mostrado que el residuo Asp<sup>127</sup> de la 6-PF 1-K bacteriana, es crítico en la unión del sustrato en el *locus* catalítico (Hellings y Evans, 1987). Este residuo aparece sustituido, en mamíferos, por una serina en el punto de unión a Fru 2,6-P<sub>2</sub>, eliminando así la carga negativa que podría conducir a una repulsión electrostática sobre el fosfato C-2 de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, permitiendo más espacio y quizás una interacción con el ligando a través de un puente de hidrógeno.

#### 1.4.3.1.2. Modificación covalente por fosforilación/defosforilación

La fosforilación de la 6-PF 1-K, llevada a cabo por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> en un único punto del extremo C-terminal, no parece tener un papel relevante en hígado (Hers y Hue, 1983). Las propiedades cinéticas de las formas fosforilada y no fosforilada no presentan grandes diferencias. Por otra parte, la purificación parcial de la enzima revierte el efecto producido por glucagón o insulina, mostrando así el papel preponderante que juega la Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Pilkis y Claus, 1991).

#### 1.4.3.2. CONTROL DE LA EXPRESION GENICA DE 6-PF 1-K EN HIGADO

El ARN<sub>m</sub> correspondiente a esta enzima incrementa sus niveles al realimentar ratones en condiciones de ayuno, con una dieta rica en carbohidratos (Gehrinch *et al.*, 1988). En cambio, en rata, Hotta *et al.* (1991) no han observado variación en los niveles de ARN<sub>m</sub> por realimentación con dietas de elevado contenido en carbohidratos a animales ayunados, ni por tratamiento de ratas diabéticas con insulina, a pesar de que la cantidad de proteína 6-PF 1-K sí experimenta un incremento (Dunaway *et al.*, 1978). Hotta *et al.* (1991) opinan que la modulación de la actividad 6-PF 1-K en hígado de rata tiene lugar fundamentalmente a nivel traduccional y/o post-traduccional, en contraste con la regulación de otros genes involucrados en el control de glucólisis y gluconeogénesis, como PEPCK, glucoquinasa y 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, que se encuentra bajo el control recíproco de insulina y AMP<sub>c</sub>.

En humanos cada isoenzima de la 6-PF 1-K está codificado por un gen diferente (Vora, 1983). El gen muscular contiene al menos dos promotores alternativos y tres productos diferentes (Nakajima *et al.*, 1990).

#### 1.4.3.3. ESTRUCTURA DE LA FRU 1,6-P<sub>2</sub>ASA

La Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa hepática de mamífero es un homotetrámero con 38-41 kDa de peso molecular por subunidad (Hosey y Marcus, 1981). Aunque respecto a su sustrato, Fru 1,6-P<sub>2</sub>, presenta cinética hiperbólica (Tejwani, 1983), se considera un enzima alostérico con el AMP como inhibidor no competitivo.

Todas las Fru 1,6-P<sub>2</sub>asas nativas conocidas (mamíferos, aves, plantas, hongos, bacterias) son inhibidas por Fru 2,6-P<sub>2</sub>, incluso las de cloroplastos (Gottschalk *et al.*, 1982) y *Escherichia coli* (Marcus *et al.*, 1984), aún cuando éstos carecen del metabolito. En todos los casos parece que la unión a Fru 2,6-P<sub>2</sub> tiene lugar en el centro activo de la enzima, no pareciendo probable la existencia de un centro alostérico particular para un compuesto que en algunos casos ni siquiera existe de forma natural. En peces, las propiedades cinéticas de la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa de hígado son similares a las de mamíferos (Biswas y Majumder, 1985). La enzima ha sido purificada de manto de mejillón (Barcia *et al.*, 1991), mostrando la dependencia de cationes divalentes que presentan la mayoría de Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa conocidas, constituyendo la isoforma de cerebro de rata la excepción.

A nivel estructural el conocimiento que se tiene de otra enzima, 6-PF 1-K, parece indicar que la aparición de un *locus* alostérico para análogos del sustrato ha

sido un proceso evolutivamente complejo, a través de duplicación génica, fusión y mutación. La comparación de las cuatro secuencias proteicas de Fru 1,6-P<sub>2</sub>asas conocidas hasta el momento, riñón de cerdo (Marcus *et al.*, 1982), hígado de oveja (Fisher y Thompson, 1983), *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* (Rogers *et al.*, 1988), indica la existencia de un alto grado de similitud pero no la evidencia de una duplicación génica. Además, no aparece evidencia de la existencia de una segunda región similar a la que contiene el residuo Lys<sup>274</sup>, el cual se une al 6-fosfato del sustrato Fru 1,6-P<sub>2</sub> en el centro activo.

La enzima hepática de rata contiene 24-26 aminoácidos extras en el extremo C-terminal (Rittenhouse *et al.*, 1983). Esta región contiene secuencias de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, ausentes en otras Fru 1,6-P<sub>2</sub>asas (Hosey y Marcus, 1981; Rittenhouse *et al.*, 1985). No obstante, no parece que la fosforilación tenga un papel fisiológico relevante.

En levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, la enzima puede fosforilarse *in vitro* e *in vivo* por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>. La mayoría de autores concluyen que, en levaduras, la fosforilación disminuye la actividad enzimática, aumentando la sensibilidad a la inhibición por AMP y Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Gancedo *et al.*, 1983; Pohlig y Holzer, 1985), e incluso algunos autores han indicado que podría ser una señal que provoque degradación de la enzima (Müller y Holzer, 1981; Mazón *et al.*, 1982). Otra levadura, *Kluyveromyces fragilis*, presenta también una enzima fosforilable, proceso que parece no afectar a la inhibición por Fru 2,6-P<sub>2</sub> y sí hacerla más sensible a la inhibición por AMP (Toyoda y Sy, 1984). En levaduras la concentración elevada de AMP<sub>c</sub> es una señal de estado alimentado que activa a la 6-PF 2-K e incrementa los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, metabolito que se encarga de inhibir la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (François *et al.*, 1984).

#### 1.4.3.3.1. Inhibición por Fru 2,6-P<sub>2</sub>

Pilkis *et al.* (1981) y Van Schaftingen y Hers (1981) descubrieron independientemente el papel de inhibidor competitivo que presenta la Fru 2,6-P<sub>2</sub>, a nivel micromolar, sobre la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de rata, y por consiguiente sobre la gluconeogénesis. La unión favorece la inhibición alostérica por AMP (Gidh-Jain *et al.*, 1994).

La Fru 2,6-P<sub>2</sub> ejerce su papel inhibidor por unión al *locus* catalítico, en donde el residuo Arg<sup>243</sup> desempeña un papel fundamental, probablemente por unión al fosfato en 6-C de Fru 1,6-P<sub>2</sub> y Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Giroux *et al.*, 1994). La Lys<sup>274</sup> se encuentra también implicada en la unión al inhibidor, probablemente por interacción con el fosfato en 2-C (El-Maghrabi *et al.*, 1992).

En extractos crudos de hígado de dorada se ha observado que la Fru 2,6-P<sub>2</sub> ejerce un efecto inhibitor de tipo mixto sobre la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, probablemente por unión a dos puntos, uno cercano al *locus* catalítico y que da lugar a una inhibición de tipo competitivo, y otro lejano, que desarrollaría un efecto inhibitor no competitivo (Bonamusa, 1991).

#### 1.4.3.3.2. Modificación covalente por fosforilación/defosforilación

El suministro de glucagón o AMP<sub>c</sub> incrementa la actividad de la enzima hepática en rata, lo cual indica que se produce regulación de la actividad por fosforilación. Se ha observado que <sup>32</sup>P<sub>i</sub> se incorpora a la enzima tanto *in vivo* (Riou *et al.*, 1977) como *in vitro* (Claus *et al.*, 1981). Además, la fosforilación da como resultado un pequeño incremento en la V<sub>max</sub>, así como descensos en la K<sub>m</sub> para Fru 1,6-P<sub>2</sub> y en la inhibición por AMP y Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Ekdahl y Ekman, 1985).

A pesar de todos estos datos, el papel de la fosforilación en la regulación de la enzima no parece ser relevante. La concentración de glucagón necesaria para conseguir la mitad de la incorporación máxima de <sup>32</sup>P<sub>i</sub> es mucho más elevada que la necesaria para conseguir la mitad de la estimulación máxima de la gluconeogénesis (Claus *et al.*, 1981). Por otra parte Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa se muestra como peor sustrato de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> que PK o 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.

Como en el caso de la 6-PF 1-K, el nivel de Fru 2,6-P<sub>2</sub> parece ser la vía a través de la cual se produce la regulación hormonal de la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (Hue y Rider, 1987; Pilkis y Claus, 1991).

Como ocurre en mamíferos, en dorada se ha observado que el aumento de la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa observado en condiciones de ayuno es fundamentalmente debido a los bajos niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> presentes bajo dichas condiciones en hígado, dado que al analizar los extractos crudos filtrados a través de Sephadex G-25 no se han apreciado diferencias significativas entre doradas ayunadas o alimentadas (Bonamusa *et al.*, 1992).

#### 1.4.3.4. CONTROL DE LA EXPRESION GENICA DE FRU 1,6-P<sub>2</sub>ASA

Su mensajero hepático se encuentra aumentado 10 veces en ratas diabéticas, efecto que es revertido por insulina (El-Maghrabi *et al.*, 1988). *In vitro* el nivel del ARN<sub>m</sub> se ha visto incrementado por AMP<sub>c</sub> y disminuido por insulina (El-Maghrabi *et al.*, 1991), de forma similar a como ocurre con PEPCK.

**1.4.4. REGULACION HORMONAL DE LOS CICLOS FRU 6-P/FRU 1,6-P<sub>2</sub> Y PIRUVATO/FOSFOENOLPIRUVATO**

El glucagón y los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos unidos a su receptor activan la adenilato ciclasa, actividad que eleva los niveles de AMP<sub>c</sub> intracelular y disminuye los de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. Así, por inhibición de 6-PF 1-K y activación de Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, descienden los niveles de Fru 1,6-P<sub>2</sub>, lo que a su vez promueve un incremento de la sensibilidad de la PK a ser inhibida por fosforilación. Esta modulación, con impacto a nivel de los ciclos de sustrato piruvato/fosfoenolpiruvato y Fru 6-P/Fru 1,6-P<sub>2</sub>, favorece el flujo gluconeogénico. Los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos también estimulan la gluconeogénesis, aunque en menor medida y fundamentalmente a través del aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, que provoca la activación de la proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina, la cual fosforila e inactiva a la PK. 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, 6-PF 1-K y Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa no son fosforilables por esta actividad, lo que explica la poca estimulación gluconeogénica resultado de esta acción (Pilkis y Claus, 1991).

Los efecto de la insulina son contrarios a la acción del glucagón o los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos. Además, la insulina puede actuar de forma opuesta a los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos sobre la PK, mecanismo poco conocido que podría deberse a la activación de la proteína fosfatasa 2A (Claus *et al.*, 1986), y sobre la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa (Assimacopoulous y Jeanrenaud, 1990).

		Insulina	Glucagón
<b>Glucólisis</b>	Glucoquinasa	+	-
	6-PF 1-K	+	-
	PK	+	-
	6-PF 2-K/Fru 2,6-P <sub>2</sub> asa	+	-
<b>Gluconeogénesis</b>	Glucosa 6-fosfatasa	?	?
	Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa	-	+
	PEPCK	-	+

**Tabla 1.1 . Regulación de la expresión génica de enzimas clave en la glucólisis y gluconeogénesis hepática por insulina y glucagón.**

El signo + indica aquellos genes cuya expresión es estimulada por la acción hormonal, mientras que el signo - indica aquéllos cuya expresión es inhibida. Se desconoce si insulina o glucagón tienen algún efecto sobre la expresión de la glucosa 6-fosfatasa. Basado en un esquema de Pilkis y Claus (1991).

A largo plazo, las hormonas también modulan la expresión génica de las enzimas implicadas en la regulación de glucólisis-gluconeogénesis en hígado. En la tabla 1.1 se resume el efecto de insulina y glucagón sobre las principales enzimas involucradas en la síntesis y degradación de la glucosa en hígado.

### **1.5. FRU 2,6-P<sub>2</sub>**

Este metabolito fue identificado en 1980 (Van Schaftingen *et al.*, 1980a y 1980b) en hígado de animales alimentados, como un potente efector positivo de la 6-PF 1-K, enzima clave en la glucólisis, y simultáneamente inhibidor de la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, enzima clave en la gluconeogénesis. La presencia de Fru 2,6-P<sub>2</sub> previene, además, la reversión del paso Fru 6-P a Fru 1,6-P<sub>2</sub> (Pilkis *et al.*, 1981; Van Schaftingen y Hers, 1981).

Más allá de su papel activador sobre 6-PF 1-K, la Fru 2,6-P<sub>2</sub> se comporta como un factor estabilizador de dicha enzima, protegiéndola de la inactivación (Van Schaftingen y Hers, 1983), proceso importante en el descenso de actividad enzimática observado en condiciones de ayuno o diabetes.

La tardanza en su descubrimiento fue debida diversas razones, su extrema labilidad en medio ácido, así como el que no forme parte directa de una ruta metabólica importante. La Fru 2,6-P<sub>2</sub> se comporta más como una señal que como un metabolito propiamente dicho (Stryer, 1995).

#### **1.5.1. Papel de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> en la regulación del metabolismo de carbohidratos en hígado**

Los dos efectos primordiales de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> en los tejidos animales son, como queda dicho, la activación de 6-PF 1-K y la inhibición de Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa. A concentraciones mucho más elevadas que las fisiológicas también inhibe a la fosfoglucomutasa hepática, proceso que no parece tener un significado fisiológico relevante (Bartrons *et al.*, 1985). Asimismo se ha publicado que la PK hepática también se ve afectada por Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Söling *et al.*, 1981), aunque actualmente se piensa que este resultado fue obtenido probablemente a partir de una contaminación de la preparación de Fru 2,6-P<sub>2</sub> con Fru 1,6-P<sub>2</sub>.

La concentración celular de Fru 2,6-P<sub>2</sub> está controlada por las dos actividades de la enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, reguladas por la concentración de varios metabolitos y por modificación covalente (ver apartado 1.6.). El dominio

quinasa (6-PF 2-K) sintetiza Fru 2,6-P<sub>2</sub>, mientras que el dominio bisfosfatasa (Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa) la degrada.

### **1.5.2. Efecto del estado nutricional sobre los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub>**

El ayuno provoca disminución en los niveles de glucógeno y Fru 2,6-P<sub>2</sub>, paralelamente a la bajada en la actividad 6-PF 1-K (Van Schaftingen *et al.*, 1980a). Tras realimentación o administración intragástrica de glucosa los niveles de glucógeno se recuperan en pocas horas, tras un período *lag* de unos pocos minutos. Por el contrario, los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> no se empiezan a recuperar hasta pasadas 5 horas, periodo durante el cual se piensa que la gluconeogénesis permanece activa a fin de proveer una parte del carbono requerido para la síntesis de glucógeno (Katz *et al.*, 1986). Se ha sugerido que hasta reponer los niveles de glucógeno, la concentración de hexosas 6-P permanecería baja a fin de evitar la formación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, posibilidad que es difícil de probar debido a los cambios que se producen en los niveles de las hexosas 6-P tras decapitación y por anestesia de los animales.

En cambio, la realimentación con una dieta de alto contenido en carbohidratos provoca, en hígado de rata, una rápida recuperación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, debido a una pronta disminución de la fosforilación de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa y una más rápida elevación de la relación insulina/glucagón que con otras dietas (Kuwajima *et al.*, 1986).

Dietas ricas en proteína conducen a niveles bajos en los valores de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa (Bois-Joyeux *et al.*, 1986), en relación con un elevado flujo gluconeogénico y una insulinemia baja.

### **1.5.3. Control hormonal de los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>**

En condiciones de ayuno, los niveles de glucagón en circulación se elevan, promoviendo, en hígado, disminución de glucógeno, estimulación de la gluconeogénesis y de la producción de cuerpos cetónicos e inhibición de la glucólisis y de la producción de ácidos grasos. Todos estos efectos están mediados por la formación intracelular de AMP<sub>c</sub> (Hers y Hue, 1983), aunque se ha sugerido que el inositol-trifosfato y el Ca<sup>2+</sup> citosólico están también involucrados como mensajeros (Wakelam *et al.*, 1986). El AMP<sub>c</sub> activa la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, la cual es capaz de fosforilar a cuatro enzimas controladores del metabolismo de carbohidratos en hígado: glucógeno sintasa, fosforilasa quinasa, 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa y PK. Estos cambios conducen a un descenso en la vía glucolítica, coordinado

con un incremento en los niveles de hexosas 6-P. El efecto activador de la Fru 6-P sobre 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa resulta dificultado por la fosforilación de la enzima, disminuyendo en definitiva, tras pocos minutos, los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Bartrons *et al.*, 1983).

Actualmente se admite que la vasopresina, angiotensina II y fenilefrina, agentes -adrenérgicos, mediante interacción con sus receptores membranales, causan la activación de la fosfolipasa C, que hidroliza fosfatidil-inositolbisfosfato a diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato. Este último dispara el nivel de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Berridge, 1984 y Exton, 1986), estimulando la fosforilasa quinasa y otras enzimas dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Como resultado de esta cascada de acontecimientos, la fosforilasa se activa, se degrada glucógeno y la concentración de hexosas 6-P se ve incrementada. Dado que 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa bajo estas condiciones no resulta fosforilada, el aumento en la concentración de Fru 6-P conduce a un aumento de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y , como consecuencia, se produce una estimulación de la glucólisis.

La insulina antagoniza los efectos del glucagón, incrementando los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, aunque al parecer el aumento en los niveles de metabolito es más un efecto del descenso en la concentración de AMP<sub>c</sub> que del aumento de insulina (Pilkis *et al.*, 1988). Assimacopoulos y Jeanrenaud (1990), no obstante, han sugerido la posibilidad de una vía directa de acción de la insulina , promoviendo la activación de una o más fosfatasas, que podrían defosforilar, y por tanto activar, a la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. En cultivos de hepatocitos, niveles altos de insulina y bajos en glucagón provocan, secuencialmente, incrementos en la actividad 6-PF 2-K, niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, activación de PK y en definitiva una elevada tasa de funcionamiento de la glucólisis (Probst y Unthan-Fechner, 1985).

Animales diabéticos y urémicos presentan niveles bajos de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, situación inversa a la encontrada en ratas obesas (Van Schaftingen, 1990).

En mamíferos se ha observado que la anoxia incrementa la glucólisis, por estimulación de la 6-PF 1-K, fundamentalmente a través de AMP (Ramaiah, 1974). Esta activación no es resultado de una elevación en los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, dado que la concentración de éste disminuye en situación de anoxia. Contrariamente, en plantas, la Fru 2,6-P<sub>2</sub>, que también tiene papel activador de la glucólisis, aumenta fuertemente sus niveles como consecuencia de la anoxia (Mertens *et al.*, 1987). Brooks *et al.* (1991) han observado una disminución de la demanda energética en moluscos bajo condiciones de anoxia, relacionada con un descenso del flujo

glucolítico a través de cambios covalentes sobre las enzimas PK, 6-PF 1-K y glucógeno fosforilasa. De forma similar, la hibernación en los mamíferos provoca un descenso del flujo glucolítico, promoviendo una menor tasa metabólica y favoreciendo gluconeogénesis, a través de la inactivación por fosforilación de 6-PF 1-K, PK y por defosforilación de glucógeno fosforilasa, sin que los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> se vean afectados (Storey, 1987a).

En peces la anoxia conduce a una disminución de los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, promoviendo un descenso del flujo glucolítico y del metabolismo basal (Storey, 1987b).

La letargia inducida por el frío y el ayuno se ha visto que también provocan descensos paralelos en los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y de las enzimas glucolíticas 6-PF 1-K y PK en hígado de lagarto (González *et al.*, 1988).

#### **1.5.4. Fru 2,6-P<sub>2</sub> en *Sparus aurata***

Este metabolito está sujeto a regulación nutricional en hígado de dorada. Nuestro grupo ha comprobado una elevación de sus niveles, hasta 30 veces superiores a los encontrados en rata, como consecuencia de alimentación con dietas ricas en carbohidratos (García de Frutos *et al.*, 1990).

Tras 1 día de ayuno los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> prácticamente no se diferencian de los de peces alimentados. En cambio, los niveles del metabolito en hígado descienden de forma significativa a los 8 días de ayuno, mientras que un ayuno más prolongado (20 días) promueve un descenso aún mayor (García de Frutos *et al.*, 1990). En rata, por el contrario, el metabolito desciende a niveles mínimos después de tan sólo 24 horas de ayuno (Bois-Jeyoux *et al.*, 1986).

En peces, como ocurre en mamíferos, el mecanismo involucrado en la disminución de Fru 2,6-P<sub>2</sub> en ayuno podría asociarse directamente con el aumento del glucagón y del AMP<sub>c</sub> intracelular (Baanante *et al.*, 1991).

En dorada, durante el transcurso de las primeras horas de realimentación en animales sometidos previamente a un ayuno de 24 horas, junto a niveles elevados de glucógeno, se encontró un descenso de Fru 2,6-P<sub>2</sub> (García de Frutos *et al.*, 1991). Este bajo nivel de Fru 2,6-P<sub>2</sub> observado en las primeras etapas de la realimentación se correlaciona con el bajo nivel de activación de la 6-PF 2-K, mientras que la forma total de la enzima permanecía invariable. Estos resultados sugirieron la existencia de un fino mecanismo de regulación de los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> a través de procesos de fosforilación/defosforilación. El mantenimiento de niveles bajos del metabolito parece responder a un mantenimiento de la gluconeogénesis, a

fin de aportar hexosas fosfato que, fundamentalmente, se desviarían hacia la vía de las pentosas fosfato en mayor medida que hacia la síntesis de glucógeno, como ocurre en mamíferos (Bois-Joyeux *et al.*, 1986). De esta forma, los peces pueden generar poder reductor útil para la síntesis *de novo* de ácidos grasos, principal reserva energética en estos organismos.

### **1.5.5. Fru 2,6-P<sub>2</sub> en la evolución**

En la actualidad se admite que animales, plantas y hongos se han separado recientemente, de forma relativa, durante la evolución. Contrariamente, protozoos como los euglenoides, los tripanosomátidos y los microspóridos, se separaron del tronco evolutivo mucho antes que el resto de eucariotas. Por ello no sorprende que en algunos protozoos, así como en ciertos procariotas, la Fru 2,6-P<sub>2</sub> se encuentre ausente o desempeñando un papel diferente al descrito.

En tripanosomátidos, la primera parte de la glucólisis tiene lugar en unos orgánulos especializados, los glicosomas. Este hecho parece ser la razón por la que la Fru 2,6-P<sub>2</sub> en estos organismos no estimula a la 6-PF 1-K (Cronin y Tipton, 1985), y sí a la PK, única enzima glucolítica regulable que está presente en citosol (Van Schaftingen *et al.*, 1985). En estos organismos las actividades enzimáticas 6-PF 2-K y Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa se encuentran ubicadas en proteínas diferentes (Van Schaftingen *et al.*, 1987).

En *Dictyostelium discoideum*, el papel que desempeña la Fru 2,6-P<sub>2</sub> es básicamente el control de la gluconeogénesis por inhibición de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, sin afectar a las enzimas glucolíticas (Aragon *et al.*, 1986).

En protozoos carentes de mitocondrias, como *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus* e *Isotricha prostoma*, no se han detectado Fru 2,6-P<sub>2</sub>, 6-PF 2-K ni 6-PF 1-K, sin embargo sí que presentan la actividad PP<sub>i</sub>-6-PF 1-K (6-fosfofructo 1-quinasa dependiente de pirofosfato inorgánico) (Mertens *et al.*, 1986).

En procariotas no se ha encontrado Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Cséke *et al.*, 1982).

En la tabla 1.2 se resume la presencia y papel regulador de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> en diferentes organismos.

En conclusión, el hecho de que el metabolito se encuentre en tripanosomátidos, euglenoides, plantas, hongos y animales, indica su presencia en el organismo ancestro de todos ellos, que debería haber vivido hace unos 10<sup>9</sup> años (Cavalier-Smith, 1987). A partir de su aparición en la evolución, la Fru 2,6-P<sub>2</sub> se ha

conservado, sin que haya conocimiento de ningún organismo de evolución posterior que carezca del metabolito. Su modo de acción también ha sido bastante conservado, todas las 6-PF 1-K de animales y hongos conocidas son estimuladas por este efector. Van Schaftingen *et al.* (1990), basándose en la carencia del efecto producido por el metabolito sobre la 6-PF 1-K bacteriana y en la inhibición eficaz observada sobre la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa bacteriana, han especulado que esta inhibición sería la función original de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>, proceso que tendría lugar por unión en el centro activo y que así ha sido mantenido a lo largo de la evolución. Por el contrario, la unión del metabolito a la 6-PF 1-K tiene lugar en un *locus* alostérico que habría aparecido tras duplicación génica, ligación y mutación. La función más constante de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>, inhibición de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, parece ser la función primitiva, presente quizás ya en un precursor protoeucariótico que la podría sintetizar. A partir de este punto, habría sido más ventajoso reforzar el mecanismo regulador antagonizando el efecto ejercido en la gluconeogénesis, a través de la regulación de 6-PF 1-K, PP<sub>i</sub>-6-PF 1-K o PK según la rama evolutiva (tabla 1.2).

		Fru 2,6-P <sub>2</sub>	Enzimas modulados por Fru 2,6-P <sub>2</sub>	
			Activación	Inhibición
<b>Eucariotas</b>	Animales	Presente	6-PF 1-K	Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa
	Plantas	Presente	PP <sub>i</sub> -6-PF 1-K	Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Presente	6-PF 1-K	Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa
	<i>Dictyosteliuym discoideum</i>	Presente	-	Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa
	<i>Trypanosoma brucei</i>	Presente	PK	-
	<i>Euglena gracilis</i>	Presente	PP <sub>i</sub> -6-PF 1-K	Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa
<b>Procariotas</b>	<i>Escherichia coli</i>	Ausente	-	Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa

**Tabla 1.2 . Presencia y papel regulador de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> en diferentes organismos.**

En la tabla, basada en un diagrama publicado por Van Schaftingen *et al.* (1990), no aparecen otros organismos que carezcan del metabolito. Con un guión (-) aparecen indicados aquellos organismos en los que no se ha probado un efecto activador o inhibidor de Fru 2,6-P<sub>2</sub> sobre actividades enzimáticas de glucólisis o gluconeogénesis. En los Procariotas no se ha detectado la presencia de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, sin embargo la incubación con el metabolito provoca inhibición de la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa en *Escherichia coli*.

### 1.6. 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>ASA

La enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa se encarga de la síntesis y degradación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. La síntesis es catalizada por la actividad 6-PF 2-K, a través de la transferencia del -fosfato del ATP al C-2 de la Fru 6-P, según la reacción:



La degradación se produce por transferencia del grupo 2-P de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> al agua a través de la actividad Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa:



La enzima fue descubierta en hígado de rata (El-Maghrabi *et al.*, 1982a y 1982b; Lively *et al.*, 1988). En mamíferos se han descrito posteriormente otras isoformas de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en músculo esquelético (Darville *et al.*, 1988; Kitamura *et al.*, 1989), corazón (Kitamura y Uyeda, 1987; Tsuchya y Uyeda, 1994), testículo (Sakata *et al.*, 1991) y cerebro (Ventura *et al.*, 1992).

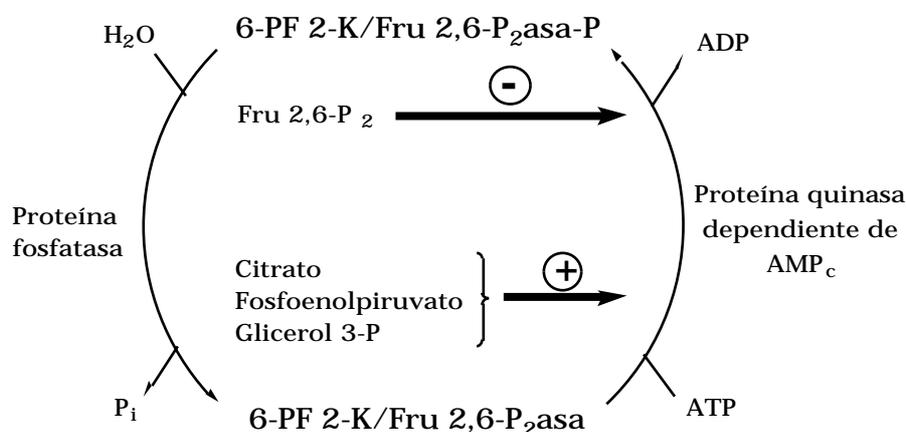
En dorada, nuestro grupo ha purificado las formas hepática (García de Frutos y Baanante, 1994) y muscular (García de Frutos y Baanante, 1995).

Dentro de los vertebrados, la enzima ha sido detectada, además de en mamíferos y peces, en aves (Van Schaftingen y Hers, 1986) y anfibios (Pyko *et al.*, 1993; Sakai *et al.*, 1994). Asimismo, se ha encontrado en invertebrados marinos, concretamente en manto de mejillón (Vázquez-Illanes *et al.*, 1991 y 1992).

Las diversas isoformas aparecen muy conservadas en los vertebrados. Todas mantienen la estructura central con dominios quinasa y bisfosfatasa. La diferencia mayor entre ellas recae en la longitud y composición de los extremos amino y carboxilo terminal, con presencia o ausencia de puntos de fosforilación por proteínas quinasas en estas regiones.

La 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de rata es fosforilable por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, proceso que da como resultado la activación del dominio bisfosfatasa y la inhibición del dominio quinasa (Pilkis *et al.*, 1995). La defosforilación promueve el efecto contrario sobre ambas actividades. De esta forma, en hígado, los niveles elevados de AMP<sub>c</sub> conllevan a un descenso de los de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. El estado de fosforilación está modulado por ligandos. Los inhibidores de la quinasa, glicerol 3-P, fosfoenolpiruvato y citrato, refuerzan su efecto estimulando la fosforilación, efecto que es disminuido por la presencia de Fru 2,6-P<sub>2</sub> (figura 1.3).

Las características cinéticas y de fosforilación de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de *Sparus aurata* presentan ligeras diferencias respecto a las de la enzima de rata (ver apartado 1.6.7.) (García de Frutos y Baanante, 1994).



**Figura 1.3 . Regulación de la fosforilación de la enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de rata.**

Citrato, fosfoenolpiruvato y glicerol 3-P favorecen la fosforilación de la enzima por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>. La presencia de Fru 2,6-P<sub>2</sub> disminuye el rango de fosforilación provocado por la presencia de los ligandos. Esquema tomado de Van Schaftingen (1990).

A nivel tisular, la diferencia más importante entre las isoformas de mamíferos es la variabilidad en la afinidad de la bisfosfatasa por Fru 2,6-P<sub>2</sub>, 1000 veces superior en la forma hepática. Por otra parte, mientras la enzima de músculo esquelético de rata presenta una actividad quinasa baja, en la de corazón de bovino, la bisfosfatasa es la disminuida. En dorada, a diferencia de la situación en rata, la isoforma de músculo esquelético presenta una elevada relación entre las actividades quinasa y bisfosfatasa (García de Frutos y Baanante, 1995).

En levaduras han sido descritas dos isoenzimas de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, producto de genes diferentes, PFK26, con actividad exclusivamente quinasa y fosforilable en el extremo C-terminal del dominio bisfosfatasa (Kretschmer y Fraenkel, 1991), y FBP26, con actividad mayoritariamente bisfosfatasa y sin puntos fosforilables (Kretschmer *et al.*, 1992).

En células de hepatoma de rata ha sido detectada una enzima 6-PF 2-K monofuncional (Loiseau *et al.*, 1988), presente también en hepatocitos fetales del mismo animal (Martín-Sanz *et al.*, 1987).

### **1.6.1. Propiedades generales del dominio 6-PF 2-K en la enzima hepática**

La quinasa puede utilizar GTP y ( $-^{35}\text{S}$ )ATP como donadores de fosfato, además de ATP. El aceptor preferido del grupo fosfato es D-Fru 6-P, aunque L-sorbose 6-P puede servir también como aceptor. El pH óptimo para esta actividad está entre 8 y 9.

La enzima también cataliza reacciones de intercambio entre ATP y ADP, así como entre Fru 6-P y Fru 2,6-P<sub>2</sub>, lo que ha llevado a sugerir un mecanismo de catálisis covalente, aún cuando el intermediario fosfoenzimático covalente no haya sido detectado (El-Maghrabi *et al.*, 1990). Siguiendo el curso estereoquímico de la reacción, se ha visto que probablemente la reacción sea resultado de una transferencia directa del grupo fosfato entre dos sustratos sin que haya formación de un fosfoenzima intermediario (Kountz *et al.*, 1988).

Estudios cinéticos muestran inhibición de la reacción de la enzima bifuncional de rata por sus productos, ADP (competitivamente con ATP) y Fru 2,6-P<sub>2</sub> (no competitivo con ningún sustrato). Kountz *et al.* (1988) encuentran al P<sub>i</sub> no esencial para la actividad y sin efecto a concentraciones máximas de Fru 6-P, no obstante reduce su K<sub>m</sub> a niveles fisiológicos. Citrato, fosfoenolpiruvato y glicerol 3-P (competitivo con Fru 6-P) son inhibidores. Al AMP le han otorgado algunos autores efecto activador, mientras que otros no han observado este efecto (El-Maghrabi *et al.*, 1990).

La regulación de la isoenzima de hígado de dorada presenta algunas características específicas (apartado 1.6.7.). La diferencia fundamental estriba en la menor capacidad de inhibición por glicerol 3-P presentada por la actividad quinasa (García de Frutos y Baanante, 1994). La insensibilidad a glicerol 3-P también se ha encontrado en la enzima de músculo esquelético de dorada (García de Frutos y Baanante, 1995), mamíferos y anfibios (Pyko *et al.*, 1993), así como de manto del molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis* (Vázquez-Illanes *et al.*, 1992).

La 6-PF 2-K y la reacción de intercambio entre Fru 6-P y Fru 2,6-P<sub>2</sub> son específicamente abolidas por el sistema oxidativo ascorbato/Fe<sup>3+</sup>. La adición de DTT reestablece las funciones, atribuyéndose la inactivación a la oxidación de uno o más residuos de cisteína esenciales para la reacción que utiliza azúcares fosfato. El ATP previene de la inactivación por oxidación al ser añadido a enzima parcialmente oxidada, por inducción de un cambio conformacional en la enzima, haciéndola probablemente menos susceptible a modificación y proteólisis.

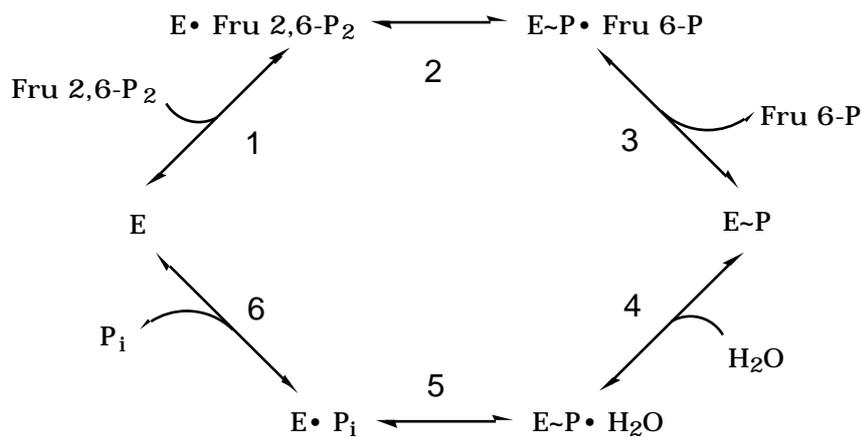
Quinasa y reacción de intercambio de azúcares son además muy sensibles a la inactivación por agentes que modifican grupos tiol, como la N-etilmaleimida y el p-cloromercuribenzoato. Esos mismos grupos son alquilados por yodoacetamida, lo que

aunque disminuye la afinidad por Fru 6-P, eleva unas 10 veces la  $V_{max}$ , a través de un fuerte incremento de la  $K_i$  para Fru 2,6-P<sub>2</sub>. Todos estos efectos están de acuerdo con la posible participación de grupos sulfhidrilo en la unión con los azúcares fosfato. Asimismo, se ha visto que en las reacciones de unión a nucleótidos interactúan grupos sulfhidrilo reactivos (El-Maghrabi *et al.*, 1987).

### 1.6.2. Propiedades generales del dominio Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en la enzima hepática

La reacción que cataliza es específica para el fosfato de la posición C-2 de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>. No requiere cationes divalentes y tiene un pH óptimo entre 5.5 y 6.5. Tanto el sustrato, Fru 2,6-P<sub>2</sub>, como el producto de la reacción, Fru 6-P, inhiben la actividad enzimática en rata (Van Schaftingen y Hers, 1982; Stewart *et al.*, 1985). P<sub>i</sub> y glicerol 3-P la activan a concentraciones saturantes (micromolares) del sustrato Fru 2,6-P<sub>2</sub>, comportándose inhibitoriamente a concentraciones más bajas, acciones que se desarrollan antagonizando la unión a Fru 2,6-P<sub>2</sub> y Fru 6-P, respectivamente. P<sub>i</sub> y glicerol 3-P son al parecer necesarios para la actividad bisfosfatasa, *in vivo*, en rata, donde las concentraciones de Fru 2,6-P<sub>2</sub> son del orden micromolar.

Pilkis *et al.* (1983b) postularon que la reacción involucra la formación de una 3-fosfohistidina en la subunidad enzimática. Stewart *et al.* (1985) demostraron que la formación y la desaparición del fosfoenzima intermediario tiene lugar con la necesaria rapidez. Estudios por resonancia magnética nuclear con [<sup>31</sup>P] han confirmado la presencia de este intermediario (Okar *et al.*, 1995). La reacción que se ha postulado se muestra esquematizada en la Figura 1.4 .



**Figura 1.4 . Modelo de reacción postulado para la actividad Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.**

El rango de formación del fosfoenzima intermediario (E~P) tiene al menos dos órdenes de magnitud mayor que el de su hidrólisis. El punto limitante de la reacción parece ser el paso 3, en razón a la aceleración que se da si se elimina la Fru 6-P, así como por fosforilación, proceso responsable de la elevación de la  $K_i$  para Fru 6-P. Esquema basado en El-Maghrabi *et al.*, 1990.

### **1.6.3. Evidencia de dos loci catalíticos**

Se ha sugerido la existencia de dos lugares de unión para Fru 6-P en la enzima bifuncional a partir de las respuestas opuestas de las dos actividades de la enzima al  $P_i$  (Kountz *et al.*, 1986; Stewart *et al.*, 1985). Además, las dos actividades parecen presentar diferentes mecanismos de catálisis, la de la bisfosfatasa por la formación de una fosfohistidina intermediaria, y la de la quinasa a través de una transferencia directa de un grupo fosfato entre ATP y Fru 6-P. La independencia entre los donadores de fosfato para ambas reacciones o el diferente pH óptimo durante la catálisis son razones que se suman a la hora de concluir que la unión de la Fru 6-P a la enzima bifuncional sucede en dos lugares diferentes. Físicamente ambas actividades también se presentan separadas, habiendo sido expresadas en *Escherichia coli* por separado (Tauler *et al.*, 1988; Tauler *et al.*, 1989).

### **1.6.4. Estructura de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de rata**

La 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de rata es un homodímero, en el que cada una de las dos cadenas peptídicas consta de 470 aminoácidos (Lively *et al.*, 1988). El ADN<sub>c</sub> correspondiente al mensajero hepático de rata tiene una secuencia codificante de 1410 pb (Colosia *et al.*, 1987; Darville *et al.*, 1987).

El conocimiento de la secuencia primaria reveló que en el extremo N-terminal se encuentra la zona reguladora de ambas actividades. A continuación se sitúa el dominio quinasa, mientras que la mitad C-terminal alberga la actividad bisfosfatasa. Esta estructura parece ser el resultado de una fusión génica entre los dominios bisfosfatasa y quinasa, que han dado lugar a la enzima bifuncional (Bazan *et al.*, 1989).

#### **1.6.4.1. REGULACION POR FOSFORILACION**

La enzima bifuncional hepática de rata es un buen sustrato para la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, que fosforila la Ser<sup>32</sup> incluida en la secuencia <sup>25</sup>VLQRRRGSSIQ<sup>36</sup> (Murray *et al.*, 1984). Ninguna otra quinasa estudiada se ha visto capaz de fosforilar a la enzima. La secuencia consenso RXXDXXX<sub>Y</sub>, situada en los residuos 352 a 358, podría ser también reconocida por proteínas quinasas específicas de tirosinas, aunque ni *in vivo* ni *in vitro* hay evidencia de que sea fosforilada por tales quinasas (Darville *et al.*, 1987).

La isoenzima hepática de rata resulta afectada, en sus dos actividades, por fosforilación/defosforilación. La fosforilación inhibe la actividad 6-PF 2-K a través de un incremento de 20-30 veces de la  $K_m$  para Fru 6-P, así como disminuyendo la  $V_{max}$  a un 50-65% (Pilkis *et al.*, 1995). Simultáneamente se activa la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa a través de un aumento de 2-3 veces en la  $V_{max}$ , probablemente a través de un incremento en el rango de disociación de Fru 6-P del complejo E~P•Fru 6-P. Dado que la fosforilación de la Ser<sup>32</sup> de la enzima de hígado de rata, ubicada en una zona previa al dominio quinasa, afecta a las dos actividades de la enzima bifuncional, cabe suponer que los extremos amino y carboxilo terminal de la enzima se comunican. Esta posible comunicación entre los extremos parece tener un papel fundamental en las actividades de la enzima. Se ha postulado que la defosforilación del homodímero provoca la interacción de los extremos amino y carboxilo de las dos subunidades con los centros activos, proceso que promueve inhibición de la actividad bisfosfatasa y activación de la quinasa (Pilkis *et al.*, 1995).

Argaud *et al.* (1995) atribuyen a la regulación por fosforilación de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa más relevancia que al control por la cantidad de enzima.

Fundamentalmente la fosfatasa 2A y también la 2C son las actividades encargadas de la defosforilación de la enzima bifuncional de hígado de rata, reactivando 6-PF 2-K e inhibiendo Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Hasta el momento se desconoce que haya regulación hormonal o por metabolitos de este paso, aunque hay indicios de que alguna fosfatasa podría ser activada por elevados niveles de insulina (Assimacopoulos y Jeanrenaud, 1990).

La isoforma de hígado de pollo también ve afectada ambas actividades por fosforilación (Pilkis *et al.*, 1995). Salvo la isoenzima de corazón, el resto de isoformas en mamíferos han perdido la región fosforilable, como ocurre en músculo y testículo, o sus actividades no se ven afectadas por fosforilación, caso del cerebro.

La forma de 58 kDa de corazón de bovino posee, en cambio, dos residuos fosforilables, Ser<sup>466</sup> y Thr<sup>475</sup>, situados en la región C-terminal del dominio bisfosfatasa. La fosforilación de la Ser por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> activa la quinasa sin afectar la actividad bisfosfatasa, mientras que la fosforilación de la Thr por la quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> no afecta a ninguna actividad. La isoforma de corazón de 54 kDa no presenta ninguno de estos puntos de fosforilación, aunque al igual que la de 58 kDa, es fosforilable, por la quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, en Ser<sup>29</sup> (Rider *et al.*, 1992).

La enzima de corazón de rata es fosforilable por ambas quinases en las serinas en posiciones 466 y 483 (Depre *et al.*, 1993).

Por su parte la isoenzima PFK26 de levadura también puede ser fosforilada por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> en la Ser<sup>644</sup> de la zona C-terminal, activando su única actividad, la quinásica (François *et al.*, 1988).

Por otra parte, se ha visto que la enzima de hígado de rata es ribosilada por una ADP-ribosil transferasa específica de Arg (Rosa *et al.*, 1995), preferentemente en los residuos de las posiciones 29 y 30. La ribosilación bloquea la fosforilación dependiente de AMP<sub>c</sub>, disminuyendo la actividad quinasa sin afectar a la actividad bisfosfatasa. Se ha interpretado este proceso como un mecanismo regulador a nivel post-transcripcional con un papel fisiológico todavía no esclarecido.

#### 1.6.4.2. RESIDUOS IMPORTANTES EN EL MECANISMO DE REACCION DEL DOMINIO QUINASA

El alineamiento y la comparación de las secuencias de las 6-PF 1-K bacterianas, las 6-PF 1-K de mamíferos y el dominio N-terminal de las 6-PF 2-K, muestran una gran similitud estructural y funcional. Los residuos <sup>148</sup>EHGY-6(aa)-SICND<sup>162</sup> de la 6-PF 2-K presentan un elevado grado de similitud con la secuencia <sup>114</sup>EHGF-7(aa)-TIDND<sup>129</sup> de 6-PF 1-K de *Bacillus stearothermophilus*, secuencia que forma parte del centro activo y que es altamente conservada en todas las 6-PF 1-K (Shirakihara y Evans, 1988). Estos residuos se considera que formarían parte del centro activo en la enzima 6-PF 2-K.

El aminoácido Asp<sup>127</sup> de las 6-PF 1-K, clave en el mecanismo de reacción, se corresponde con la Cys<sup>160</sup> en 6-PF 2-K (El-Maghrabi *et al.*, 1987), en donde actuaría como un catalizador tipo base débil. En la enzima de músculo esquelético este residuo se corresponde con Cys<sup>138</sup>, quien para Crepin *et al.* (1993) no tiene papel de catalizador base, aunque Kurland *et al.* (1993) le atribuyen de todas formas un papel importante en el centro activo, dado que su sustitución por Ala conduce a la supresión de la actividad quinasa. Abundando en la posible importancia de esta Cys, se ha observado que este residuo se conserva en la PFK26 de levadura, enzima con actividad exclusivamente quinasa (Kretschmer y Fraenkel, 1991). Sin embargo, no se encuentra en la FBP26 de este organismo, cuya actividad es fundamentalmente bisfosfatasa (Kretschmer *et al.*, 1992). En músculo esquelético de rata, los residuos Arg<sup>82</sup> y Asp<sup>108</sup> y Asp<sup>140</sup> también parecen desempeñar un papel importante en la catálisis (Bazan *et al.*, 1989 y El-Maghrabi *et al.*, 1990).

El residuo Asp<sup>129</sup> de la 6-PF 1-K bacteriana, esencial en la catálisis por unión a Mg<sup>2+</sup>, se alinea con la Asp<sup>162</sup> en la 6-PF 2-K, aunque Crepin *et al.* (1993) al sustituirla por Ser no observó cambio en la V<sub>max</sub>.

Por homología con las 6-PF 1-K bacterianas, Arg<sup>195</sup>, Arg<sup>230</sup> y Arg<sup>238</sup> de 6-PF 2-K, se consideraron como los posibles candidatos en la unión del sustrato. El primero es un residuo que se ha mostrado crítico en la unión a Fru 6-P a través de una interacción muy específica. Los dos últimos, importantes en la unión a Fru 6-P en 6-PF 1-K, se encuentran involucrados fundamentalmente en la unión a ATP (Li *et al.*, 1992a), con la participación del Asp<sup>130</sup>, implicado en la unión a Mg<sup>2+</sup> (Rider *et al.*, 1994). El-Maghrabi *et al.* (1987) han atribuido un papel importante en la unión del sustrato a las cisteínas situadas en las posiciones 107, 160, 183 y 198, ya que al reaccionar con yodoacetamida se reducía en gran medida la capacidad de unión a Fru 6-P. Recientemente, Rider *et al.* (1995), han señalado a las argininas de las posiciones 104 y 225, además de la Arg<sup>195</sup>, como los residuos más importantes en la unión a Fru 6-P.

En la forma hepática de pollo la unión a Fru 6-P se lleva a cabo a través de residuos diferentes, siendo la Lys<sup>200</sup> (Glu en mamíferos) el candidato principal para la unión (Lange *et al.*, 1991). La cinética frente al sustrato también es diferente, hiperbólica en ausencia de P<sub>i</sub> en pollo y sigmoidal en rata (Bazan y Fletterick, 1990).

La secuencia <sup>48</sup>GLPARGKT<sup>55</sup>, que se encuentra conservada en las fosfofructoquinasas conocidas, es similar al patrón descrito para unión de ATP a proteínas (GXXXXGKT/S), (Walker *et al.*, 1982; Pain, 1986). Una segunda secuencia característica de unión a nucleótidos se asocia con la secuencia <sup>121</sup>REEGHVAVFD<sup>130</sup>, que crearía una cavidad cuyo papel sería el ser centro de unión para nucleótidos.

De los diversos efectores (ADP, GDP y P<sub>i</sub> como activadores y el inhibidor fosfoenolpiruvato) que afectan la actividad 6-PF 1-K bacteriana por unión en un mismo *locus* alostérico, sólo el P<sub>i</sub> mantiene un efecto importante sobre el *locus* derivado del bacteriano en el dominio 6-PF 2-K (Li *et al.*, 1992a).

#### 1.6.4.3. RESIDUOS IMPORTANTES EN EL MECANISMO DE REACCION DEL DOMINIO BISFOSFATASA

Se han encontrado fuertes analogías estructurales y funcionales entre el dominio bisfosfatasa de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa y las fosfoglicerato mutasas y fosfatasa ácidas (Pilkis *et al.*, 1995).

Por analogía con las mutasas, todo apunta a que es la His<sup>258</sup> el fosfoceptor en la forma hepática de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de rata. El entorno de este residuo, presenta una gran similitud con el centro activo de las fosfoglicerato mutasas, alrededor de la His<sup>8</sup> (Blundell *et al.*, 1987; Pilkis *et al.*, 1987). En posición 392 y espaciada 134 residuos, se ha encontrado otra His que acompañaría a His<sup>258</sup> en el centro activo de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Este espacio entre las histidinas, de aproximadamente unos 170 aminoácidos, también se encuentra en las isoformas de cerebro y músculo humano, así como en las bisfosfoglicerato mutasas de ratón, conejo y humana.

La sustitución de His<sup>258</sup> por Ala promueve la pérdida de actividad Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, al impedir la formación del fosfointermediario. La sustitución de His<sup>392</sup> por Ala da lugar, asimismo, a un descenso de la actividad entre 50 y 100 veces y de la formación del fosfointermediario de 1500 veces (Tauler *et al.*, 1990). Otro residuo cercano a éstos en la configuración espacial, el Glu<sup>327</sup>, conservado en todas las bisfosfatasa y mutasas, parece también importante. Su sustitución por Ala, Gln o Asp, disminuye la actividad 50 veces y la formación del intermediario 1000 veces (Lin *et al.*, 1992a).

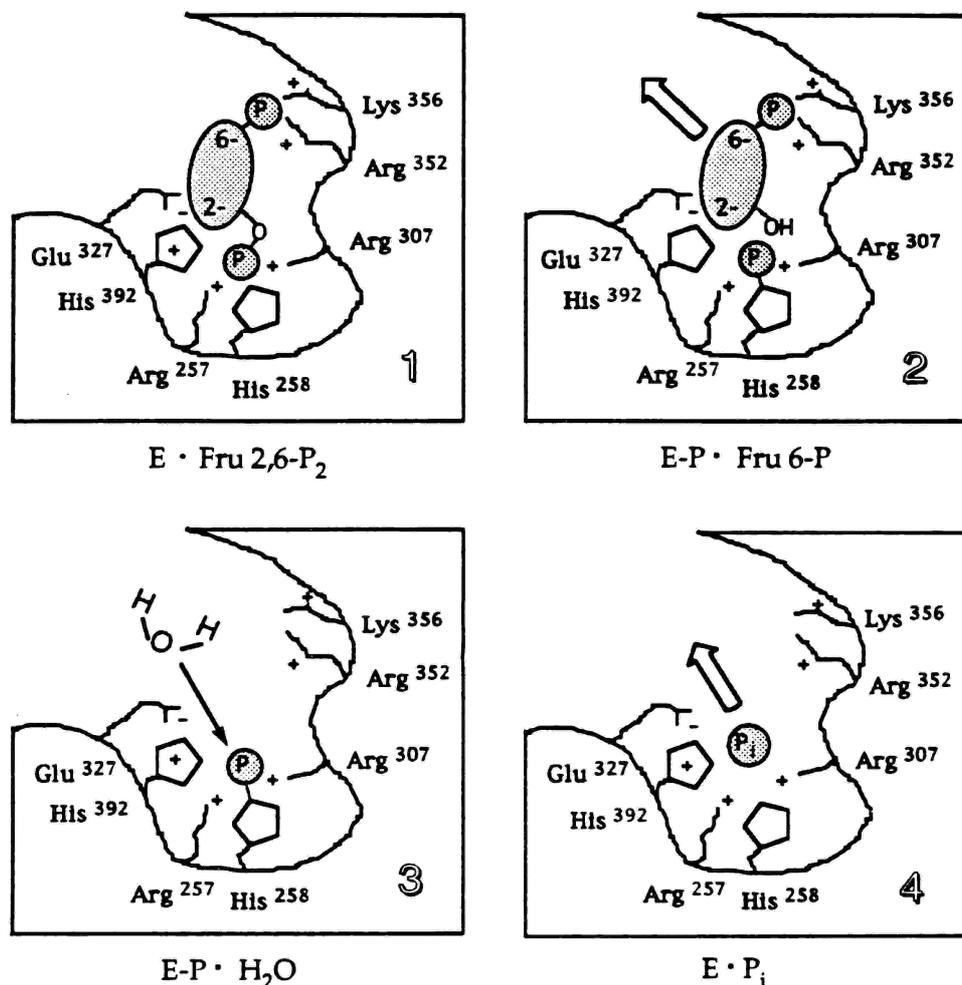
La forma PFK26 de levadura, sin actividad bisfosfatasa, carece del residuo que actúa como fosfoceptor en la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de rata, His<sup>258</sup>, presentándola sustituida por una Ser (Kretschmer *et al.*, 1993).

La Pro<sup>160</sup> de la fosfoglicerato mutasa se corresponde a la Pro<sup>376</sup> en la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Este residuo contribuye al correcto plegamiento de la estructura de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, estabilizando la fijación de las cadenas y en la mitad C-terminal de la enzima de rata (Bazan *et al.*, 1989). Tres residuos conservados entre las diferentes mutasas, Arg<sup>7</sup>, Arg<sup>59</sup> y Glu<sup>86</sup> en levadura, que parecen potencialmente importantes para su actividad, se encuentran análogamente en las posiciones 257, 307 y 327 de la bisfosfatasa (Bazan y Fletterick, 1990).

El dominio bisfosfatasa consta de 220 aminoácidos, mientras que las mutasas de levadura y humana presentan 240. La diferencia estriba en que se habría producido una delección en la cola de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Esta zona está implicada en conferir especificidad de sustrato en la fosfoglicerato mutasa, lo que podría explicar la incapacidad de ésta en la utilización de Fru 2,6-P<sub>2</sub> como sustrato (Tauler *et al.*, 1987).

La estructura tridimensional del dominio bisfosfatasa (residuos 251-440) de la enzima hepática de rata, que ha sido resuelta recientemente, muestra una estructura espacial similar a la de las mutasas (Lee *et al.*, 1994b) y confirma el modelo comentado. En el centro activo aparecen los anillos imidazol de los residuos

His<sup>258/392</sup>, separados 4 Å. A 3Å de la segunda se halla Glu<sup>327</sup>. En la figura 1.5 se muestra el esquema modelo de catálisis para la reacción de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa propuesto por Pilkis *et al.* (1995).



**Figura 1.5 . Modelo de catálisis en la reacción de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.**

*Paso 1:* La donación de un protón, por parte de His<sup>392</sup>, sobre el enlace fosfodiéster en C-2 de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> (en punteado) permite la formación del fosfoenzima intermediario (E-P) entre el fosfato en C-2 del sustrato e His<sup>258</sup> de la enzima, proceso que es facilitado por la presencia de cargas + (Arg<sup>257</sup> y Arg<sup>307</sup>). Lys<sup>356</sup> y Arg<sup>352</sup> ayudan, asimismo, al posicionamiento del sustrato en el centro catalítico, por interacción con el grupo fosfato de C-6 de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>. *Paso 2:* Fru 6-P permanece unida a través de las uniones en C-6, mientras que Glu<sup>327</sup> mantiene protonada a la His<sup>392</sup>. *Paso 3:* Hidrólisis del intermediario fosfoenzimático. Glu<sup>327</sup> en presencia de H<sub>2</sub>O puede actuar como base, dejando así de estabilizar a His<sup>392</sup>, quién a su vez desestabilizaría la unión entre el fosfato e His<sup>258</sup> por captación de un protón. *Paso 4:* El fosfato es expulsado del centro catalítico por Arg<sup>257</sup> y Arg<sup>307</sup>. El modelo presentado en la figura ha sido tomado de Pilkis *et al.* (1995)

Se ha propuesto que los residuos 333-361 formarían un brazo superficial sobre el centro activo (Bazan *et al.*, 1989), hecho confirmado mediante la resolución de la estructura cristalina (Lee *et al.*, 1994b). Entre estos residuos se encuentran 8

Glu, 2 Asp y 4 aminoácidos básicos (Arg<sup>352</sup>, Lys<sup>356</sup>, Arg<sup>358</sup> y Arg<sup>360</sup>). Los dos primeros aminoácidos básicos intervienen en la unión al grupo fosfato del sustrato/producto en C-6 (Li *et al.*, 1992b y 1992c), mientras que Arg<sup>360</sup> contribuye a la unión al grupo fosforilo en C-2 de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. El residuo Arg<sup>358</sup> no parece estar implicado en mecanismos de unión o catálisis (Li *et al.*, 1992b). Otros dos residuos, Arg<sup>257</sup> y Arg<sup>307</sup>, parecen importantes en el contacto en C-2 (Lin *et al.*, 1992b). En la isoforma de cerebro bovino, Arg<sup>307</sup> está sustituida por Ser, siendo al parecer responsable de la elevada K<sub>m</sub> para Fru 2,6-P<sub>2</sub>, 2000 veces superior al valor observado en rata (Pilkis *et al.*, 1995).

La actividad bisfosfatasa no hidroliza nucleótidos, aunque en la región del centro activo se encuentra una secuencia similar al motivo característico de unión a nucleótidos. Lee *et al.* (1994a) al expresar el dominio Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en *Escherichia coli*, han observado activación por ATP y GTP a concentraciones saturantes de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, e inhibición por competición a concentraciones subsaturantes de sustrato. La unión a nucleótidos parece por tanto posible, aunque innecesaria para la actividad.

#### **1.6.5. Genes de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa**

Las múltiples isoformas de la enzima bifuncional presentes en mamíferos, son codificadas por al menos cuatro genes.

Un gen codifica para las 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado y de músculo esquelético en rata (Darville *et al.*, 1989; Lange *et al.*, 1992). Situado en el cromosoma X, con un tamaño de 60 Kb y compuesto por 14 exones, genera, además de las isoformas de hígado y músculo esquelético, la forma fetal, a través del uso alternativo de tres promotores diferentes. Además de este gen, otros tres diferentes codifican para las isoformas de corazón (Kitamura y Uyeda, 1987; Tsuchya y Uyeda, 1994), testículo (Sakata *et al.*, 1991) y cerebro (Ventura *et al.*, 1992).

Los 33 aminoácidos del extremo N-terminal de la enzima que preceden al dominio quinasa y en donde se encuentra la Ser<sup>32</sup> fosforilable en la isoforma de hígado, son codificados por un exón adicional. Las isoformas muscular y fetal son resultado de un procesamiento diferente del ARN<sub>m</sub> y no presentan este exón (Lange *et al.*, 1989; Kitamura *et al.*, 1989; Pilkis *et al.*, 1995).

En mamíferos el control de la expresión génica de la forma de hígado/músculo esquelético se encuentra bajo control multihormonal.

Un gen de 22 Kb, localizado en el cromosoma 10, codifica para la forma de corazón (Tsuchya y Uyeda, 1994). Presenta 16 exones, de los que 12 son similares a los de la forma de hígado/músculo esquelético. Los 4 restantes y que marcan la diferencia se encuentran en los extremos. El gen bovino codifica, al menos, 5 mensajeros, de los cuales 3 dan lugar a una proteína de 58 kDa, otro a una de 54 kDa (sin el exón 15) y otro genera una forma truncada de la enzima sin actividad (Vidal *et al.*, 1993). La isoforma de cerebro bovino, con extensas regiones C y N-terminales, da lugar a una proteína de tamaño doble que la de hígado (110 KDa por 55 KDa) (Ventura *et al.*, 1995).

Mientras la forma de cerebro se expresa sólo en tejido nervioso (Ventura *et al.*, 1992 y 1995), el resto se expresan en más de un tejido, aunque predominando siempre una de las isoformas específicas. Así, en hígado de rata, por ejemplo, se pueden encontrar las formas de hígado (mayoritaria), músculo esquelético y corazón. En músculo, además de la isoenzima muscular, se puede encontrar la forma hepática. La isoforma de corazón se encuentra también en cerebro. La naturaleza de las señales que gobiernan la expresión y los promotores específicos tisulares es aún poco conocida, así como está por esclarecer cuál es el papel fisiológico de la presencia de distintas isoformas en un determinado tejido (Pilkis *et al.*, 1995).

#### 1.6.5.1. CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD 6-PF 2-K/FRU 2,6-P<sub>2</sub>ASA A CORTO PLAZO

A corto plazo, las actividades de la enzima bifuncional de hígado están reguladas a través de cambios covalentes por fosforilación-defosforilación. La sensibilidad de la enzima para ser sustrato fosforilable está modulada por ligandos (apartado 1.6.). La fosforilación de la enzima se lleva a cabo fundamentalmente a través de estimulación hormonal vía AMP<sub>c</sub> (Pilkis y Claus, 1991).

El glucagón disminuye los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, vía fosforilación dependiente de AMP<sub>c</sub> de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa (Richards y Uyeda, 1982, Pilkis *et al.*, 1983a y Bartrons *et al.*, 1983).

Assimacopoulos y Jeanrenaud (1990) han observado que la insulina promueve la defosforilación de la enzima bifuncional hepática, proceso que podría ser el resultado de la activación de una o más fosfatasa.

Richards y Uyeda (1982) indican que las catecolaminas reducen los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> a través de un mecanismo  $\alpha$ -adrenérgico. Contrariamente, Pilkis y Claus

(1991) sostienen que los efectos  $\alpha$ -adrenérgicos son irrelevantes en comparación con los mediados por glucagón o  $\beta$ -agonistas, lo que es consistente con el hecho de que la enzima no resulte fosforilada por proteínas quinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ .

#### 1.6.5.2. CONTROL HORMONAL DE LA EXPRESION GENICA DE 6-PF 2-K/FRU 2,6-P<sub>2</sub>ASA

A largo plazo, la regulación de los niveles de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa parece resultado de una serie de mecanismos que incluyen el control de la transcripción por glucocorticoides e insulina, así como efectos transcripcionales, post-transcripcionales y/o de degradación de la enzima.

Aunque tanto la actividad como la concentración de la enzima decrecen en ratas ayunadas o diabéticas, el mensajero hepático permanece sin alteración en rata (Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1988). En cambio, durante la realimentación y tras la inyección de insulina incrementan tanto la concentración de proteína como su ARN<sub>m</sub>. Parece, por tanto, que en rata la acción de la insulina, además de estimular la transcripción génica, puede afectar al procesado del mensajero y/o a la traducción, así como quizás a la degradación de la proteína. La inyección de glucagón disminuye los niveles de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa y de su ARN<sub>m</sub> (Rosa *et al.*, 1993), proceso que fundamentalmente se desarrolla por inhibición de la transcripción del gen y quizás por disminución de la estabilidad del mensajero.

Los niveles de proteína y ARN<sub>m</sub> descienden en el hígado y, en menor medida, en músculo de ratas adrenalectomizadas, restaurándose tras administración de glucocorticoides por aumento de la transcripción génica (Marker *et al.*, 1989). Lo mismo ocurre en ratas tiroidectomizadas tras administración de hormonas tiroideas (Wall *et al.*, 1989). *In vitro*, Kummel y Pilkis (1990) han observado una acción sinérgica de la insulina y la tiroxina sobre la estimulación de la expresión del mensajero de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa por los glucocorticoides.

Tras hepatectomía parcial los niveles del mensajero también descienden, para incrementar fuertemente en la fase de regeneración hepática. Estos cambios correlacionan con cambios a nivel de transcripción (Rosa *et al.*, 1992). Este no es el único caso en que se relaciona un aumento en la expresión génica con proliferación celular, indicando quizás a la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa como el producto de un proto-oncogén (Hue y Rousseau, 1993). Factores como el EGF (factor de crecimiento epidérmico), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante de tipo  $\beta$ ), responsables de proliferación celular en hígado, estimulan la expresión de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en cultivos primarios de hepatocitos (Baulida *et al.*, 1992; Joaquín *et al.*, 1996).

### **1.6.6. Evolucion de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa**

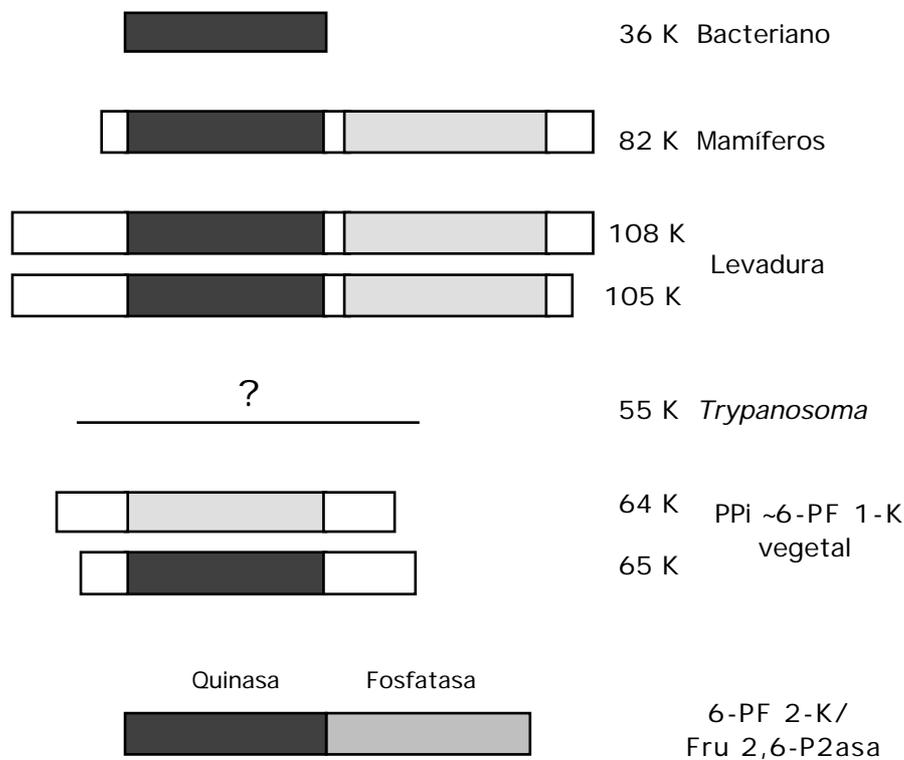
El modelo de desarrollo evolutivo de la enzima bifuncional parte de la existencia de genes ancestrales independientes que codifican para las actividades fosfotransferasa y fosfohidrolasa/mutasa, y que, por vías divergentes, darían lugar a 6-PF 1-K y 6-PF 2-K, y Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, fosfatasas ácidas y mutasas, respectivamente. Por fusión génica se obtendría la enzima bifuncional que contiene las actividades 6-PF 2-K y Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.

Según la hipótesis de la fusión génica propuesta para la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa presente en los vertebrados (El-Maghrabi *et al.*, 1990), sería de esperar que algunos grupos taxonómicos, reflejando el curso de la evolución, poseyeran separadamente las dos actividades. En procariotas no están presentes, mientras que en protozoos, como *Trypanosoma brucei*, se encuentran, en efecto, ambas actividades ubicadas en proteínas diferentes. En levaduras también se encuentran actividades 6-PF 2-K y Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa separadas (Kretschmer, 1992). En plantas, la mayor parte de la actividad Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa se ha encontrado separada de la quinasa, aunque una pequeña porción se encuentra asociada a formas de 6-PF 2-K. La presencia de formas mono y bifuncionales en plantas y levaduras sugiere que aquí es en donde aparecería por primera vez el resultado de la fusión génica. En estas especies también se encuentran formas monofuncionales de 6-PF 2-K y Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa divergentes, cuyo origen permanece poco claro.

El dominio bisfosfatasa de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa está relacionado en cuanto a su función y estructura con las fosfoglicerato mutasas y las fosfatasas ácidas (Pilkis *et al.*, 1995). El progenitor de esta familia debió de haber tenido, en principio, un bolsillo básico, formado por ensamblaje de elementos  $\alpha$  y  $\beta$ , que presentaba afinidad por moléculas pequeñas cargadas negativamente. La formación del centro activo surgiría por la aparición en esta hendidura de uno o dos grupos reactivos, papel que desempeñarían los anillos imidazol de histidina. Divergencias en la superficie y estructura proteica, así como cambios en la periferia del centro activo darían lugar a las diferencias de comportamiento entre las mutasas y las bisfosfatasas.

El análisis de las estructuras de las 6-PF 1-K bacteriana y de mamíferos, de la PP<sub>i</sub>-6-PF 1-K (vegetal) y del dominio quinasa de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, muestra una clara relación. El peso molecular de la subunidad de 6-PF 1-K es 36 kDa en bacterias (Hellinga y Evans, 1985), mientras que 82 kDa, prácticamente el doble, es el encontrado en mamíferos (Lee *et al.*, 1987). Los extremos N y C-terminal son homólogos entre bacterias y mamíferos, por lo que se ha postulado que en

mamíferos, 6-PF 1-K podría ser el resultado de una duplicación génica (Poorman *et al.*, 1984). El gran tamaño de la subunidad de la enzima 6-PF 1-K presente en mamíferos se explica por la necesidad de espacio para los diversos *loci*, activadores (Fru 2,6-P<sub>2</sub>, AMP, ADP) e inhibidores (ATP, citrato). La enzima bacteriana, por el contrario, presenta un sólo centro efector al que pueden unirse tanto activadores (ADP, GDP, P<sub>i</sub>) como el inhibidor fosfoenolpiruvato. Mutaciones puntuales en el extremo C-terminal de la enzima de mamíferos habrían determinado la aparición de *loci* alostéricos, como por ejemplo para Fru 2,6-P<sub>2</sub>, lo que explica que en la enzima bacteriana este metabolito no presente efecto. En la figura 1.7 se representa un esquema de la evolución de las fosfofructoquinasas.



**Figura 1.6 . Evolución de las fosfofructoquinasas.**

A partir de la unidad catalítica bacteriana (■) aparece, en levadura y mamíferos, por duplicación génica y ligación en tándem, una segunda región con papel regulador (▒), que da lugar a la aparición de *loci* efectores resultado de mutaciones puntuales. En el caso de *Trypanosoma* o protozoos no se dispone de información actualmente. La PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K, presente en vegetales, es un heterodímero resultante de duplicación sin ligación. Por último, 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, tiene su origen en la fusión génica de una unidad catalítica fosfofructoquinasa con la de una fosfatasa. Basado en Pilkis y Claus (1991).

La subunidad de la enzima 6-PF 1-K de levadura, heterodimérica, también parece proceder de duplicación y ligación en tándem a partir de un gen ancestral (Heinisch *et al.*, 1989).

Las subunidades y de la de la enzima heterodimérica vegetal PPI~6-PF 1-K, parecen tener un origen común por duplicación sin fusión (Carlisle *et al.*, 1990). La presencia de residuos conservados implicados en la unión a ATP y Fru 6-P, indica que la subunidad es la subunidad catalítica de la enzima vegetal.

La 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa comparte en su dominio 6-PF 2-K la estructura conservada de las fosfofructoquinasas (figura 1.6).

### **1.6.7. Diferencias entre la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa hepática de *Sparus aurata* y las de mamíferos**

La lenta metabolización de la glucosa y la menor capacidad de utilización de los carbohidratos de la dieta como precursores metabólicos, son características diferenciales entre el metabolismo de los peces teleósteos y el de los mamíferos (Cowey y Walton, 1989). Las diferencias metabólicas se hacen patentes en los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, por lo que la regulación de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa aparece como clave para las adaptaciones metabólicas específicas de los peces (Baanante *et al.*, 1991).

La enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de dorada se presenta como una forma dimérica, con 54 kDa de peso molecular para cada subunidad. Las características generales de la enzima son análogas a las de rata. La enzima es, al igual que la de hígado de rata, sustrato fosforilable por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (García de Frutos y Baanante, 1994).

La K<sub>m</sub> para la Fru 6-P de la actividad quinasa de la enzima bifuncional aparece incrementada unas tres veces en la forma hepática de dorada en comparación con la de rata, lo que se traduce en una mayor limitación del flujo glucolítico cuando los niveles de Fru 6-P son bajos. Como en rata, la actividad 6-PF 2-K es inhibida por ADP, citrato y fosfoenolpiruvato. A diferencia de la enzima de rata, la forma defosforilada no es prácticamente inhibida por 3-P glicerol, aunque sí se hace efectiva la inhibición sobre la forma fosforilada. De esta forma, un aumento en el nivel de 3-P glicerol, relacionado con un aumento de los precursores gluconeogénicos, no afecta la enzima no fosforilada, y por tanto no provoca cambios en la concentración de Fru 2,6-P<sub>2</sub> (García de Frutos y Baanante, 1994). Así se consigue mantener unos niveles elevados de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, incluso cuando los componentes mayoritarios de la dieta son aminoácidos, lo que explica la diferencia

de respuesta en sus niveles tras la alimentación con dietas ricas en proteína entre rata (Bois-Joyeux *et al.*, 1986) y peces (Baanante *et al.*, 1991). La falta de inhibición por 3-P glicerol concuerda además con el metabolismo hepático más lipogénico que gluconeogénico descrito para otros teleósteos (Cowey y Walton, 1990). En ayuno, los lípidos son la principal fuente energética en peces teleósteos, con preferencia del glucógeno hepático (Jeziarska *et al.*, 1982). Las grandes reservas lipídicas acumuladas por los peces se utilizan a efectos relacionados con migración y ayuno (Larsson *et al.*, 1990).

La fosforilación de la enzima inhibe la actividad quinasa no por aumento de la  $K_m$  para la Fru 6-P, sino por incremento del efecto inhibitor de 3-P glicerol. Así, los bajos niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> que encontramos en ayuno o por alimentación con dietas ricas en lípidos (Bonamusa *et al.*, 1992), pueden ser consecuencia de la fosforilación de la enzima y de la activación de la lipólisis (Kountz *et al.*, 1986; Steffens, 1989).

La enzima de dorada es la única que presenta cooperatividad negativa para el ATP, característica que no parece tener repercusiones en la actividad enzimática, dado que la  $K_m$  para el ATP es unas diez veces inferior al valor de su concentración fisiológica. Por otra parte, mientras en rata la inhibición por sustrato es de tipo mixto, en *Sparus aurata* simplemente se desarrolla por competición con el sustrato Fru 6-P. En dorada, fosfoenolpiruvato y citrato ejercen sus efectos por unión a centros diferentes (García de Frutos y Baanante, 1994).

La poca sensibilidad de la enzima purificada de hígado de dorada a 3-P glicerol, junto a otras características, como el peso molecular, el comportamiento durante el proceso de purificación y la baja  $K_m$  para el ATP, recuerdan a las características de la isoforma muscular de la enzima de rata.



## **2. MATERIALES Y METODOS**



## 2.1. ANIMALES UTILIZADOS EN LA EXPERIMENTACION

Como animal de experimentación hemos utilizado la dorada, *Sparus aurata*, pez perteneciente a la familia Sparidae. Se trata de una especie propia de las aguas cálidas del Atlántico y del Mediterráneo. La dorada es un pez de forma oval, de cabeza voluminosa, que puede llegar a medir 70 cm de longitud y exceder los 5 Kg de peso, caracterizándose por presentar una mancha dorada entre los ojos, así como otra negra, normalmente subrayada de rojo, en el opérculo.

Suele encontrarse en pequeños grupos, en fondos litorales rocosos con vegetación, entre 5 y 30 metros de profundidad. En primavera y verano pueden encontrarse formando grandes bancos en aguas salobres, desembocaduras de ríos y lagunas salinas.

Siendo un pez básicamente carnívoro, su dieta se basa fundamentalmente en la ingestión de crustáceos y moluscos, llegando con facilidad a romper las conchas más resistentes gracias a su potente dentadura.

Las doradas se defienden enérgicamente, para lo que se ayudan de fuertes espinas que presentan en las aletas, adquiriendo una coloración aposemática típica en sus estadios de agresión.

Como espárido es una especie hermafrodita proterándica, sin diferenciación sexual en su fase juvenil hasta el primer año de vida, a partir del cual se comportan funcionalmente como machos durante 2 ó 3 años, periodo al que sigue una inversión de sexo, para pasar a comportarse definitivamente como hembras.

Su carne ya era muy apreciada por griegos y romanos, quienes las criaban en viveros inmensos. Actualmente la actividad económica de pesca y cultivo de la dorada es elevada en los países mediterráneos europeos.

## 2.2. TOMA DE MUESTRAS

La manipulación con fin experimental de animales en general, y especialmente de peces, no es un proceso fácil, debiendo evitarse en la medida de lo posible procesos anóxicos o de estrés que podrían modificar los niveles de los parámetros objeto de estudio.

Doradas en fase alevín o juvenil de entre aproximadamente 1 y 10 g de peso, procedentes de Aquadelt, S.A. y Diagona, S.A. (Delta del Ebro) y Tina Menor, S.A. (Santander), fueron mantenidas a 20°C en acuarios, en donde eran alimentadas hasta la adquisición del peso adecuado para el inicio de los experimentos. En los tanques se evitaba el

crecimiento de microorganismos haciendo uso de un circuito cerrado provisto de filtros y lámparas de luz ultravioleta. El fotoperiodo fue regulado a través de un ciclo de oscuridad/luz de 12/12 horas. Los peces fueron alimentados o ayunados en función del tipo de experimento realizado (especificados en el apartado de *Resultados*).

En nuestro caso el método utilizado para la toma de muestras fue el que a continuación se describe:

Previo a su sacrificio, los peces, de entre 20 y 50 g de peso aproximadamente - siempre en fase juvenil-, se retiran del acuario y se depositan en una cuba de menor tamaño con agua marina aireada y MS-222 (anestésico sedante) en una dilución 1:15000. De esta forma, tras 3 ó 4 minutos los peces quedaban sedados, tranquilizados y dormidos sobre el fondo de la cubeta, con la respiración ralentizada. En esos momentos los peces estaban aptos para ser manipulados.

El sacrificio era inmediato por corte cervical (decapitación), proceso que incluía pinchar el corazón y proceder así a tomar la sangre con la ayuda de un tubo capilar o jeringa, que previamente había estado en contacto con una solución de citrato sódico al 3%. El volumen de sangre obtenido era en general pequeño, por lo que procedíamos a hacer un *pool* con la sangre obtenida de cada individuo para cada grupo de experimentación. La sangre se dejaba a temperatura ambiente un tiempo no superior a 30 minutos, hasta conseguir la retracción del coágulo. Posteriormente se centrifugaba a 3000g durante 10 minutos, para tomar de esta forma el suero separado de los restos celulares sedimentados. Los sueros así obtenidos fueron conservados congelados a -20°C hasta su análisis.

Tras la toma de muestra de sangre, el pez era abierto ventralmente a fin de extraer el hígado, que era lavado en solución salina al 0.9% e inmediatamente congelado por la técnica de *freeze clamping*, mediante el uso de una pinza que presenta sendas placas redondas de aluminio, de 6 cm de diámetro, previamente enfriadas en nitrógeno líquido. Al prensar entre ambas placas el hígado, éste queda instantáneamente congelado, siendo almacenado hasta su uso a -80°C.

## 2.3. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS HEPATICOS

### 2.3.1. Obtención de extractos crudos de hígado para la determinación de proteína total y de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST:

Unos 50 mg de tejido mantenido congelado a -80°C, se pulverizaba y pesaba en tubos de vidrio, previamente tarados y enfriados con nitrógeno líquido, asegurándonos así que la muestra permanecía congelada hasta entrar en contacto con la solución de homogeneización, que era adicionada en una relación peso:volumen de 1:5. La homogeneización se llevó a cabo haciendo uso de un POLYTRON™- PTA 7 (posición 3) durante 30 segundos.

El homogeneizado se centrifugaba a 20000g, durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante recogido era utilizado, el mismo día de su obtención, para la determinación de proteína total, así como para ensayar las actividades enzimáticas: 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST.

*Solución de homogeneización:*

Tampón Tris-HCl, pH 7.5	50 mM
EDTA	4 mM
Fluoruro sódico	50 mM
Sacarosa	250 mM
PMSF	0.5 mM
DTT	1 mM

### 2.3.2. Obtención de extractos crudos para la determinación de actividad e inmunodetección de 6-PF 2-K:

Aproximadamente 30 mg de hígado congelado y pulverizado era homogeneizado, como se ha descrito anteriormente, en relación 1:10 (P/V) en solución amortiguadora.

A la solución homogeneizada se le añadía un 5% PEG 6000. Después de 15 minutos en hielo, se procedía a centrifugar durante 20 minutos a 20000g a 4°C. Al sobrenadante resultante se le añadía PEG 6000 hasta tener una concentración final del 15%. Tras centrifugar en las mismas condiciones, se recogía el precipitado en solución de resuspensión.

En los extractos así obtenidos se determinó la actividad 6-PF 2-K en el mismo día de su elaboración. Asimismo se utilizaron dichos extractos para llevar a cabo la inmunodetección por la técnica de *Western blot*.

*Solución amortiguadora:*

Tampón Hepes, pH 7.8	20 mM
KCl	100 mM
EDTA	5 mM
EGTA	5 mM
DTT	1 mM

*Solución de resuspensión:*

Tampón Hepes, pH 7.6	20 mM
KCl	100 mM
EDTA	0.1 mM
DTT	1 mM

### **2.3.3. Obtención de extractos para la determinación de glucógeno:**

A partir de unos 40 mg de hígado congelado y pulverizado, se procedía a homogeneizar en presencia de KOH al 30%, adicionado en una relación peso:volumen de 1:4. El proceso de digestión del tejido se realizó dejando actuar la base a 100°C de temperatura durante 20 minutos.

Posteriormente se le añadían 1.25 volúmenes de etanol al 95% para conseguir la precipitación del glucógeno, para lo que se dejaba reposar a -20°C durante 24 horas. Para aislar el precipitado, se procedía a centrifugar a 6000g por 45 minutos a 4°C y a decantar cuidadosamente luego. El precipitado se resuspendía en agua destilada, y se volvía a precipitar a fin de obtener una mayor pureza del glucógeno.

El glucógeno, una vez resuspendido en agua, era mantenido congelado a -20°C hasta su determinación.

### **2.3.4. Obtención de extractos alcalinos para la determinación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>:**

Dada la estabilidad de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> a pH alcalino (Van Schaftingen *et al.*, 1981), se procedió a este tipo de extracción que permite eliminar productos inestables a pH básico, que como la Fru 1,6-P<sub>2</sub>, podrían interferir en el resultado final.

Unos 30 mg de tejido hepático congelado y pulverizado se homogeneizaban en 50 mM NaOH, en una relación 1:10 P/V, con un sistema POLYTRON™ en posición 3 durante 30 segundos.

Tras calentar a 80°C durante 5 minutos se centrifugaba durante 30 minutos a 20000g, recogiendo el sobrenadante para ser conservado a -20°C hasta el momento de su ensayo.

### **2.3.5. Obtención de extractos ácidos para la determinación de Glu 6-P y Fru 6-P:**

Alrededor de 50 mg de tejido hepático congelado y pulverizado eran homogeneizados con 0.5 ml de una solución al 3.5% de HClO<sub>4</sub>. Tras centrifugar a 20000g 5 minutos se tomaba el sobrenadante, que era neutralizado a pH 6-7 con una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 70%. Este proceso provoca la precipitación de los carbonatos, que posteriormente se retiran por centrifugación a velocidad máxima durante 2-3 minutos en centrifuga de sobremesa. El extracto así obtenido era almacenado congelado hasta su análisis.

## **2.4. ADAPTACION DE TECNICAS ESPECTROFOTOMETRICAS MANUALES A LA DETERMINACION AUTOMATIZADA**

El disponer de un analizador automático *COBAS MIRA S* (Roche) nos ha permitido la adaptación a la metodología automatizada de técnicas espectrofotométricas manuales para la cuantificación de metabolitos y la determinación de actividades enzimáticas.

La utilización de técnicas automatizadas disminuye de forma considerable el tiempo de proceso requerido por los métodos manuales, así como el volumen de reactivos y muestras necesarios. Además, la precisión mejora con la utilización de métodos automatizados, gracias al alimentado automático de muestras y reactivos en las cubetas de reacción, minimizando de esta forma la manipulación.

Las determinaciones de glucosa, lactato y triglicéridos, así como las actividades AST y ALT, fueron llevadas a cabo con *kits* comerciales adaptados para el sistema *COBAS MIRA S* de Roche.

Las cuantificaciones de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, Glu 6-P, Fru 6-P y proteína total, además de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH, fueron adaptadas por nosotros al sistema automatizado *COBAS MIRA S*.

## **2.5. DETERMINACION DE METABOLITOS Y DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS**

### **2.5.1. DETERMINACION DE PROTEINA**

Para la determinación de proteína total en extractos hepáticos se siguió el método de Bradford (1976), adaptado al autoanalizador *COBAS MIRA S*.

La determinación se fundamenta en los complejos formados entre proteína y el reactivo colorante Coomassie Brilliant Blue G-250.

El ensayo se llevaba a cabo a 30°C con 5 µl de muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) en un volumen final de 250 µl, en los que el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad Lab.) se encontraba diluido 5 veces. La absorbancia a 600 nm es seguida durante 100 segundos, interpolándose la resultante en una curva patrón previa efectuada con concentraciones de albúmina sérica bovina entre 0.125 y 1 mg ml<sup>-1</sup>.

### 2.5.2. DETERMINACION DE GLUCOGENO

Esta determinación se basa en el cambio de color del reactivo antrona producido por la presencia de azúcares en un medio ácido, cambio detectable espectrofotométricamente a 620 nm (Carrol *et al.*, 1956).

Para ello 0.5 ml de una disolución acuosa de la muestra (obtenida según el apartado 2.3.3.) se mezclaba mediante agitación con 2.5 ml de reactivo antrona. Se dejaba incubar 10 minutos a 100°C, y tras enfriar en hielo, se registraba manualmente la absorbancia a 620 nm.

La cuantificación se conseguía por el uso de una recta de calibrado con concentraciones de glucosa entre 0.04 y 0.20 mg ml<sup>-1</sup>.

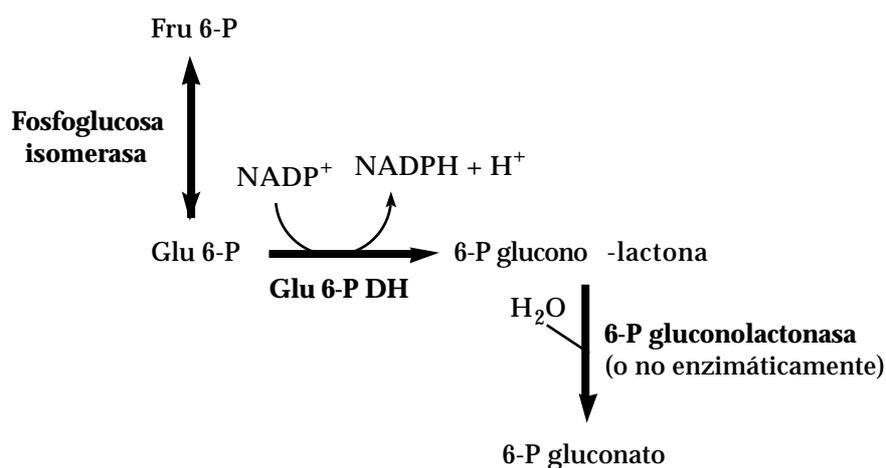
*Reactivo antrona:*

Antrona	0.5 %
Tiourea	1 %
Acido sulfúrico	72 %

### 2.5.3. DETERMINACION DE GLU 6-P Y FRU 6-P

La determinación de estos dos metabolitos, adaptada a la medición automatizada, se basó en el método descrito en Bergmeyer (1984).

**-Fundamento:**



**-Condiciones de ensayo:**

Ambos metabolitos fueron ensayados secuencialmente, a 30°C de temperatura, en un volumen final de reacción de 200 µl compuesto por:

R1:	Trietanolamina, pH 7.6	200 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	NADP	200 mM
R2:	Glu 6-P DH	0.34 U ml <sup>-1</sup>
R3:	Fosfoglucosa isomerasa	1.4 U ml <sup>-1</sup>

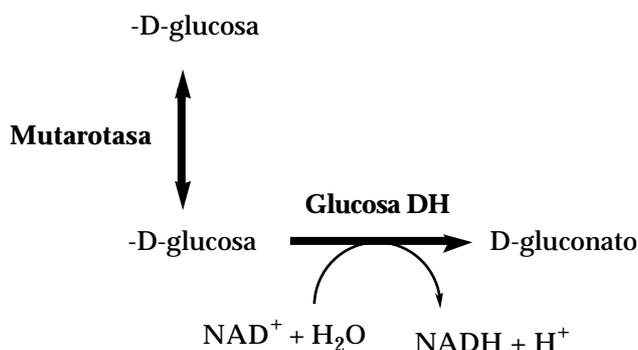
Tras la adición automática de 80 µl de muestra (obtenida según el apartado 2.3.5.) a la mezcla de reacción R1 (114 µl), se incubaba durante 2 minutos 55 segundos. La determinación de Glu 6-P se llevó a cabo previa adición de 2 µl de solución de Glu 6-P DH (R2), registrándose el aumento de absorbancia a 340 nm por formación de NADPH. Pasados 5 minutos 50 segundos de reacción, período suficiente para agotar el contenido de Glu 6-P en la muestra, se procedía a determinar la presencia del metabolito Fru 6-P. Para ello, 4 µl de solución con la enzima fosfoglucosa isomerasa (R3) era añadida, dejando seguir el curso de la reacción otros 5 minutos 50 segundos, tras lo que se registraba el aumento de absorbancia a 340 nm debido a la presencia de Fru 6-P en la muestra.

Ambos incrementos de absorbancia correlacionan con las concentraciones de Glu 6-P y Fru 6-P, respectivamente.

#### 2.5.4. DETERMINACION DE GLUCOSA

Los niveles de glucosa en suero fueron determinados a través de un ensayo comercial (*GLUC GDH*) preparado por la casa Roche.

##### -Fundamento:



**-Condiciones de ensayo:**

La mezcla final de reacción contenía un volumen de 283  $\mu\text{l}$  con:

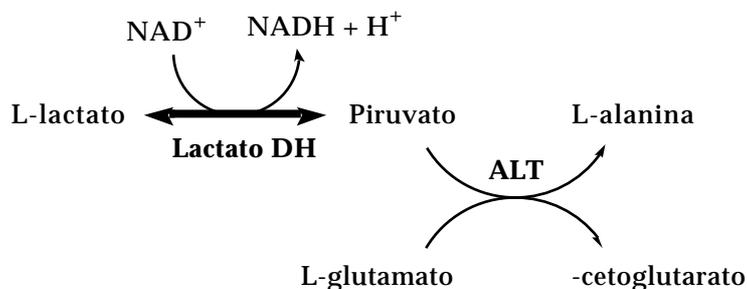
Tampón Fosfatos, pH 7.5	110 mM
NAD	1.6 mM
ClNa	130 mM
Glucosa DH	4 U ml <sup>-1</sup>
Mutarotasa	80 mU ml <sup>-1</sup>

La reacción fue llevada a cabo a 30°C tras adición de 3  $\mu\text{l}$  de muestra sérica a 280  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción, registrándose el incremento en absorbancia a 340 nm por reducción del NAD de la mezcla.

La cuantificación se realizaba por comparación con una recta de calibrado, con concentraciones de glucosa entre 6.25 y 100 mg dl<sup>-1</sup>.

**2.5.5. DETERMINACION DE LACTATO**

El lactato fue determinado utilizando un *kit* comercial (adaptado para sistemas automatizados en *COBAS MIRA S* de la casa Boehringer Mannheim.

**-Fundamento:****-Condiciones de ensayo:**

En 384  $\mu\text{l}$  de volumen final la mezcla de reacción contenía:

Tampón Carbonatos, pH 10	400 mM
NAD	3.6 mM
L-glutamato	50 mM
Lactato DH	30 U ml <sup>-1</sup>
ALT	2 U ml <sup>-1</sup>

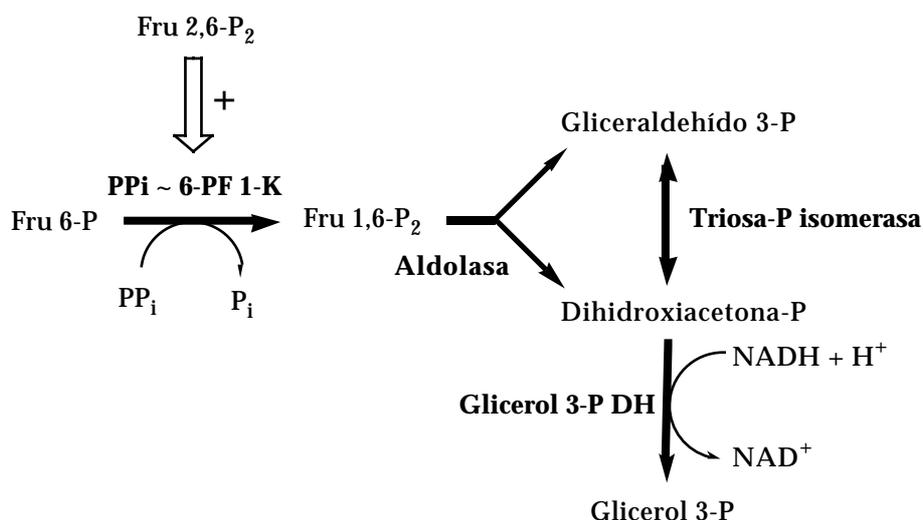
La reacción era iniciada al añadir 4  $\mu\text{l}$  de muestra (suero) a 380 de mezcla de reacción, llevándose a cabo a 30°C y registrando el incremento en absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADH en el curso de la reacción.

La cuantificación se realizaba por comparación con una recta patrón entre 6.25 y 100  $\text{mg dl}^{-1}$  de lactato.

### 2.5.6. DETERMINACION DE FRU 2,6-P<sub>2</sub>

El método utilizado, adaptado al sistema automatizado *COBAS MIRA S* (Metón *et al.*, 1995), es un ensayo basado en el grado de activación por presencia de Fru 2,6-P<sub>2</sub> de la enzima PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K, extraída de patata, capaz de convertir Fru 6-P en Fru 1,6-P<sub>2</sub> (Van Schaftingen *et al.*, 1982 y Van Schaftingen, 1984).

#### -Fundamento:



#### -Condiciones del ensayo:

La mezcla final de reacción (250  $\mu\text{l}$ ) constaba de:

R1:	Tampón Tris-HCl, pH 7.8	50 mM
	Acetato magnésico	2 mM
	NADH	0.2 mM
	Fru 6-P	1 mM
	Glu 6-P	3.5 mM
	PP <sub>i</sub>	0.5 mM
	Glicerol 3-P DH	0.53 U ml <sup>-1</sup>
	Triosa-P isomerasa	2.17 U ml <sup>-1</sup>
	Aldolasa	0.29 U ml <sup>-1</sup>
R2:	PP <sub>i</sub> ~6-PF 1-K	15 mU ml <sup>-1</sup>

Las enzimas auxiliares glicerol 3-P DH, triosa-P isomerasa y aldolasa fueron desaladas previamente a su uso, por centrifugación a velocidad máxima durante 3 minutos en centrífuga de sobremesa. Las enzimas sedimentadas se resuspendían en 50 mM tampón Tris-HCl pH 7.8

Tanto la Glu 6-P como la Fru 6-P fueron previamente tratadas en medio ácido para eliminar posibles contaminaciones de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, que podrían interferir en el resultado final. Para ello nos basamos en el método de Kruger *et al.* (1983), según el cual se debe disminuir el pH de las preparaciones de Glu 6-P y Fru 6-P hasta 1.5-2 con HCl, incubar a 30°C durante 30 minutos, y proceder posteriormente a neutralizar con NaOH.

Previo al desarrollo de la reacción se incubaban 245 µl de la mezcla de reacción R1 con 2.5 µl de muestra (obtenida según el apartado 2.3.4.) durante 125 segundos a 30°C, iniciándose entonces el ensayo con la adición de 2.5 µl de solución de PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K (R2), registrándose cada 25 segundos, hasta un total de 7 minutos 5 segundos, el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADH de la mezcla.

La concentración de Fru 2,6-P<sub>2</sub> en µmol es calculada por correlación con el grado de activación en unidades de la enzima PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K, de la que una unidad se definió como la actividad necesaria para consumir 2 µmol de NADH por minuto. Para llevar a cabo el cálculo se estableció una curva patrón para determinar concentraciones de Fru 2,6-P<sub>2</sub> entre 0.1 y 0.00625 µM.

#### **2.5.6.1. Adaptación de la cuantificación de Fru 2,6-P<sub>2</sub> al sistema automatizado:**

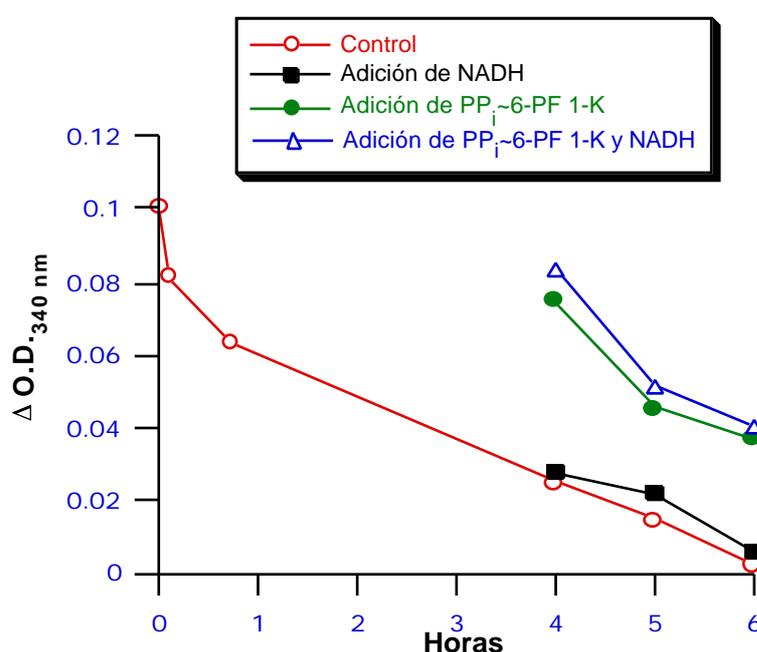
El método más comúnmente usado para la cuantificación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, manual y basado en la activación de la enzima PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K de patata por el metabolito, inicia la reacción con PP<sub>i</sub>. La automatización del proceso manual, en el que la PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K se incluye en la mezcla de incubación previa a la reacción (Van Schaftingen *et al.*, 1982), presentó graves problemas de inestabilidad para el ensayo, viéndose disminuida la capacidad de detección del metabolito a lo largo del tiempo.

Con el fin de comprobar a qué era debida tal inestabilidad se diseñó el siguiente experimento: se prepararon diferentes mezclas de reacción, una con todos los componentes menos NADH, otra con todos excepto PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K, una tercera con todos salvo NADH y PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K, y una última que contenía tanto NADH como PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K y que sería tomada como control a lo largo del experimento. Durante el transcurso del ensayo las mezclas fueron mantenidas a 4°C.

Como se puede observar en la figura 2.1, la mezcla control pierde su funcionalidad rápidamente. La pérdida llega a ser del 40% 45 minutos después de haber constituido el reactivo, alcanzando un 75% a las 4 horas y más del 90% a las 6 horas.

Después de 4 horas de haber sido preparadas las diferentes soluciones, les fueron adicionados los componentes necesarios en cada caso para constituir el reactivo completo, siendo utilizadas a continuación.

El resultado fue hartamente revelador. Mientras la adición de NADH no comportó ninguna mejora, la adición de  $PP_i\sim 6\text{-PF 1-K}$  restableció el 75% de la absorbancia obtenida a tiempo 0, llegando al 85% en el caso de la adición de NADH y  $PP_i\sim 6\text{-PF 1-K}$  juntos.



**Figura 2.1 . Estabilidad de los reactivos en el tiempo.**

Se muestran las absorbancias obtenidas a 340 nm al analizar una concentración conocida (0.5 nM) de Fru 2,6- $P_2$  en la cubeta de ensayo, a diferentes tiempos, utilizando  $PP_i$  como reactivo iniciador. Una mezcla de reacción fue preparada a tiempo 0 (control). Otras tres soluciones se prepararon simultáneamente, una carente de NADH, otra de  $PP_i\sim 6\text{-PF 1-K}$  y una tercera carente de ambos compuestos. Tales compuestos fueron añadidos 4 horas después para completar el reactivo de análisis. Durante todo el experimento todas las soluciones fueron mantenidas a 4°C. Cada valor es la media de dos determinaciones ensayadas según el método manual.

Así, pudimos concluir que el principal responsable en la pérdida de capacidad de reacción era la dilución de la enzima  $PP_i\sim 6\text{-PF 1-K}$  en la mezcla principal de reacción. De esta forma, en el método automatizado, debido a sus especiales características, la enzima  $PP_i\sim 6\text{-PF 1-K}$  debía de ser mantenida aparte, pasando a ser usada como reactivo iniciador de la reacción, función ejercida por el  $PP_i$  en los métodos manuales.

Conseguimos así una estabilidad en el tiempo, de al menos 2 horas. Como queda reflejado en la tabla 2.1, a las 3 horas de haber preparado la mezcla de ensayo la pérdida de sensibilidad era de tan sólo de un 2.2% respecto a los valores obtenidos a tiempo 0. Periodos más prolongados dan lugar a un deterioro evidente.

Tiempo (Horas)	0	1	3	5	6
Absorbancia a 340 nm	0.0547	0.0550	0.0535	0.0484	0.0476
% Desviación		+1.01	-2.19	-11.52	-12.98

**Tabla 2.1 . Estabilidad de la mezcla de reacción una vez preparada y mantenida a 4°C.**

Como reactivo iniciador se usó PP<sub>i</sub>-6-PF 1-K, estando el resto de componentes de la reacción incluidos en una mezcla separada. En la mezcla de reacción final el contenido de Fru 2,6-P<sub>2</sub> era 0.5 nM. Cada valor es la media de dos determinaciones ensayadas según el método automatizado a diferentes tiempos, manteniendo siempre los reactivos a 4°C.

Mientras el límite de detección del método de determinación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, 0.016 pmol, que corresponde a una concentración de  $6.25 \times 10^{-14}$  mol ml<sup>-1</sup>, no presenta diferencias con el método manual, la precisión mejora significativamente en el método automatizado. En la tabla 2.2 se aprecia una disminución de más de 5 veces del %C.V. en el sistema automatizado respecto del manual.

	Media (nM)	Mínimo	Máximo	Máximo-mínimo	SEM (n=10)	%C.V.
<b>A</b>	0.502	0.485	0.508	0.023	0.007	1.335 <sup>a</sup>
<b>M</b>	0.493	0.446	0.536	0.089	0.036	7.386 <sup>b</sup>

**Tabla 2.2 . Comparación de las determinaciones de Fru 2,6-P<sub>2</sub> por los métodos automatizado y manual.**

Una mezcla de reacción incluyendo 0.5 nM Fru 2,6-P<sub>2</sub> se ensayó repetidamente, 10 veces, según el método automatizado descrito (Metón *et al.*, 1995) (**A**) o el manual (**M**). Se recogen en la tabla las medias, SEM y %C.V. de los valores obtenidos en cada método.

<sup>a,b</sup>Efecto de método significativo,  $P < 0.01$ .

La mejora en la precisión queda igualmente reflejada al aplicar ambos métodos a muestras biológicas. Un grupo de 10 doradas fue ayunado por un período de 8 días, tras lo que 5 fueron sacrificadas. El resto fue sometido a realimentación durante 8 días antes de ser sacrificado. La dieta suministrada durante la realimentación se componía de un 47.6% de

proteína, un 17% de carbohidratos y un 12.5% de lípidos, con un 2.8% de humedad relativa, siendo administrado un 2% del peso corporal una vez al día. Los hígados de los peces sacrificados fueron recogidos, congelados con nitrógeno líquido y guardados a -80°C, hasta ser utilizados para la determinación del metabolito Fru 2,6-P<sub>2</sub> (tabla 2.3).

<i>Ayunados</i>				<i>Realimentados</i>			
<b>A</b>		<b>M</b>		<b>A</b>		<b>M</b>	
Media±SEM	%C.V.	Media±SEM	%C.V.	Media±SEM	%C.V.	Media±SEM	%C.V.
1.735±0.011	0.63	1.356±0.067	4.94	17.651±0.439	2.49	17.771±0.178	1.00
0.829±0.031	3.74	0.815±0.040	4.91	15.472±0.203	1.31	16.020±1.525	9.52
0.874±0.007	0.80	1.082±0.071	6.56	16.665±0.243	1.46	13.959±1.417	10.15
0.902±0.023	2.55	0.568±0.035	6.16	19.071±0.330	1.73	17.875±4.418	24.72
0.807±0.016	1.98	0.622±0.035	5.63	18.580±0.433	2.33	16.123±3.044	18.88
<b>1.029±0.396<sup>a</sup></b>		<b>0.889±0.330<sup>a</sup></b>		<b>17.488±1.455<sup>b</sup></b>		<b>16.350±1.599<sup>b</sup></b>	

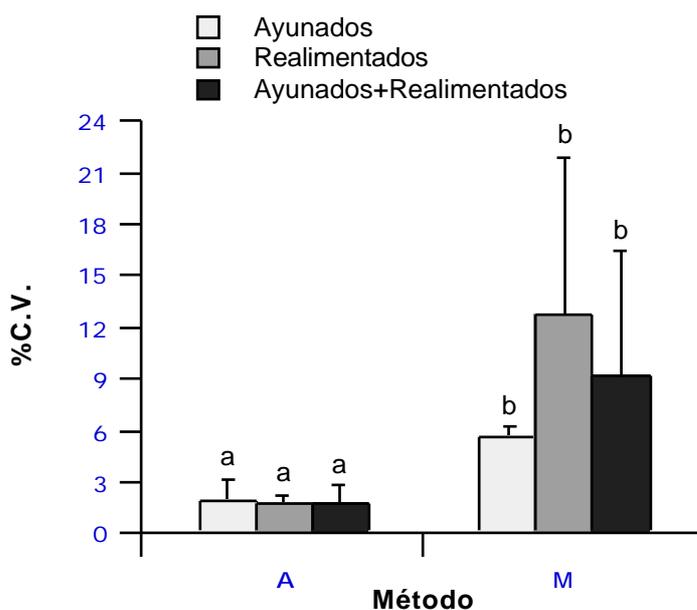
**Tabla 2.3 . Aplicación del método a muestras biológicas.**

Muestras hepáticas de *Sparus aurata* fueron tomadas como queda descrito en el apartado 2.3.4., para ser determinada la Fru 2,6-P<sub>2</sub> por los métodos automático (A) y manual (M). Cinco peces sometidos a ayuno por un período de 8 días antes de obtener los tejidos (Ayunados). Otros cinco fueron realimentados 8 días tras un período igual de ayuno (Realimentados). Los resultados presentados son la media (en nmol g<sup>-1</sup>)±SEM para cada una de las muestras de hígado, cada una de las cuales fue ensayada repetidamente tres veces. El %C.V. de cada muestra, así como, en *negrita*, el valor medio (nmol g<sup>-1</sup>)±SEM para cada grupo de animales están también reflejados en la tabla.

<sup>a,b</sup>Efecto de condición (ayuno/realimentación) significativo, P < 0.01.

Se apreciaron diferencias significativas entre los peces ayunados y los realimentados, independientemente de si el método utilizado era el automatizado o el manual. Los resultados fueron consistentes con los esperados según determinaciones previas (García de Frutos *et al.*, 1990).

Además, se encontraron diferencias significativas en el %C.V. según el método utilizado fuese el automatizado o el manual, independientemente de la condición (ayuno o realimentación) de los animales (figura 2.2). El método automatizado presenta siempre un %C.V. menor al obtenido con el método manual, lo que refleja un mayor grado de exactitud y, por tanto, de fiabilidad, del proceso automatizado.



**Figura 2.2 . Comparación de los %C.V. obtenidos por los métodos automatizado y manual al analizar muestras biológicas.**

Las condiciones de los animales fueron como las descritas en la tabla 2.3 . Cada muestra fue ensayada tres veces tanto por el método automatizado como manual. Se representa los %C.V.±SEM (n=5 para peces Ayunados y Realimentados, y n=10 para el análisis conjunto de los animales Ayunados y Realimentados), determinados automatizada (A) o manualmente (M).

<sup>a,b</sup>Efecto de método significativo,  $P < 0.01$ .

En resumen, el ensayo adaptado a un sistema automatizado mejora la precisión y reduce el tiempo de ensayo, de forma que los resultados de 30 muestras pueden obtenerse en menos de 30 minutos, lo que es especialmente importante al analizar Fru 2,6-P<sub>2</sub> de un número elevado de muestras biológicas o fracciones de elución cromatográfica durante los procesos de purificación de la enzima 6-PF 2-K.

### 2.5.6.2. Purificación de PP<sub>i</sub>-6-PF 1-K:

La enzima PP<sub>i</sub>-6-PF 1-K utilizada en el ensayo de Fru 2,6-P<sub>2</sub> fue purificada de patata por nuestro grupo aplicando el método de Van Schaftingen *et al.* (1982).

#### -Protocolo:

0.5 Kg de patata pelada se homogeniza a 4°C con 2 volúmenes de tampón de homogeneización. El homogeneizador utilizado es un *Waring Blender*. La solución

homogeneizada se filtra a través de un paño o gasa y papel de filtro. Todo el proceso se lleva a cabo a 4°C en cámara fría.

Se añade  $MgCl_2$  hasta alcanzar una concentración final de 2 mM en el homogeneizado filtrado, y se ajusta el pH a 8.2 con NaOH.

Posteriormente se coloca en un baño a 80°C y se agita hasta que alcance la temperatura de 59°C. La solución debe mantenerse durante 5 minutos a la temperatura de 59°C, enfriándose a continuación lo más rápidamente posible, en baño de hielo y sal, hasta alcanzar 0-10°C.

Se ajusta el pH a 7.1 con HCl.

Se añade lentamente PEG 6000, previamente pulverizado, hasta alcanzar una concentración final de 5 g por cada 100 ml, agitando hasta su completa disolución. Se centrifuga entonces durante 10 minutos a 6000g, a 4°C, recuperando el sobrenadante.

Se añade nuevamente PEG 6000, un 10% del volumen recuperado. Una vez conseguida la disolución, volver a centrifugar en las condiciones anteriores. Se recoge el precipitado y se resuspende en unos 20 ml del tampón utilizado para la homogeneización.

Finalmente, se centrifuga durante 5 minutos a 10000g a 4°C. Se recoge el sobrenadante, se añade glicerol hasta un 20%. Se alicuota y se mantiene congelado a -20°C. La actividad  $PP_i\sim 6$ -PF 1-K purificada debe ensayarse por el método descrito a continuación.

*Tampón de homogeneización:*

Tampón Hepes, pH 8.2	20 mM
Acetato potásico	20 mM
DTT	2 mM

### **2.5.6.3. Ensayo de actividad $PP_i\sim 6$ -PF 1-K:**

Una vez purificada la enzima  $PP_i\sim 6$ -PF 1-K, debe determinarse su actividad, para lo que nos basamos en el método de Van Schaftingen *et al.* (1982) que adaptamos al autoanalizador COBAS MIRA S.

#### **-Fundamento:**

El fundamento es el mismo que el aplicado en la determinación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>.

**-Condiciones de ensayo:**

En un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  la mezcla de reacción contenía:

R1:	Tampón Tris-HCl, pH 7.8	45 mM
	Acetato magnésico	2 mM
	NADH	0.2 mM
	Fru 6-P	2.5 mM
	Glu 6-P	17.5 mM
	Fru 2,6-P <sub>2</sub>	1 mM
	Glicerol 3-P DH	0.53 mU ml <sup>-1</sup>
	Triosa-P isomerasa	2.14 mU ml <sup>-1</sup>
	Aldolasa	0.28 mU ml <sup>-1</sup>
R2:	PP <sub>i</sub>	2.5 mM

Las enzimas auxiliares se desalaron como está indicado en el apartado 2.5.6.

Las soluciones madre de Glu 6-P y Fru 6-P fueron tratadas al ácido previamente para eliminar una posible contaminación con Fru 2,6-P<sub>2</sub> (apartado 2.5.6.).

Se incubaba la mezcla de reacción R1 (182.5  $\mu\text{l}$ ) con 2.5  $\mu\text{l}$  de la solución con PP<sub>i</sub>~6 - PF 1-K cuya actividad se quería determinar, durante 2 minutos 5 segundos. La reacción se iniciaba tras adición de 15  $\mu\text{l}$  de solución con PP<sub>i</sub> (R2). El proceso fue llevado a cabo a 30°C, registrándose el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la desaparición del NADH de la mezcla de reacción.

Una unidad de actividad PP<sub>i</sub>~6-PF 1-K fue definida como la actividad capaz de consumir 2  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto.

**2.5.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD 6-PF 2-K**

Tanto la forma activa (no fosforilada) como total (fosforilada y no fosforilada) de la enzima 6-PF 2-K fueron determinadas basándose en su capacidad de formación de Fru 2,6-P<sub>2</sub> a 30°C, tal como está descrito en García de Frutos *et al.* (1990).

**-Condiciones de ensayo para la forma activa:**

El ensayo realizado a pH 6.6, en el que la forma fosforilada no presenta actividad, se efectuó en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  que contenía:

Tampón MES, pH 6.6	50 mM
KCl	100 mM
Mg Cl <sub>2</sub>	7 mM
Fru 6-P	1 mM
Glu 6-P	3.5 mM
ATP	5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM

**-Condiciones de ensayo para la forma total:**

El ensayo, realizado a pH 8.8, al que tanto la forma fosforilada como la no fosforilada son igualmente activas, se llevó a cabo en un volumen final de 100 µl con:

Tampón Tris-HCl, pH 8.8	50 mM
KCl	100 mM
Mg Cl <sub>2</sub>	7 mM
Fru 6-P	5 mM
Glu 6-P	17.5 mM
ATP	5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM

En ambos ensayos la reacción tuvo lugar a 30°C tras adición de 5 µl de muestra (obtenida según el apartado 2.3.2.). En todos los casos, tanto para la forma activa como para la total, se realizó un blanco de reacción, en el que la incubación era parada a tiempo 0. Las mezclas de reacción eran incubadas durante 4 y 8 minutos, tiempos en los que se mantenía la linealidad en la formación de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. Las reacciones fueron paradas por adición de un volumen igual al de mezcla de reacción de 100 mM NaOH, y posteriormente se calentaban a 80°C durante 5 minutos.

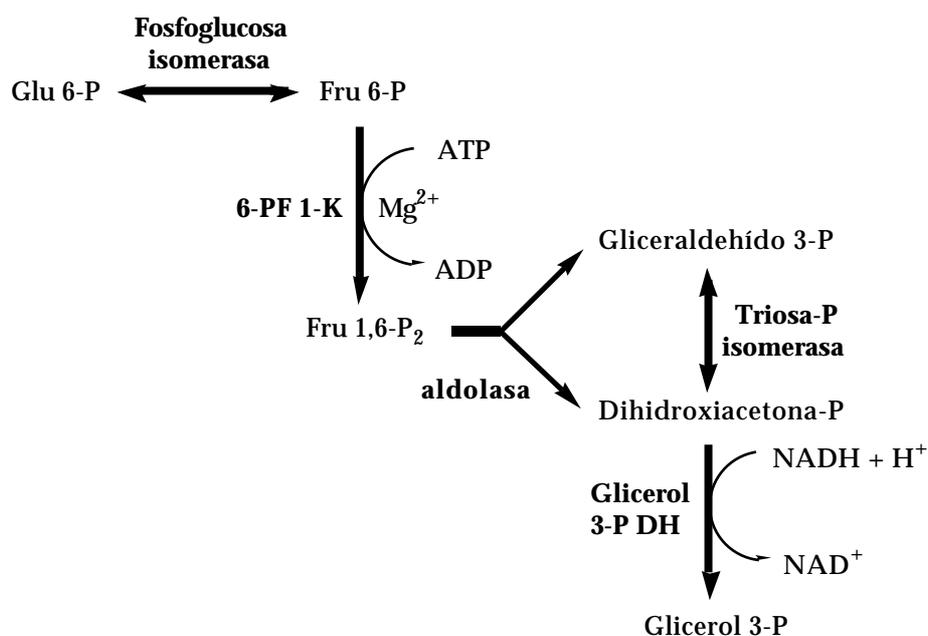
Las mezclas de ensayo así obtenidas fueron mantenidas congeladas hasta su determinación, que era llevada a cabo al analizar la concentración de Fru 2,6-P<sub>2</sub> formada durante el curso de la reacción. La determinación del metabolito se efectuó según el método descrito en el apartado 2.5.6.

Una unidad de actividad 6-PF 2-K fue definida a partir de la correlación con la concentración en µmol de la Fru 2,6-P<sub>2</sub> formada por minuto en la reacción.

### 2.5.8. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD 6-PF 1-K

El ensayo, adaptado a la determinación automatizada, se realizó a partir del método de Castaño *et al.* (1979).

#### -Fundamento:



#### -Condiciones de ensayo:

La mezcla de reacción, con un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ , contenía:

R1:	Tampón Tris-HCl, pH 8.25	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	KCl	50 mM
	NADH	0.15 mM
	Sulfato amónico	4 mM
	-mercaptoetanol	12 mM
	Fru 6-P	10 mM
	Glu 6-P	30 mM
	Aldolasa	0.675 U ml <sup>-1</sup>
	Triosa-P isomerasa	5 U ml <sup>-1</sup>
	Glicerol 3-P DH	2 U ml <sup>-1</sup>
R2:	ATP	1 mM

Las enzimas auxiliares eran desaladas como está indicado en el apartado 2.5.6.

La mezcla de ensayo contenía Glu 6-P, la cual se isomeriza fácilmente a Fru 6-P por la actividad glucosa isomerasa presente en el propio extracto crudo de la muestra, razón por la que no fue necesario la adición de dicha actividad enzimática.

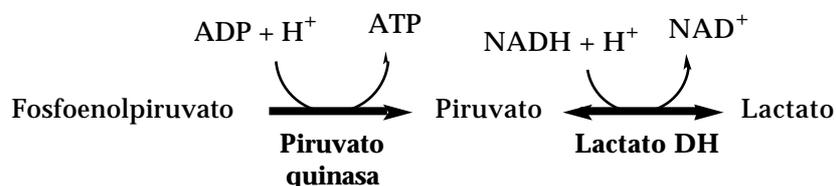
Tras haber atemperado previamente la mezcla de reacción R1 (176  $\mu$ l) con 4  $\mu$ l de muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) durante 2 minutos 55 segundos, la reacción se iniciaba tras adición de 20  $\mu$ l solución de ATP (R2), desarrollándose el proceso a 30°C y registrándose el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NADH durante el curso de la reacción.

Una unidad de actividad se definió como la actividad necesaria capaz de consumir 2  $\mu$ mol de NADH por minuto.

### 2.5.9. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PK

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

#### -Fundamento:



#### -Condiciones de ensayo:

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 250  $\mu$ l, conteniendo:

R1:	Tampón Glicilglicina, pH 7.4	70 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	KCl	100 mM
	NADH	0.15 mM
	Fosfoenolpiruvato	2.8 mM
	Lactato DH	21 U ml <sup>-1</sup>
R2:	ADP	2.5 mM

La enzima lactato DH fue utilizada desalada según se indica en el apartado 2.5.6.

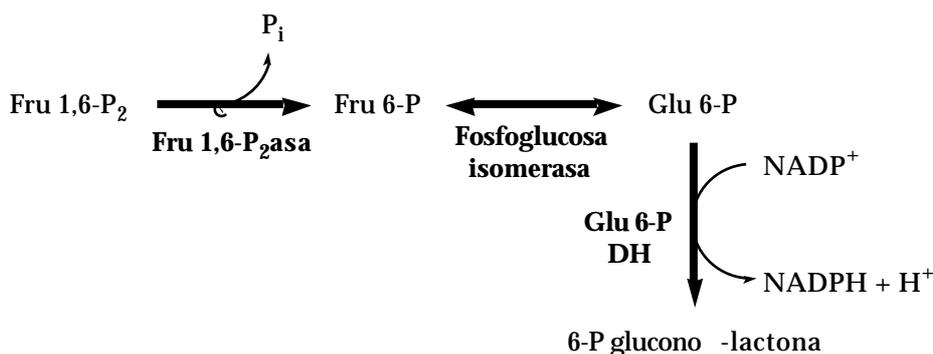
La reacción era llevada a cabo a 30°C, siendo iniciada al añadir 20.7 µl de solución de ADP (R2). La mezcla de ensayo R1 (226.8 µl) era previamente incubada con 2.5 µl de muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) durante 5 minutos. Se registró el descenso de absorbancia a 340 nm debido a oxidación del NADH.

Una unidad de actividad piruvato quinasa bajo estas condiciones fue definida como la actividad necesaria para consumir 1 µmol de NADH por minuto.

### 2.5.10. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FRU 1,6-P<sub>2</sub>ASA

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

#### -Fundamento:



#### -Condiciones de ensayo:

En un volumen final de 200 µl, la mezcla de reacción contenía:

Tampón Imidazol-HCl, pH 7.7	85 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NADP	0.5 mM
-mercatoetanol	12 mM
Fru 1,6-P <sub>2</sub>	0.05 mM
P-glucosa isomerasa	2.5 U ml <sup>-1</sup>
Glu 6-P DH	0.48 U ml <sup>-1</sup>

Las enzimas auxiliares, disueltas en sulfato amónico, no fueron desaladas, dado que el ión amonio no interfiere en el ensayo.

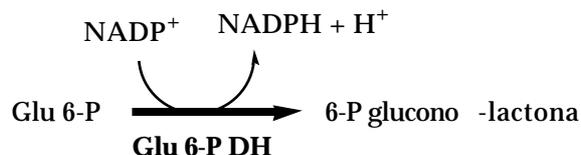
La reacción se realizó a 30°C, y se inició tras la adición de 4 µl de muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) a 196 µl de mezcla de reacción, siendo detectado el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH.

Una unidad de actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa fue definida como la actividad capaz de producir 1 µmol de NADPH por minuto.

### 2.5.11. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLU 6-P DH

El método de Chi-yu Lee (1982) fue adaptado para su desarrollo en un sistema automatizado COBAS MIRA S.

#### -Fundamento:



#### -Condiciones de ensayo:

La mezcla final de reacción (200 µl) constaba de:

Tampón Imidazol-HCl, pH 7.7	78 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NADP	1 mM
Glu 6-P	1 mM

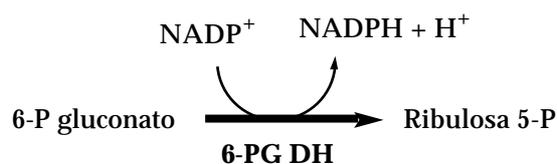
La reacción, incubada a 30°C, se iniciaba por adición de 4 µl muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) a 196 µl de mezcla de reacción, siendo seguida la producción de NADPH por incremento de la absorbancia a 340 nm .

La unidad de actividad fue definida como la actividad enzimática necesaria para la producción de 1 µmol de NADPH por minuto.

### 2.5.12. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD 6-PG DH

El ensayo automatizado, se basó en el método manual descrito en Bergmeyer (1984).

#### -Fundamento:



#### -Condiciones de ensayo:

La mezcla final de reacción, 200  $\mu\text{l}$ , contenía:

Tampón Imidazol-HCl, pH 7.7	83 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
NADP	0.5 mM
6-P gluconato	2 mM

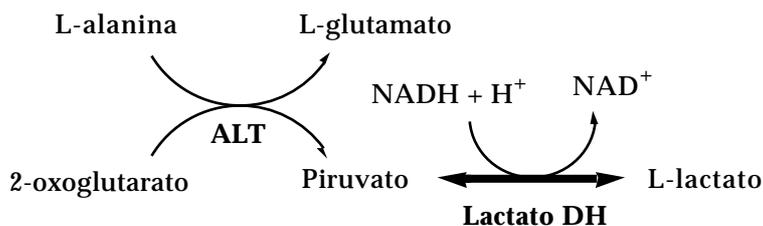
La reacción se llevaba a cabo a 30°C, siendo iniciada por adición de 4  $\mu\text{l}$  de muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) a 196  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción. Se registró el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la aparición de NADPH.

Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima capaz de producir 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto.

### 2.5.13. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ALT

La determinación de la actividad ALT fue llevada a cabo a través del uso de un *kit* de la casa Roche para su uso en *COBAS MIRA S*.

#### -Fundamento:



**-Condiciones de ensayo:**

La mezcla final de reacción (191  $\mu\text{l}$ ) constaba de:

Tampón Tris-HCl, pH 7.5	100 mM
2-oxoglutarato	13.7 mM
NADH	0.18 mM
L-alanina	0.5 mM
Lactato DH	21 mkat l <sup>-1</sup>

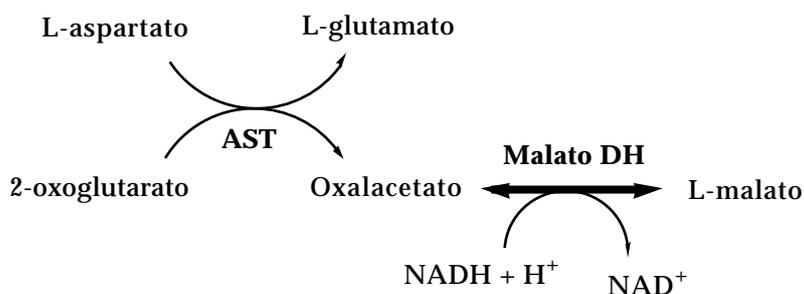
La reacción era incubada a 30°C, siendo iniciada por adición de 16  $\mu\text{l}$  de muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) a 175  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción, registrándose el descenso de absorbancia a 340 nm resultado de la oxidación del NADH de la mezcla de reacción.

La unidad de actividad era definida como la cantidad de enzima capaz de consumir 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto.

**2.5.14. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AST**

Para la determinación de la actividad enzimática AST se utilizó un *kit* comercializado por la casa Roche.

**-Fundamento:**



**-Condiciones de ensayo:**

El volumen final de ensayo, 191  $\mu$ l, contenía:

Tampón Tris-HCl, pH 7.8	80 mM
2-oxoglutarato	12.6 mM
NADH	0.18 mM
L-aspartato	220 mM
Lactato DH	15 mkat l <sup>-1</sup>
Malato DH	10 mkat l <sup>-1</sup>

La reacción fue desarrollada a 30°C tras adición de 16  $\mu$ l de muestra (obtenida según el apartado 2.3.1.) a 175  $\mu$ l de mezcla de reacción. El descenso de absorbancia, por desaparición de NADH, fue seguido a 340 nm.

Una unidad de actividad AST se definió como aquella cantidad de enzima capaz de consumir 1  $\mu$ mol de NADH por minuto.

## 2.6. ANALISIS DE LA PRESENCIA DE PROTEINA 6-PF 2-K/FRU 2,6-P<sub>2</sub>ASA INMUNODETECTABLE POR WESTERN BLOT

La presencia de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa fue detectada mediante el uso de anticuerpos policlonales específicos contra la enzima hepática de rata (cedidos por el Dr. A. Tauler) por la técnica de *Western Blot*, basada en el método de Burnette (1981).

Se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE/SDS) para separar las proteínas en base a su peso molecular por electroforesis, según el método de Laemmli (1970).

Previo a la electroforesis, las muestras (obtenida según el apartado 2.3.2.) fueron hervidas 5 minutos en tampón de carga desnaturalizante. Posteriormente fueron sembradas sobre el gel apilador, y tras aplicar un campo eléctrico de 20 mA durante 90 minutos, las proteínas fueron separadas en la malla polimérica del gel separador.

Al término del proceso electroforético la proteína se electrotransfería desde el gel hacia un filtro de nitrocelulosa Hybond™-C super (Amersham) en solución de transferencia, quedando así retenida y fijada la proteína en la membrana. La transferencia era llevada a cabo durante 3 horas a 60 V manteniendo la temperatura a 4°C.

Terminada la transferencia se dejaba el filtro a 4°C en solución bloqueante, 10% leche descremada Molico en polvo en tampón TBS, hasta proceder a la inmunodetección.

La inmunodetección fue realizada a temperatura ambiente. El filtro se incubaba inicialmente 1 hora en TBS con albúmina sérica bovina al 3%. Posteriormente se añadía el anticuerpo primario (anti - 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de rata) en una dilución

final 1:1000, dejando incubar una nueva hora. Acabado el proceso, se lavaban las membranas 3 veces durante 10 minutos con 200 ml de TBS. A continuación se procedía a incubar otra hora con el anticuerpo secundario (anti - IgG de conejo) conjugado con peroxidasa de rábano y diluido 1:3000 en TBS con albúmina sérica bovina al 3%. Finalmente, tras lavar las membranas como anteriormente, se llevó a cabo la detección del anticuerpo secundario unido por uso del *kit ECL<sup>TM</sup> Western Blotting* (Amersham).

El protocolo seguido es el descrito en el *kit*, el cual se basa en la detección de la quimioluminiscencia producida en la reacción de oxidación del luminol por la peroxidasa de rábano, conjugada al anticuerpo secundario, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y compuestos químicos potenciadores como los fenoles. La reacción emite un máximo de luz a una longitud de onda de 428 nm, que se puede detectar por exposición durante cortos espacios de tiempo (15 segundos - 3 minutos) en películas autorradiográficas sensibles a la luz azul. Se utilizaron para ello las películas Hyperfilm<sup>TM</sup>-ECL (Amersham).

*Tampón de carga:*

<b>Tampón Tris-HCl, pH 6.8</b>	<b>62.5 mM</b>
<b>SDS</b>	<b>2 %</b>
<b>Glicerol</b>	<b>10 %</b>
<b>2-mercaptoetano</b>	<b>15 %</b>
<b>Azul de bromofenol</b>	<b>0.02 %</b>

*Gel apilador:*

<b>Tampón Tris-HCl, pH 6.8</b>	<b>125 mM</b>
<b>Acrilamida</b>	<b>4 %</b>
<b>Bis</b>	<b>0.11 %</b>
<b>SDS</b>	<b>0.1 %</b>
<b>Persulfato amónico</b>	<b>0.038 %</b>
<b>TEMED</b>	<b>4 mM</b>

*Gel separador:*

<b>Tampón Tris-HCl, pH 8.8</b>	<b>375 mM</b>
<b>Acrilamida</b>	<b>10 %</b>
<b>Bis</b>	<b>0.27 %</b>
<b>SDS</b>	<b>0.1 %</b>
<b>Persulfato amónico</b>	<b>0.075 %</b>
<b>TEMED</b>	<b>5 mM</b>

*Tampón de electroforesis:*

<b>Tampón Tris-HCl, pH 8.3</b>	<b>25 mM</b>
<b>SDS</b>	<b>0.1 %</b>
<b>Glicina</b>	<b>192 mM</b>

*Solución de electrotransferencia:*

Tampón Tris-HCl, pH 8.3	25 mM
Metanol	20 %
Glicina	192 mM

*Tampón TBS:*

Tampón Tris-HCl, pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM

## 2.7. TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2.7.1. OBTENCION DE CELULAS DE *Escherichia coli* COMPETENTES

En condiciones naturales, a *Escherichia coli* sólo se le pueden introducir pequeñas cantidades de ADN exógeno. Para conseguir una transformación eficiente debe llevarse a cabo un pre-tratamiento de las células antes de llevar a cabo la transformación. Tras el tratamiento las células adquieren competencia, haciéndose más sensibles a la transformación.

El protocolo seguido se basa en poner las células en contacto con CaCl<sub>2</sub> frío (Sambrook *et al.*, 1989). Se inoculan 50 ml de medio de crecimiento LB con una colonia de células de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* (Stratagene), o bien con 300 µl de un cultivo líquido previo. Se permite el crecimiento a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica no superior a 0.9 a una longitud de onda de 590 nm. En ese momento se sedimentan las células por centrifugación a 2500g durante 10 minutos, y se resuspenden en 50 ml de 100 mM MgCl<sub>2</sub> frío. Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspende el sedimento con la misma solución, aunque esta vez en 10 ml. Se añaden 100 ml de solución 100 mM CaCl<sub>2</sub> y se mantiene la mezcla en hielo entre 30 y 90 minutos. Tras una última centrifugación se resuspende el sedimento con 12.5 ml de solución de resuspensión. A fin de incrementar la competencia se dejan 12 horas a 4°C previamente a su uso.

Las células mantienen la competencia almacenadas a -80°C hasta un año.

*Medio de crecimiento LB:*

ClNa	1 %
Triptona	1 %
Extracto de levadura	0.5 %

*Solución de resuspensión:*

CaCl <sub>2</sub>	85 mM
Glicerol	15 %

### **2.7.2. TRANSFORMACION DE CELULAS DE *Escherichia coli***

Se siguió un protocolo basado en la introducción de ADN exógeno por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989), según el cual se mezclaron 20  $\mu\text{l}$  de disolución del ADN exógeno con 200  $\mu\text{l}$  de una solución de células competentes. Tras ser mantenidas 10 minutos en hielo se incuban 3 minutos a 42°C, proceso que facilita la entrada del ADN exógeno en las células a través de poros creados en la membrana celular por efecto de la elevada temperatura. Pasada la incubación se enfría la mezcla en hielo. Posteriormente se añaden 800  $\mu\text{l}$  de medio de crecimiento líquido LB, para incubar 45 minutos más a 37°C, período durante el que las células desarrollan las resistencias a antibióticos que típicamente se incluyen en los vectores que se utilizan como vehículos portadores de ADN exógeno. Finalmente se centrifuga a 20000g durante 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentar las células, que son resuspendidas en un volumen pequeño del propio sobrenadante, volumen así apto para llevar a cabo cultivos en medio sólido.

### **2.7.3. ELECTROFORESIS DE ADN**

Fueron llevadas a cabo a fin de comprobar aislamiento de plásmidos, fragmentos de ADN purificados y análisis de fragmentos de restricción y de PCR. Para ello se utilizaron geles de agarosa, que constituyen una malla polimérica, a través de la que migran hacia el ánodo las moléculas de ácidos nucleicos, cargados negativamente, al aplicar un campo eléctrico. La velocidad de migración es inversamente proporcional al logaritmo del tamaño del fragmento del ácido nucleico en cuestión. La concentración de agarosa en el gel determina el tamaño de la malla. Los geles utilizados se prepararon, en tampón de electroforesis, con agarosa entre el 1 y el 2%, en función del tamaño de los fragmentos a separar.

Los ácidos nucleicos fueron visualizados por uso de bromuro de etidio, presente a una concentración de 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  tanto en gel como en tampón. El bromuro de etidio se intercala entre las bases nitrogenadas, pudiendo detectarse fluorescencia visible al irradiar con luz ultravioleta.

*Tampón de electroforesis:*

Tampón Tris-HCl, pH 8	40 mM
EDTA	1 mM
Acido acético glacial	20 mM

## 2.7.4. AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO

### 2.7.4.1. Preparación de pequeñas cantidades de ADN plasmídico

Se realizaron cultivos de la cepa XL1-blue de *Escherichia coli* a fin de aislar pequeñas cantidades de plásmido para realizar los análisis de restricción. Se utilizó el método de aislamiento por ebullición (Sambrook *et al.*, 1989).

#### -Protocolo:

Se inocula 1.5 ml de cultivo bacteriano y se deja crecer en agitación durante 16 horas. Tras el crecimiento, se sedimentan las células por centrifugación durante 30 segundos a 20000g. Después de retirar el sobrenadante se añaden 200  $\mu$ l de solución STET. Se resuspende el sedimento y se añaden 20  $\mu$ l de una solución de lisozima de 10 mg ml<sup>-1</sup> en TE recién preparada, y, tras mezclar por agitación 30 segundos, dejamos hervir otros 40 segundos. Los restos celulares obtenidos en el proceso lítico son separados por centrifugación a 20000g 10 minutos, quedando los ácidos nucleicos en el sobrenadante. Al que se añaden 200  $\mu$ l de 3 M acetato de sodio pH 7 y 250  $\mu$ l de isopropanol. Después de mezclar, se centrifuga 20 minutos a 20000g, lo que provoca la precipitación del ADN plasmídico. Una vez retirado el sobrenadante, se lava el precipitado con 200  $\mu$ l de 70% etanol frío durante 30 minutos a -20°C. Por último se retira el etanol y se procede a resuspender el ADN en 25  $\mu$ l de una solución de 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> RNasa A en TE recién preparada. Se incuba 30 minutos a 37°C y se almacena el ADN a -20°C hasta su uso.

#### Solución STET:

Tampón Tris-HCl, pH 8	50 mM
Sacarosa	8 %
Tritón	0.5 %
EDTA	50 mM

#### Solución TE:

Tampón Tris-HCl, pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

### 2.7.4.2. Preparación de grandes cantidades de ADN plasmídico

A fin de aislar mayores cantidades de plásmido se utilizó el *kit Plasmid Midi Protocol* de QIAGEN. Así fue aislado el vector pBluescript SK- (Stratagene), de elevado número de copias por célula. El protocolo seguido, brevemente descrito comprende:

Tras dejar crecer a saturación 50 ml de un cultivo bacteriano de *E. coli*, se sedimentan las células por centrifugación a 10000g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento se resuspende en 4 ml de solución A. Posteriormente se adicionan otros 4 ml de solución B, de lisis celular, y se deja actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añaden a continuación 4 ml de solución C, dejándose incubar 15 minutos en hielo, para luego centrifugar a 30000g 30 minutos a 4°C. El sobrenadante, en el que se encuentra el ADN en solución, se aplica a una columna con resina capturante de ADN, previamente equilibrada con 4 ml de solución D. La columna cargada se lava dos veces con 10 ml de solución E. Posteriormente se procede a la elución del ADN de la resina con 5 ml de tampón de elución F. Finalmente el ADN es precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol y aislado por centrifugación a 30000g durante 30 minutos a 4°C. El sedimento se lava con 70% etanol frío, para ser finalmente redisolto en 300 µl de solución TE.

<i>Solución A:</i>	Tris-HCl, pH 8 EDTA RNasa A	50 mM 10 mM 100 mg ml <sup>-1</sup>
<i>Solución B:</i>	NaOH SDS	200 mM 1 %
<i>Solución C:</i>	Acetato potásico, pH 5.5	3 M
<i>Solución D:</i>	MOPS, pH 7 NaCl Etanol Tritón X-100	50 mM 750 mM 15 % 0.15 %
<i>Solución E:</i>	MOPS, pH 7 NaCl Etanol	50 mM 1 M 15 %
<i>Solución F:</i>	Tris-HCl, pH 8 NaCl EDTA	50 mM 1.25 M 1 mM

### 2.7.5. PURIFICACION DE FRAGMENTOS LINEALES DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN fueron extraídos de geles de agarosa a través del *QIAEX Gel Extraction Kit* de QIAGEN. El protocolo, descrito brevemente, se basa en:

Al trozo de agarosa que contiene el fragmento de ADN, se le añaden, por cada 100 mg de gel, 300  $\mu$ l de solución 1. Tras añadir 10  $\mu$ l de la resina capturante del ADN en suspensión e incubar 10 minutos a 50°C, se sedimenta la resina por centrifugación a velocidad máxima en una centrifuga de sobremesa durante 30 segundos. La resina, unida al ADN, se lava dos veces, primero con la solución 2 y posteriormente con la solución 3. Después de hacerla sedimentar por centrifugación, se seca el sedimento durante 15 minutos a 37°C. Tras resuspender el sedimento en 20  $\mu$ l de TE e incubar 5 minutos a temperatura ambiente, se obtiene el ADN en suspensión, separado de la resina y listo para ser almacenado a -20°C.

<i>Solución 1:</i>	Tris-HCl, pH 7	10 mM
	NaI	3 M
	NaClO <sub>4</sub>	4 M
	Tiosulfito sódico	10 mM
<i>Solución 2:</i>	Tris-HCl, pH 7	10 mM
	NaClO <sub>4</sub>	8 M
<i>Solución 3:</i>	Tris-HCl, pH 7.5	10 mM
	Etanol	70 %
	NaCl	100 mM

### 2.7.6. AISLAMIENTO DE ARN

El ARN total fue aislado de tejido congelado y pulverizado (100-200 mg de hígado), a partir de la formación de un gradiente de cloruro de cesio (Sambrook *et al.*, 1989). El tejido fue homogeneizado con una solución de tiocianato de guanidina haciendo uso de un POLYTRON™-PTA 7 en posición 7-8.

Una vez obtenida la solución homogeneizada se procedió a aislar el ARN mediante el uso de un gradiente de cloruro de cesio, para lo cual se adicionaban 3 volúmenes de homogeneizado sobre un volumen de solución de cloruro de cesio y se procedía a centrifugar a 100000g durante 18 horas a 20°C en una centrifuga Beckman provista de un rotor SW 41 Ti. El ARN, sedimentado en el fondo del tubo, se resuspendía con una solución de 0.3 M acetato de sodio pH 5, tras lo que se dejaba precipitar en 60% etanol frío durante 2-3 horas a -20°C, para recuperar luego el ARN por centrifugación a 20000g durante 15 minutos a 4°C. Después de retirar el sobrenadante, el ARN se redisolvió en solución TE / 0.1% SDS, para ser almacenado a -80°C.

La concentración de ácidos nucleicos en una solución puede ser cuantificada por medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm. En el caso del ARN, 1 unidad de densidad óptica se corresponde con una concentración de 40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Además, la relación de absorbancias 260 nm/280 nm da idea del grado de contaminación proteica de la solución. Valores entre 1.7 y 2 corresponden a un nivel de pureza aceptable para el ARN.

Solución de tiocianato de guanidina:

Tiocianato de guanidina	4 M
N-lauryl-sarcosina	0.5 %
2-mercaptoetanol	0.7 %
Citrato sódico, pH 7	0.75 M

Solución de cloruro de cesio:

Cloruro de cesio, pH 7	5.7 M
EDTA	110 mM
DEPC	0.1 %

### 2.7.7. OBTENCION DE ARN POLI (A+)

A fin de aislar ARN Poli (A+) se hizo uso del *kit* comercial *PolyA Tract mRNA Isolation System* (Promega). Este sistema se basa en la atracción entre oligo (dT)-biotinilados y partículas metálicas unidas a estreptavidina. El protocolo seguido, brevemente descrito, fue:

Calentar, durante 10 minutos a 65°C, 1 mg de ARN total en un volumen total de 0.5 ml. Añadir 3 µl de oligo (dT)-biotinilados y 13 µl de 20x SSC. Mezclar y dejar a temperatura ambiente 10 minutos, permitiendo la unión de los oligo (dT) y los ARN Poli (A+).

Añadir la mezcla a una suspensión de partículas metálicas unidas a estreptavidina, previamente equilibrada con 0.5x SSC. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Capturar, haciendo uso de un soporte magnético, las partículas metálicas/estreptavidina unidas a biotina/oligo (dT)-ARN Poli (A+). Retirar el sobrenadante y limpiar las partículas 4 veces con 300 µl de 0.1x SSC. Finalmente eluir el ARN<sub>m</sub> por resuspensión de las partículas en H<sub>2</sub>O DEPC y posterior captura de las partículas en el soporte magnético. De esta forma, en el sobrenadante, se encuentra el ARN Poli (A+) en suspensión.

### 2.7.8. ANALISIS DE LA EXPRESION GENICA DE 6-PF 2-K/FRU 2,6-P<sub>2</sub>ASA POR NORTHERN BLOT

El ARN era separado, en base al tamaño, por electroforesis en geles de agarosa, que eran preparados al 1% en tampón de electroforesis. Por carril se sembraban 20 µg de ARN total ó 2 µg de ARN poli (A+) en tampón de carga. La electroforesis se desarrolla a 3-5 V cm<sup>-1</sup> durante aproximadamente 4-5 horas. Posteriormente, el formaldehído era retirado por agitación del gel sumergido en agua. El ARN se fijaba entonces a una membrana de nylon (N-

hybond), lo que se llevaba a cabo transfiriendo por capilaridad desde el gel hasta la membrana con una solución de 5x SSC. El ARN transferido se fijó a la membrana por irradiación con luz ultravioleta durante 2-3 minutos. Los filtros fueron almacenados secos hasta su uso a 4°C.

Las sondas de ADN utilizadas para la detección de ARN<sub>m</sub>, fueron marcadas por el método de *random-primer* (cebadores al azar), haciendo uso del *kit* de marcage *Rediprime* (Amersham). Para ello se incuban, a 37°C durante 10 minutos, 25 ng del ADN a utilizar como sonda, con el fragmento klenow de la polimerasa I de ADN de *Escherichia coli*, en presencia de nonámeros al azar como cebadores, dATP, dGTP, dTTP y [ - <sup>32</sup>P] dCTP (20 µCi).

Los filtros fueron prehibridados durante 4 horas a 42°C con 10 ml por filtro de solución de prehibridación. Posteriormente se añadía la sonda, recién hervida durante 10 minutos y enfriada en hielo, a la solución de prehibridación. De esta forma se deja proceder la hibridación durante 18 horas a 42°C, con una actividad específica final del orden de 10<sup>6</sup> cpm ml<sup>-1</sup>.

Los filtros que fueron hibridados con la sonda homóloga obtenida para la detección de la expresión de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa (apartado 2.7.11.), se lavaron en condiciones de elevada astringencia. Para ello, se lavó dos veces durante 15 minutos a la temperatura de hibridación con 2x SSC, 0.2% SDS, y posteriormente en otras dos ocasiones a 65°C con 0.1x SSC, 0.2% SDS.

A causa del fuerte enlace entre el ARN y la membrana, los filtros pudieron ser reutilizados en diversas ocasiones, para lo que debían retirarse previamente las sondas hibridadas, lo que se conseguía lavando primeramente en dos ocasiones durante 30 minutos con 0.2x SSC, 0.1% SDS a 100°C, y por último otros 30 minutos a 100°C con 0.2x SSC. De esta forma los filtros pudieron ser rehibridados con una sonda heteróloga, -actina de hígado de rata, a fin de comprobar la normalización de las cantidades sembradas de ARN. Los lavados en este caso fueron realizados en condiciones de baja astringencia, llevando a cabo dos durante 15 minutos a 42°C con 2x SSC, 0.2% SDS y otros dos a 65°C con 0.5x SSC, 0.2% SDS.

Prehibridaciones, hibridaciones y lavados fueron llevados a cabo en un horno de hibridación (Hybaid).

Una vez finalizado el proceso de hibridación, las membranas fueron puestas en contacto con películas autorradiográficas Hyperfilm<sup>TM</sup>-MP (Amersham) a -80°C por un tiempo variable. Después de revelar las películas, las intensidades de las bandas aparecidas fueron analizadas por densitometría.

Las medidas de las diferentes especies de ARN analizados fueron determinadas por comparación con marcadores de tamaño de ARN de rango 0.28-6.58 Kb.

*Tampón de electroforesis:*

Tampón MOPS, pH 7	20 mM
Formaldehído	0.67 M
Acetato de sodio	5 mM
EDTA	1 mM

*Tampón de carga:*

Tampón MOPS, pH 7	40 mM
Formaldehído	0.67 %
Formamida	25 %
Acetato de sodio	10 mM
EDTA	2 mM
Azul de bromofenol saturado	10 %
Glicerol	6 %
Bromuro de etidio	20 µg

*Solución SSC (1x):*

Citrato sódico, pH 7	150 mM
NaCl	150 mM

*Solución de prehibridación:*

Fosfato sódico, pH 6.5	50 mM
NaCl	1 M
Solución de Denhardt	7.5 x
Sulfato de dextrano	0.2 mM
SDS	1 %
ADN de esperma de salmón	0.5 mg ml <sup>-1</sup>

*Solución de Denhardt (1x):*

Ficoll 400	0.02 %
Poli (vinilpirrolidona)	0.02 %
Albúmina sérica bovina fracción V	0.02 %

### **2.7.9. CUANTIFICACION POR DENSITOMETRIA DE PELICULAS AUTORRADIOGRAFICAS**

Las impresiones en película autorradiográficas fueron densitometradas en un sistema VILBER LOURMAT en línea con la utilización en ordenador del programa Bio-Profil.

### 2.7.10. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEOTIDOS Y AMINOACIDOS

Mapas de restricción, alineamientos, comparaciones entre secuencias y, en general, todos los análisis de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas fueron llevados a cabo a través del manejo de los programas incluidos en el GCG (Genetic Computer Group, Madison WI).

### 2.7.11. RT-PCR

El ADN complementario fue sintetizado a partir de ARN total de tejido hepático, preparado según se indica en el apartado 2.7.6., por incubación con la actividad enzimática transcriptasa reversa durante una hora a 37°C en un volumen final de 20  $\mu$ l. La mezcla de reacción contenía:

Tampón Tris-HCl pH 8.3	50 mM
KCl	75 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
DTT	10 mM
dNTP	0.5 mM de cada
Hexanucleótidos al azar	125 ng
rRNAsin (inhibidor de ribonucleasas)	20 U
ARN total	1 $\mu$ g
Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT)	200 U

Las reacciones de amplificación se realizaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un Mini Cycloer™ (MJ Research), llevándose a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l con:

dNTP	200 $\mu$ M de cada
Cebadores	0.5 $\mu$ M de cada
ADN <sub>c</sub> obtenido en la transcripción reversa	5 $\mu$ l
Polimerasa de ADN de <i>Thermus aquaticus</i> (Taq DNA pol)	1 U

Todos los componentes de la reacción, salvo el ADN<sub>c</sub> y la polimerasa, fueron incubados en un volumen de 25  $\mu$ l durante 7 minutos a 80°C bajo una perla de cera de parafina en un microtubo de 0.5 ml de capacidad. Tras dejar enfriar la mezcla, el ADN<sub>c</sub> y la polimerasa se añadían en un volumen de 25  $\mu$ l sobre la parafina. Tras una desnaturalización inicial de 1 minuto a 94°C, se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación a 92°C durante 1 minuto (desnaturalización), 60°C por 1 minuto 15 segundos (anillamiento), 72°C por 1 minuto 50 segundos (extensión), para acabar con cinco minutos de extensión final a 72°C.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación por PCR corresponden a regiones conservadas en mamíferos, concretamente en humanos, ratón y vaca.

I1, TACATCAAGATCTTCGACGTGGG, e I2, AGGCACCGCATGACAGCCTG, ambos en sentido 5´ a 3´, fueron sintetizados de acuerdo con la secuencia del ADN<sub>c</sub> de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado humana (Lange y Pilkis, 1990) en las posiciones 728-750 y 1259-1278, respectivamente.

### 2.7.12. CLONAJE DEL ADN<sub>c</sub> AMPLIFICADO POR RT-PCR

El fragmento de ADN<sub>c</sub> amplificado por RT-PCR fue clonado en el vector plasmídico pBluescript® SK- (Stratagene). Pevio a la ligación del ADN con el vector, el plásmido fue cortado con *EcoR* V. Los grupos 5´-fosfato terminales de los extremos romos del vector, fueron eliminados para impedir la recircularización y la formación de dímeros del vector, por incubación con fosfatasa alcalina durante 30 minutos a 37°C. Después de incubar a 75°C durante 10 minutos, se eliminaron los restos de fosfatasa alcalina por aislamiento del vector a partir de su extracción desde un gel de agarosa según el método descrito en el apartado 2.7.5.

Por otra parte el fragmento de ADN<sub>c</sub> obtenido por PCR, purificado también por extracción a partir de un gel de agarosa, como consecuencia de la utilización de la *Taq DNA pol*, presenta en sus extremos 3´ una adenina extra. Por esta razón, los extremos debieron de hacerse perfectamente romos a fin de lograr una ligación eficiente. Ello fue conseguido por incubación a 37°C durante 10 minutos con la actividad exonucleásica 3´ a 5´ del fragmento *klenow* de la polimerasa I de ADN de *Escherichia coli*. A fin de rellenar posibles huecos producidos por un exceso de actividad exonucleásica se incubó posteriormente 5 minutos más a 37°C con una mezcla de dNTPs (0.5 mM cada uno), para dejar así actuar la actividad polimerásica 5´ a 3´ del fragmento *klenow*.

Para clonar el producto de PCR en la diana *EcoR* V del vector plasmídico pBluescript® SK-, se llevó a cabo la ligación a temperatura ambiente durante 16 horas, en un volumen final de 20 µl conteniendo:

Tampón Tris-HCl, pH7.8	30 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	10 mM
ATP	0.5 mM
Ligasa del fago T <sub>4</sub>	3 U
Plásmido	1.2 µg
ADN a insertar	0.4 µg

### **2.7.13. SELECCION DE CELULAS TRANSFORMADAS DE *Escherichia coli***

Tras la ligación se procedió a transformar células competentes de la cepa XL1-Blue MRF' de *Escherichia coli*, resistentes a tetraciclina, identificándose los plásmidos con inserto a través de la selección de colonias de color blanco en medio de crecimiento sólido LB agar con tetraciclina, ampicilina, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido) e IPTG (Isopropil-D-tio-galactopiranosido). Mientras que la tetraciclina selecciona el crecimiento de las células de la cepa XL1-Blue MRF' de *Escherichia coli*, la ampicilina selecciona las transformadas por el vector, dado que éste presenta la resistencia a dicho antibiótico. La cepa XL1-Blue MRF' presenta el episoma F', el cual permite la selección por color, puesto que contiene la mutación  $\Delta M15$  del gen codificador para  $\beta$ -galactosidasa (*lac Z*), requerida para la complementación con el extremo amino terminal del gen, presente en el vector pBluescript®. La expresión de ambas partes es necesaria para la síntesis funcional de la  $\beta$ -galactosidasa. El gen *lac Z* del vector se presenta interrumpido por el conjunto de dianas, *polylinker*, en donde se encuentra el punto de clonaje. De esta forma, en un medio de crecimiento en presencia de IPTG, inductor de la transcripción del promotor del gen *lac Z*, así como como del sustrato cromogénico X-gal, éste es hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa liberando un derivado indólico que confiere un característico color azul a las colonias procedentes de células que han incorporado el plásmido intacto. Sin embargo, en aquellas en las que se ha insertado el fragmento a clonar, se produce una interrupción insalvable a la hora de producir actividad  $\beta$ -galactosidásica, por lo que el X-gal no se hidroliza y las colonias resultantes son fácilmente identificables por su color blanco.

### **2.7.14. SECUENCIACION DE ADN**

Dos colonias independientes del fragmento clonado por PCR fueron secuenciadas por ambos lados. Para ello se utilizó un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystems 373A) y el *kit* comercial *Taq dye primer cycle sequencing kit*. Este sistema hace uso de terminadores unidos a fluorocromos específicos para cada dideoxinucleótido, de forma que un sistema láser es capaz de discriminar la longitud de onda fluorescente emitida.

## **2.8. ANALISIS ESTADISTICO**

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante el uso del programa SuperANOVA. De esta forma, los efectos debidos a las condiciones objeto de estudio, fueron ensayadas y determinadas según el test *Student-Newman-Keuls*. Con un asterisco se indica un

nivel de significación con  $P < 0.05$ , mientras que dos asteriscos indican que el nivel de significación es  $P < 0.01$ .



### **3. RESULTADOS**



### 3.1. EFECTO DEL AYUNO Y DE LA REALIMENTACION

Con anterioridad, nuestro grupo, había comprobado, en hígado de *Sparus aurata*, la sensibilidad del contenido de glucógeno y de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, así como de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, 6-PF 2-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH, a las condiciones de ayuno y de realimentación (García de Frutos *et al.*, 1990; Bonamusa *et al.*, 1989 y 1992). Para conocer cómo inciden las condiciones nutricionales sobre el metabolismo intermediario de los carbohidratos en hígado de dorada, y, en especial, sobre la actividad, cantidad y expresión de la enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, clave en la glucólisis-gluconeogénesis, nos planteamos el diseño de un experimento previo de ayuno y realimentación.

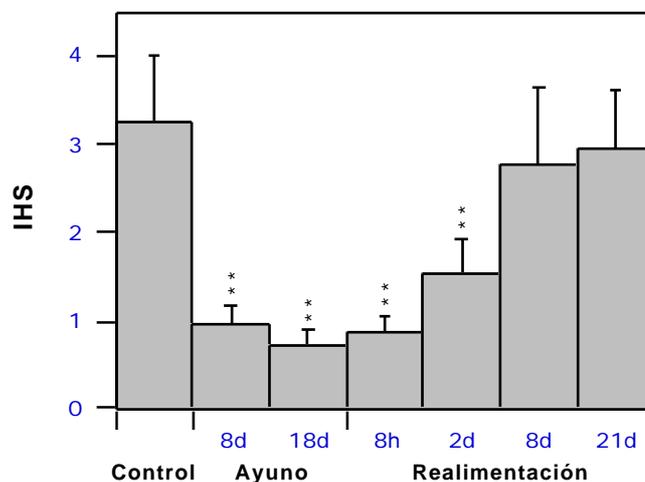
El experimento se realizó con 42 peces, habituados previamente durante un periodo de 17 días, a la ingestión de una dieta rica en carbohidratos (dieta 10: 31.6% carbohidratos, 37.4% proteína, 11.6% lípidos, 16.0% sales, 3.4% humedad, 439.7 Kcal/100g). La dieta les fue administrada una vez al día, en cantidad de un 2% en relación al peso fresco. Previo al inicio del ayuno (grupo de peces alimentados control), así como a los 8 y 18 días de ayuno, se sacrificaron peces para efectuar la toma de muestras de hígado y sangre. Posteriormente fueron sometidos a realimentación en las mismas condiciones que en la fase de habituación a la dieta, tomándose muestras de los tejidos a las 8 horas, 2 días, 8 días y 21 días de iniciada la realimentación.

#### **3.1.1. Efecto del ayuno y de la realimentación sobre el índice hepatosomático.**

El índice hepatosomático (IHS = [Peso del hígado (g) / Peso corporal (g)] x 100) se contempla como un buen indicador del aporte energético suministrado por la dieta en los peces (Love, 1970), habiendo sido utilizado por nosotros a lo largo de todos los experimentos.

El efecto del ayuno sobre este índice es un dramático descenso, llegando a un tercio del valor observado en los animales alimentados a los 8 días de ayuno, y a una cuarta parte a los 18 días. La realimentación fuerza la recuperación del IHS,

alcanzando un 45% del valor control a los 2 días, y recuperando los valores normales a los 8 días. (figura 3.1).



**Figura 3.1 . Efecto del ayuno y de la realimentación sobre el índice hepatosomático (IHS).**

Aparecen representados los valores obtenidos para el grupo control (alimentado 17 días), doradas ayunadas, tras el periodo de alimentación, 8 (8d) y 18 días (18d) y peces realimentados 8 horas (8h), 2 (2d), 8 (8d) y 21 días (21d). El IHS [Peso del hígado (g) x100 / Peso corporal (g)] se expresa como la media±SEM de al menos cuatro doradas. La dieta utilizada estaba compuesta por: 31.6% carbohidratos, 37.4% proteínas, 11.6% lípidos, 16.0% sales, 3.4% de humedad, 439.7 Kcal/100g. Una vez al día se administraba la dieta, en cantidad de un 2% en relación al peso fresco de los peces.

\*\* Diferencia significativa con el control, P < 0.01.

### **3.1.2. Respuesta al ayuno y a la realimentación de glucosa y lactato en suero, y de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, glucógeno, Fru 6-P y Glu 6-P en hígado**

Comprobado el estado somático de los animales, pasamos a determinar los niveles de diferentes metabolitos, determinados en suero e hígado, que se presentan en la tabla 3.1. En cuanto a los valores de glucosa y lactato, determinados en suero, pudimos observar unos ligeros descensos como consecuencia del ayuno. En cambio, los parámetros determinados en hígado (Fru 2,6-P<sub>2</sub>, glucógeno, Fru 6-P y Glu 6-P), mostraron descensos notables y significativos como consecuencia del ayuno prolongado. A los 18 días de ayuno, los niveles de glucógeno y Fru 2,6-P<sub>2</sub> en hígado alcanzaron valores mínimos.

En todos los metabolitos hepáticos determinados, glucógeno, Fru 6-P, Glu 6-P y Fru 2,6-P<sub>2</sub>, se apreció una tendencia a la recuperación después de tan sólo 8 horas de iniciada la realimentación. De todos ellos, fue el glucógeno el que mostró una más rápida recuperación de sus niveles tras la realimentación, de forma que a

los 8 días ya alcanzó los valores observados en condiciones normales de alimentación. Por el contrario, Glu 6-P, Fru 6-P y Fru 2,6-P<sub>2</sub> no alcanzaron los valores control hasta los 21 días de iniciada la realimentación.

	Control	Ayuno		Realimentación			
		8 días	18 días	8 horas	2 días	8 días	21 días
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	60.1	41.1	50.3	297.1	51.2	67.5	53.9
<b>Lactato (mg/dl)</b>	33.2	13.8	21.5	19.8	25.1	21.8	27.1
<b>fru 2,6-P<sub>2</sub> (nmol/g)</b>	99.5±24.8(3)	5.9±4.0 (3)**	0.6±0.3 (3)**	6.5±3.6 (5)**	17.6±20.7 (5)**	46.8±31.1 (4)	189.0±60.0 (4)**
<b>Glucógeno (g/100g)</b>	18.4 ±3.7 (4)	5.0±3.0 (3)**	0.3±0.3 (3)**	5.4±0.2 (3)**	14.9±2.6 (3)	17.1±1.2 (3)	21.3±1.5 (3)
<b>Fru 6-P (nmol/g)</b>	184.6	--	25.6	--	61.2	57.7	185.4
<b>Glu 6-P (nmol/g)</b>	304.6	--	92.3	--	159.3	130.2	280.5

**Tabla 3.1 . Efecto del ayuno y de la realimentación sobre glucosa y lactato en suero y sobre Fru 2,6-P<sub>2</sub>, glucógeno, Fru 6-P y Glu 6-P en hígado.**

Glucosa y lactato, expresados en mg/dl, fueron determinados en *pools* de sueros obtenidos de al menos cuatro peces, según los métodos explicados en los apartados 2.5.4. y 2.5.5. respectivamente, de *Materiales y métodos*. Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno, expresados en nmol/g tejido y g glucosa/100g tejido respectivamente, aparecen expresados como la media±SEM. El número de animales utilizados aparece entre paréntesis. Los extractos de tejido hepático fueron preparados según los apartados 2.3.4. y 2.3.3. respectivamente. Fru 6-P y Glu 6-P se expresan como la media de dos determinaciones efectuadas en *pools* de extractos ácidos de tejido hepático de al menos cuatro animales, y fueron obtenidos según el apartado 2.3.5. Las determinaciones de glucógeno, Fru 2,6-P<sub>2</sub> y Glu 6-P y Fru 6-P fueron llevadas a cabo según se describe en los apartados 2.5.2., 2.5.6. y 2.5.3. respectivamente, de *Materiales y métodos*. Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.1 .

\*\* Diferencia significativa con el control, P < 0.01.

### **3.1.3. Modificaciones en las actividades enzimáticas hepáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH como consecuencia del ayuno y de la realimentación.**

Una vez comprobados los cambios en los metabolitos hepáticos, analizamos las actividades enzimáticas del metabolismo de la glucosa en hígado (figura 3.2). Así, comprobamos que las enzimas reguladoras de la glucólisis (6-PF

1-K y PK) y de la ruta de las pentosas fosfato (Glu 6-P DH y 6-PG DH), descendían como consecuencia del ayuno. La actividad 6-PF 1-K es la que sufre un descenso más acusado, presentando un 45% y un 30%, a los 8 y 18 días de ayuno respectivamente, de la actividad enzimática observada en los peces control. En cambio, las actividades PK, Glu 6-P DH y 6-PG DH tras un periodo de ayuno de 18 días, presentan más del 50% de actividad respecto de los valores control.

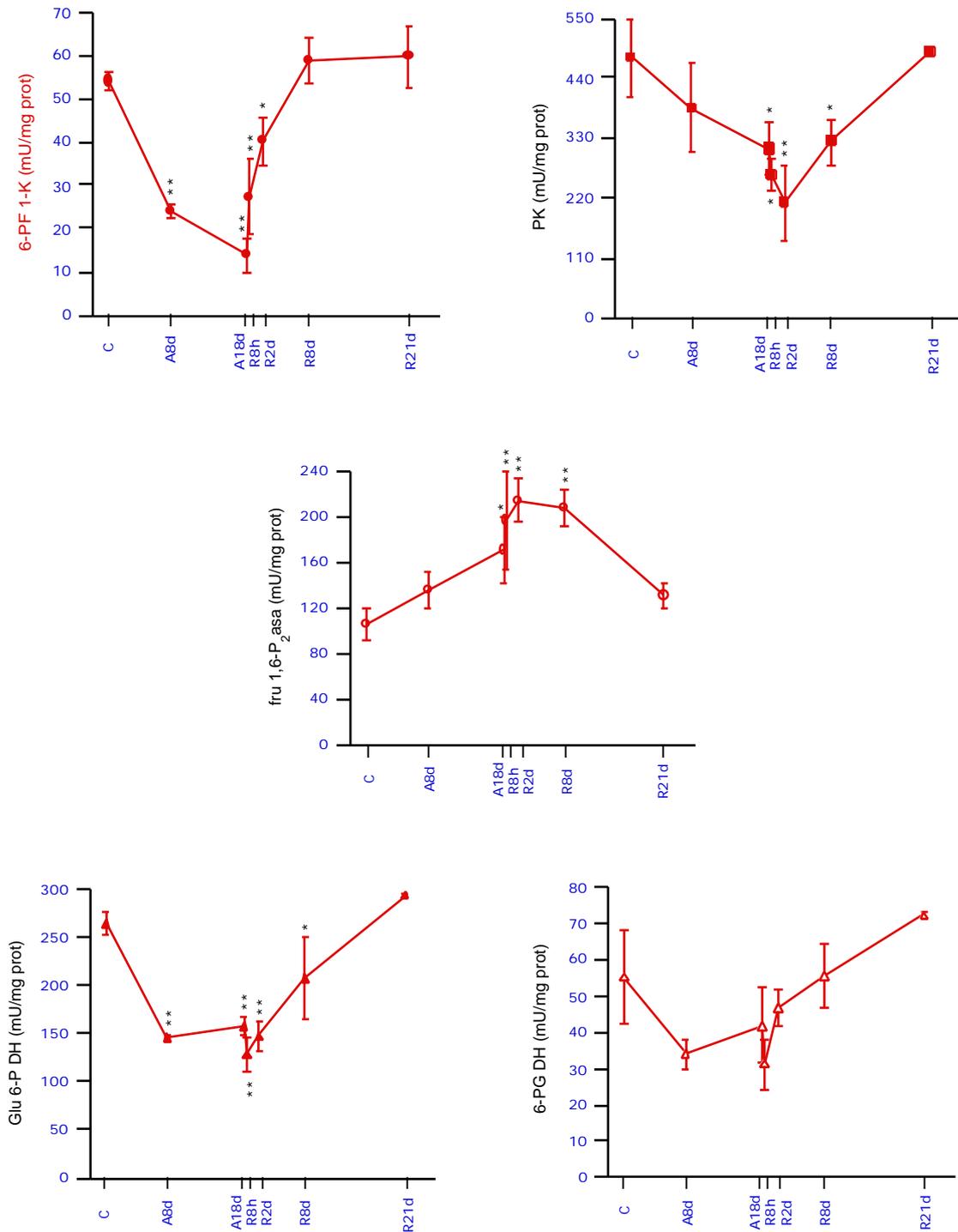
Todas estas actividades recuperan sus valores tras la realimentación. La actividad 6-PF 1-K fue la que se recuperó con mayor rapidez, siendo evidente el incremento de actividad promovido por la realimentación ya a las 8 horas, llegando incluso a superar los valores control a los 8 días de la realimentación. PK, Glu 6-P DH y 6-PG DH, por el contrario, no llegan a presentar niveles de actividad superiores a los presentados en ayuno hasta los sobrepasar los 8 días de realimentación, no llegando a alcanzar los valores control hasta los 21 días de realimentación.

La gluconeogénesis, medida a partir de la determinación de la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, sufre un proceso inverso al de la glucólisis. El ayuno promueve un aumento gradual de sus niveles de actividad, valores que no disminuyeron hasta alcanzar los 21 días de iniciada la realimentación.

En la tabla 3.2 se presentan las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa calculadas a partir de las medias obtenidas para las actividades enzimáticas correspondientes. Ambas relaciones se utilizan como un indicador del sentido del flujo glucolítico (6-PF 1-K y PK) - gluconeogénico (Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa). Ambas relaciones sufren, en condiciones de ayuno, una disminución de sus valores respecto a los obtenidos en los peces control, indicando un efecto estimulador de la gluconeogénesis e inhibidor de la glucólisis bajo estas condiciones. La realimentación promueve una lenta recuperación en ambos parámetros, que no llegan a alcanzar los valores control hasta los 21 días de la realimentación.

	Control	Ayuno		Realimentación			
		8 días	18 días	8 horas	2 días	8 días	21 días
<b>6-PF 1K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa</b>	0.51	0.18	0.08	0.14	0.19	0.28	0.46
<b>PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa</b>	4.51	2.83	1.82	1.33	0.98	1.56	3.73

**Tabla 3.2 . Efecto del ayuno y de la realimentación sobre las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa.**



**Figura 3.2 . Efecto del ayuno y de la realimentación sobre las actividades enzimáticas hepáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH.**

Se representan los valores determinados para el grupo alimentado control (C), grupos ayunados 8 (A8d) y 18 días (A18d) y grupos realimentados 8 horas (R8h), 2 (R2d), 8 (R8d) y 21 días (R21d). Todas las actividades enzimáticas se expresan en mU/mg prot, representando el valor de la media±SEM de al menos tres determinaciones en extractos crudos, obtenidos según el apartado 2.3.1. 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH fueron ensayadas de acuerdo a los apartados 2.5.8-12. de *Materiales y métodos*. Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.1 .

\* Diferencia significativa con el control, P < 0.05. \*\* Diferencia significativa con el control, P < 0.01.

**3.1.4. Variaciones en la actividad enzimática, cantidad de enzima y expresión de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de dorada, como efecto del ayuno y de la realimentación.**

Tras haber comprobado que la utilización de los metabolitos y actividades enzimáticas determinados en hígado son unos buenos indicadores del estado nutricional en la dorada y, dado el papel crucial que juegan los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub> en la regulación de la glucólisis-gluconeogénesis, pasamos a determinar la regulación nutricional de la enzima responsable de su síntesis y degradación, 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.

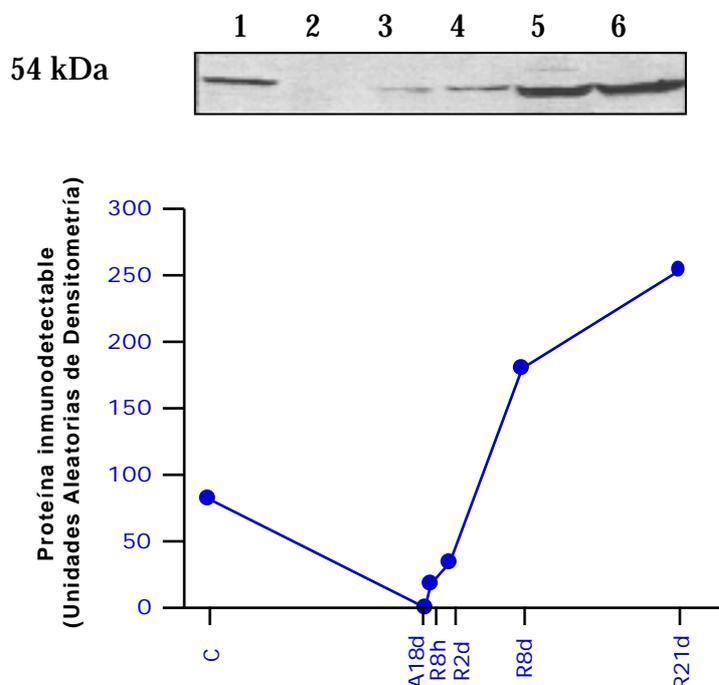
Condición	6-PF 2-K		
	Enzima activa	Enzima total	Activa/Total
Alimentados 17 días	24.4	27.9	0.88
Ayunados 18 días	0.8	8.7	0.09
Realiment. 8 horas	8.7	12.8	0.68
Realiment. 2 días	13.0	19.8	0.65
Realiment. 8 días	18.8	30.0	0.63
Realiment. 21 días	26.9	30.6	0.88

**Tabla 3.3 . Actividad enzimática 6-PF 2-K en extractos de hígado de *Sparus aurata*.**

Los datos están expresados en mU/g tejido, y corresponden a la media de dos determinaciones de actividad 6-PF 2-K efectuadas en *pools* formados por al menos cuatro peces para cada condición. Los ensayos de actividad se determinaron en extractos hepáticos parcialmente purificados, obtenidos según el apartado 2.3.2. Los ensayos de actividad de las formas total y activa de 6-PF 2-K se llevaron a cabo según el apartado 2.5.7. de *Materiales y métodos*. Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.1 .

En la tabla 3.3 se presentan los valores obtenidos en extractos enzimáticos hepáticos preparados para efectuar los ensayos de la forma activa (no fosforilada) y de la total (fosforilada y no fosforilada) de la actividad enzimática 6-PF 2-K, así como la relación entre ambas formas, activa/total. Tanto la forma activa de la enzima como la total descienden en peces sometidos a condiciones de ayuno y se recuperan por efecto de la realimentación, aunque de forma diferenciada. Mientras la forma activa sufre, tras un periodo de ayuno de 18 días, un descenso de 30 veces en relación a los valores de peces alimentados, la forma total desciende con menor intensidad, unas tres veces. La recuperación de la actividad a las 8 horas de la realimentación se produce, asimismo, en mayor medida por activación de la enzima ya presente, aunque inactiva, en condiciones de ayuno, provocando la inicial recuperación observada en los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. A partir de este momento la actividad y su producto, el metabolito Fru 2,6-P<sub>2</sub>, incrementan sus niveles gradualmente hasta el final del experimento. El ensayo de la

forma total de la actividad 6-PF 2-K alcanza los valores de los peces alimentados a los 8 días de realimentación, mientras que el de la forma activa, así como la relación activa/total, no alcanzan tales valores hasta los 21 días de iniciada la realimentación.



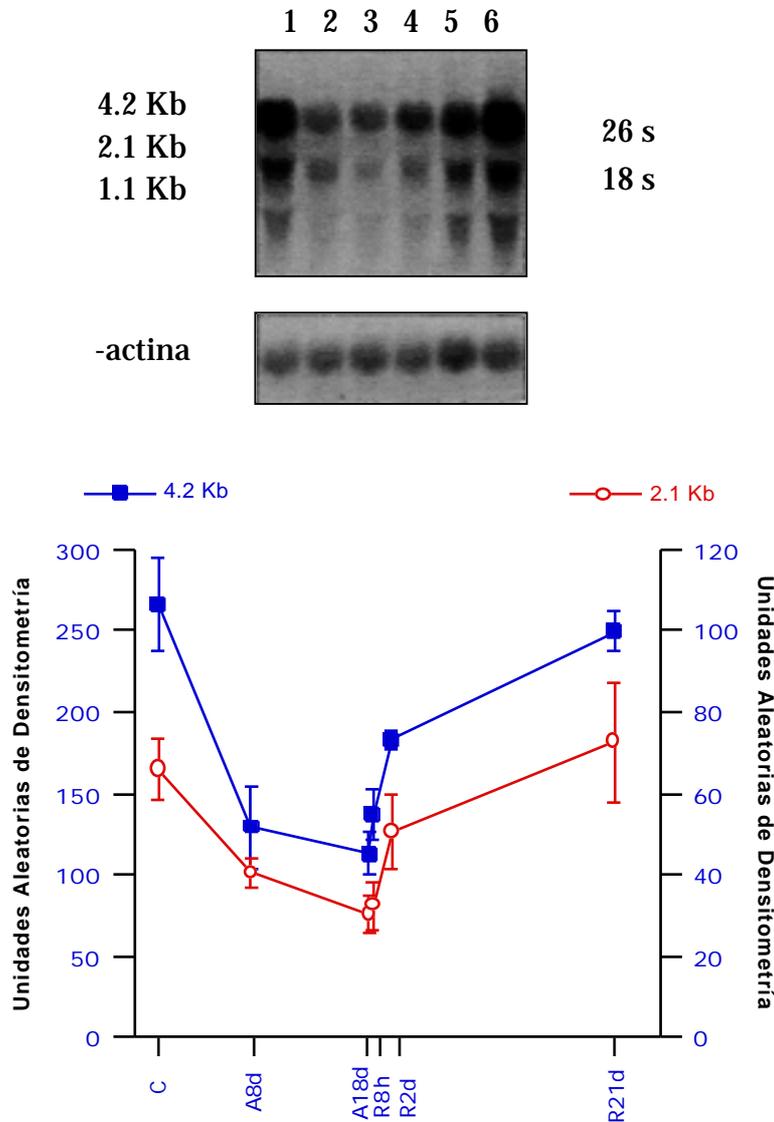
**Figura 3.3 . Análisis por Western blot del efecto del ayuno y la realimentación sobre la cantidad de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en extractos hepáticos de dorada.**

En la parte superior de la figura se puede observar la autorradiografía del análisis por *Western blot* de extractos hepáticos sometidos a purificación parcial de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Los extractos se obtuvieron a partir de *pools* de tejido hepático de 4 peces, como en la tabla 3.3. En los geles de poliacrilamida se cargaron 60 µg de proteína total por carril. Carril 1: control de alimentación; carril 2: ayunados 18 días; carril 3: realimentados 8 horas; carril 4: realimentados 2 días; carril 5: realimentados 8 días; carril 6: realimentados 21 días. El análisis por *Western blot* se llevó a cabo según el apartado 2.6. de *Materiales y métodos*. La dieta suministrada se corresponde a la descrita en la figura 3.1.

En la parte inferior se muestra la representación gráfica del análisis densitométrico de la película de autorradiografía. C: control de alimentación; A18d: ayunados 18 días; R8h: realimentados 8 horas; R2d: realimentados 2 días; R8d: realimentados 8 días; R21d: realimentados 21 días.

Gracias a la disponibilidad de un anticuerpo policlonal anti - 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de rata (amablemente cedido por el Dr. A. Tauler), llevamos a cabo la determinación de la cantidad de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa presente en los extractos hepáticos de doradas sometidas a ayuno y realimentación por *Western blot*. Este anticuerpo se mostró útil en el reconocimiento de la enzima hepática de dorada. En la figura 3.3 se muestra el resultado del análisis, pudiendo

observarse el descenso en la cantidad de proteína provocado por el ayuno, y el posterior aumento promovido por la realimentación.



**Figura 3.4.** Análisis por *Northern blot* de la expresión de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de doradas sometidas a ayuno y realimentación.

En la parte superior de la figura se presenta la autorradiografía correspondiente al análisis por *Northern blot* de ARN total obtenido, según el apartado 2.7.6., a partir de *pools* de tejido hepático de 4 peces, tras hibridación con una sonda de ADN<sub>c</sub> del mensajero hepático de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Se cargaron 20 µg de ARN por carril. Carril 1: control de alimentación; carril 2: ayunados 8 días; carril 3: ayunados 18 días; carril 4: realimentados 8 horas; carril 5: realimentados 2 días; carril 6: realimentados 21 días. Una vez deshibridado el filtro, se rehibridó con una sonda de -actina de rata. El análisis por *Northern blot* se llevó a cabo según el apartado 2.7.8. de *Materiales y métodos*. La dieta utilizada corresponde a la descrita en la figura 3.1 .

En la parte inferior se muestra la representación gráfica del análisis densitométrico de las películas autorradiográficas. C: control de alimentación; A8d: peces ayunados 8 días; A18d: ayunados 18 días; R8h: realimentados 8 horas; R2d: realimentados 2 días; R21d: realimentados 21 días.

A los 18 días de ayuno, la inmunodetección de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa es prácticamente nula, lo que se contradice con los valores de actividad total ensayados. Esta paradoja posiblemente se deba a falta de sensibilidad en el método o a un imperfecto reconocimiento de la enzima de dorada por el antisuero de rata. La realimentación promueve la recuperación de los niveles de proteína, que llegan a alcanzar y superar los observados en peces control a los 8 días de iniciada la realimentación.

Para analizar si los cambios en la actividad enzimática y en la cantidad de proteína eran debidos a cambios en la expresión del gen hepático 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, se realizaron ensayos por *Northern blot* a partir de ARN total. Con este fin se utilizó una sonda homóloga, que obtuvimos por la técnica RT-PCR como está indicado en el apartado 2.7.11. de *Materiales y métodos*. En hígado de dorada (figura 3.4), la sonda reconoce tres bandas de ARN, una mayoritaria de 4.2 Kb y dos bandas minoritarias de 2.1 y 1.1 Kb. En mamíferos, sin embargo, se ha descrito la presencia de una banda mayoritaria de unas 2 Kb (Pilkis *et al.*, 1995). Las tres bandas detectadas respondieron de forma paralela en todos los casos que hemos estudiado.

A los 8 días de ayuno el descenso en los niveles de ARN<sub>m</sub> es significativo, alcanzando menos del 50% de los valores control tras un periodo de ayuno de 18 días. La realimentación promueve una recuperación gradual de dichos niveles, llegando a alcanzar los valores observados en peces control a los 21 días de realimentación.

### 3.2. EFECTO DEL TIPO DE DIETA

Una vez analizado el efecto del ayuno y de la realimentación, procedimos a estudiar el efecto que dietas de contenido energético similar, aunque de diferente composición, puede ejercer sobre el metabolismo hepático de *Sparus aurata*. Con anterioridad, nuestro grupo había observado, que la composición de la dieta determina los valores hepáticos de los metabolitos y actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo intermediario en la dorada, a través del uso de dietas de composición muy dispar (García de Frutos *et al.*, 1990; Bonamusa *et al.*, 1992). La composición de las dietas utilizadas en el experimento aquí presentado, se diseñó de forma que la cantidad de carbohidratos fuera incrementando en las dietas estudiadas, a la vez que la proteína fuera disminuyendo. La composición de las dietas utilizadas aparece descrita en la tabla 3.4 .

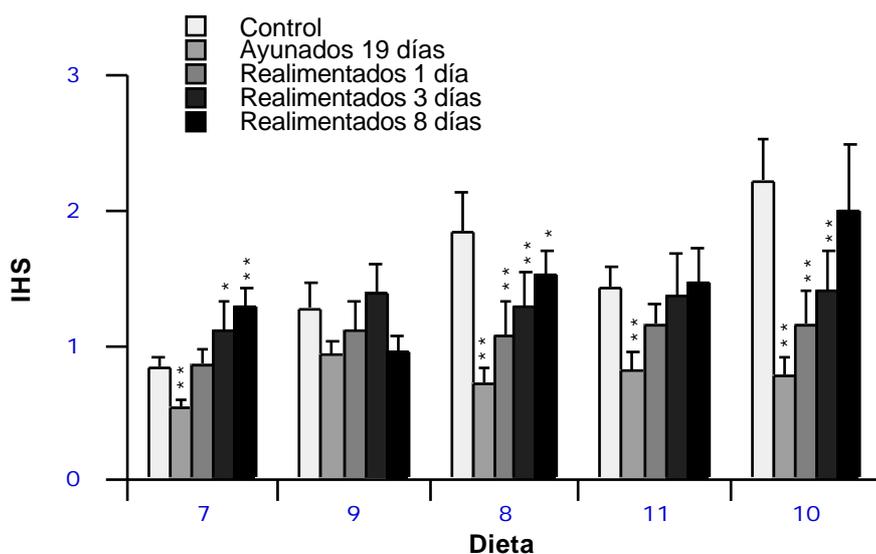
	% Carbohidratos	% Proteína	% Lípidos	% Sales minerales	% Humedad	Contenido energético (Kcal/100g)
<b>Dieta 7</b>	11.5	58.3	8.3	19.3	2.6	442.7
<b>Dieta 9</b>	13.1	47.7	16.2	20.0	3.0	461.3
<b>Dieta 8</b>	17.0	47.6	12.5	20.0	2.8	445.1
<b>Dieta 11</b>	25.9	37.9	16.9	16.1	3.1	464.0
<b>Dieta 10</b>	31.6	37.4	11.6	16.0	3.4	439.7

**Tabla 3.4 . Composición en porcentaje y contenido energético de las dietas utilizadas.**  
Las dietas fueron fabricadas a petición nuestra por la empresa Dalgeti España, S.A.

Cinco grupos de unas 25 doradas fueron habituados al suministro, una vez al día, de un 2% en relación al peso fresco de la dieta correspondiente, durante un periodo de 18 días. Posteriormente fueron sometidos a un ayuno de 19 días, para volver entonces a ser realimentado cada grupo, durante 8 días, en las mismas condiciones en que fueron habituados en el inicio del experimento. La toma de muestras se efectuó antes del inicio del periodo de ayuno (peces control), a los 19 días de ayuno y a los 1, 3 y 8 días de realimentación.

### **3.2.1. Influencia de la composición de la dieta en el índice hepatosomático**

Al analizar el IHS de los diferentes grupos de peces estudiados, observamos una tendencia a alcanzar valores más elevados en los grupos de peces alimentados con las dietas de mayor contenido en carbohidratos, tanto en los valores de los controles como en los niveles alcanzados por la realimentación (figura 3.5). Al comparar los valores alcanzados por los peces alimentados con la dieta 9 con los de la dieta 8, ambas con casi un 48% de composición proteica, o los de la dieta 11 con los de la 10, en ambos casos con un 38% de proteína, se puede observar que los niveles más elevados en el IHS se corresponden con los peces con mayor contenido de carbohidratos en la dieta.



**Figura 3.5 . Efecto del tipo de dieta sobre el índice hepatosomático (IHS) en doradas sometidas a ayuno y realimentación.**

En el diagrama de barras aparecen los valores de IHS [peso del hígado (g) x100/peso corporal(g)] obtenidos para peces alimentados durante 18 días (control) con diferentes dietas (7, 9, 8, 11 y 10), sometidos posteriormente a 19 días de ayuno y, finalmente, realimentados 1, 3 y 8 días. El IHS se expresa como el valor medio obtenido  $\pm$  SEM a partir de al menos tres individuos. Las dietas, cuya composición aparece detallada en la tabla 3.4 , fueron administradas una vez al día, en cantidad de un 2% en relación al peso fresco de los peces.

\* Diferencia significativa con el control,  $P < 0.05$ . \*\* Diferencia significativa con el control,  $P < 0.01$ . Las diferencias estadísticas se analizaron para cada uno de los grupos alimentados con una dieta diferente.

### **3.2.2. Efecto del tipo de dieta sobre la glucemia y los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno.**

En la tabla 3.5 aparecen los valores obtenidos para glucosa en suero. Aunque los valores de glucemia no muestran grandes variaciones entre las diferentes dietas objeto de estudio, los valores observados parecen indicar que en los peces alimentados con las dietas de mayor contenido de carbohidratos se tiende a presentar los mayores niveles de glucosa en sangre.

Los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno se muestran en las tablas 3.6 y 3.7. Ambos parámetros se ven influenciados positivamente por el contenido de carbohidratos de la dieta.

La dieta 7, con un alto contenido proteico, es la más cercana a la dieta que encuentran las doradas en el medio natural. Los niveles que se presentan para los dos metabolitos en los peces alimentados con la dieta 7 son bajos en comparación

con los observados en los grupos alimentados con las dietas de menor contenido proteico y mayor en carbohidratos. El ayuno durante 19 días promueve en todos los grupos un descenso hasta valores mínimos de glucógeno y Fru 2,6-P<sub>2</sub> en hígado. Dichos niveles se recuperaron por realimentación, aunque de forma diferenciada, en función de la composición de la dieta suministrada. En los peces alimentados con las dietas 7 y 9, tras 1 día de realimentación los valores de ambos metabolitos alcanzan e incluso sobrepasan los observados en peces control. Por el contrario, hasta sobrepasados los 3 días de realimentación, los grupos alimentados con las dietas de mayor contenido en carbohidratos y menor en proteína, dietas 11 y 10, no llegan a alcanzar los niveles de los grupos control.

	Control	Ayuno 19 días	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días
<b>Dieta 7</b>	82	70	113	83	85
<b>Dieta 9</b>	93	55	134	90	103
<b>Dieta 8</b>	77	50	246	82	92
<b>Dieta 11</b>	110	63	97	243	148
<b>Dieta 10</b>	83	58	338	228	127

**Tabla 3.5 . Efecto del tipo de dieta sobre los valores de glucosa en suero de peces sometidos a ayuno y realimentación.**

Los datos están expresados en mg/dl, habiendo sido determinados, como en la tabla 3.1, en *pools* de sueros de al menos cuatro individuos. Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.5 .

	Control	Ayuno 19 días	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días
<b>Dieta 7</b>	7.1±1.1 (3)	0.1±0.0 (3)**	10.6±2.6 (3)	12.0±2.5 (3)	7.9±1.0 (3)
<b>Dieta 9</b>	6.3±0.6 (3)	0.4±0.2 (3)**	5.3±0.6 (3)**	7.9±0.7 (3)*	8.3±0.3 (3)*
<b>Dieta 8</b>	10.7±3.8 (5)	0.4±0.3 (3)**	7.3±0.3 (3)	7.5±0.5 (3)	28.0±4.9 (3)**
<b>Dieta 11</b>	43.1±12.1 (3)	1.1±1.3 (3)**	7.5±0.8 (3)**	32.3±1.5 (3)	26.3±5.6 (3)*
<b>Dieta 10</b>	78.8±43.8 (3)	0.2±0.1 (3)*	7.5±2.5 (3)	51.4±17.2 (3)	60.0±24.6 (3)

**Tabla 3.6 . Efecto del tipo de dieta sobre los valores de Fru 2,6-P<sub>2</sub> en hígado de doradas sometidas a ayuno y realimentación.**

Los datos están expresados en nmol/g tejido y corresponden la valor de la media±SEM. El número de muestras analizadas está indicado entre paréntesis. La obtención de los extractos alcalinos y la determinación de Fru 2,6-P<sub>2</sub> se llevó a cabo como en la tabla 3.1 . Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.5 .

\* Diferencia significativa con el control, P < 0.05. \*\* Diferencia significativa con el control, P < 0.01.

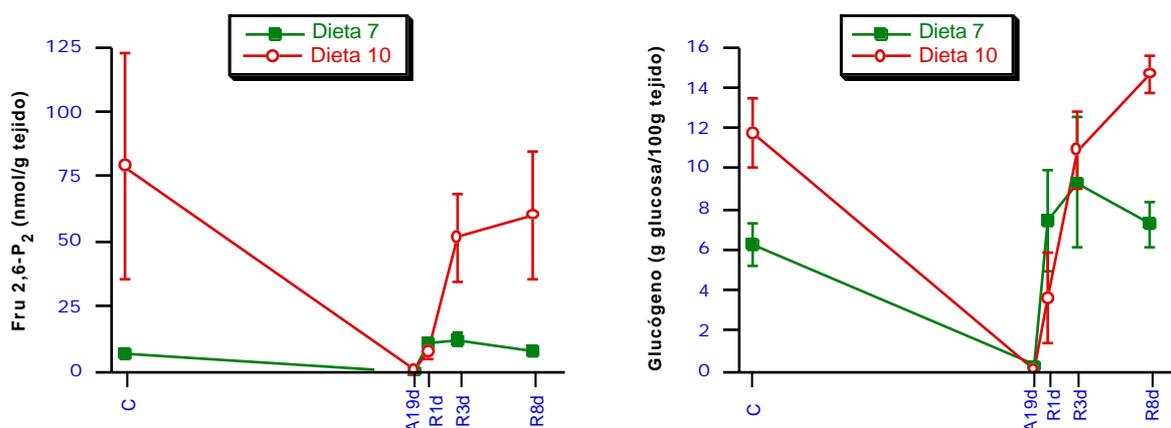
	Control	Ayuno 19 días	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días
<b>Dieta 7</b>	6.26±1.09 (3)	0.27±0.08 (3)**	7.44±2.52 (5)	9.32±3.27 (5)	7.26±1.14 (3)
<b>Dieta 9</b>	3.76±0.76 (3)	0.07±0.02 (3)**	2.86±1.27 (4)	5.68±0.30 (3)	4.51±0.46 (3)
<b>Dieta 8</b>	8.43±0.54 (3)	0.07±0.02 (3)**	3.83±0.16 (3)**	9.69±1.14 (3)	13.82±0.30 (3)**
<b>Dieta 11</b>	14.02±2.93 (3)	0.11±0.01 (3)**	2.09±0.46 (3)**	12.60±1.55 (3)	18.03±0.71 (3)*
<b>Dieta 10</b>	11.72±1.71 (3)	0.10±0.01 (3)**	3.57±2.23 (5)**	10.90±1.94 (3)	14.66±0.92 (3)

**Tabla 3.7. Efecto del tipo de dieta sobre los valores de glucógeno en hígado de doradas sometidas a ayuno y realimentación.**

Los datos están expresados en g glucosa/100 g tejido y corresponden a la media±SEM. El número de muestras determinadas se indica entre paréntesis. La obtención del extracto y la determinación de glucógeno se llevó a cabo como en la tabla 3.1. Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.5.

\* Diferencia significativa con el control, P < 0.05. \*\* Diferencia significativa con el control, P < 0.01.

La figura 3.6 muestra en forma de gráfica, la comparación de los valores de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno obtenidos para las dietas 7 y 10, las de composición más extrema.



**Figura 3.6. Comparación de los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno en hígado de doradas alimentadas con las dietas 7 y 10, y sometidas a ayuno y realimentación.**

Las condiciones de alimentación y las determinaciones de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno corresponden a las descritas en las tablas 3.6 y 3.7.

### 3.2.3. Respuesta de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST a la alimentación con dietas de diferente composición en hígado de dorada.

La regulación de las actividades enzimáticas glucolíticas (6-PF 1-K y PK) y las de la vía de las pentosas (Glu 6-P DH y 6-PG DH) ha mostrado, en hígado, una gran dependencia del contenido de carbohidratos en la dieta (tabla 3.8). Los valores

observados en los peces alimentados control muestran que la presencia de carbohidratos favorece el incremento de la actividad de dichas enzimas. Para las cuatro actividades enzimáticas, los niveles alcanzados en los peces alimentados con la dieta 10, la de mayor contenido en carbohidratos, son entre 1.6 y 2 veces más elevados que los observados en los peces alimentados con la dieta 7, la de menor contenido en carbohidratos y mayor en proteína.

El ayuno, por un periodo de 19 días, promueve en todas las dietas un descenso general en las actividades 6-PF 1-K, PK, Glu 6-P DH y 6-PG DH. Tras 1 día de realimentación, los niveles de las actividades 6-PF 1-K y PK muestran una sensible recuperación en las dietas estudiadas. Los peces alimentados con las dietas 7, 9 y 8, de menor contenido en carbohidratos, son los que alcanzan antes los valores que presentan los peces alimentados (control), cuyos valores ya son más bajos que los de las dietas 10 y 11, las de mayor contenido en carbohidratos. Los grupos alimentados con las dietas 10 y 11, siguen incrementando sus niveles de actividad a lo largo del periodo de realimentación, llegando a igualar o sobrepasar los valores observados en los peces control a los 8 días de realimentación.

Las actividades de las dos deshidrogenasas se recuperan, sin embargo, con más lentitud. Hasta el tercer día de realimentación no se observan valores de actividad diferentes de los presentados en condiciones de ayuno. Después de 8 días de iniciada la realimentación, las actividades de las deshidrogenasas alcanzan los valores de los peces alimentados control.

La realimentación con las distintas dietas estudiadas no mostró una respuesta diferenciada en la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, enzima clave en la gluconeogénesis (tabla 3.8), si bien en los peces alimentados (control) se observan ligeros incrementos en las dietas que presentan un mayor contenido en carbohidratos, dietas 10 y 11. En todos los casos, el ayuno promueve el incremento en dicha actividad, mientras que la realimentación durante 8 días no fue suficiente para restaurar los niveles observados en los peces control.

En la misma tabla aparecen detalladas las actividades enzimáticas correspondientes a las transaminasas ALT y AST, determinadas en extractos de hígado. En cuanto a la actividad ALT, se observa que en los peces alimentados con las dietas de mayor contenido proteico los valores son ligeramente superiores, promoviendo el ayuno un descenso más evidente que en los observados con las dietas pobres en proteína. Después de 19 días de ayuno, la realimentación conduce a una lenta recuperación de los valores en todas las dietas estudiadas, alcanzándose los niveles más elevados después de 8 días de realimentación. Por el

contrario, la actividad AST no mostró diferencias significativamente importantes en función de la alimentación con diferentes dietas, aunque se intuye una tendencia a incrementar en doradas sometidas a condiciones de ayuno.

Activ. Enzimática (mU/mg prot)	Dieta	Condición				
		Control alimentados	Ayuno 19 días	Realiment. 1 día	Realiment. 3 días	Realiment. 8 días
6-PF 1-K	7	30.7±2.0	8.8±3.1**	23.0±1.1*	34.3±3.7	30.7±1.8
	9	25.4±15.2	8.3±4.9	32.3±2.2	32.6±3.7	33.3±10.1
	8	33.0±2.9	8.7±1.9**	30.6±3.3	31.4±2.2	41.5±4.5*
	11	42.5±2.8	9.3±0.5**	30.8±7.0	38.8±2.1	53.7±8.1
	10	49.2±12.4	6.1±0.8**	37.0±5.1	39.1±2.4	65.5±13.9
PK	7	300±27	197±5*	205±31*	268±29	273±28
	9	382±42	146±17**	297±24*	283±21*	338±32
	8	513±74	231±83*	327±54	329±27	448±81
	11	799±163 (6)	305±35**	426±28**	427±27**	486±29**
	10	567±70	242±56**	360±30*	332±76*	524±68
Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa	7	123±8	137±30 (5)	156±2	194±28*	178±7
	9	119±11	219±10**	151±13	157±21	180±11*
	8	119±35	193±5*	211±34	145±17	194±35 (4)
	11	140±24	171±31 (5)	168±17	207±29	207±7
	10	141±23	185±19	164±10	156±5	190±67
Glu 6-P DH	7	110±49	84±8	86±10	145±26	187±20*
	9	132±28	113±14	117±26	134±5	124±29
	8	150±73	114±26	118±6	120±10	209±27
	11	163±3	116±10*	117±8*	118±17*	153±21
	10	221±36	105±7*	126±16*	122±5*	222±53
6-PG DH	7	24.4±3.3	13.8±1.9	19.3±2.6	28.6±8.4	30.2±0.6
	9	34.8±9.5	28.2±1.0	23.3±2.0	26.9±0.7	27.5±5.6
	8	44.5±8.7	25.1±3.2**	22.5±1.9**	24.0±3.6**	37.6±2.3
	11	40.3±5.3	29.6±2.7	24.6±1.9*	30.3±2.9	34.4±4.2
	10	44.6±9.4	28.5±1.6	26.1±4.0	28.1±1.4	48.7±10.8
ALT	7	1085±146	575±15*	847±40	911±222	1408±152*
	9	1040±89	567±6**	748±60*	795±91*	799±52*
	8	904±356	858±275	686±276	796±29	1109±167
	11	671±63	467±24*	521±64*	471±64*	526±29*
	10	811±201	470±81	490±75	490±51	538±41
AST	7	1745±48	1838±23	1457±116	1655±448	1786±228
	9	1489±16	1804±115**	1608±55	1498±47	1655±18
	8	1693±114	2417±693	1349±710	1462±205	1780±166
	11	1387±128	1802±357	1512±86	1120±17	1312±24
	10	1567±16	1833±200	1341±231	1076±16*	1544±78

**Tabla 3.8 . Efecto del tipo de dieta sobre las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST en hígado de doradas sometidas a ayuno y realimentación.**

Los datos están expresados en mU/mg prot, y representan la media±SEM, determinadas en muestras de tejido hepático de tres animales, salvo en los casos en los que el número de determinaciones está indicado entre paréntesis. La obtención de extractos crudos de tejido, así como las determinaciones de 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH se llevaron a cabo como en la figura 3.2 . Las determinaciones de ALT y AST fueron realizadas según los apartados 2.5.13. y 2.5.14. de *Materiales y métodos*. Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.5 .

\* Diferencia significativa con el control, P < 0.05. \*\* Diferencia significativa con el control, P < 0.01.

En la tabla 3.9 se muestran los descensos promovidos por el ayuno sobre las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, y los diferentes valores que alcanzan en las doradas sometidas posteriormente a realimentación con las diferentes dietas en estudio. Desde el primer día de realimentación, ambas relaciones tienden a recuperarse, aunque la realimentación durante 8 días no se ha mostrado suficiente para recuperar totalmente los valores observados en los peces control, como consecuencia de los altos niveles que presenta la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa.

	Dieta	Condición				
		Control	Ayuno 19 días	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días
<b>6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa</b>	7	0.25	0.06	0.15	0.18	0.17
	9	0.21	0.04	0.21	0.21	0.19
	8	0.28	0.05	0.15	0.22	0.21
	11	0.30	0.05	0.18	0.19	0.26
	10	0.35	0.03	0.23	0.25	0.35
<b>PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa</b>	7	2.44	1.44	1.31	1.38	1.53
	9	3.21	0.67	1.97	1.80	1.88
	8	4.31	1.20	1.55	2.27	2.31
	11	5.71	1.78	2.54	2.06	2.35
	10	4.02	1.31	2.20	2.13	2.76

**Tabla 3.9. Efecto del tipo de dieta sobre las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de doradas sometidas a ayuno y realimentación.**

**3.2.4. Efectos de la composición de la dieta sobre la actividad, cantidad y expresión de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de dorada.**

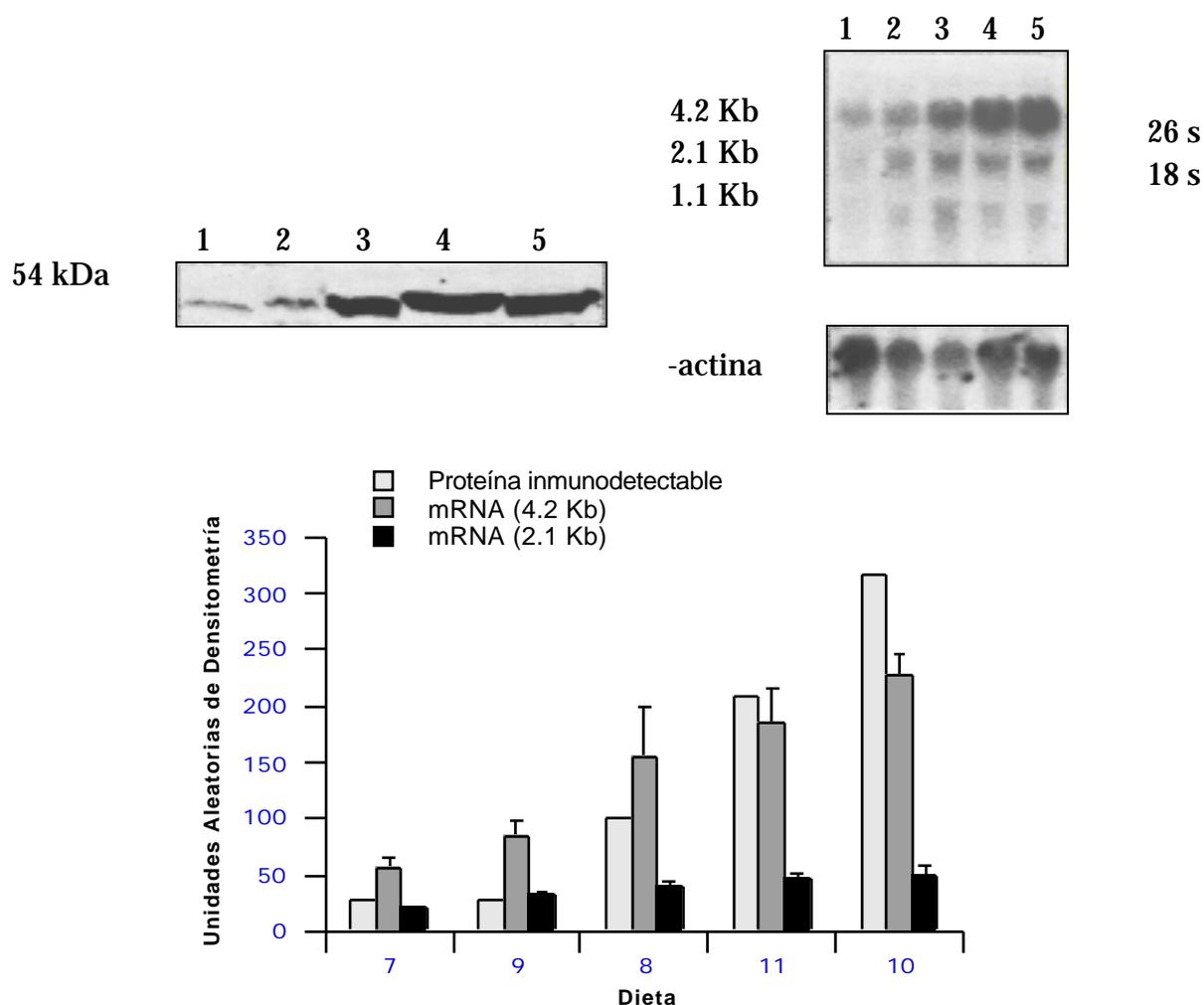
En la tabla 3.10 se presentan las determinaciones de las formas activa y total de la enzima 6-PF 2-K, así como la relación entre ambas actividades en doradas alimentadas con diferentes tipos de dietas y posteriormente sometidas a ayuno y realimentación. Los parámetros determinados muestran una correlación positiva con el contenido de carbohidratos de la dieta, encontrándose los mayores valores de actividad en los peces alimentados con las dietas de mayor contenido en carbohidratos. El ayuno, por un periodo de 19 días, promueve un descenso, tanto en la forma activa como en la total de la enzima, independientemente del tipo de dieta suministrado. Sin embargo, este descenso es más acusado en la forma activa. En todas las dietas ensayadas, la realimentación da lugar a la recuperación de los valores observados en los peces alimentados, control, en

dichos parámetros. A los 3 días de iniciada la realimentación, los valores alcanzados por las formas activa y total de la enzima, son equivalentes para todas las dietas estudiadas. Aquéllas de menor contenido en carbohidratos, dietas 7 y 9, ya presentan en ese momento los valores observados en sus correspondientes controles. Las dietas 8, 11 y 10, cuyos valores de actividad control son mayores que los de las dietas 7 y 9, después de 8 días de realimentación no llegan a alcanzar los niveles control.

		Dieta				
		7	9	8	11	10
<b>Control</b>	<b>Activa</b>	9.13±0.72	5.78±0.81	9.32±2.76	15.79±0.59	21.12±1.08
	<b>Total</b>	16.60±3.91	12.13±2.66	22.66±10.14	27.01±4.62	36.80±1.31
	<b>Act./Tot.</b>	0.56±0.08	0.48±0.04	0.43±0.07	0.60±0.08	0.58±0.05
<b>Ayuno 19 días</b>	<b>Activa</b>	0.11±0.08	0.29±0.26	0.20±0.21	0.12±0.07	0.14±0.09
	<b>Total</b>	3.54±2.03	3.98±0.85	5.50±2.59	4.74±1.00	4.38±3.95
	<b>Act./Tot.</b>	0.03±0.00	0.07±0.05	0.04±0.02	0.03±0.02	0.04±0.01
<b>Realim. 3 días</b>	<b>Activa</b>	7.51±0.55	7.32±0.35	9.16±1.12	7.89±1.68	8.12±0.75
	<b>Total</b>	13.66±0.11	13.97±2.50	17.12±3.29	10.50±2.31	14.70±1.06
	<b>Act./Tot.</b>	0.55±0.04	0.53±0.07	0.54±0.04	0.76±0.01	0.55±0.01
<b>Realim. 8 días</b>	<b>Activa</b>	9.10±0.11	7.86±0.93	9.19±1.01	12.13±0.66	16.04±0.26
	<b>Total</b>	17.11±1.75	14.20±0.32	17.53±8.12	17.90±1.48	25.62±1.55
	<b>Act./Tot.</b>	0.53±0.06	0.56±0.05	0.58±0.21	0.68±0.09	0.63±0.05

**Tabla 3.10 . Efecto del tipo de dieta sobre la actividad enzimática 6-PF 2-K en hígado de doradas sometidas a ayuno y realimentación.**

Los datos están expresados en mU/g tejido, correspondiendo a la media±SEM de las determinaciones de cuatro individuos. La obtención de los extractos y la determinación de la actividad 6-PF 2-K se realizó como en la tabla 3.3 . Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.5 .



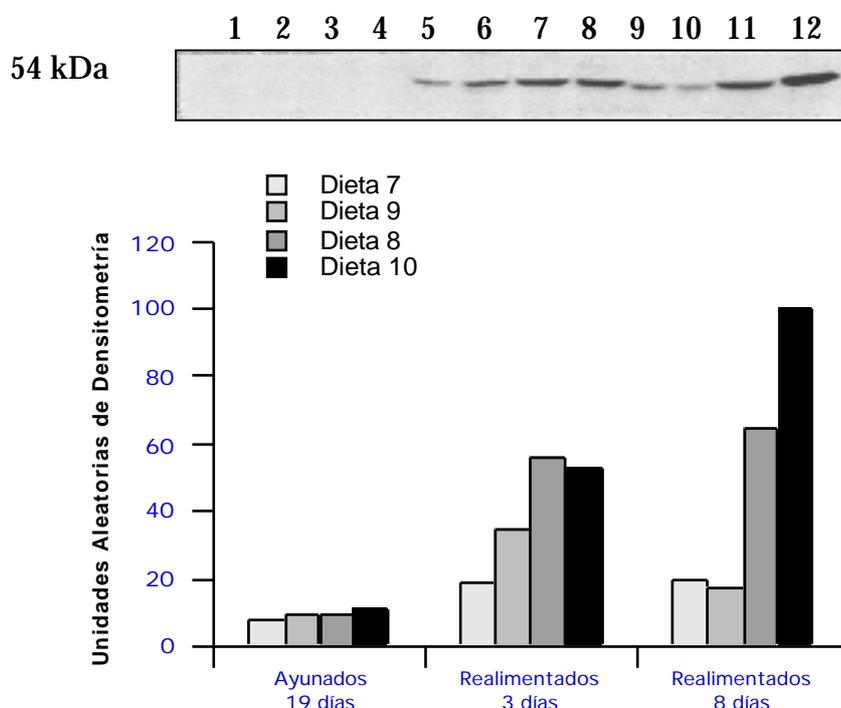
**Figura 3.7. Análisis por Western y Northern blot de la cantidad de proteína inmunodetectable y de los niveles de ARN<sub>m</sub> de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de doradas alimentadas con diferentes dietas.**

En la parte superior izquierda de la figura se muestra la autorradiografía de la inmunodetección por *Western blot* de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en extractos parcialmente purificados, obtenidos a partir de *pools* de tejido hepático de 3 peces. Carril 1: grupo de peces alimentados con la dieta 7; carril 2: peces alimentados con la dieta 9; carril 3: peces alimentados con la dieta 8; carril 4: peces alimentados con la dieta 11; carril 5: peces alimentados con la dieta 10. La obtención de extractos y el análisis por *Western blot* se llevó a cabo como se indica en la figura 3.3.

En la parte superior derecha se puede observar la autorradiografía del análisis por *Northern blot* de ARN total, aislado de *pools* de tejido hepático de 3 peces, tras hibridación con una sonda de ADN<sub>c</sub> del ARN<sub>m</sub> de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado. Se cargaron 20 µg de ARN total por carril. Carril 1: grupo de peces alimentados con la dieta 7; carril 2: peces alimentados con la dieta 9; carril 3: peces alimentados con la dieta 8; carril 4: peces alimentados con la dieta 11; carril 5: peces alimentados con la dieta 10. Previa deshibridación del filtro, se rehibridó con una sonda de *-actina* de rata. El aislamiento de ARN total y el análisis por *Northern blot* fue realizado como en la figura 3.4. Los peces fueron alimentados una vez al día con dieta al 2% del peso fresco durante 18 días. La composición de las dietas se describe en la tabla 3.4.

En la parte inferior se representa, con diagrama de barras, el análisis densitométrico de las películas de autorradiografía de los análisis por *Western* (proteína inmunorreactiva) y *Northern blot* (análisis de las bandas de ARN de 4.2 y 2.1 Kb, efectuados sobre tres réplicas) de grupos de peces alimentados con las dietas 7, 9, 8, 11 y 10.

Tras un ayuno de 19 días, la realimentación de doradas con las dietas de menor contenido en carbohidratos (7 y 9), no conduce a un aumento significativo en la cantidad de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa o en los niveles de ARN<sub>m</sub>, respecto a los valores observados en condiciones de ayuno (figuras 3.8 y 3.9). Por el contrario, la realimentación con las dietas de mayor contenido de carbohidratos (8, 11 y 10) promueve cambios significativos en ambos parámetros. En cuanto a la cantidad de proteína detectada por *Western blot*, los cambios son apreciables a partir del tercer día de realimentación. Después de 1 día de realimentación la cantidad de proteína inmunorreactiva no se diferencia de la observada en ayuno (resultados no presentados), sin embargo, los niveles de ARN<sub>m</sub> ya experimentan un incremento en los peces alimentados con las dietas más ricas en carbohidratos.

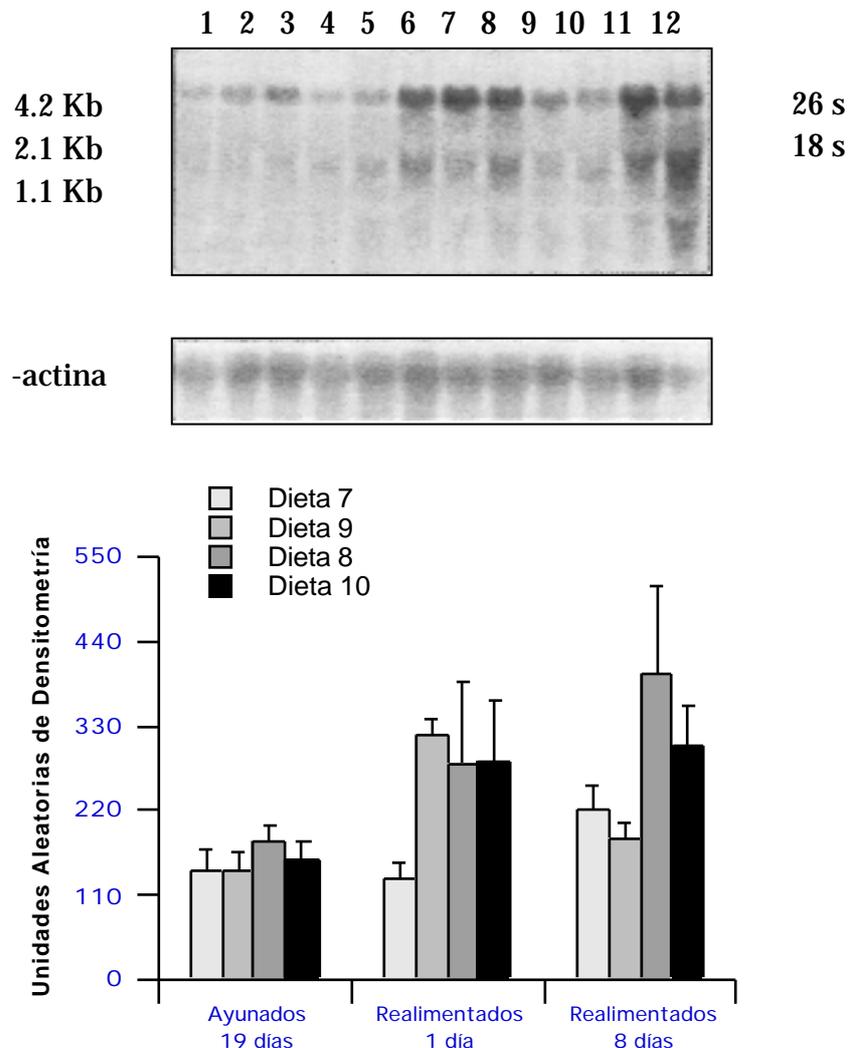


**Figura 3.8 . Análisis por *Western blot* del efecto de la realimentación con diferentes dietas sobre la cantidad de enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.**

En la parte superior de la figura se muestra la autorradiografía del análisis por *Western blot* de la inmunodetección de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, realizado a partir de extractos parcialmente purificados, obtenidos a partir de *pools* de tejido hepático procedente de 3 peces. Carriles 1-4: grupos de peces sometidos a un ayuno de 19 días, que habían estado habituados previamente a la alimentación con las dietas 7, 9, 8 y 10 respectivamente; carriles 5-8: peces realimentados, después del periodo de ayuno, durante 3 días con las dietas 7, 9, 8 y 10, respectivamente; carriles 9-12: peces realimentados 8 días con las dietas 7, 9, 8 y 10, respectivamente. La obtención de extractos y el análisis por *Western blot* se llevó a cabo como en la figura 3.3 . Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.5 .

En la parte inferior se representa, con diagrama de barras, el análisis densitométrico de la películas de autorradiografía del análisis por *Western blot* .

Estos resultados sugieren que las variaciones en la actividad enzimática 6-PF 2-K observadas en peces alimentados con las dietas más pobres en carbohidratos, no serían debidas en gran medida a cambios en los niveles de mensajero, proceso que al parecer sí adquiriría relevancia en lo peces alimentados con dietas de elevado contenido en carbohidratos.



**Figura 3.9 . Análisis por Northern blot del efecto de la composición de la dieta sobre los niveles de ARN<sub>m</sub> de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de doradas sometidas a ayuno y realimentación.**

En la parte superior de la figura se puede observar la autorradiografía del análisis por Northern blot de ARN total, obtenido de pools de tejido hepático de 3 peces, tras hibridación con una sonda de ADN<sub>c</sub> del ARN<sub>m</sub> de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado. Se cargaron 20 µg de ARN total por carril. Carriles 1-4: grupos de peces sometidos a un ayuno de 19 días, y que previamente se habían alimentado con las dietas 7, 9, 8 y 10 respectivamente; carriles 5-8: peces realimentados durante 1 día, después del ayuno, con las dietas 7, 9, 8 y 10, respectivamente; carriles 9-12: peces realimentados 8 días con las dietas 7, 9, 8 y 10, respectivamente. Previa deshibridación del filtro, se rehibridó con una sonda de -actina de rata. El aislamiento de ARN total y el análisis por Northern blot fue realizado como en la figura 3.4 . Las condiciones de alimentación de los peces son las descritas en la figura 3.5 .

En la parte inferior de la figura se representa, en diagrama de barras, el análisis densitométrico las películas de autorradiografía de tres experimentos (banda de ARN de 4.2 Kb).

El análisis de la actividad (tabla 3.10), cantidad de enzima detectable por *Western blot* (figuras 3.7 y 3.8), y de los niveles de ARN<sub>m</sub> (figuras 3.7 y 3.9) de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, ha indicado una correlación positiva entre los tres parámetros determinados y la cantidad de carbohidratos de la dieta.

### 3.3. EFECTO DE LA CANTIDAD DE DIETA

El efecto que provoca la alimentación con diferentes cantidades de dieta sobre el metabolismo hepático de carbohidratos en dorada, fue comprobado suministrando distintas cantidades de una misma dieta a diferentes grupos de peces. Así, cuatro grupos de animales, después de estar en ayuno por un período de 8 días, fueron realimentados durante 22 días con cantidades de dieta al 0.5%, 1%, 2% y 3.5% en relación al peso fresco de los peces, suministradas una vez al día. La dieta utilizada fue la número 8 (17.0% carbohidratos, 47.6% proteína, 12.5% lípidos, 20% sales minerales, 2.8% humedad, 445.1 Kcal/100g). Se tomaron muestras de tejidos a los 8 días de ayuno, así como a los 1, 3, 8 y 22 días de iniciada la realimentación, después del periodo de ayuno.

#### **3.3.1. Variaciones en el crecimiento y en el índice hepatosomático a consecuencia de la alimentación con diferentes cantidades de dieta.**

La tabla 3.11 muestra la ganancia diaria de peso en los grupos de peces realimentados durante 22 días, tras un periodo de 8 días de ayuno, con cantidades de dieta correspondientes al 0.5, 1, 2 y 3.5% del peso fresco de los peces.

Mientras los peces alimentados al 0.5% llegaron incluso a perder peso respecto al grupo de peces en ayuno, el resto mostró incrementos dependientes de la cantidad de dieta suministrada. En los peces alimentados con dieta al 2 y al 3.5%, los incrementos son significativos respecto a los valores de ayuno.

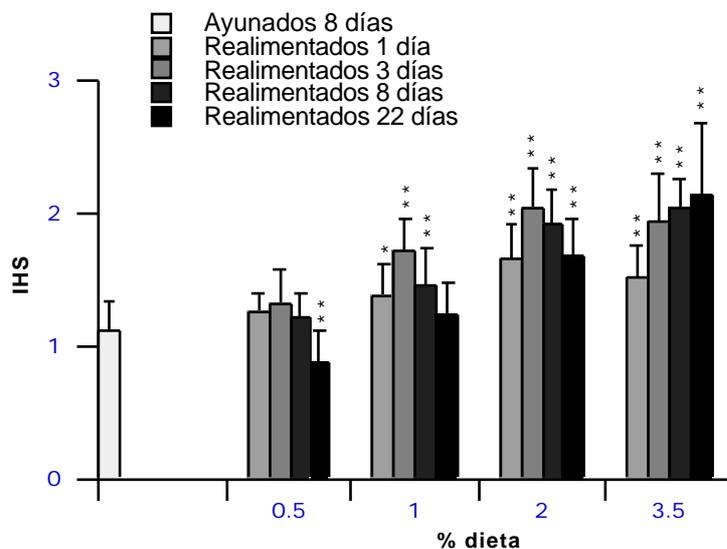
También el IHS se vió afectado en dorada, por el aporte de diferentes cantidades de dieta. A los 22 días de realimentación, los peces alimentados al 0.5% presentaron el índice más bajo, inferior incluso al observado en condiciones de 8 días de ayuno. En el resto de los grupos estudiados, el valor del IHS se observó más elevado cuanto mayor era la cantidad de dieta suministrada (figura 3.10), incrementando de forma gradual desde el primer día de la realimentación.

Condición	Peso fresco (g/pez)	Incremento diario de peso (g/pez) respecto al ayuno de 8 días
Ayunados 8 días	9.56±1.45 (18)	
Realimentados 22 días al 0.5%	8.67±1.24 (20)	-0.041
Realimentados 22 días al 1%	10.45±1.40 (20)	+0.041
Realimentados 22 días al 2%	12.28±2.02 (18)**	+0.124
Realimentados 22 días al 3.5%	13.46±2.20 (14)**	+0.175

**Tabla 3.11 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre el peso fresco.**

Se representan en g/pez los valores de peso fresco, expresado como media±SEM del número de peces indicado entre paréntesis, y de ganancia diaria de peso determinados para los grupos de peces realimentados durante 22 días, después de un periodo de ayuno previo de 8 días, con cantidades de dieta del 0.5, 1, 2 y 3.5% en relación al peso fresco de los peces, suministradas una vez al día. La composición de la dieta suministrada es: 17.0% carbohidratos, 47.6% proteína, 12.5% lípidos, 20% sales minerales, 2.8% humedad y 445.1 Kcal/100g.

\*\* Diferencia significativa con el grupo ayunado 8 días, P < 0.01.



**Figura 3.10 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre el índice hepatosomático (IHS).**

El IHS [peso del hígado (g) x100/peso corporal(g)] se representa como media±SEM de al menos diez determinaciones. Los peces fueron realimentados durante 1, 3, 8 y 22 días después de un periodo previo de ayuno de 8 días. La cantidad de dieta (% dieta), que fue suministrada una vez al día, se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. La composición de la dieta utilizada aparece detallada en la tabla 3.11 .

\* Diferencia significativa con el ayuno, P < 0.05. \*\* Diferencia significativa con el ayuno, P < 0.01.

**3.3.2. Efecto de la alimentación con diferentes porcentajes de dieta sobre los valores séricos de glucosa y lactato.**

Los valores de glucosa y lactato en suero se vieron afectados por la restricción energética. Las doradas alimentadas con la dieta 8 al 0.5% de peso fresco mostraron valores cercanos a los observados en los peces en condiciones de ayuno, (tablas 3.12 y 3.13). Hasta los 22 días de realimentación, los valores séricos de glucosa y lactato no muestran grandes diferencias entre los grupos alimentados con distintas cantidades de dieta. Los valores más elevados se encontraron en los peces alimentados con dieta al 3.5% del peso fresco de los peces, como consecuencia del mayor aporte de nutrientes suministrado por la dieta.

Ayuno 8 días	% dieta	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días	Real. 22 días
43	0.5	50	47	53	56
	1	58	57	70	83
	2	67	64	63	107
	3.5	71	66	61	122

**Tabla 3.12 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre los valores de glucosa en suero.**

Los datos, expresados en mg/dl, fueron determinados en *pools* de sueros obtenidos con muestras de al menos diez individuos. Las determinaciones se llevaron a cabo como en la tabla 3.1 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

Ayuno 8 días	% dieta	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días	Real. 22 días
19	0.5	19	15	14	16
	1	26	25	21	18
	2	20	15	20	31
	3.5	29	20	31	50

**Tabla 3.13 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre los valores de lactato en suero.**

Los datos, expresados en mg/dl, fueron determinados en *pools* de sueros de al menos diez individuos. Las determinaciones se realizaron como en la tabla 3.1 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

**3.3.3. Efecto de la alimentación con distintas cantidades de dieta sobre los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno.**

En las tablas 3.14 y 3.15 aparecen los valores hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno, respectivamente, resultado de la alimentación con diferentes cantidades de dieta. Los peces realimentados al 0.5% presentan los niveles más bajos para ambos metabolitos, aunque superiores a los valores que presentan las doradas en condiciones de ayuno. Los valores más elevados de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno correspondieron a los peces alimentados al 2%, valores incluso superiores a los observados en los peces alimentados al 3.5%. El nivel de Fru 2,6-P<sub>2</sub> en hígado muestra diferencias entre los grupos alimentados con distintas cantidades de dieta hasta los 8 días de iniciada la realimentación. Por el contrario, los niveles de glucógeno ya mostraron diferencias desde el primer día de realimentación.

Ayuno 8 días	% dieta	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días	Real. 22 días
0.9±0.3 (6)	0.5	4.2±1.7 (6)**	3.8±1.3 (4)**	4.2±0.8 (4)**	8.3±1.1 (4)**
	1	4.2±2.2 (4)**	5.3±0.2 (4)**	8.6±1.3 (4)**	13.2±1.9 (4)**
	2	4.2±1.2 (4)**	5.5±1.0 (4)**	11.2±2.0 (4)**	19.0±7.5 (6)**
	3.5	4.8±0.8 (4)**	3.6±0.9 (6)**	10.4±1.4 (4)**	13.3±4.1 (6)**

**Tabla 3.14 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre los valores de Fru 2,6-P<sub>2</sub> en hígado.**

Los valores están expresados en nmol/g tejido, y corresponden a la media±SEM. El número de individuos utilizados para cada determinación está indicado entre paréntesis. La obtención de extractos de tejido y las determinaciones fueron realizadas como en la tabla 3.1 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

\*\* Diferencia significativa con el ayuno, P < 0.01.

Ayuno 8 días	% dieta	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días	Real. 22 días
0.2±0.1 (4)	0.5	1.1±0.9 (4)	4.9±1.8 (4)**	3.0±1.0 (4)*	2.1±1.8 (4)
	1	1.2±1.3 (4)	5.3±2.2 (4)**	6.8±1.2 (4)**	9.2±1.3 (4)**
	2	5.5±1.5 (4)**	7.50±1.9 (4)**	10.9±1.3 (4)**	12.8±2.8 (5)**
	3.5	7.1±2.0 (4)**	6.9±3.2 (6)**	7.6±2.9 (5)**	10.2±3.9 (6)**

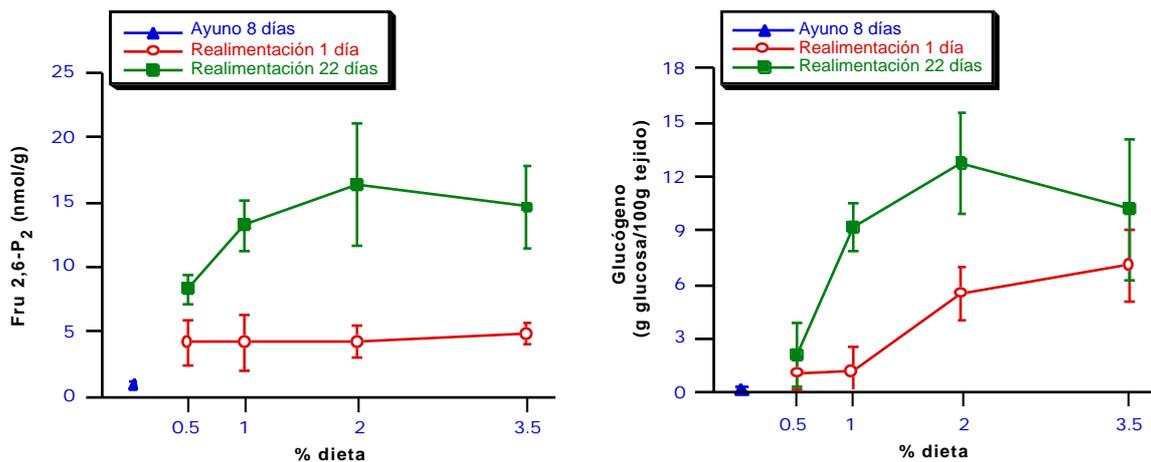
**Tabla 3.15 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre los valores de glucógeno en hígado.**

Los valores está expresados en g glucosa/100 g tejido como media±SEM, determinados con el número de individuos indicados entre paréntesis. Extractos y determinaciones se realizaron como en la tabla 3.1 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

\* Diferencia significativa con el ayuno, P < 0.05. \*\* Diferencia significativa con el ayuno, P < 0.01.

En la figura 3.11 se representan los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno observados después de 1 y 22 días de realimentación en los grupos de peces alimentados con diferentes cantidades de dieta. En la figura se observa que los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, tras el primer día de realimentación, no se diferencian en función de la cantidad de dieta suministrada, presentando los diferentes grupos un valor 5 veces superior al observado en condiciones de ayuno. En cambio, los niveles de glucógeno correlacionaron con la cantidad de dieta suministrada ya en el primer día de realimentación.

A los 22 días de iniciada la realimentación, el nivel de Fru 2,6-P<sub>2</sub> en el grupo alimentado al 0.5% es 9 veces superior al observado en los peces en ayuno, mientras que el resto de grupos alimentados presentó unos valores de 15 a 20 veces superiores a los de ayuno. En cuanto al glucógeno, mientras los grupos alimentados con el 1, 2 y 3.5% presentaron valores entre 45 y 65 veces superiores a los de los peces en ayuno, los niveles observados en los peces alimentados al 0.5% eran tan sólo 10 veces superiores a los encontrados en ayuno.



**Figura 3.11 . Comparación del efecto de la cantidad de dieta suministrada entre la realimentación a 1 y 22 días sobre los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno en hígado.**

Los valores representados y las condiciones de alimentación son los indicados en las tablas 3.14 y 3.15, para Fru 2,6-P<sub>2</sub> y glucógeno respectivamente.

Los valores de Fru 6-P y Glu 6-P, determinados en hígado, aparecen en las tablas 3.16 y 3.17. Todos los grupos alimentados mostraron niveles superiores a los observados en condiciones de ayuno desde el primer día de realimentación, en donde se puede observar que el grupo de peces con mayor aporte energético (3.5%) presentó una recuperación notablemente mayor, para ambos metabolitos, que el resto de peces. Sin embargo, a partir del tercer día de realimentación no se

detectaron diferencias significativas en función de la cantidad de dieta suministrada.

Ayuno 8 días	% dieta	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días	Real. 22 días
6.7±1.5 (3)	0.5	16.7±14.0 (3)	119.1±14.0 (3)	110.7±24.6 (3)	--
	1	12.9±8.3 (3)	71.3±19.2 (3)	99.3±47.3 (3)	122.5±30.2 (4)
	2	17.7±2.8 (4)	68.9±17.9 (3)	70.4±19.0 (3)	127.7±55.3 (4)
	3.5	33.8±10.7 (3)	77.0±30.7 (3)	93.9±33.1 (4)	111.2±24.5 (4)

**Tabla 3.16 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre los valores de Fru 6-P en hígado.**

Los valores están expresados en nmol/g tejido, y corresponden a la media±SEM. El número de individuos utilizados se indica entre paréntesis. Extractos y determinaciones se llevaron a cabo como en la tabla 3.1 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

Ayuno 8 días	% dieta	Real. 1 día	Real. 3 días	Real. 8 días	Real. 22 días
26±11 (3)	0.5	43±2 (3)	555±92 (3)	519±83 (3)	--
	1	32±31 (3)	307±88 (3)	400±170 (3)	599±131 (4)
	2	59±27 (4)	308±31 (3)	394±55 (3)	512±289 (4)
	3.5	162±49 (3)	356±127 (3)	408±177 (4)	562±113 (4)

**Tabla 3.17 . Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre los valores de Glu 6-P en hígado.**

Los valores están expresados en nmol/g tejido como media±SEM. El número de individuos utilizados se indica entre paréntesis. La obtención de extractos de tejido y las determinaciones se llevaron a cabo como en la tabla 3.1 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

### **3.3.4. Variaciones en las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST en hígado de dorada como consecuencia de la alimentación con diferentes cantidades de dieta.**

En la tabla 3.18 se presentan los valores de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST ensayadas en hígado de doradas alimentadas con diferentes cantidades de dieta.

El efecto de la alimentación con diferentes cantidades de dieta sobre las actividades enzimáticas estudiadas fue especialmente acusado en los peces alimentados al 0.5%. Los valores que presentan las actividades 6-PF 1-K y PK

(glucólisis), Glu 6-P DH y 6-PG DH (pentosas fosfato) y ALT (metabolismo de aminoácidos) a los 22 días de realimentación, no sólo no estaban en ningún caso significativamente por encima de los valores en situación de ayuno, sino que las actividades enzimáticas PK y las de las dos deshidrogenasas mostraron valores incluso significativamente inferiores a los observados en los peces en condiciones de ayuno. De forma análoga, la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (gluconeogénesis), en los grupos alimentados al 0.5%, presentó valores equivalentes a los observados en condiciones de ayuno.

El que la situación metabólica de los peces alimentados al 0.5% se mostrara peor incluso que la de los peces en condiciones de ayuno, sugiere que el aporte energético que recibieron era insuficiente para su mantenimiento, fenómeno que se ha visto también reflejado por el crecimiento negativo presentado por este grupo de doradas (tabla 3.11).

En los peces alimentados al 1%, las actividades 6-PF 1-K, PK, Glu 6-P DH, 6-PG DH y ALT, son ligeramente superiores a la que presentan el grupo alimentado al 0.5%, sin llegar, no obstante, a superar en gran medida a las observadas en condiciones de ayuno.

A los 22 días de realimentación con distintas cantidades de dieta, los valores más elevados de las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Glu 6-P DH, 6-PG DH y ALT, así como los más bajos de la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, se observaron, como era de esperar, en los peces alimentados al 2 y al 3.5%. Entre ambos porcentajes de alimentación no se encontraron diferencias notables. (tabla 3.18).

La actividad AST, a diferencia del resto de actividades enzimáticas estudiadas, no se vió afectada por la restricción energética. A los 22 días de realimentación la actividad AST presentó, en todos los grupos estudiados, valores inferiores a los observados en condiciones de ayuno, independientemente de la cantidad de dieta suministrada.

En la tabla 3.19 se muestran las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa. Hasta el octavo día de realimentación no se encontraron diferencias en las dos relaciones entre los diferentes grupos de peces, concretamente los valores del grupo alimentado al 0.5% fueron los más bajos. El resto de grupos no presenta diferencias entre si hasta los 22 días de iniciada la realimentación con diferentes cantidades de dieta, momento en el que se puede observar la correlación existente entre la cantidad de dieta suministrada y los valores determinados para ambas relaciones.

Activ. Enzimática (mU/mg prot)	Ayunados 8 días	% peso fresco en la dieta	Realimentación			
			1 día	3 días	8 días	22 días
6-PF 1-K	15.0±5.5	0.5	16.4±5.6 (6)	20.7±7.5 (5)	14.7±3.4	21.0±2.8
		1	16.3±7.4 (6)	28.4±0.3 (3)	25.6±9.3 (5)	22.5±5.6
		2	32.4±1.4**	28.7±2.1**	40.7±9.5 (6)**	38.6±3.5**
		3.5	25.5±4.6**	29.6±7.2**	32.3±3.3**	38.7±2.2**
PK	231±29	0.5	216±25	176±30 (3)*	181±15*	160±23*
		1	191±16	221±32	226±33	301±28**
		2	195±38	194±21	286±36*	340±36**
		3.5	227±9	228±36	292±39 (6)*	371±19**
Fru 1,6-P <sub>2</sub> asa	162±19	0.5	153±12	100±14**	130±6**	162±13 (6)
		1	156±17	119±34 (6)*	95±10**	146±15 (6)
		2	160±17	156±19	108±39 (8)*	131±18 (6)
		3.5	130±18*	149±11 (3)	121±24 (6)*	111±9 (6)**
Glu 6-P DH	133±34 (3)	0.5	120±15	105±22	78±13**	73±13**
		1	111±14	107±15 (3)	105±33	95±14
		2	134±13	107±14	126±30 (5)	154±55 (7)
		3.5	115±15	99±26 (3)	158±38	175±21
6-PG DH	35±2	0.5	25±0 (3)	29±6	29±5	24±5*
		1	26±4 (3)	29±5	28±6	28±4
		2	34±2	29±6	41±13	45±9 (4)
		3.5	32±3	40±17 (5)	36±8	41±8 (6)
ALT	306±112	0.5	584±141*	472±55	427±65	305±148
		1	588±83 (3)**	526±78**	580±97**	629±81**
		2	417±38	511±87	448±132	1071±236 (3)**
		3.5	436±28	452±133	671±43**	831±132 (3)**
AST	2218±344	0.5	1515±459*	2074±98	1539±59*	1438±304*
		1	2071±505	1752±206 (3)	2052±238	1438±102*
		2	1663±223*	1615±48*	1690±216 (3)*	1891±272
		3.5	1433±170**	1846±358 (3)	1862±169	1502±195**

Tabla 3.18 . Efecto de la cantidad de dieta sobre las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST en hígado de dorada.

Los datos, expresados en mU/mg prot, hacen referencia a la media±SEM, determinada en extractos hepáticos de cuatro animales, salvo en los casos en los que el número de determinaciones está indicado entre paréntesis. La obtención de extractos crudos de hígado y las determinaciones de las actividades enzimáticas fueron llevadas a cabo como en la tabla 3.8 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

\* Diferencia significativa con el ayuno, P < 0.05. \*\* Diferencia significativa con el ayuno, P < 0.01.

	Ayunados 8 días	% peso fresco en la dieta	Realimentación			
			1 día	3 días	8 días	22 días
<b>6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa</b>	0.09	0.5	0.11	0.21	0.11	0.13
		1	0.11	0.24	0.27	0.15
		2	0.20	0.18	0.38	0.30
		3.5	0.20	0.20	0.27	0.35
<b>PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa</b>	1.43	0.5	1.41	1.76	1.39	0.99
		1	1.22	1.86	2.38	2.06
		2	1.22	1.24	2.65	2.60
		3.5	1.75	1.53	2.41	3.34

Tabla 3.19 . Efecto de la cantidad de dieta sobre las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa.

En las figuras 3.12 y 3.13 se representan las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Gluc 6-P DH, 6-PG DH, ALT y AST ensayadas en hígado de doradas realimentadas durante 1 y 22 días con diferentes cantidades de dieta.

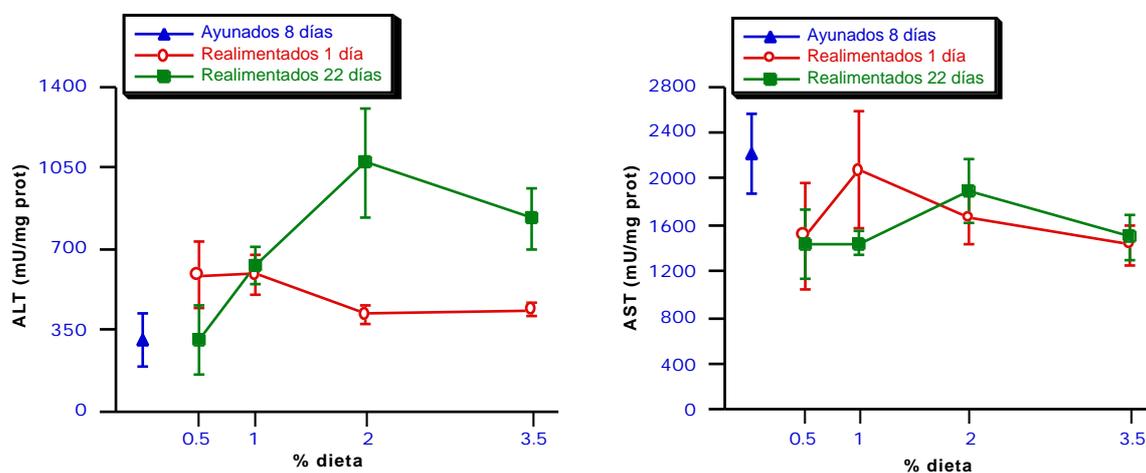
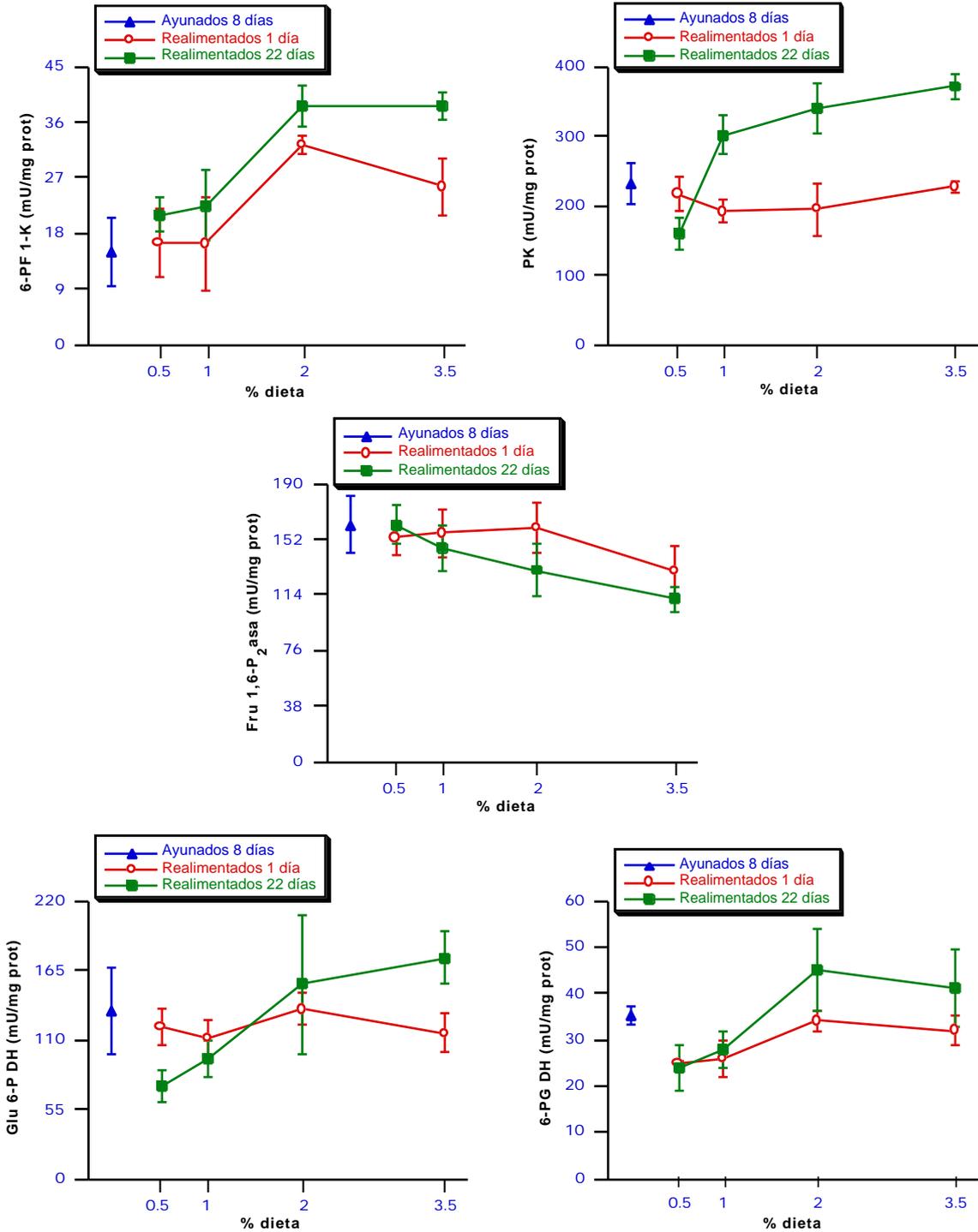


Figura 3.12 . Comparación del efecto de la cantidad de dieta suministrada durante 1 y 22 días sobre las actividades enzimáticas ALT y AST en hígado de dorada.

Las condiciones de alimentación y las actividades enzimáticas corresponden a las descritas en la tabla 3.18 .



**Figura 3.13. Comparación del efecto de la cantidad de dieta suministrada durante 1 y 22 días sobre las actividades enzimáticas 6-PF 1-K, PK, Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, Glu 6-P DH y 6-PG DH en hígado de dorada.**

Las condiciones de alimentación y las actividades enzimáticas se corresponden a las descritas en la tabla 3.18 .

**3.3.5. Cambios en la actividad, cantidad de proteína y mensajero de la enzima hepática 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa como consecuencia de la alimentación con diferentes cantidades de dieta.**

La actividad enzimática 6-PF 2-K, presentada en la tabla 3.20, se vió afectada, tanto al ensayar la forma activa como la forma total de la 6-PF 2-K, por la alimentación con diferentes cantidades de dieta.

Ayunados 8 días	6-PF 2-K	% dieta	Realimentación			
			1 día	3 días	8 días	22 días
0.3±0.4	Activa	0.5	6.8±1.0	7.7±0.9	7.1±0.5	7.9±2.9
4.3±1.8	Total		17.7±1.7	12.2±1.9	12.9±1.4	15.0±4.0
0.08±0.09	Act./Tot.		0.39±0.07	0.64±0.05	0.55±0.05	0.53±0.07
	Activa	1	7.0±1.5	8.1±1.2	8.5±0.8	11.8±2.2
	Total		15.0±1.4	13.2±2.6	17.7±2.2	23.6±6.5
	Act./Tot.		0.47±0.11	0.62±0.06	0.48±0.05	0.51±0.07
	Activa	2	7.6±2.7	8.5±0.9	10.2±0.8	15.8±4.2
	Total		13.5±2.9	14.0±1.9	21.7±2.0	40.1±5.8
	Act./Tot.		0.55±0.07	0.61±0.08	0.47±0.01	0.39±0.09
	Activa	3.5	9.0±1.5	7.6±1.1	13.5±1.5	17.9±4.8
	Total		20.1±4.4	14.0±2.4	22.2±1.9	53.4±11.0
	Act./Tot.		0.46±0.12	0.55±0.05	0.61±0.07	0.33±0.03

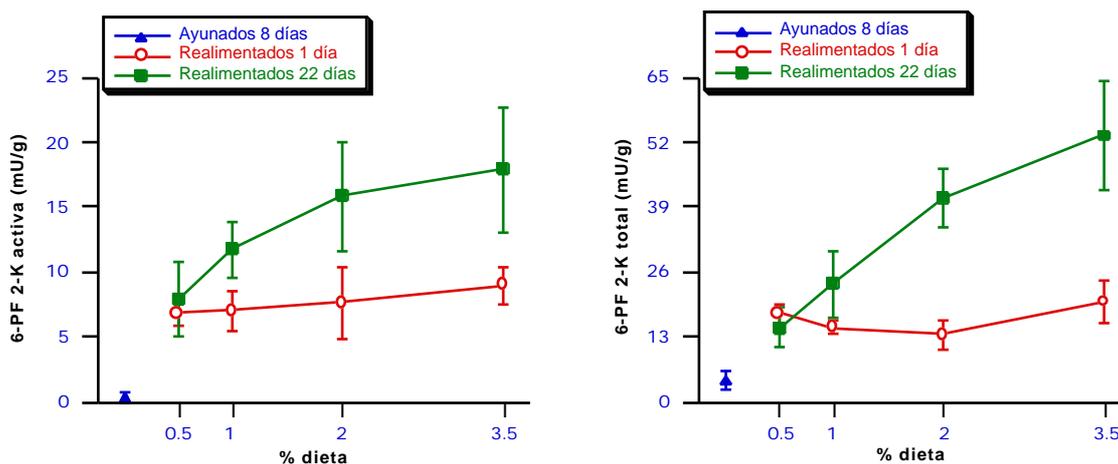
**Tabla 3.20 . Efecto de la cantidad de dieta sobre la actividad enzimática 6-PF 2-K.**

En la tabla se presentan los valores obtenidos en los ensayos de las formas activa y total, así como la relación entre ambas, resultado del ayuno y de la realimentación con distintas cantidades de dieta. Los datos están expresados en mU/g tejido, y corresponden a la media±SEM de al menos tres determinaciones. Extractos de tejido y determinaciones fueron realizadas como en la tabla 3.3 . La cantidad de dieta suministrada (% dieta) se expresa como porcentaje de peso en relación al peso fresco de los peces. Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

Respecto a los valores observados en ayuno, la actividad 6-PF 2-K presentó una recuperación parcial, y similar para los peces alimentados con diferentes cantidades de dieta, después de 1 día de realimentación. Dicha actividad permanece prácticamente constante para los peces alimentados al 0.5% a lo largo del experimento, mientras que siguió aumentando en los peces alimentados al 1, 2 y 3.5% de forma directamente proporcional a la cantidad de dieta suministrada, principalmente a partir de los 8 días de realimentación.

En la figura 3.14 se representan las actividades de las formas total y activa de la 6-PF 2-K observados en hígado de dorada, tras 1 y 22 días de realimentación con diferentes cantidades de dieta. En la figura se puede observar que los peces sometidos a 1 día de realimentación, no presentan diferencias ni en la forma activa ni en la total en función de la cantidad de dieta suministrada. Los valores de actividad superan a los observados en los peces en ayuno, unas 25 veces para la forma activa y entre 3 y 4.5 veces para la forma total de la enzima, independientemente de la cantidad de dieta suministrada.

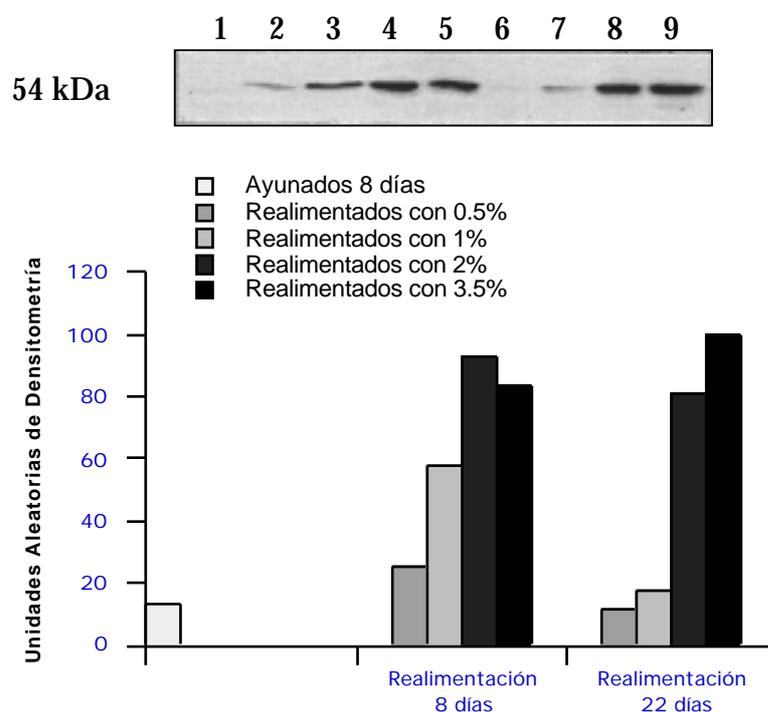
A los 22 días de realimentación, la actividad 6-PF 2-K en el grupo alimentado al 0.5%, es unas 25 y 3.5 veces superiores a los de ayuno, para las formas activa y total respectivamente. Por el contrario, el grupo alimentado al 3.5% presentó los valores más elevados, unas 60 y 12 veces superiores a los de ayuno, para los ensayos de las formas activa y total respectivamente.



**Figura 3.14 . Comparación del efecto de la cantidad de dieta suministrada durante 1 y 22 días sobre las formas activa y total de la actividad 6-PF 2-K hepática.**

Las condiciones de alimentación y los valores de actividad corresponden a los descritos en la tabla 3.20 .

La figura 3.15 presenta el resultado del análisis por *Western blot* de la cantidad de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Después de 22 días de realimentación se aprecia que la administración, una vez al día, de cantidades de dieta al 0.5% ó al 1% en relación al peso fresco, da lugar a valores similares a los observados en condiciones de ayuno. En cambio, en los peces alimentados al 2% ó al 3.5%, las densitometrías efectuadas indican que los niveles de proteína 6-PF 2-K son unas 5 y 7 veces superiores, respectivamente, a las determinadas en condiciones de ayuno. Después de 1 y 3 días de realimentación no conseguimos apreciar diferencias respecto a los niveles detectados en ayuno (datos no presentados).



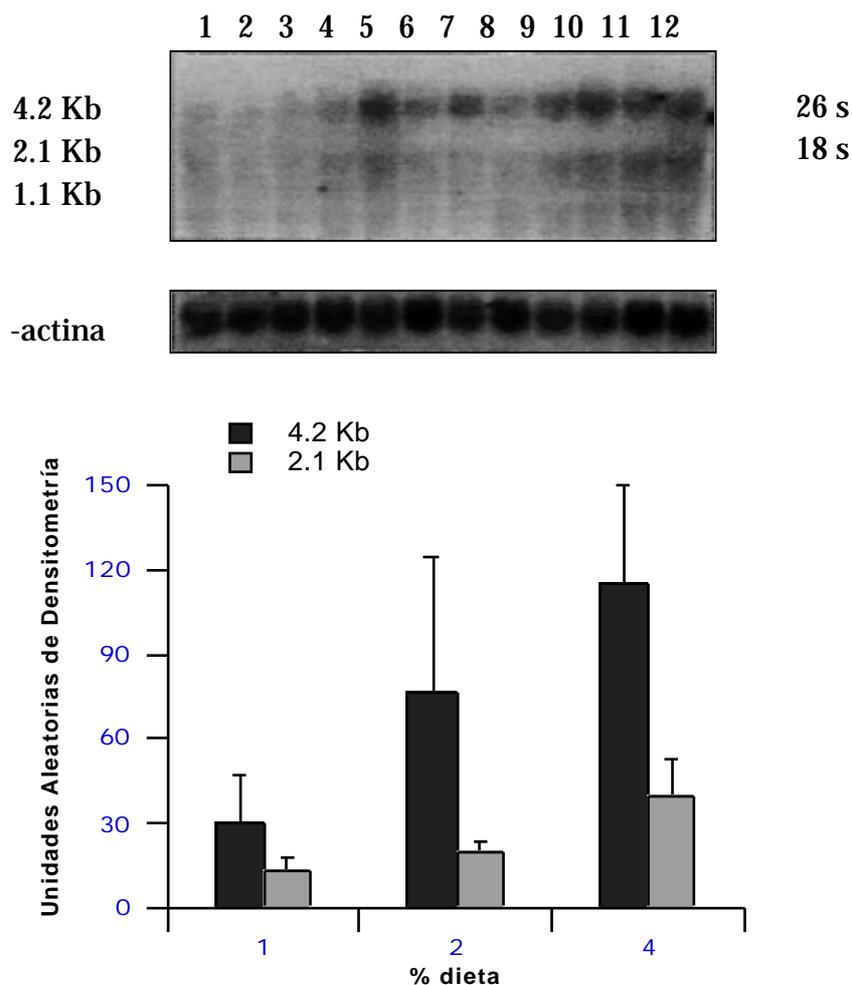
**Figura 3.15 . Análisis por *Western blot* del efecto de la alimentación con distintas cantidades de dieta sobre los niveles de proteína inmunodetectable 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.**

En la parte superior de la figura se muestra la autorradiografía del análisis por *Western blot* correspondiente a extractos de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa parcialmente purificados, y obtenidos de *pools* de tejido hepático de 3 peces. Carril 1: grupo de peces ayunados 8 días; carriles 2-5: peces realimentados 8 días con el 0.5%, 1%, 2% y 3.5% en relación al peso fresco, respectivamente; carriles 6-9: peces realimentados 22 días con el 0.5%, 1%, 2% y 3.5% del peso fresco, respectivamente. La obtención de extractos y el análisis por *Western blot* se realizaron como en la figura 3.3 . Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

En la parte inferior se muestra en diagrama de barras, el análisis densitométrico de las películas de autorradiografía del análisis por *Western blot*.

A fin de comprobar el efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre los niveles de ARN<sub>m</sub> de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de *Sparus aurata*, tres grupos de cuatro peces fueron alimentados una vez al día por un periodo de

16 días con el 1, 2 y 4%, respectivamente, del peso fresco. La composición de la dieta era: 23% de carbohidratos, 51% de proteína, 11% de lípidos, 13% de sales minerales, 2.3% de humedad y 475.6 Kcal/100g. Después de aislar el ARN total hepático de todos los peces, se realizó el análisis por *Northern blot*, que se muestra en la figura 3.16 . Tal como puede observarse, Los niveles de mensajero correlacionaron con la cantidad de dieta suministrada.



**Figura 3.16 . Análisis por *Northern blot* del efecto de la cantidad de dieta sobre los niveles de ARN<sub>m</sub> de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de dorada.**

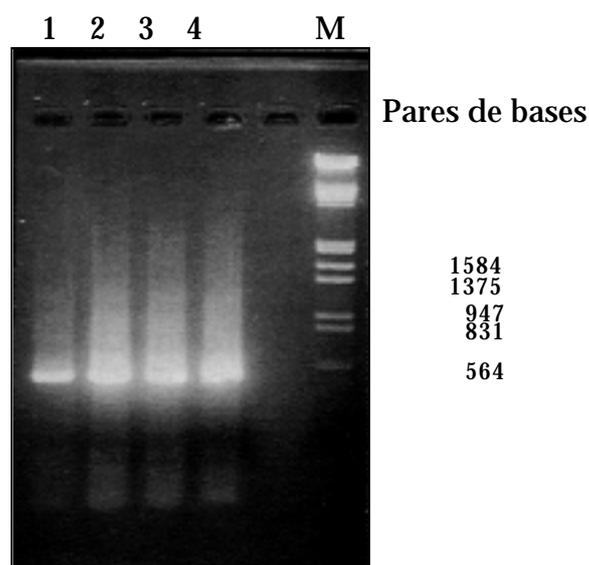
En la parte superior se puede observar la autorradiografía del análisis por *Northern blot* de ARN total de hígado de dorada, tras hibridación con una sonda de ADN<sub>c</sub> del ARN<sub>m</sub> de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado. Se cargaron 20 µg de ARN total por carril. Carriles 1-4: peces alimentados con dieta al 1% del peso fresco; carriles 5-8: peces alimentados al 2% del peso fresco; carriles 9-12: peces alimentados al 4% del peso fresco. Previa deshibridación del filtro, se rehibridó con una sonda de - actina de rata. El aislamiento de ARN total y el análisis por *Northern blot* se llevó a cabo como en la figura 3.4 . Las condiciones de alimentación son como las descritas en la tabla 3.11 .

En la parte inferior de la figura se representa, en diagrama de barras, el análisis densitométrico de la película de autorradiografía. Se representa la media±SEM de los valores obtenidos en el análisis de las bandas de 4.2 y 2.1 Kb, realizadas sobre cuatro peces para cada cantidad de dieta estudiada.

### 3.4. SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL FRAGMENTO DE ADN<sub>c</sub> CLONADO DE LA ENZIMA 6-PF 2-K/FRU 2,6-P<sub>2</sub>ASA DE HIGADO DE DORADA

#### 3.4.1. Obtención de una sonda homóloga de ADN<sub>c</sub> por RT-PCR para la detección de los niveles de mensajero de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de *Sparus aurata*.

Una sonda homóloga de ADN<sub>c</sub> para la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, fue obtenida por amplificación por RT-PCR a partir de ARN total de hígado de *Sparus aurata*. Para ello se seleccionaron dos oligonucleótidos (I1 e I2, descritos en el apartado 2.7.11.) que delimitan un fragmento en el que los dominios quinasa y bisfosfatasa de la enzima bifuncional hepática se encuentran yuxtapuestos en las secuencias nucleotídicas descritas para mamíferos. La figura 3.17 muestra el análisis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos por PCR, donde se observa una banda mayoritaria con el tamaño esperado, unos 551 pb.

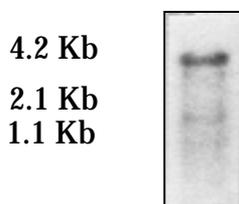


**Figura 3.17 . Gel teñido con bromuro de etidio con el producto de amplificación de PCR.**

En el gel, de agarosa al 1.5%, se cargaron 10  $\mu$ l (carril 1) y 25  $\mu$ l (carriles 2 - 4) del producto de PCR. El carril M contiene marcadores de talla, fragmentos de digestión *EcoR* I/*Hind* III de  $\lambda$ -ADN. La electroforesis se llevó a cabo como está especificado en el apartado 2.7.3. Los oligonucleótidos utilizados y las condiciones de amplificación aparecen descritos en el apartado 2.7.11. de *Materiales y Métodos*.

El fragmento amplificado por RT-PCR fue clonado en el vector pBluescript® SK- (Stratagene), como está indicado en *Materiales y métodos* (apartado 2.7.12.), y utilizado como sonda homóloga para la detección de la expresión del gen de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de dorada. La hibridación con ARN total de hígado dió lugar, en todos los casos estudiados (figuras 3.4, 3.7, 3.9 y 3.16), a la aparición de tres bandas, una mayoritaria de 4.2 Kb, y dos minoritarias de 2.1 y 1.1 Kb. En hígado de mamíferos aparece, sin embargo, una banda mayoritaria de unas 2 Kb (Pilkis *et al.*, 1995). A fin de confirmar si las tres bandas que se detectan utilizando ARN total, correspondían a transcritos diferentes de ARN<sub>m</sub>, se llevó a cabo el análisis por *Northern blot* a partir de ARN poli (A+) de tejido hepático, haciendo uso del fragmento clonado por RT-PCR como sonda.

El resultado, que aparece en la figura 3.18, muestra la presencia en el ARN poli (A+) de las tres bandas detectadas con ARN total, permaneciendo la banda de 4.2 Kb como mayoritaria. Este resultado apoya la idea de que las tres bandas son resultado de transcripción.



**Figura 3.18 . Análisis por *Northern blot* de la expresión de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en ARN poli (A+) de hígado de *Sparus aurata*.**

En la figura aparece el análisis por *Northern blot* de la expresión de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de dorada. Se cargaron 2 µg de ARN poli (A+), aislado como se indica en el apartado 2.7.7. de *Materiales y métodos*. Para la hibridación se utilizó como sonda el fragmento clonado por RT-PCR de la isoforma hepática de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, obtenida como se especifica en el apartado

2.7.11. El análisis por *Northern blot* se llevó a cabo como en la figura 3.4 .

La figura 3.19 presenta la secuencia de nucleótidos y la deducida en aminoácidos del fragmento clonado obtenido tras amplificación por PCR.

```

1  CAGCCGGTACCTGGTGAACCGGGTCCAGGACCACATTCAGAGCCGGATCGTCTACTACCT
   S R Y L V N R V Q D H I Q S R I V Y Y L

61  CATGAACATCCACGTACCCCGAGGTCCATCTACCTGTGTGCGCCACGGAGAGAGCGAGCT
   M N I H V T P R S I Y L C R H G E S E L

121 CAACCTCATCGGTTCGCATCGGGGGAGACTCCGGGCTGTACCTCGCGGGGCGAAGTTTGC
   N L I G R I G G D S G L S P R G A K F A

181 CAGCGCTCTGGGTGTGTACCTCCGTGGGCAGTGCATCAGTGACCTGAAGGTGTGGACGAG
   S A L G V Y L R G Q C I S D L K V W T S

241 CCACATGAAGAGGACCATCCAGACCGCGGAGGCTCTGGGAGTCCAGTACGAGCAGTGGAA
   H M K R T I Q T A E A L G V Q Y E Q W K

301 GGCCCTCAACGAGATCGACGCTGGGGTTTTCGAGGACATGACGTACGAGGAGATCCAGGA
   A L N E I D A G V C E D M T Y E E I Q E

361 GAATTACCCAGAGAGTTTGCACCTGAGGGACCAAGACAAGTATCGCTACCGCTACCCTAA
   N Y P E E F A L R D Q D K Y R Y R Y P K

421 AGGAGAGTCGTACGAGGACCTCGTCCAGCGTCTGGAGCCCGTCATCATGGAGCTGGAGAG
   G E S Y E D L V Q R L E P V I M E L E R

481 GCAGGAGAACGTGTTGGTTCATCTGTCAC
   Q E N V L V I C H

```

**Figura 3.19 . Secuencia nucleotídica del ADN<sub>c</sub>, y secuencia deducida en aminoácidos, del fragmento de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa clonado de hígado de dorada.**

### **3.4.2. Comparación de la secuencia del fragmento clonado con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas para la forma hepática de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de otros organismos.**

Una vez secuenciado el ADN<sub>c</sub> clonado, procedimos a compararlo con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas para la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de otros organismos. Se alinearon las secuencias de rana (Sakai *et al.*, 1994), pollo (Li *et al.*, 1993), rata (Colosia *et al.*, 1987; Darville *et al.*, 1987), vaca (Lange *et al.*, 1991) y humano (Lange y Pilkis, 1990) con la de *Sparus aurata* (figuras 3.20 y 3.21).

RESULTADOS

				1		27
<i>Sparus</i>		*****	*****	***CAGCCGG	TACCTGGTGA	ACCGGGTCCA
Rana	807	.....T....	.T..TA.T..	T..G.....C	..T.....	.TA.A..G..
Pollo	745	.....	.....	...GGTG...	.....C..	.....G..
Rata	821	.....	.....	.....CA..C	...A...A.	.T..A..G..
Vaca	825	.....	.....	.....CA..C	...A.....	.T..T..G..
Humano	728	<u>TACATCAAGA</u>	<u>TCTTCGACGT</u>	GGG..CA..C	...A.....	...A..G..
	<b>I1</b>	→				
Consenso				----CG-	TA--TGG--A	A--G-GT-CA
		28				77
<i>Sparus</i>		GGACCACATT	CAGAGCCGGA	TCGTCTACTA	CCTCATGAAC	ATCCACGTCA
Rana		...T.....	..A.....G	CG..T.....	...G.....T	.....G.
Pollo		..G...G.G	.....A...	CG..G.....	...G.....	.CA.....
Rata		.....G..	.....T.	CA.C.....	.....	.....T....
Vaca		.....T..C	.....C.	CA.....	T.....	..T.....
Humano		...T.....C	.....C.	CA.....	.....T	.....T....
Consenso		GG--CA--T-	CA-AGC-G--	--G--TACTA	-CT-ATGAA-	A--CA-GT-A
		78				127
<i>Sparus</i>		CCCCGAGGTC	CATCTACCTG	TGTCGCCACG	GAGAGAGCGA	GCTCAACCTC
Rana		.G...C.C..	.....A	.CC.....T.	.G.....	.....T..T
Pollo		.A..AC.AG.	.....A	A.C.....	.G.....C.	.....G
Rata		.A..TC.A..	T.....A	.C.....T.	.T.....T..	A.....T
Vaca		.A..CC.C..	.....A	.C..G....	.T.....T..	A.....
Humano		.A..TC.C..	.....T	.C..A..T.	.C.....T..	A.....A..
Consenso		C-CC--G--C	-ATCTACCT-	---CG-CA-G	G-GAGAG--A	-CTCAA--T-
		128				177
<i>Sparus</i>		ATCGGTGCGA	TCGGGGGAGA	CTCCGGGCTG	TCACCTCGCG	GGGCGAAGTT
Rana		C..A..AA.G.	.T..T..G..	...T..A...	..GGTG..A.	..AAAAC...A
Pollo		.AG..A....	.....C..	.G.A...T..	..CA.C..T.	..CGCC...A
Rata		.GA..C....	.T..A..T..	...T..C..C	...G...G.	.CAA.C...A
Vaca		.GA..C....	.T..A..T..	...T..C..C	...G...G.	.CAA.C...A
Humano		.GA..C....	...A..T..	...T..C..C	...GT.....	.CAA.C...A
Consenso		---GG--G-A	T-GG-GG-GA	C-C-GG--T-	TC----CG-G	G-----AGT-
		178				227
<i>Sparus</i>		TGCCAGCGCT	CTGGGTGTGT	ACCTCCGTGG	GCAGTGCATC	AGTGACCTGA
Rana		...TCAT.AG	.....AAAC.	T.A..AAGTC	T...CAG...	CCA.....
Pollo		C...CAG..C	T...C..AA.	T.A....GA.	C..AA.....	C...G....
Rata		...TAT..A	..A.CCAAC.	T.A....GTC	T..AG.....	..CTC....
Vaca		...TAT..C	...CCAAT.	T.A.T.AGTC	C...G.T...	..CTCA....
Humano		...TAT..C	...CCAAC.	T.A.T.AGTC	C...G.....	..CTC....
Consenso		-GC----G--	-T-G-----T	-C-T-----	-CA----ATC	-----CTGA
		228				277
<i>Sparus</i>		AGGTGTGGAC	GAGCCACATG	AAGAGGACCA	TCCAGACCGC	GGAGGCTCTG
Rana		...A.....	C..T..T...	...C.T....	.....A..	A..A..AT..
Pollo		.....	.....	...C.C....	..G...G..	C...G..C
Rata		.A..A....	T.....	.....	.T.....	T..A..C..A
Vaca		...TG....	C.....	.....T.	.....A.	T..A..CT.A
Humano		.....	C..T.G....	.....	.....A.	T...C...
Consenso		A-GT--GGAC	-AG-C--ATG	AAG-G-AC-A	T--AGAC-GC	-GA-GC--T-

RESULTADOS

	278				327
<i>Sparus</i>	GGAGTCCAGT	ACGAGCAGTG	GAAGGCCCTC	AACGAGATCG	ACGCTGGGGT
Rana	CAC....C..	.T.....	.....G..G	..T.....	.T..G..T..
Pollo	..C..G.CT.	.T.....	.....A..G	..T.....	.T..A..A..
Rata	..T....CC.	.T..A.....	.....G	..T.....T.	.T..G..T..
Vaca	...C.T.CC.	.T.....A..	.....G	..T.....T.	.T..G..T..
Humano	..T....CC.	.T.....	.....G	..T.....T.	.T..G..T..
Consenso	----T-C--T	A-GA-CA-TG	GAAGGC-CT-	AA-GAGAT-G	A-GC-GG-GT
	328				377
<i>Sparus</i>	TTGCGAGGAC	ATGACGTACG	AGGAGATCCA	GGAGAATTAC	CCAGAGGAGT
Rana	G..T.....G	.....T..T.	.A.....A..	...TC...TT	..T.....A.
Pollo	C.....G	.....C..T.	.....	....CGC...	..C.....
Rata	C..T..A..G	.....C..T.	.A..A..T..	...AC.C...	..T.....A.
Vaca	C..T.....G	.....C..T.	.A..A.....	...AC.C...	..T..A..A.
Humano	C..T.....G	.....C..T.	.A..A.....	...AC.....	..T..A..A.
Consenso	-TG-GA-GA-	ATGAC-TA-G	A-GA-AT-CA	-GA----T--	CC-GA-GA-T
	378				427
<i>Sparus</i>	TTGCACTGAG	GGACCAAGAC	AAGTATCGCT	ACCGCTACCC	TAAAGGAGAG
Rana	.....A..	.....G...	..A.....	..A.A.....	C.....
Pollo	.C..C...C.	T.....G...	.....C...	.....	C..G...##
Rata	.....AC.	.....G..T	..A.....T.	.....T.	C..G.....
Vaca	.....C.	A.....T	..A..C...	.....T.	..G.....
Humano	.....C.	A.....T	..A.....	.....T.	C..G.....
Consenso	T-GC-CT--G	-GACCA-GA-	AA-TA-CG-T	AC-G-TA-CC	-AA-GGAG--
	428				477
<i>Sparus</i>	TCGTACGAGG	ACCTCGTCCA	GCGTCTGGAG	CCCCTCATCA	TGGAGCTGGA
Rana	..C..T....	..A.T..A..	.A.A.....	..G..T..T.	.....A..
Pollo	#TC.....	.....G..G..	.....T.....	..T.....	.....
Rata	..C..T....	.T..G..T..	.....T..A	..A..T..A.	.....A..
Vaca	..T.....	.T..G.....	.....	..A..T..A.	.....A..
Humano	..C..T....	.T..G..T..	.....	..A..G..A.	.....A..
Consenso	---TA-GAGG	A--T-GT-CA	G-G--T-GA-	CC-GT-AT-A	TGGAGCT-GA
	478		508		
<i>Sparus</i>	GAGGCAGGAG	AACGTGTTGG	TCATCTGTCA	C*****	*****
Rana	.C.T.....	..T..T....	.G.....C..	T..A.....T	.....C....
Pollo	.C.....	.....C....	.T.....	.....	.....C....
Rata	AC...A..A	..T..AC...	.G.....	.....	.....
Vaca	AC...G..A	..T..A....	.G.....C..	T.....	.....
Humano	AC.A.....	..T..AC...	.G.....C..	<u>.CAGGCTGTC</u>	<u>ATGCGGTGCC</u>
Consenso	--G-CA-GA-	AA-GT--TGG	T-ATCTG-CA		
					← I2
<i>Sparus</i>	*				
Rana	. 1357				
Pollo	. 1292				
Rata	. 1371				
Vaca	. 1375				
Humano	<u>T</u> 1278				

**Figura 3.20 . Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del ADN<sub>c</sub> clonado de *Sparus aurata* y el núcleo de las isoformas hepáticas de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de rana, pollo, rata, vaca y humana.**

Para el alineamiento se han utilizado los programas del GCG PILEUP y PRETTY /CONS. Los oligonucleótidos correspondientes a los cebadores utilizados en la reacción de PCR, I1 and I2, aparecen subrayados.

RESULTADOS

		1				42
<i>Sparus</i>		***** <u>SR</u>	YLVN <u>R</u> VQDHI	Q <u>SR</u> IVYYLMN	IHVT <u>PR</u> SIYL	<u>CR</u> HGESELNL
Rana	215	.....N.....	.....	..A.....	.....	S.....
Pollo	215	.....V..	..A...G..	...T.....	T.....A...	S.....Q...
Rata	216	.....T..	.M.....V	...TA.....	.....	.....
Vaca	216	.....T..	.M.....	...T.....	.....	.....
Humano	216	<u>YIKIFD</u> VGT.	.M.....	...T.....	.....	.....I
Consenso		<u>-R</u>	Y-- <u>NR</u> VQ-H-	Q <u>SR</u> --YYLMN	-HVT <u>PR</u> -IYL	<u>-RH</u> GES-LN-
		43				92
<i>Sparus</i>		IGRIGGDSGL	SPRGAKFASA	LGVYLRGQCI	SDLKVWTS <u>SHM</u>	<u>KR</u> TIQTAEAL
Rana		L.....	.V..KQY.HE	..NFIKS.Q.	P.....	.....
Pollo		K.....A..	.T..RQY.Q.	.AEFI.S.S.	RE.....	...E.....
Rata		R.....	.A..KQY.Y.	.ANFI.S.G.	.S.....	.....
Vaca		R.....	.A..KQY.Y.	.ANFIQS.G.	.S...G...	.....
Humano		R.....	.V..KQY.Y.	.ANFIQS.G.	.S.....R.	.....
Consenso		-GRIGGD-GL	S-RG---A--	L-----Q-I	--LKV-TS-M	<u>KR</u> TI-TAEAL
		93				142
<i>Sparus</i>		GVQYEQWKAL	<u>NE</u> IDAGVCE <u>D</u>	MTYEEIQENY	PEEFAL <u>RD</u> QD	<u>KYR</u> <u>YR</u> Y <u>PK</u> GE
Rana		H.P.....	.....E	.....DHF	.....	.....
Pollo		..P.....	.....E	.....R.	.....	.....#
Rata		..P.....	.....E	.....H.	.....	.....
Vaca		.LP.....	.....E	.....H.	.....	.....
Humano		..P.....	.....E	.....H.	.....	.....
Consenso		---YEQWKAL	<u>NE</u> IDAGVCE-	MTYEEIQ---	PEEFAL <u>RD</u> QD	<u>KYR</u> <u>YR</u> Y <u>PK</u> G-
		143		169		
<i>Sparus</i>		SYEDLVQRLE	PVIMELERQE	NVLVICH***	****	
Rana		....I.....	.....	.....	....	398
Pollo		V.....	.....	.....	....	397
Rata		.....	.....	.....	....	399
Vaca		.....	.....	.....	....	399
Humano		.....	.....	.....QAV	MRCL	399
Consenso		-YED-VQRLE	PVIMELERQE	NVLVICH		

**Figura 3.21 . Alineamiento de las secuencias aminoácidas deducidas para el fragmento de ADN<sub>c</sub> clonado de *Sparus aurata* y las correspondientes a la isoforma hepática de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de rana, pollo, rata, vaca y humana.**

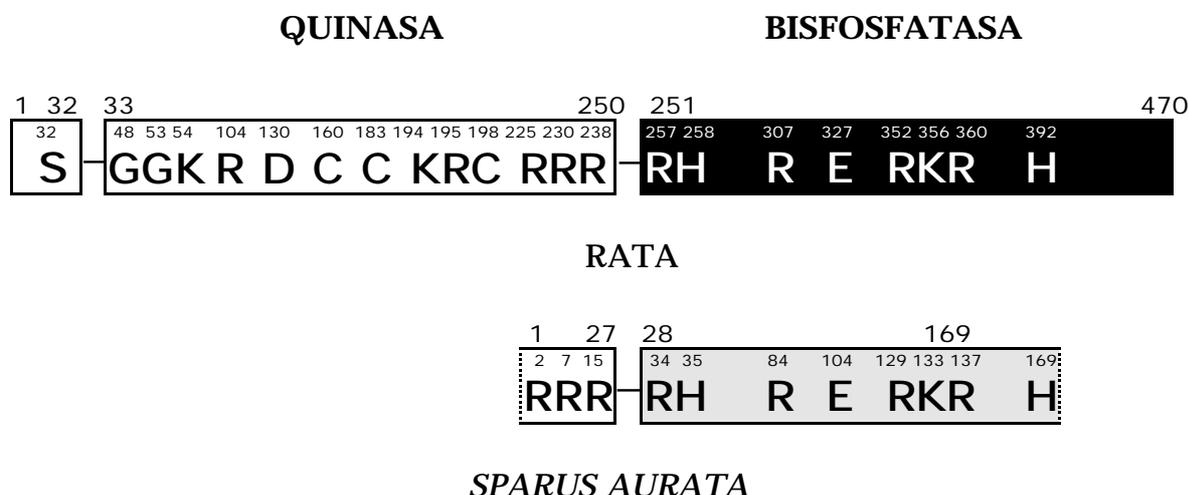
El alineamiento fue realizado como en la figura 3.20. Los residuos aminoácidos correspondientes a la secuencia de oligonucleótidos de los cebadores usados para PCR aparecen subrayados. En **negrita** y en doble subrayado están señalados los residuos implicados en la actividad 6PF-2-K/Fru-2,6-P<sub>2</sub>asa.

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado de 6-PF 2-K/Fru-2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de *Sparus aurata* con las formas hepáticas descritas previamente para humano, bovino, rata, pollo y rana ha revelado unos grados de homología del 77.8, 76.2, 75.6, 81.1 y 74.4% respectivamente.

De forma análoga procedimos a la comparación entre las secuencias deducidas en aminoácidos, mostrando un consenso de 127 residuos de un total de

169 alineados. Los grados de homología de la secuencia deducida a partir del ADN<sub>c</sub> clonado con las secuencias aminoacídicas de humano, bovino, rata, pollo y rana, son 86.9, 86.9, 87.5, 83.3 y 85.7%, respectivamente.

La figura 3.22 muestra la comparación entre los dominios estructurales y funcionales en la secuencia clonada de hígado de dorada y la de hígado de rata. En la figura aparecen marcados los residuos clave implicados en la regulación o catálisis en la enzima bifuncional. El fragmento clonado por nosotros presenta todos los residuos considerados importantes en el mecanismo de catálisis de la actividad bisfosfatasa.



**Figura 3.22 . Estructuras de la región reguladora (residuos 11-32), dominio quinasa (33-250) y dominio bisfosfatasa (251-470) en el ADN<sub>c</sub> de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de rata, comparadas con las correspondientes en el fragmento clonado de hígado de *Sparus aurata*.**

Los residuos marcados indican aquéllos implicados en la catálisis y regulación de la enzima bifuncional.



## **4. DISCUSSION**



## 4.1. REGULACION NUTRICIONAL DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN HIGADO DE DORADA

### 4.1.1. Regulación nutricional de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa

Nuestro grupo había observado la sensibilidad de los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub> frente al estado nutricional en *Sparus aurata* (García de Frutos, 1990). Asimismo, tales niveles, se habían correlacionado con el estado de activación de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, enzima bifuncional con capacidad de síntesis y degradación del metabolito. En mamíferos, es bien conocido el papel clave que desempeña la Fru 2,6-P<sub>2</sub> en el control del ciclo de sustrato Fru 6-P/Fru 1,6-P<sub>2</sub> y, por tanto, en la regulación de los flujos glucolítico y gluconeogénico en hígado. Mientras el metabolito bisfosforilado activa alostéricamente a la 6-PF 1-K, inhibe por competición a la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (Hue y Rider, 1987; Pilkis *et al.*, 1988).

La enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa fue detectada y posteriormente purificada de hígado de dorada (García de Frutos *et al.*, 1990; García de Frutos y Baanante, 1994), mostrando una buena capacidad reguladora de la concentración de Fru 2,6-P<sub>2</sub>. En dorada, como ocurre en mamíferos (Pilkis y Claus, 1991), la enzima bifuncional está sometida a regulación por fosforilación, siendo este proceso catalizado por la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>. A diferencia de la enzima de rata, la afinidad por el sustrato Fru 6-P es menor en dorada, mientras que es mayor frente a ATP. Además, la enzima defosforilada de dorada es menos sensible a inactivación por 3-P glicerol (García de Frutos y Baanante, 1994). Este metabolito eleva sus niveles como resultado de la presencia de precursores gluconeogénicos, como los aminoácidos, presentes en gran medida en la dieta natural de los peces. De esta forma, en estos organismos, la habitual presencia de precursores gluconeogénicos en condiciones de alimentación, no promovería una inactivación de la 6-PF 2-K defosforilada y, en consecuencia, del flujo glucolítico.

Nuestros estudios corroboran la gran disminución en la actividad 6-PF 2-K provocada por el ayuno (García de Frutos *et al.*, 1991). Esta pérdida de actividad la atribuimos, en parte, a inactivación por fosforilación de la enzima, consecuencia de la elevación de los niveles de glucagón y por tanto de AMP<sub>c</sub> intracelular, que conduce a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> en condiciones de ayuno. Este efecto lo vemos reflejado en el bajo nivel alcanzado por la relación

enzima activa / enzima total que se observa durante el ayuno, unas diez veces menor que en condiciones de alimentación. En rata, de forma similar, el ayuno promueve un descenso de actividad 6-PF 2-K a un 25% del valor normal (El-Maghrabi *et al.*, 1990).

No obstante, el mecanismo de fosforilación no sería el único proceso que influiría en la pérdida de actividad observada en condiciones de ayuno. En nuestros experimentos hemos observado que los niveles de ARN<sub>m</sub> de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa también descienden, y son, por tanto, sensibles a este efecto. Los cambios que hemos detectado en mensajero se han visto reflejados en todo momento en cambios de los niveles de proteína detectada por *Western blot*. Contrariamente, en rata, no se ha observado que el ARN<sub>m</sub> para la enzima bifuncional varíe como consecuencia de ayuno o diabetes, a pesar de que tanto la actividad enzimática como la cantidad de proteína inmunodetectable sí disminuyen (Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1988). Paradójicamente, estos autores han descrito que los niveles de ARN<sub>m</sub> aumentan como consecuencia de la realimentación de ratas ayunadas o por administración de insulina a ratas diabéticas (Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1988; Miralpeix *et al.*, 1992).

En nuestros estudios de ayuno y de realimentación con distintas dietas, la elevación de los niveles de mensajero por la realimentación, tras el descenso promovido por el ayuno, ha sido más acusada en las doradas que habían estado alimentadas con las dietas de mayor contenido en carbohidratos, indicando una estimulación positiva de la presencia de éstos en la dieta sobre el nivel de ARN<sub>m</sub>.

La realimentación nos muestra dos fases diferenciadas en el tiempo. Inicialmente se produce una rápida recuperación de la actividad 6-PF 2-K, relacionada fundamentalmente al incremento en la relación enzima activa / enzima total y al aumento de las hexosas fosfato. Posteriormente adquiere mayor importancia el aumento en la cantidad de proteína enzimática, observable tanto a través del ensayo de la forma total como por la cantidad de enzima inmunorreactiva, y consecuencia del aumento en los niveles de ARN<sub>m</sub>. Este doble proceso tiene a su vez un claro reflejo en los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>.

El metabolito Fru 2,6-P<sub>2</sub> y la actividad enzimática 6-PF 2-K se recuperan en un porcentaje considerable, ya a las 8 horas de iniciada la realimentación de los peces. El aumento en ambos parámetros, tras la realimentación, es gradual y claramente dependiente de la composición de la dieta suministrada. Los grupos de doradas realimentadas, tras un periodo de ayuno, con dietas de bajo contenido en carbohidratos y elevado en proteína, similares a la dieta natural, mostraron una

rápida recuperación de ambos valores, llegando a niveles equivalentes a los que presentan los peces en condiciones de alimentación, en 1-3 días de realimentación. Por el contrario, los peces alimentados con dietas pobres en proteína y ricas en carbohidratos, tras alcanzar unos niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y actividad 6-PF 2-K equivalentes a los de dietas de elevado contenido proteico, necesitaron un periodo de tiempo más prolongado para alcanzar los valores de sus correspondientes animales control.

Este diferente comportamiento en el tiempo puede ser atribuido a un efecto de regulación transcripcional y/o post-transcripcional de la abundancia del ARN<sub>m</sub>.

Las doradas alimentadas con dietas ricas en proteína y pobres en carbohidratos no mostraron prácticamente variaciones significativas en cantidad de proteína inmunodetectable y ARN<sub>m</sub>, como consecuencia de la realimentación tras el ayuno. Para estas dietas, por tanto, el control de la actividad 6-PF 2-K se vería influenciado por modificaciones de las condiciones cinéticas de la enzima por efectores y/o por defosforilación. En cambio, dietas de elevado contenido en carbohidratos y bajo en proteína sí que afectaron a ambos parámetros. A los 2 días de realimentación ya observamos un aumento en el nivel de mensajero en doradas que habían estado previamente ayunadas 19 días, aumento que se corresponde con un incremento gradual de la cantidad de enzima detectada por *Western blot*. Así, en este caso, mientras a corto plazo se produce una activación similar a la que encontramos en peces alimentados con dietas ricas en proteína, se combina el efecto a largo plazo producido por el aumento en los niveles de ARN<sub>m</sub>.

En rata, la alimentación con dietas ricas en carbohidratos, eleva los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> por defosforilación y consecuente activación de la actividad 6-PF 2-K (Kuwajima *et al.*, 1986). En cambio, en ratas alimentadas con dietas pobres en carbohidratos y ricas en proteína se mantienen bajos los niveles del metabolito, pudiendo mantenerse así el flujo gluconeogénico, y ser aportada glucosa a partir de precursores proteicos (Bois-Joyeaux *et al.*, 1986).

#### **4.1.2. Regulación nutricional de las vías glucolítica y gluconeogénica**

En la dorada, como en mamíferos, los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> juegan un papel clave en la regulación de la glucólisis-gluconeogénesis a través de la activación de la 6-PF 1-K e inhibición de la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa (Baanante *et al.*, 1991).

Los peces carnívoros y poiquilotermos, adaptados a condiciones específicas ambientales y de nutrición, muestran un metabolismo diferenciado del de los

mamíferos omnívoros. La glucemia está menos regulada que en mamíferos, y la capacidad de metabolizar glucosa es menor. Por otra parte, los descensos en parámetros como la Fru 2,6-P<sub>2</sub> y el glucógeno, como consecuencia del ayuno, son más lentos que en mamíferos (Bois-Joyeaux *et al.*, 1986).

Las actividades enzimáticas reguladoras de la glucólisis, 6-PF 1-K y PK, disminuyen en doradas sometidas a ayuno profundo. Bajo estas condiciones, por el contrario, la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, clave en el control de la gluconeogénesis, la hemos visto incrementada. El aumento en los niveles de glucagón y la consecuente activación intracelular de la proteína quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub>, provocaría la fosforilación de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, lo que llevaría al descenso en los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, y de la PK, que se inactivaría. La caída de Fru 2,6-P<sub>2</sub> dejaría de mantener estimulada la actividad 6-PF 1-K, a la vez que permitiría el incremento de actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa. Este proceso sucedería en dorada de forma análoga a como ocurre en mamíferos (Hue y Rider, 1987; Pilkis y Claus, 1991).

En contraste con el lento descenso de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y de glucógeno que hemos observado en los peces sometidos a ayuno, después de 2 días de realimentación los niveles hepáticos del polisacárido están prácticamente recuperados. La recuperación de Fru 2,6-P<sub>2</sub> sucede, en cambio, más retrasada en el tiempo. Parece, por tanto, que a la recuperación del glucógeno hepático le sigue un incremento de la vía glucolítica. Las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de *Sparus aurata*, se recuperan de forma gradual tras la realimentación. Estos datos, en conjunto, muestran un cierto predominio de la gluconeogénesis en las primeras etapas de realimentación, de forma que la recuperación inicial de glucógeno podría tener lugar a partir de compuestos tricarbóxicos precursores de Glu 6-P vía gluconeogénesis. Apoyando esta posibilidad, French *et al.* (1981) y Cowey y Walton (1989), apuntan que, dado el bajo contenido en carbohidratos y alto en proteína de la dieta natural de los peces, sustratos diferentes a los carbohidratos, como lactato, aminoácidos y glicerol, pueden jugar un papel fundamental en la síntesis de glucosa y glucógeno en estos organismos.

En mamíferos, también se ha observado un retraso en la recuperación de los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> respecto a los de glucógeno durante las primeras etapas de la realimentación, a fin de mantener activa la gluconeogénesis para reponer los niveles del polisacárido, disminuidos por el ayuno (Katz y McGarry, 1984; Pilkis *et al.*, 1985; Katz *et al.*, 1986). En la dorada, después de un ayuno de 24 horas, y aún cuando prácticamente no se aprecia disminución del glucógeno hepático, la realimentación provoca un descenso inicial de Fru 2,6-P<sub>2</sub> (García de Frutos *et al.*, 1991), manteniéndose así el flujo gluconeogénico, a fin de aportar hexosas-P para

la vía de las pentosas fosfato y generar, de esta forma, poder reductor para la producción de ácidos grasos, así como la formación de precursores para la síntesis de ácidos nucleicos.

Nuestro grupo, a través del uso de dietas de composición extrema, había comprobado una fuerte dependencia de los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> y de varias actividades enzimáticas clave involucradas en el control de los flujos glucolítico y gluconeogénico, de los componentes de la dieta (Bonamusa *et al.*, 1992). En el presente trabajo se probaron dietas de composición más ajustada, a fin de determinar el nivel de sensibilidad de dichos parámetros metabólicos.

El nivel del metabolito Fru 2,6-P<sub>2</sub>, las actividades 6-PF 1-K y PK, así como la actividad quinasa, la cantidad de enzima detectada por la técnica de *Western blot* y los niveles de ARN<sub>m</sub> de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, todos ellos implicados en la regulación de la vía glucolítica, aparecen incrementados en los peces que fueron alimentados con dietas de elevado contenido en carbohidratos. Las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, son asimismo elevadas, indicando el predominio de la vía glucolítica sobre la gluconeogénica como adaptación metabólica al consumo de dietas pobres en proteína y ricas en hidratos de carbono.

Gehrinch *et al.* (1988) habían observado que la 6-PF 1-K hepática de ratas alimentadas con dietas ricas en carbohidratos, experimentan de forma similar un aumento en los niveles del mensajero de la enzima. Asimismo, en rata, la actividad PK también aumenta bajo estas condiciones, asociada a un aumento en su ARN<sub>m</sub> a largo plazo (Noguchi *et al.*, 1985).

Resultados similares a los obtenidos por nosotros en dorada, se han observado en *Anguilla anguilla* (Suárez *et al.*, 1995), en donde la administración de dietas de elevado contenido en carbohidratos estimula la actividad PK en hígado. Este proceso se relaciona con un aumento en la producción de piruvato, que junto a la producción de NADPH, conducen a la biosíntesis de ácidos grasos, para formar grandes reservas energéticas a las que se atribuye un rol fundamental en procesos migratorios y de ayuno en los peces. A diferencia de nuestros resultados en dorada, no se ha observado regulación del estado nutricional de la actividad PK ni en trucha (Guderley y Cardenas, 1980; Hilton y Atkinson, 1982) ni en *Anguilla rostrata* (Roberts y Anderson, 1985).

#### **4.1.3. Regulación nutricional de la vía de las pentosas fosfato**

Las actividades enzimáticas reguladoras de la vía de las pentosas fosfato, Glu 6-P DH y 6-PG DH, se ven disminuidas como consecuencia del ayuno. Ello es resultado del cese de aporte de nutrientes de la dieta, precursores de la síntesis de ácidos grasos y de ácidos nucleicos (Stryer, 1995). La realimentación provoca una recuperación gradual en ambas actividades. Resultados análogos ya habían sido observados en dorada por nuestro grupo (Bonamusa *et al.*, 1992).

En otras especies de peces, como los salmónidos *Salvelinus fontinalis* (Yamauchi *et al.*, 1975), *Cyprinus carpio* (Bastrop *et al.*, 1991) y *Oncorhynchus mykiss* (Barroso *et al.*, 1993), también se ha observado que las actividades Glu 6-P DH y 6-PG DH, se encuentran disminuidas en hígado como consecuencia del ayuno. En hígado de rata la actividad enzimática y el mensajero de Glu 6-P DH decaen en condiciones de ayuno, para recuperarse con la realimentación (Iritani, 1992).

En rata, la alimentación con dietas pobres en lípidos y ricas en proteína y, en menor medida, ricas en carbohidratos estimula la actividad, nivel de ARN<sub>m</sub> y transcripción de la enzima Glu 6-P DH (Iritani, 1992). El contenido en proteína y carbohidratos de la dieta, modula el metabolismo de lípidos a través de cambios en la relación glucagón/insulina (Hurley *et al.*, 1995).

En los peces teleósteos, Cornell *et al.* (1986) han indicado que los lípidos son la principal reserva energética. En nuestros experimentos, las actividades Glu 6-P DH y 6-PG DH mostraron una dependencia del contenido de carbohidratos aportado con la dieta. Las elevadas actividades enzimáticas detectadas en los grupos alimentados con las dietas de mayor contenido en carbohidratos, apoyan que la glucosa en exceso puede utilizarse para formar poder reductor útil para lipogénesis. Se han obtenido resultados similares en pez gato (Likimani y Wilson, 1982), en dorada (Bonamusa *et al.*, 1992), en *Oreochromis niloticus* (Shimeno *et al.*, 1993), y en anguila (Suárez *et al.*, 1995). Por otra parte, Hilton y Atkinson (1982) observaron que la alimentación con dietas de alto contenido en carbohidratos eleva la actividad Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa en trucha, favoreciendo así un desvío del exceso de glucosa hacia la formación de NADPH y la síntesis de ácidos grasos. Por otra parte, se ha sugerido que la vía de las pentosas fosfato desempeña un importante papel en la asimilación de los carbohidratos de la dieta en los peces (Christiansen y Klungsoyr, 1987).

#### **4.1.4. Regulación nutricional del metabolismo de aminoácidos**

La determinación de las actividades aminotransferasas ALT y AST en hígado de *Sparus aurata*, bajo diferentes condiciones nutricionales nos ha proporcionado información acerca del nivel de utilización metabólica de aminoácidos en los casos objeto de estudio. Ambas actividades constituyen las aminotransferasas cuantitativamente más importantes en el hígado de los peces teleósteos, especialmente la actividad ALT (Cowey y Walton, 1989). La actividad AST no mostró dependencia de la composición de la dieta suministrada. Contrariamente, la alimentación con dietas ricas en proteína nos permitió observar los valores más elevados en la actividad ALT, consecuencia de la mayor disponibilidad de aminoácidos procedentes de la dieta, que pueden ser utilizados eficazmente como sustratos de gluconeogénesis en las especies carnívoras. Fynn-Aikins *et al.* (1995) han obtenido, en salmón atlántico, resultados similares en las actividades ALT y AST al alimentar los peces con dietas de elevado contenido en proteína. Lupiáñez *et al.* (1989) han encontrado, asimismo, que las actividades enzimáticas hepáticas ALT y glutamato deshidrogenasa, implicada también en el catabolismo de aminoácidos, están elevadas en truchas sometidas a alimentación con elevado contenido proteico. Sin embargo, previamente se había indicado que en especies de peces de hábitos carnívoros, como los salmónidos (Cowey y Walton, 1989, Kim *et al.*, 1992) y omnívoros, como la carpa (Nagai e Ikeda, 1973a y b) no se había apreciado variación en la actividad de las transaminasas como consecuencia de la alimentación con fuentes ricas en proteínas. En cambio, en una especie de hábito herbívoro, como es *Mugil capito*, sí se había encontrado que la alimentación con dietas con elevado contenido en proteína promueve una adaptación metabólica, a través de la elevación de los niveles de actividad de las aminotransferasas.

Tomados en conjunto todos los datos, la dorada muestra una adaptación metabólica a la alimentación con dietas ricas en carbohidratos y pobres en proteína, desacelerando el catabolismo de aminoácidos y la gluconeogénesis, y estimulando la glucólisis y la lipogénesis.

La actividad ALT descendió como consecuencia del ayuno en los distintos grupos de peces alimentados con diferentes dietas. Los descensos fueron significativamente mayores en aquellas dietas de mayor contenido en proteína y menor en carbohidratos. Por otra parte, la actividad AST mostró una ligera tendencia, no significativa, al aumento. En peces, el efecto del ayuno sobre las actividades ALT y AST en hígado varían según la especie estudiada (Cowey y Walton, 1989). En la brema roja, carpa, lenguado y anguila se ha encontrado que

ambas actividades están incrementadas. En trucha arco iris (Kim *et al.*, 1992) la actividad ALT y la actividad glutamato deshidrogenasa también se han encontrado elevadas en condiciones de ayuno. Este aumento en las actividades metabolizadoras de aminoácidos, coordinado con un incremento en el flujo gluconeogénico, se ha explicado como el resultado de la movilización de aminoácidos como precursores de glucosa. Sin embargo, en trucha, anguila americana y salmón rojo, no se han observado cambios significativos (Cowey y Walton, 1989).

La actividad enzimática ALT se ha mostrado en nuestros experimentos más sensible a los cambios en las condiciones nutricionales que la actividad AST. Este hecho puede relacionarse con la mayor utilización que hacen los peces de la alanina como aminoácido precursor de gluconeogénesis que el aspartato (Fynn-Aikins, 1995).

#### **4.1.5. Efecto de la cantidad de dieta suministrada sobre glucólisis, gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato y metabolismo de aminoácidos**

La restricción de la cantidad de dieta suministrada da lugar a unos niveles bajos de glucosa y lactato en suero, equivalentes a los valores obtenidos en ayuno, en el caso de la alimentación con una cantidad de dieta equivalente al 0.5% del peso fresco del pez. Ello es consecuencia de la poca disponibilidad de tanto carbohidratos como proteínas en la dieta. Asimismo, el índice hepatosomático resulta modulado por la cantidad de dieta suministrada.

Los niveles hepáticos de glucógeno y de Fru 2,6-P<sub>2</sub> muestran también una clara dependencia de la cantidad de dieta aportada. La restricción en el suministro energético, tras 22 días de realimentación, da lugar a unos valores de glucógeno, que aunque superan siempre a los de ayuno, son extremadamente bajos en el grupo de peces alimentado con el 0.5% del peso fresco.

En el otro lado de la balanza, los valores obtenidos, para glucógeno y Fru 2,6-P<sub>2</sub>, con el suministro del 2% del peso fresco superan a los obtenidos con el 3.5%, a pesar de la mayor disponibilidad de nutrientes. Ello es indicativo de que la alimentación con el 2% del peso fresco consigue un efecto estimulador máximo sobre la síntesis de ambos parámetros.

La alimentación restringida conduce, en hígado, a una disminución en la actividad enzimática 6-PF 2-K, así como en la cantidad de proteína

inmunodetectable y en el ARN<sub>m</sub> de la enzima bifuncional. Como consecuencia, los valores de Fru 2,6-P<sub>2</sub> se han encontrado disminuidos en los grupos de animales sometidos a realimentación con baja cantidad de dieta.

El bajo nivel de Fru 2,6-P<sub>2</sub> presentado por el grupo alimentado al 0.5% del peso fresco conduce a un descenso en la actividad 6-PF 1-K, que junto al bajo nivel en la actividad PK y al elevado en la Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa, se corresponde con unos niveles de glucólisis y de gluconeogénesis similares a los observados en condiciones de ayuno. Este efecto queda reflejado en las relaciones 6-PF 1-K / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa y PK / Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa.

Las actividades reguladoras de la vía de las pentosas fosfato, Glu 6-P DH y 6-PG DH, muestran un claro descenso como consecuencia de la restricción en el aporte de dieta. En ambos casos, los niveles alcanzados a los 22 días de realimentación son inferiores en los grupos alimentados con dieta al 0.5 y al 1% que los observados en el grupo de peces en condiciones de ayuno. Este hecho se relacionaría con una poca disponibilidad de glucosa como sustrato para la vía de las pentosas, generándose de esta forma menos poder reductor. Se produciría así un descenso de la capacidad biosintética de ácidos grasos y ácidos nucleicos. Estos resultados concuerdan con los descensos observados para ambas actividades en trucha arco iris (Bastrop *et al.*, 1992), *Morone saxatilis* (Hung *et al.*, 1993) y carpa (Shimeno y Shikata, 1993), en condiciones de alimentación restringida. En peces, ambas actividades parecen ser buenos indicadores del nivel de síntesis de ácidos grasos (Bastrop *et al.*, 1992).

La actividad AST, ligeramente incrementada en condiciones de ayuno, desciende de forma equivalente durante la realimentación, sin verse afectada por la alimentación con diferentes cantidades de dieta.

Sin embargo, la actividad ALT, presenta una fuerte dependencia de la cantidad de dieta suministrada. En el grupo de peces alimentado con dieta al 0.5%, se han observado unos niveles de actividad ALT equivalentes a los encontrados en ayuno, mientras que en los peces alimentados al 1% y, de forma más acusada en aquéllos alimentados al 2 y al 3.5%, se ha encontrado una estimulación de dicha actividad, siendo los valores encontrados significativamente superiores a los observados en ayuno. De forma similar, Suárez *et al.* (1995) han encontrado disminuida la actividad glutamato deshidrogenasa en anguila, como consecuencia del suministro restringido de proteína y energía.

#### 4.2. HOMOLOGIA ENTRE LAS SECUENCIAS HEPATICAS DE OTRAS 6-PF 2-K/FRU 2,6-P<sub>2</sub>ASA CONOCIDAS Y EL FRAGMENTO CLONADO DE HIGADO DE DORADA

En la actualidad, el fragmento que hemos clonado representa la única secuencia descrita para el ADN<sub>c</sub> del mensajero de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en peces. *Sparus aurata*, como teleósteo, se encuentra dentro del grupo de peces más evolucionados. Al encontrarse alejado del organismo ancestral de peces primitivos y resto de vertebrados, no sorprenden los valores de homología presentados con las secuencias hepáticas de nucleótidos y aminoácidos descritas para otros vertebrados, como anfibios, *Rana* (Sakai *et al.*, 1994), aves, *Gallus* (Li *et al.*, 1993) y mamíferos, *Bos*, *Rattus* y *Homo* (Lange *et al.*, 1991; Colosia *et al.*, 1987; Darville *et al.*, 1987; Lange y Pilkis, 1990).

En la secuencia de aminoácidos deducida para el fragmento clonado de hígado de *Sparus aurata*, aparecen conservados todos los residuos que se han descrito como críticos para el mecanismo de acción de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.

El dominio de la actividad bisfosfatasa de la isoforma de la enzima bifuncional de hígado de rata, requiere tres residuos fundamentales para su actividad, que se encuentran ubicados próximos al centro activo, la His<sup>258</sup> (fosforilada en el mecanismo de catálisis), la Glu<sup>327</sup> y la His<sup>392</sup>. Estos aminoácidos son esenciales para la formación del fosfoenzima intermediario, necesario para catalizar la hidrólisis del sustrato Fru 2,6-P<sub>2</sub> a Fru 6-P y P<sub>i</sub>. En esta triada de residuos, el papel de Glu<sup>327</sup>, conservado en todas las fosfoglicerato mutasas analizadas, es el de mantener un estado de protonación adecuado en la dos histidinas del centro activo (Tauler *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1992a; Okar *et al.*, 1995). En el fragmento clonado de *Sparus aurata*, los tres aminoácidos aparecen conservados, correspondiendo a His<sup>35</sup>, Glu<sup>104</sup> y His<sup>169</sup> en la secuencia peptídica deducida para la dorada.

La Lys<sup>356</sup> y la Arg<sup>352</sup>, implicadas en la unión al grupo fosfato del C-6 del sustrato y producto (Li *et al.*, 1992b), la Arg<sup>360</sup>, responsable de la unión con el fosforilo del C-2 del sustrato Fru 2,6-P<sub>2</sub> (Li *et al.*, 1992c), así como las argininas 257 y 307, importantes también para el contacto con el C-2 (Lin *et al.*, 1992b), forman un grupo de residuos localizado en una región superficial del péptido de rata. Todos ellos, que aparecen totalmente conservados en las isoformas de hígado, músculo, corazón y testículo (Ventura *et al.*, 1995), se encuentran también

en la isoenzima hepática de *Sparus aurata*, correspondiendo a los aminoácidos Lys<sup>133</sup>, Arg<sup>129</sup>, Arg<sup>137</sup>, Arg<sup>34</sup> y Arg<sup>84</sup>, respectivamente.

Por otra parte, la Pro<sup>376</sup>, que contribuye al correcto plegamiento de la estructura de la proteína, permitiendo que las cadenas y se aproximen a la zona C-terminal de la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de rata (Bazan *et al.*, 1989), se conserva como Pro<sup>153</sup> en la secuencia aminoacídica que proponemos para dorada.

Aunque sólo una pequeña parte del fragmento clonado corresponde al dominio de la actividad quinasa de la enzima, en las posiciones 7 y 15 aparecen sendas argininas que corresponderían a las Arg<sup>230</sup> y Arg<sup>238</sup> de la isoforma de rata, y que se encuentran conservadas en todas las 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa hepáticas descritas. Ambas argininas, importantes para la unión del sustrato Fru 6-P a la enzima 6-PF 1-K bacteriana, en la 6-PF 2-K/fru-2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de rata han adquirido un papel más importante en la unión a ATP (Li *et al.*, 1992a). Arg<sup>225</sup>, implicada en la unión al sustrato (Rider *et al.*, 1995), aparece asimismo conservada en la isoforma hepática de dorada en posición 2. Queda por determinar la presencia de residuos análogos a Gly<sup>48</sup> y Arg<sup>195</sup> de hígado de rata, aminoácidos clave para la reacción de la quinasa (Li *et al.*, 1992a) y que podrían esclarecer, en parte, las diferencias cinéticas encontradas en la isoforma hepática de dorada (García de Frutos *et al.*, 1994).

En la secuencia primaria de la enzima hepática de rata aparecen dos motivos de unión a ATP (GX<sub>4</sub>GK), en las posiciones 48-55 y 274-281. Del primero, punto de unión a ATP necesario para la reacción de la quinasa (Pilkis 1990 y Li *et al.*, 1992a), actualmente no poseemos información acerca de su presencia en la secuencia de dorada. El segundo, situado en el dominio Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa y que no parece ser necesario para la reacción bisfosfatasa, corresponde con la secuencia <sup>51</sup>GLSPRGAK<sup>58</sup> en *Sparus aurata*. Esta secuencia presenta una ligera modificación respecto al posible motivo de unión de ATP, dado que la lisina que en rata se correspondería a la posición 57, aparece en posición 58 en dorada.

La secuencia sita en los residuos 57-74 del péptido de dorada es la región que presenta menos homología con el resto de 6-PF 2-K/fru-2,6-P<sub>2</sub>asa conocidas. Hasta el momento, no se han descrito implicaciones importantes de esta región en las actividades enzimáticas de la proteína.

La posible obtención en el futuro de la secuencia completa del ADN<sub>c</sub> de la enzima probablemente ayudará a explicar su comportamiento cinético y el uso de

carbohidratos en peces, así como facilitará el entendimiento de la evolución genética de esta enzima.

#### **4.2.1. Mensajeros de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de dorada**

La utilización del fragmento de 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, clonado de hígado de dorada, en el análisis de los niveles de mensajero en diferentes condiciones nutricionales, nos ha permitido detectar la presencia en hígado de tres bandas, reconocidas por la sonda en las hibridaciones con ARN total o poli (A+). Las tres han mostrado ser objeto de regulación nutricional en paralelo.

En mamíferos aparece una banda mayoritaria de 2 Kb, aunque es habitual encontrar la expresión de diferentes isoformas en un mismo tejido. En hígado de rata, además de la forma específica tisular, aparecen bandas minoritarias correspondientes a las isoformas de músculo esquelético (1.9 Kb) y corazón (4.3 Kb). Queda por esclarecer los factores determinantes de la especificidad tisular, así como el sentido fisiológico de la presencia de diferentes isoformas en un mismo tejido (Pilkis *et al.*, 1995).

En hígado de *Sparus aurata* la banda mayoritaria corresponde a 4.2 Kb, apareciendo dos con menor intensidad, una de 2.1 Kb y otra, minoritaria, de 1.1 Kb. Todos los análisis por *Northern blot* realizados, para evaluar la expresión del gen de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado en los experimentos de ayuno y realimentación con diferentes tipos y distintas cantidades de dieta, fueron llevados a cabo trabajando en condiciones de elevada astringencia, lo que en principio descarta una unión inespecífica. Además, el hecho de que la regulación nutricional afecte a las tres bandas por igual, parece indicar que son objeto de un mismo control, lo que sugiere que las tres bandas podrían corresponder a diferentes formas de mensajero expresadas por el gen hepático de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. Queda por esclarecer el mecanismo que da lugar a la expresión de las tres formas. La banda de 1.1 Kb, minoritaria, podría ser resultado de la expresión de una forma truncada en el proceso de maduración del ARN<sub>m</sub>. Vidal *et al.* (1993) han observado que el gen que codifica para la forma de corazón de la enzima bifuncional en bovino da lugar, por diferente procesamiento, a cinco mensajeros diferentes, de los cuales uno es una forma truncada sin actividad 6-PF 2-K.

Las tres formas expresadas podrían ser resultado de un procesamiento diferente en la maduración del ARN<sub>m</sub>, sin poder descartar que sean isoformas

diferentes. Si la banda de 4.2 Kb, que es la mayoritaria, se traduce es probable que dé lugar a la forma proteica activa mayoritaria de la enzima en hígado. La cantidad de mensajero de 2.1 Kb es relativamente baja, lo que podría indicar que, si se traduce, posiblemente dé lugar a una forma proteica minoritaria, no necesariamente diferente del producto de la posible traducción de la banda de 4.2 Kb.



## **5. CONCLUSIONES**



1. El ayuno promueve, en hígado de *Sparus aurata*, una disminución del flujo glucolítico por inhibición de 6-PF 1-K y PK, a la vez que un aumento de la gluconeogénesis mediante activación de Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa. La vía de las pentosas fosfato, a través de la inhibición de Glu 6-P DH y 6-PG DH, y la metabolización de aminoácidos, por inhibición de ALT, se ven a su vez disminuidas. Los valores de las actividades enzimáticas se restablecen al realimentar peces previamente en situación de ayuno.

2. De entre las dietas de diferente composición suministradas a doradas, aquéllas que tienen mayor contenido en carbohidratos y menor proteína, son las que promueven un mayor incremento en las actividades enzimáticas de la ruta glucolítica (6-PF 1-K y PK) y de la vía de las pentosas fosfato (Glu 6-P DH y 6-PG DH), dando lugar, además, a bajos valores en la actividad ALT. La alimentación con dietas ricas en proteína y pobres en carbohidratos promueven los efectos contrarios en dichas actividades determinadas en hígado de dorada.

3. El aporte de bajas cantidades de dieta conlleva un descenso general del metabolismo, que se manifiesta en el crecimiento y en el índice hepatosomático (IHS) de los peces, así como en la disminución de las actividades 6-PF 1-K, PK, Glu 6-P DH, 6-PG DH y ALT, determinadas en extractos hepáticos. En cambio, la actividad gluconeogénica Fru 1,6-P<sub>2</sub>asa se ve aumentada.

4. Los niveles hepáticos de Fru 2,6-P<sub>2</sub>, correlacionan con el estado de activación de la enzima bifuncional 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa. El ayuno y la alimentación con baja cantidad de dieta dan lugar a un descenso en los niveles hepáticos del metabolito. Al realimentar peces previamente sometidos a ayuno, los niveles de Fru 2,6-P<sub>2</sub> aumentan. Este incremento depende del contenido de carbohidratos y de la cantidad de dieta suministrada.

5. El ayuno y la posterior realimentación promueven un descenso y aumento, respectivamente, de la actividad 6-PF 2-K en hígado de dorada. El incremento observado en la actividad quinasa por realimentación es, a corto plazo, mayoritariamente debido al aumento en la relación forma activa/total de la 6-PF 2-

K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, que no se corresponde con aumentos en los niveles de mensajero o de proteína detectable por *Western blot*. En los peces realimentados con las dietas de alto contenido en carbohidratos y bajo en proteína se promueve, a largo plazo, un incremento de los niveles de ARN<sub>m</sub> y de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa inmunodetectable, que correlaciona con los elevados niveles de actividad 6-PF 2-K observados bajo estas condiciones. La enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa de hígado de dorada está sometida, por tanto, a regulación nutricional a través de mecanismos de control a corto y a largo plazo.

6. El aporte de bajas cantidades de dieta, tiene consecuencias similares a las observadas en condiciones de ayuno sobre los niveles de ARN<sub>m</sub> y cantidad de proteína 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en hígado de dorada.

7. A partir de ARN total de hígado de *Sparus aurata* se ha amplificado, clonado y secuenciado un fragmento de ADN<sub>c</sub>. La comparación de su secuencia con las de los bancos de datos de ácidos nucleicos, indica que corresponde a un fragmento de ARN<sub>m</sub> de la enzima 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa.

8. El fragmento clonado presenta un elevado grado de homología con las secuencias descritas para la enzima bifuncional en otros vertebrados, lo que indica un alto grado de conservación en la evolución. El fragmento secuenciado corresponde a la zona central de la enzima, donde se yuxtaponen parte del dominio quinasa y bisfosfatasa, y es la primera secuencia descrita para el mensajero de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa en peces.

9. En el ADN<sub>c</sub> clonado aparecen todos los residuos implicados en el mecanismo de catálisis descrito para la Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa hepática de rata. Estos residuos, que en rata son Arg<sup>257</sup>, His<sup>258</sup>, Arg<sup>307</sup>, Glu<sup>327</sup>, Arg<sup>352</sup>, Lys<sup>356</sup>, Arg<sup>360</sup> e His<sup>392</sup>, corresponden en el fragmento clonado de hígado de dorada a Arg<sup>34</sup>, His<sup>35</sup>, Arg<sup>84</sup>, Glu<sup>104</sup>, Arg<sup>129</sup>, Lys<sup>133</sup>, Arg<sup>137</sup> e His<sup>169</sup>.

10. Los residuos arginina de las posiciones 225, 230 y 238 de la enzima de hígado de rata, importantes en la reacción del dominio quinasa de la 6-PF 2-K/Fru 2,6-P<sub>2</sub>asa, aparecen conservados en las posiciones 2, 7 y 15 del fragmento clonado de hígado de *Sparus aurata*.

11. La utilización del fragmento clonado como sonda ha permitido detectar variaciones en los niveles de ARN<sub>m</sub> en hígado de doradas sometidas a diferentes condiciones nutricionales, ayuno y realimentación con diferentes tipos y/o cantidades de dieta, por *Northern blot*. Tanto a partir de ARN total como de ARN poli (A+), los mensajeros detectados corresponden a una banda mayoritaria de 4.2 Kb, otra no tan abundante de 2.1 Kb y una tercera minoritaria de 1.1 Kb. En mamíferos se ha descrito una banda mayoritaria de unas 2 Kb en hígado.



## **6. BIBLIOGRAFIA**



## A

Alexis, M.N. y 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.* **83B**, 245-249.

Aragón, J.J.; Sánchez, V. y Boto, L. (1986) Fructose-2,6-bisphosphate in *Dictyostelium discoideum*. Independence of cyclic AMP production and inhibition of fructose-1,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* **161**, 757-761.

Argaud, D.; Lange, A.J.; Becker, T.C.; Okar, D.A.; El-Maghrabi, M.R.; Newgard, C.B. y Pilkis, S.J. (1995) Adenovirus-mediated overexpression of liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in gluconeogenic rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 24229-24236.

Assimacopoulos, J.F. y Jeanrenaud, B. (1990) Insulin activates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and pyruvate kinase in liver: Indirect evidence for action *via* a phosphatase. *J. Biol. Chem.* **265**, 7202-7206.

## B

Baanante, I.V.; García de Frutos, P.; Bonamusa, L. y Fernández, F. (1991) Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis. Role of fructose 2,6-P<sub>2</sub> and PFK-2. *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**, 11-17.

Barcia, R.; Villamarín, J.A.; Vázquez-Illanes, M.D.; Ibarguren, I. y Ramos-Martínez, J.I. (1991) Fructose 1,6-bisphosphatase in mantle of the sea mussel *Mytillus galloprovincialis* Lmk-I. Purification and ion requirements. *Comp. Biochem. Physiol.* **100B**, 635-639.

Barroso, J.B.; García-Salguero, L.; Peragón, J.; de la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. (1993) Effects of long-term starvation on the NADPH production systems in several different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: *Fish nutrition in practice* (ed. Kaushik, S.J. y Luquet, P.), pp. 333-338, INRA, París.

Bartrons, R.; Hue, L.; Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1983) Hormonal control of fructose-2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **214**, 829-837.

Bartrons, R.; Carreras, M.; Climent, F. y Carreras, J. (1985) Inhibition of phosphoglucomutase by fructose-2,6-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Acta* **842**, 52-55.

Bastrop, R.; Spangenberg, R. y Jürss, K. (1991) Biochemical adaptation of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) to food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol.* **98A**, 143-149.

- Bastrop, R.; Jürss, K. y Wacke, R. (1992) Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* **102A**, 151-161.
- Baulida, J.; Onetti, R. y Bassols, A. (1992) Effects of epidermal growth factor on glycolysis in A431 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 1216-1223.
- Bazan, J.F.; Fletterick, R.J. y Pilakis, S.J. (1989) Evolution of a bifunctional enzyme: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9642-9646.
- Bazan, J.F. y Fletterick, R.J. (1990) Tertiary structure modeling of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Structural, functional and evolutionary design of a bifunctional enzyme. En: *Fructose-2,6-bisphosphate* (ed. Pilakis, S.J.), pp. 125-171, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Beliveau, G.P. y Freedland, R.A. (1982) Metabolism of serine, glycine and threonine in isolated cat hepatocytes *Felis domestica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **71B**, 13-18.
- Bergmeyer, H.U. (1984) *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York.
- Berridge, M.J. (1984) Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **220**, 345-360.
- Bever, K.; Chenoweth, M. y Dunn, A. (1977) Glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax sp.*): *In vivo* studies with [6-<sup>3</sup>H, 6-<sup>14</sup>C]glucose. *Am. J. Physiol.* **232**, R66-72.
- Biswas, R. y Majumder, A.L. (1985) Fructose-1,6-bisphosphatase: Part I-Purification and proteolytic modification of fish liver enzyme. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **22**, 293-299.
- Blasco, J.; Fernández, J. y Gutiérrez, J. (1992) Variations in tissue reserves, plasma metabolites and pancreatic hormones during fasting in immature carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* **103A**, 357-363.
- Blundell, T.L.; Sibanda, B.L.; Sternberg, M.J.E. y Thornton, J.M. (1987) Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* **326**, 347-352.
- Böhm, R.; Hanke, W. y Segner, H. (1994) The sequential restoration of plasma metabolite levels, liver composition and liver structure in refed carp, *Cyprinus carpio*. *J. Comp. Physiol.* **164B**, 32-41.
- Bois-Joyeux, B.; Chanez, M.; Azzout, B. y Peret, J. (1986) Studies on the early changes in rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate and enzymes in response to a high protein diet. *J. Nutr.* **116**, 446-454.
- Bonamusa, L.; García de Frutos, P.; Fernández, F. y Baanante, I.V. (1989) Enzymes as indicators of nutritional conditions in the gilthead sea bream fish, *Sparus aurata*. En *International Aquaculture Conference. Aquaculture Europe '89*, p. 37.
- Bonamusa, L. (1991) Metabolisme glucídic en fetge de *Sparus aurata*. Regulació en funció de l'aport nutricional. Tesis Doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.
- Bonamusa, L.; García de Frutos, P.; Fernández, F. y Baanante, I.V. (1992) Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **1** (2), 113-125.

Borrebaek, B.; Waagbø, R.; Christophersen, B.; Tranulis, M.; Hemre, G-I. y Krogdahl, Å. (1995) Salmon liver glucokinase. *Physiol. Zool.* **68**, en *Proceedings of the 4th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry*, p. 138.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brand, I.A. y Söling, H.D. (1974) Rat liver phosphofructokinase. Purification and characterization of its reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* **249**, 7824-7831.

Brauge, C.; Medale, F. y Corraze, G. (1994) Effects of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* **123**, 109-120.

Brooks, S.P.J.; De Zwaan, A.; Van der Thillart, G.; Cattani, O.; Cortesi, P. y Storey, K.B. (1991) Differential survival of *Venus gallina* and *Scapharca inaequivalvis* during anoxic stress. Covalent modification of phosphofructokinase and glycogen phosphorylase during anoxia. *J. Comp. Physiol.* **161B**, 207-212.

Brown, W.D. y Tappel, A.L. (1959) Fatty acid oxidation by carp liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **85**, 149-158.

Buck, L.T.; Brill, R.W. y Hochachka, P.W. (1992) Gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Can. J. Zool.* **70**, 1254-1257.

Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.

## C

Carlisle, S.M.; Blakely, S.D.; Hemmingsen, S.M.; Trevanion, S.J.; Hiyoshi, T.; Kruger, N.J. y Dennis, D.T. (1990) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase: Conservation of protein-sequence between the alpha-subunit and beta-subunit and with the ATP-dependent phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **265**, 8366-8371.

Carrol, N.V.; Longley, R.W. y Roe, J.H. (1956) The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* **220**, 583-593.

Castaño, J.; Nieto, A. y Feliu, J.E. (1979) Inactivation of phosphofructokinase by glucagon in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **254**, 5576-5579.

Cavalier-Smith, T. (1987) Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* **326**, 332-333.

Christiansen, D.C. y Klungsøyr, L. (1987) Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**, 701-711.

Claus, T.H.; Schlumpf, J.R.; EL-Maghrabi, M.R.; Pilkis, J. y Pilkis, S.J. (1980) Mechanism of action of glucagon on hepatocyte phosphofructokinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6501-6505.

Claus, T.H.; Schlumpf, J.R.; EL-Maghrabi, M.R.; McGrane, M. y Pilkis, S.J. (1981) Glucagon stimulation of fructose 1,6-bisphosphatase phosphorylation in rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 716-723.

Claus, T.H.; EL-Maghrabi, M.R.; Regen, D.M.; Stewart, H.B.; McGrane, M.; Kounzt, P.D.; Nyfeler, F.; Pilkis, J. y Pilkis, S.J. (1984) The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **23**, 57-86.

Claus, T.H.; EL-Maghrabi, M.R.; Regen, D.M. y Pilkis, S.J. (1986) Mechanism of the acute action of insulin on hepatic gluconeogenesis. En: *Mechanisms of insulin action* (ed. Donner, P. y Strafors, P.), pp. 305-321, Elsevier Sci., New York.

Cognet, M.; Yu, C.L.; Vaulont, S.; Kahn, A. y Marie, J. (1987) Structure of the rat L-type pyruvate kinase gene. *J. Mol. Biol.* **196**, 11-25.

Colosia, A.D.; Lively, M.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1987) Isolation of a cDNA clone for rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophysics. Res. Commun.* **143**, 1092-1098.

Colosia, A.D.; Marker, A.J.; Lange, A.J.; El-Maghrabi, M.R.; Granner, D.K.; Tauler, A.; Pilkis, J. y Pilkis, S.J. (1988) Induction of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin. *J. Biol. Chem.* **263**, 18669-18677.

Cornell, N.W.; Stegelman, J.J.; Kerich, M.J. y Woodwin, B.R. (1986) Metabolite and enzyme contents of freeze-clamped liver of the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**, 669-674.

Cowey, C.B.; Higuera, M. y Adron, J.W. (1977a) The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* **38**, 385-395.

Cowey, C.B.; Knox, D.; Walton, M.J. y Adron, J.W. (1977b) The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* **38**, 463-470.

Cowey, C.B. y Walton, M.J. (1989) *Fish Nutrition* (ed. Halver, J.E.), Academic Press, San Diego.

Crepin, K.M.; Darville, M.I.; Hue, L. y Rousseau, G.G. (1988) Starvation or diabetes decreases the content but not the mRNA of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* **227**, 136-140.

Crepin, K.M.; Vertammen, D.; Dom, G.; Hue, L. y Rider, M.H. (1993) Rat muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Study of the kinase domain by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 15277-15284.

Cronin, C.N. y Tipton, K.F. (1985) Purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei*. *Biochem J.* **227**, 113-124.

Cséke, C.; Weeden, N.F.; Buchanan, B.B. y Uyeda, K. (1982) A special fructose bisphosphate functions as a cytoplasmic regulatory metabolite in green leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4322-4326.

## D

Darville, M.I.; Crepin, K.M.; Vanderckhove, J.; Van Damme, J.; Octave, J.N.; Rider, M.H.; Marchan, M.J.; Hue, L. y Rousseau, G.G. (1987) Complete nucleotide sequence coding for rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase derived from a cDNA clone. *FEBS lett.* **224**, 317-321.

Darville, M.I.; Crepin, K.M.; Hue, L. y Rousseau, G.G. (1989) 5' flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6543-6547.

De Silva, S.S. y Anderson, T.A. (1995) *Fish Nutrition in Aquaculture*, Chapman & Hall, London.

Decaux, J.F.; Antione, B. y Kahn, A. (1989) Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biol. Chem.* **264**, 11881-11890.

Depre, C.; Rider, M.; Veitch, K. y Hue, L. (1993) Role of fructose-2,6-bisphosphate in the control of heart glycolysis. *J. Biol. Chem.* **268**, 13274-13279.

Dunaway, G.A.; Leung, G. L-Y.; Thrasher, J.R. y Cooper, M.D. (1978) Turnover of hepatic phosphofructokinase in normal and diabetic rats. *J. Biol. Chem.* **253**, 7460-7463.

## E

Eilers, F.; Bartels, H. y Jungermann, K. (1993) Zonal expression of the glucokinase gene in rat liver. Dynamics during the daily feeding rhythm and starvation-refeeding cycle demonstrated by *in situ* hybridization. *Histochemistry* **99**, 133-140.

Ekdahl, K.N. y 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.

El-Maghrabi, M.R.; Pilkis, J.; Fox, E.; Claus, T.H. y Pilkis, S.J. (1982a) Regulation of rat liver fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **257**, 7603-7607.

El-Maghrabi, M.R.; Fox, E.; Pilkis, J. y Pilkis, S.J. (1982b) cAMP-dependent phosphorylation of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 794-802.

El-Maghrabi, M.R.; Claus, T.H. y Pilkis, S.J. (1983) Substrate-directed regulation of cAMP-dependent phosphorylation. *Methods Enzymol.* **99**, 212-219.

El-Maghrabi, M.R.; Pate, T.M.; D'Angelo, G.; Correia, J.J.; Lively, M.O. y Pilkis, S.J. (1987) Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Identification of essential sulfhydryl residues in the primary sequence of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**, 11714-11720.

El-Maghrabi, M.R.; Pilkis, J.; Marker, A.; Colosia, A.D.; D'Angelo, G.; Fraser, B.A. y Pilkis, S.J. (1988) cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8430-8434.

El-Maghrabi, M.R.; Colosia, A.D.; Tauler, A.; Kurland, I. y Pilkis, S.J. (1990) Liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. En: *Fructose-2,6-bisphosphate* (ed. Pilkis, S.J.), pp. 87-124, CRC Press, Boca Raton, Florida.

El-Maghrabi, M.R.; Lange, A.J.; Tauler, A.; Kummel, L. y Pilkis, S.J. (1991) The rat fructose-1,6-bisphosphatase gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 2115-2120.

El-Maghrabi, M.R.; Austin, L.R.; Correia, J.J. y Pilkis, S.J. (1992) Lysine 274 is essential for fructose 2,6-bisphosphate inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 6526-6530.

Engstrom, D.; Ekman, P.; Humble, E. y Zellerqvist, O. (1987) Pyruvate kinase. *The Enzymes* **18**, 47-75.

Evans, P.R. y Hudson, P.J. (1979) Structure and control of phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature* **279**, 500-504.

Exton, J.H. (1986) Mechanisms involved in calcium-mobilizing agonist responses. *Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phosphoryl. Res.* **20**, 211-262.

## F

Fideu, M.D.; Soler, G. y Ruiz-Amil, M. (1983) Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**, 795-799.

Fisher, W.K. y Thompson, E.O.P. (1983) Amino acid sequence studies on sheep liver fructose-bisphosphatase-2. The complete sequence. *Aust. J. Biol. Sci.* **36**, 235-250.

Foe, L.G.; Latshaw, S.P. y Kemp, R.G. (1983) Binding of hexose bisphosphates to muscle phosphofructokinase. *Biochemistry* **22**, 4601-4606.

Foster, G.D.; Storey, K.B. y Moon, T.W. (1989) The regulation of 6-phosphofructo 1-kinase by insulin and glucagon in isolated hepatocytes of the american eel. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**, 382-389.

Foster, G.D. y Moon, T.W. (1990a) Control of key carbohydrate-metabolizing enzymes by insulin and glucagon in freshly isolated hepatocytes of marine teleost *Hemiramphus americanus*. *J. Exp. Zool.* **254**, 55-62.

Foster, G.D. y Moon, T.W. (1990b) The role of glycogen phosphorylase in the regulation of glycogenolysis by insulin and glucagon in isolated eel (*Anguilla rostrata*) hepatocytes *Fish Physiol. Biochem.* **8**, 299-309.

François, J.; Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1984) The mechanism by which glucose increases fructose-2,6-bisphosphate concentration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **145**, 187-193.

François, J.; Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1988) Characterization of phosphofructokinase 2 and of enzymes involved in the degradation of fructose 2,6-bisphosphate in yeast. *Eur. J. Biochem.* **171**, 599-608.

French, C.J.; Mommsen, T.P. y Hochachka, P.W. (1981) Amino acid utilization in isolated hepatocytes from rainbow trout. *Eur. J. Biochem.* **113**, 311-317.

French, C.J.; Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (1983) Metabolic organization in liver during spawning migration of sockeye salmon. *Am. J. Physiol.* **245**, R827-R830.

Frieden, E. y Lipner, H. (1971) *Biochemical endocrinology of the vertebrates*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Furuichi, M. y Yone, Y. (1981) The utilization of carbohydrate by fishes. 3. Changes of blood-sugar and plasma-insulin levels of fishes in glucose-tolerance test. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* **47**, 761-764.

Fynn-Aikins, K.; Hughes, S.G. y Vandenberg, G.W. (1995) Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comp. Biochem. Physiol.* **111A**, 163-170.

## G

Gancedo, J.M.; Mazón, M.J. y Gancedo, C. (1983) Fructose-2,6-bisphosphate activates the cAMP-dependent phosphorylation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **258**, 5998-5999.

García de Frutos, P.; Bonamusa, L.; Fernández, F. y Baanante, I.V. (1990) Fructose 2,6-bisphosphate in liver of *Sparus aurata*. *Comp. Biochem. Physiol.* **96B**, 63-65.

García de Frutos, P.; Bonamusa, L. y Baanante, I.V. (1991) Metabolic changes in fish liver during the starved-to-fed transition. *Comp. Biochem. Physiol.* **98A**, 329-331.

García de Frutos, P. y Baanante, I.V. (1994) 6-Phosphofructo 2-Kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in liver of the teleost *Sparus aurata*. *Arch. Biochem. Biophys.* **308** (2), 461-468.

García de Frutos, P. y Baanante, I.V. (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** (2), 297-302.

Gehrich, S.; Gekakis, N. y Sul, H.S. (1988) Liver ( -type) phosphofructokinase mRNA. *J. Biol. Chem.* **263**, 11755-11759.

Gidh-Jain, M.; Zhang, Y.; van Poelje, P.D.; Liang, J.Y.; Huang, S.; Kim, J.; Elliott, J.T.; Erion, M.D.; Pilkis, S.J.; El-Maghrabi, M.R. y Lipscomb, W.N. (1994) The allosteric site of human liver fructose-1,6-bisphosphatase. Analysis of six AMP site mutants based on the crystal structure. *J. Biol. Chem.* **269**, 27732-27738.

Giroux, E.; Williams, M.K. y Kantrowitz, E.R. (1994) Shared active sites of fructose-1,6-bisphosphatase. Arginine 243 mediates substrate binding and fructose 2,6-bisphosphate inhibition. *J. Biol. Chem.* **269**, 31404-31409.

González, C.; Rodríguez-Fernández, J.L.; Cabrera i Poch, H.; Frías, I.; Pérez, J.A. y Siverio, J.M. (1988) Fructose-2,6-bisphosphate and other metabolites and enzymes in the process of cold-induced lethargy and starvation in lizard liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **89B**, 131-135.

Gottschalk, M.E.; Chatterjee, T.; Edelstein, I. y Marcus, F. (1982) Studies on the mechanism of interaction of fructose-2,6-bisphosphate with fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **257**, 8016-8020.

Guderley, H. y Cardenas, J.M. (1980) Pyruvate kinases of salmon: Purification and comparison with the isozymes from birds and mammals. *J. Exp. Zool.* **211**, 185-198.

Gutiérrez, J.; Carrillo, M.; Zanuy, S. y Planas, J. (1984) Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of the sea bass *Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. *Gen. Comp. Endocrinol.* **55**, 393-397.

## H

Hakim, G.; Carpené, E.; Cortesi, P. e Isani, G. (1985) Regulation by phosphorylation-dephosphorylation of pyruvate kinase in *Venus gallina* and *Scapharca inaequivalvis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**, 109-112.

Heinisch, J.; Ritzel, R.G.; Von Borstel, R.C.; Aguilera, A.; Rodicio, R. y Zimmermann, F.K. (1989) The phosphofructokinase genes of yeast evolved from two duplication events. *Gene* **78**, 309-321.

Helmerhorst, E. y Stokes, G.B. (1980) Microcentrifuge desalting: A rapid, quantitative method for desalting small amounts of protein. *Anal. Biochem.* **104**, 130-135.

Hellinga, H.W. y Evans, P.R. (1985) Nucleotide sequence and high-level expression of the major *E. coli* phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* **108**, 363-373.

Hellinga, H.W. y Evans, P.R. (1987) Mutations in the active site of *Escherichia coli* phosphofructokinase. *Nature* **327**, 437-439.

Hemre, G.I.; Lie, O.; Lambertsen, G. y Sundby, A. (1990) Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*). Hormonal response of insulin, glucagon and glucagon-like-peptide to diet and starvation. *Comp. Biochem. Physiol.* **97A**, 41-44.

Hers, H.G. y Hue, L. (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 617-653.

Heylen, A.; Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1982) The stimulation of phosphofructokinase from human erythrocytes by fructose-2,6-bisphosphate. *FEBS Lett.* **143**, 141-143.

Hickling, D.R. y March, B.E. (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.* **81A**, 391-396.

Hilton, J.W. y Atkinson, J.L. (1982) Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *Br. J. Nutr.* **47**, 597-607.

Hochachka, P.W. (1961) Glucose and acetate metabolism in fish. *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 1937-1941.

Holwerda, D.A.; Veldhuizen-Tsoerkan, M., Veenhof, P.R. y Evers, E. (1989) *In vivo* and *in vitro* studies on the pathway of modification of mussel pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**, 375-380.

Hosey, M.M. y Marcus, F. (1981) Fructose-bisphosphatases as a substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 91-94.

Hotta, K.; Nakajima, H.; Yamasaki, T.; Hamaguchi, T.; Kuwajima, M.; Noguchi, T.; Tanaka, T.; Kono, N. y Tarui, S. (1991) Rat-liver-type phosphofructokinase mRNA. Structure, tissue distribution and regulation. *Eur. J. Biochem.* **202**, 293-298.

Houlihan, D.F.; Mathers, E. y Foster, A. (1994) Biochemical correlates of growth rate in fish. En: *Fish Ecophysiology*, pp. 45-71, Chapman & Hall, London.

Hue, L. y Rider, M. H. (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* **245**, 313-324.

Hue, L. y Rousseau (1993) Fructose-2,6-bisphosphate and the control of glycolysis by growth-factors, tumor promoters and oncogenes. *Adv. Enzyme Regul.* **33**, 97-110.

Hung, S.S.O.; Conte, F.S. y Hallen, E.F. (1993) Effects of feeding rates on growth, body composition and nutrient metabolism in striped bass (*Morone saxatilis*) fingerlings. *Aquaculture* **112**, 349-361.

Hurley, C.; Galibois, I. y Jacques, H. (1995) Fasting and postprandial lipid and glucose metabolisms are modulated by dietary proteins and carbohydrates: Role of plasma insulin concentrations. *Nutr. Biochem.* **6**, 540-546.

## I

Ince, B.W. y Thorpe, A. (1976) The *in vivo* metabolism of <sup>14</sup>C-glucose and <sup>14</sup>C-glycine in insulin treated northern pike (*Esox lucius*, L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **28**, 481-486.

Ince, B.W. y Thorpe, A. (1977) Glucose and amino acid-stimulated insulin release *in vivo* in the european silver eel (*Anguilla anguilla*) *Gen. Comp. Endocrinol.* **31**, 249-256.

Iritani, N. (1992) Nutritional and hormonal regulation of lipogenic-enzyme gene expression in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **205**, 433-442.

## J

Jeziarska, B.; Hazel, J.R. y Gierking, S.D. (1982) Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., with attention to fatty acids. *J. Fish Biol.* **21**, 681-692.

Joaquín, M.; Rosa, J.L.; Salvadó, C.; López, S.; Nakamura, T.; Bartrons, R.; Gil, J. y Tauler, A. (1996) Hepatocyte growth factor and transforming growth factor regulate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression in rat hepatocyte primary cultures. *Biochem. J.* **314**, 235-240.

## K

Katz, J. y Rongstad, R. (1978) Futile cycling in glucose metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **3**, 171-174.

Katz, J. y McGarry, J.D. (1984) The glucose paradox: Is glucose a substrate for liver metabolism? *J. Clin. Invest.* **74**, 1901-1909.

Katz, J.; Kuwajima, M.; Foster, D.W. y McGarry, J.D. (1986) The glucose paradox: New perspectives on hepatic carbohydrate-metabolism review. *Trends Biochem. Sci.* **113**, 136-140.

Kemp, R.G. y Krebs, E.G. (1967) Binding of metabolites by phosphofructokinase. *Biochemistry* **6**, 423-434.

Kemp, R. y Marcus, F. (1990) Effects of fructose-2,6-bisphosphate on 6-phosphofructo-1-kinase and fructose-1,6-bisphosphatase. En: *Fructose-2,6-bisphosphate* (ed. Pilkis, S.J.), pp. 17-37, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Kim, KI; Grimshaw, TW; Kayes, TB y Amundson, CH (1992) Effect of fasting or feeding diets containing different levels of protein or amino acids on the activities of the liver amino acid-degrading enzymes and amino acid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **107**, 89-105.

Kitamura, K. y Uyeda, K. (1987) The mechanism of activation of heart fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **262**, 679-681.

Kitamura, K.; Uyeda, K.; Kangawa, K. y Matsuo, M. (1989) Purification and characterization of rat skeletal muscle fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **264**, 9799-9806.

Kletzien, R.F. y Berdanier, C.D. (1993) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Diet and hormonal influences on *de novo* enzyme synthesis. En: *Nutrition and Gene Expression* (eds. Berdanier, C.D. y Hargrove, J.L.), pp. 187-206, CRC Press, Boca Raton.

Knox, D.; Walton, M.J. y Cowey, C.B. (1980) Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. *Mar. Biol.* **56**, 7-10.

Kountz, P.D.; McCain, R.W.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1986) Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Phosphate dependence and effects of other oxyanions. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**, 104-113.

Kountz, P.D.; Freeman, S.; Cook, A.G.; El-Maghrabi, M.R.; Knowles, J.R. y Pilkis, S.J. (1988) The stereochemical course of phospho group transfer catalyzed by rat liver 6-phosphofructo-2-kinase. *J. Biol. Chem.* **263**, 16069-16072.

Kretschmer, M. y Fraenkel, D.G. (1991) Yeast 6-phosphofructo-2-kinase: Sequence and mutant. *Biochemistry* **30**, 10663-10672.

Kretschmer, M.; Paravicini, G. y Fraenkel, D.G. (1992) The yeast FBP26 gene codes for a fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochemistry* **31**, 7126-7133.

Kretschmer, M.; Langer, C. y Prinz, W. (1993) Mutation of monofunctional 6-phosphofructo-2-kinase in yeast to bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochemistry* **32**, 11143-11148.

Kruger, N.J.; Kombrink, E. y Beevers, H. (1983) Fructose 2,6-bisphosphate as a contaminant of commercially obtained fructose 6-phosphate: Effect on PP<sub>i</sub>; fructose 6-phosphate phosphotransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 37-42.

Kummel, L. y Pilkis, S.J. (1990) Multi-hormonal regulation of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression in primary culture of rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 406-413.

Kurland, I.J. y Pilkis, S.J. (1989) Indirect versus direct routes of hepatic glycogen synthesis. *FASEB J.* **3**, 2277-2281.

Kurland, I.J.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1993) Lack of evidence for a role of Cys-138 as a base catalyst in the skeletal muscle 6-phosphofructo-2-kinase reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 229-236.

Kuwajima, M.; Golden, S.; Katz, J.; Unger, R.H.; Foster, D.W. y McGarry, J.D. (1986) Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **261**, 2632-2637.

## L

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**, 680-685.

Lange, A.J.; Kummel, L.; El-Maghrabi, M.R.; Tauler, A.; Colosia, A.; Marker, A. y Pilkis, S.J. (1989) Sequence of the 5'-flanking region of the rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene: Regulation by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 753-760.

Lange, A.J. y Pilkis, S.J. (1990) Sequence of human liver phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3652-3652.

Lange, A.J.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1991) Isolation of bovine liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase cDNA: bovine liver and heart forms of the enzyme are separate products. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 258-263.

Lange, A.J.; Espinet, C.; Hall, R.; El-Maghrabi, M.R.; Vargas, A.M.; Miksicek, R.J.; Granner, D.K. y Pilkis, S.J. (1992) Regulation of gene expression of rat skeletal muscle / liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 15073-15080.

Larsson, A. y Lewander, K. (1973) Metabolic effects of starvation in the eel *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **44A**, 367-374.

Larsson, P.; Hahrim, S. y Okla, L. (1990) Fat content as a factor inducing migratory behavior in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. *Naturwissenschaften* **77**, 488-490.

- Lawrence, J.C. (1992) Signal transduction and protein phosphorylation in the regulation of cellular metabolism by insulin. *Ann. Rev. Physiol.* **54**, 177-193.
- Lee, C.Y. (1982) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse. *Meth. Enzymol.* **89**, 252-257.
- Lee, C.P.; Kao, M.C.; French, B.A.; Putney, S.D. y Chang, D.H. (1987) The rabbit muscle phosphofructo kinase gene. *J. Biol. Chem.* **262**, 4195-4199.
- Lee, Y.H.; Okar, D.; Lin, K. y Pilkis, S.J. (1994a) Mechanism of modulation of rat liver fructose-2,6-bisphosphatase by nucleotide triphosphates. *J. Biol. Chem.* **269**, 11002-11010.
- Lee, Y.H.; Lin, K.; Okar, D.; Alfano, N.L.; Sarma, R.; Pflugrath, J.W. y Pilkis, S.J. (1994b) Preliminary-X-ray analysis of a truncated form of recombinant fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Mol. Biol.* **235**, 1147-1151.
- Leff, S.E.; Rosenfeld, M.G. y Evans, R.M. (1986) Complex transcriptional units: Diversity in gene expression by alternative RNA processing. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1091-1117.
- Lemaigre, F.P. y Rousseau, G.G. (1994) Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* **303**, 1-14.
- Li, L.; Lin, K.; Kurland, I.J.; Correia, J.J. y Pilkis, S.J. (1992a) Site-directed mutagenesis in rat liver 6-Phosphofructo-2-kinase. Mutation at the fructose 6-phosphate binding site affects phosphate activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 4386-4393.
- Li, L.; Lin, K.; Correia, J.J. y Pilkis, S.J. (1992b) Lysine 356 is a critical residue for binding the C-6 phospho group of fructose 2,6-bisphosphate to the fructose 2,6-bisphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 16669-16675.
- Li, L.; Lin, K.; Pilkis, J.; Correia, J.J. y Pilkis, S.J. (1992c) Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. The role of surface loop basic residues in substrate binding to the fructose-2,6-bisphosphatase domain. *J. Biol. Chem.* **267**, 21588-21594.
- Li, L.; Lange, A.J. y Pilkis, S.J. (1993) Isolation of a cDNA for chicken liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 397-405.
- Likimani, T.A. y Wilson, R.P. (1982) Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *J. Nutr.* **112**, 112-117.
- Lin, H.; Romsos, D.R.; Tack, P.I. y Leveille, G.A. (1977) Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)). *J. Nutr.* **107**, 846-854.
- Lin, H.; Romsos, D.R.; Tack, P.I. y Leveille, G.A. (1978) Determination of glucose utilization in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* with [6-<sup>3</sup>H] and [6-<sup>14</sup>C]glucose. *Comp. Biochem. Physiol.* **59A**, 189-191.
- Lin, K.; Li, L.; Correia, J.J. y Pilkis, S.J. (1992a) Glu-327 is part of a catalytic triad in rat liver fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 6556-6562.

Lin, K.; Li, L.; Correia, J. y Pilkis, S.J. (1992b) Arg-257 and Arg-307 of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase bind the C-2 phospho group of fructose-2,6-bisphosphate in the fructose-2,6-bisphosphatase domain. *J. Biol. Chem.* **267**, 19163-19171.

Liu, Z.; Thompson, K.S. y Towle, H.C. (1993) Carbohydrate regulation of the rat L-type pyruvate kinase gene requires two nuclear factors: LF-A1 and a member of the c-myc family. *J. Biol. Chem.* **268**, 12787-12795.

Lively, M.O.; El-Maghrabi, M.R.; Pilkis, J.; Angelo, G.D.; Colosia, A.D.; Ciavola, J.A.; Fraser, B.A. y Pilkis, S.J. (1988) Complete amino acid sequence of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **263**, 839-849.

Loiseau, A.N.; Rider, M.R.; Foret, D.; Rousseau, G.G. y Hue, L. (1988) Rat hepatoma (HTC) cell 6-phosphofructo-2-kinase differs from that in liver and can be separated from fructose-2,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* **175**, 27-32.

Love, R. M. (1970). *The Chemical Biology of Fishes*, Academic Press, London.

Lupiáñez, J.A.; Sánchez-Lozano, M.J.; García-Rejón, L. y 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.

## M

Marcus, F.; Edelstein, I. y Reardon, I. y Heinrikson, R.L. (1982) Complete amino acid sequence of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7161-7165.

Marcus, F.; Edelstein, I. y Rittenhouse, J. (1984) Inhibition of *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**, 1103-1108.

Marie, J.; Lewis, M.J.; Simon, M.P. y Kahn, A. (1983) Genetic and epigenetic control of the pyruvate kinase isozymes in mammals. En: *Isozymes: Current topics in biological and medical research*. (ed. Rattazzi, M.C.; Scandalios, J.G. y Whitt, G.S.) pp. 221-240, Liss, New York.

Marker, A.J.; Colosia, A.D.; Lange, A.J.; Tauler, A.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1989) Glucocorticoid regulation of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA. *J. Biol. Chem.* **264**, 7000-7004.

Martín-Sanz, P.; Cascales, M. y Boscá, L. (1987) Fructose-2,6-bisphosphate in isolated fetal hepatocytes. *FEBS Lett.* **225**, 37-42.

Mazón, M.J.; Gancedo, J.M. y Gancedo, C. (1982) Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **257**, 1128-1130.

Mertens, E.; Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1987) Fructose-2,6-bisphosphate and the control of the energy charge in higher plants. *FEBS Lett.* **221**, 124-128.

- Mertens, E.; Van Schaftingen, E. y Müller, M. (1986) Presence of a fructose-2,6-bisphosphate-insensitive pyrophosphate : fructose-6-phosphate phosphotransferase in the anaerobic protozoa *Tritrichomonas foetus*, *Trichomonas vaginalis* and *Isotricha prostoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**, 183-190.
- Metón, I.; Mediavilla, D. y Baanante, I.V. (1995) Automated assay for fructose 2,6-bisphosphate. *Anal. Lett.* **28**, 1919-1935.
- Michelsen, K. y Sheridan, M.A. (1990) Influence of cAMP and calcium on epinephrine-mediated hepatic glycogenolysis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* **97C**, 329-332.
- Minassian, C.; Ajzannay, A.; Riou, J.P. y Mithieux, G. (1994) Investigation of the mechanism of glycogen rebound in the liver of 72-hour fasted rats. *J. Biol. Chem.* **269**, 16585-16588.
- Miralpeix, M.; Carballo, E.; Bartrons, R.; Crepin, K. Hue, L. y Rousseau, G.G. (1992) Oral administration of vanadate to diabetic rats restores liver 6-phosphofructo-2-kinase content and messenger RNA. *Diabetologia* **35**, 243-248.
- Mommsen, T.P. y Moon, T.W. (1990) Metabolic response of teleost hepatocytes to glucagon-like peptide and glucagon. *J. Endocrinol.* **126**, 109-118.
- Moon, T.W. y Johnston, I.A. (1980) Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp. Physiol.* **136**, 31-38.
- Moon, T.W. y Johnston, I.A. (1981) Amino acid transport and interconversions in tissues of freshly caught and food-deprived plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.* **19**, 653-663.
- Moon, T.W.; Foster, G.D. y Plisetskaya, E.M. (1989) Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks. *Can. J. Zool.* **67**, 2189-2193.
- Morata, P.; Vargas, A.M.; Sánchez-Medina, F.; García, M; Gardenete, G. y Zamora, S. (1982) Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* **71B**, 65-70.
- Müller, D. y Holzer, H. (1981) Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 926-933.
- Murat, J.C.; Castilla, C. y Paris, H. (1978) Inhibition of gluconeogenesis and glucagon-induced hyperglycemia in carp. (*Cyprinus carpio* L.) *Gen. Comp. Endocrinol.* **34**, 243-246.
- Murray, K.; El-Maghrabi, M.R.; Kountz, P.; Lukas, T.; Soderling, T.R. y Pilkis, S.J. (1984) Amino acid sequence of the phosphorylation site of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **259**, 7673-7681.

## N

- Nagai, M. e Ikeda, S. (1971) Carbohydrate metabolism in fish -I. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **37**, 404-409.

Nagai, M. e Ikeda, S. (1973a) Carbohydrate metabolism in fish -III. Effect of dietary composition on metabolism of glucose-U-<sup>14</sup>C and glutamate-U-<sup>14</sup>C in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **38**, 137-143.

Nagai, M. e Ikeda, S. (1973b) Carbohydrate metabolism in fish-IV. Effect of dietary composition on metabolism of acetate-U-<sup>14</sup>C and L-alanine-U-<sup>14</sup>C in carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **39**, 633-643.

Nakai, T.; Shibata, T. y Satio, T. (1970) Seasonal variations in the metabolic activities of tissue constituents of some fishes-III. On the activity of energy metabolising enzymes in the muscle and liver of kokanee salmon. *Bull. Fac. Hokkaido Univ.* **21**, 234-239.

Nakajima, H.; Yamashi, T.; Noguchi, T.; Tanska, T.; Kona, N. y Tori, S. (1990) Evidence for alternative RNA splicing and possible alternative promoters in human muscle phosphofructokinase gene at the 5' untranslated region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 637-641.

Navarro, I.; Gutiérrez, J. y 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.* **102A**, 401-407.

Netheler, H. y Ziegenhorn, J. (1987) En: *Principles of enzymatic analysis*, eds. H.U. Bergmeyer y K. Gawehn, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 175-201.

Newgard, C.B.; Hirsch, L.J.; Foster, D.W. y McGarry, J.D. (1983) Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in rat. A direct or an indirect pathway? *J. Biol. Chem.* **258**, 8046-8052.

Newsholme, E.A. y Start, C. (1973) *Regulation in metabolism*. Wiley, London.

Noguchi, T.; Inoue, H. y Tanaka, T. (1985) Transcriptional and posttranscriptional regulation of L-type pyruvate kinase in diabetic rat liver by insulin and dietary fructose. *J. Biol. Chem.* **260**, 14393-14397.

Noguchi, T.; Inoue, H. y Tanaka, T. (1986) The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807-13812.

Noguchi, T.; Yamada, K.; Inoue, H. y Tanaka, T. (1987) The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by use of different promoters. *J. Biol. Chem.* **262**, 14366-14371.

Noguchi, T. y Tanaka, T. (1993) Dietary and hormonal regulation of L-type pyruvate kinase gene expression. En: *Nutrition and Gene Expression* (eds. Berdanier, C.D. y Hargrove, J.L.), pp. 169-186, CRC Press, Boca Raton.



Ocampos, D.; Rosa, C.D.; Rodrigues, E. y Rosa, R. (1987) Kinetic properties of pyruvate kinase from the epaxial muscle of the marine fishes *Mugil lisa* and *Chaetoditerus faber*. *Comp. Biochem. Physiol.* **88B**, 625-630.

Okar, D.A.; Kakalis, L.T.; Narula, S.S.; Armitage, I.M. y Pilkis, S.J. (1995) Identification of transient intermediates in the bisphosphatase reaction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *Biochem. J.* **308**, 189-195.

## P

Pain, R.H. (1986) Evolutionary economics. *Nature* **323**, 393-394.

Palmer T.N. y Ryman, B.E. (1972) Studies on oral glucose tolerance in fish. *J. Fish Biol.* **4**, 311-319.

Pelletier, D.; Dutil, J.D.; Blier, P. y Guderley, H. (1994) Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol. B* **164**, 179-190.

Pelletier, D.; Blier, P.U.; Dutil, J.D. y Guderley, H. (1995) How should enzyme activities be used in fish growth studies? *J. Exp. Biol.* **198**, 1493-1497.

Pilkis, S.J.; El-Maghrabi, M.R.; Pilkis, J. y Claus, T. (1981) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **256**, 3619-3622.

Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R.; McGrane, M. y Pilkis, J. (1981) The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of fructose 1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **256**, 11489-11495.

Pilkis, S.J.; Chrisman, T.D., El-Maghrabi, M.R.; Colosia, A.; Fox, E.; Pilkis, J. y Claus, T.H. (1983a) The action of insulin on hepatic fructose-2,6-bisphosphate metabolism. *J. Biol. Chem.* **258**, 1495-1503.

Pilkis, S.J.; Walderhaug, M.; Murray, K.; Beth, K.; Venkataramu, S.D.; Pilkis, J. y El-Maghrabi, M.R. (1983b) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver: Isolation and identification of a phosphorylated intermediate. *J. Biol. Chem.* **258**, 6135-6141.

Pilkis, S.J.; Regen, D.M.; Claus, T.H. y Cherrington, A.D. (1985) Role of hepatic glycolysis and gluconeogenesis in glycogen synthesis. *BioEssays* **2**, 273-276.

Pilkis, S.J.; Fox, E.G.; Wolf, L.; Rothbarth, L.; Colosia, A.D.; Stewart, H.B. y El-Maghrabi, M.R. (1986) Hormonal modulation of key hepatic regulatory enzymes in the gluconeogenic/glycolytic pathway. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **478**, 1-19.

Pilkis, S.J.; Lively, M.O. y El-Maghrabi, M.R. (1987) Active site sequence of hepatic fructose-2,6-bisphosphatase. Homology in primary structure with phosphoglycerate mutase. *J. Biol. Chem.* **262**, 12672-12675.

Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R. y Claus, T.H. (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 755-783.

Pilkis, S.J. y Claus, T.H. (1991) Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* **11**, 465-515.

Pilkis, S.J.; Claus, T.H.; Kurland, I.J. y Lange, A.J. (1995) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: A metabolic signaling enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 799-835.

Plisetskaya, E.M.; Bhattacharya, S.; Dickhoff, W.W. y 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.* **78A**, 773-778.

Plisetskaya, E.M.; Sheridan, M.A. y Mommsen, T.P. (1989) Metabolic changes in coho and chinook salmon resulting from acute insufficiency in pancreatic hormones. *J. Exp. Zool.* **249**, 158-164.

Plisetskaya, E.M. (1990) Endocrine pancreas of teleost fish: A model for interaction of islet hormones? *J. Exp. Zool.* **4**, 53-57.

Pohlig, G. y Holzer, H. (1985) Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase by cyclic AMP-dependent protein kinase from yeast. *J. Biol. Chem.* **260**, 13818-13823.

Poorman, R.A.; Randolph, A.; Kemp, R.G. y Henrikson, R.L. (1984) Evolution of phosphofructokinase-gene duplication and creation of new effector sites. *Nature* **309**, 467-469.

Potter, V.R. y Ono, T. (1961) Enzyme patterns in rat liver and Morris hepatoma 5123 during metabolic transition. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**, 355-362.

Probst, I. y Unthan-Fechner, K. (1985) Activation of glycolysis by insulin with a sequential increase of the 6-phosphofructo-2-kinase activity, fructose-2,6-bisphosphate level and pyruvate kinase activity in cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **153**, 347-353.

Pyko, M.; Rider, M.H. y Wegener, G. (1993) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from frog skeletal muscle: Purification, kinetics and immunological properties. *J. Comp. Physiol.* **163B**, 89-98.

## R

Ramaiah, A. (1974) Pasteur effect and phosphofructokinase. *Curr. Top. Cell. Regul.* **8**, 297-345.

Richards, C.S. y Uyeda, K. (1982) Hormonal regulation of fructose-6-P, 2-kinase and fructose-2,6-P<sub>2</sub> by two mechanisms. *J. Biol. Chem.* **257**, 8854-8861.

Rider, M.H., Vandamme, J.; Lebeau, E.L.; Vertommen, D.; Vidal, H.; Rousseau, G.G.; Vandekerckhove, J. y Hue, L. (1992) The two forms of bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase result from alternative splicing. *Biochem. J.* **285**, 405-411.

Rider, M.H.; Crepin, K.M.; De Cloedt, M.; Bertrand, L. y Hue, L. (1994) Site-directed mutagenesis of rat muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Role of Asp-130 in the 2-kinase domain. *Biochem. J.* **300**, 111-115.

Rider, M.H.; Crepin, K.M.; De Cloedt, M.; Bertrand, L.; Vertommen, D. y Hue, L. (1995) Study of the roles of Arg-104 and Arg-225 in the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **309**, 341-346.

Riou, J.P.; Claus, T.H.; Flockhart, D.; Corbin, J. y Pilkis, S.J. (1977) *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4615-4619.

Rittenhouse, J.; Chatterjee, T.; Marcus, F.; Reardon, I. y Henrikson, R.L. (1983) Amino acid sequence of the COOH-terminal region of fructose-1,6-bisphosphatases in relation to cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **258**, 7648-7652.

Rittenhouse, J.; Nevo, E. y Marcus, F. (1985) Distribution of a COOH-terminal amino acid extension of liver fructose-1,6-bisphosphatase among rodent species. *Comp. Biochem. Physiol.* **82B**, 507-509.

Roach, P.J. (1986) Liver glycogen synthase. En: *The Enzymes* (ed. Boyer, P. y Krebs, E.G.), vol. 17, pp. 499-539, Academic Press, London.

Roberts, B. y Anderson, P.J. (1985) The purification and kinetic characterization of eel white muscle pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* **80B**, 51-56.

Rogers, D.T.; Hiller, E.; Mitsock, L. y Orr, E. (1988) Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: Sequence, protein homology and expression during growth on glucose. *J. Biol. Chem.* **263**, 6051-6057.

Roodyn, D.B. (1970) En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (ed. Work, T.S. y Work, E.), vol. 2, pp. 1-221, North-Holland Publ. Co., London.

Rosa, J.L.; Tauler, A.; Lange, A.J.; Pilkis, S.J. y Bartrons, R. (1992) Transcriptional and posttranscriptional regulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase during liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3746-3750.

Rosa, J.L.; Ventura, F.; Tauler, A. y Bartrons, R. (1993) Regulation of hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression by glucagon. *J. Biol. Chem.* **268**, 22540-22545.

Rosa, J.L.; Pérez, J.X.; Ventura, F.; Tauler, A.; Gil, J.; Shimoyama, M.; Pilkis, S.J. y Bartrons, R. (1995) Role of the N-terminal region in covalent modifications of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Comparison of phosphorylation and ADP-ribosylation. *Biochem. J.* **309**, 119-125.

Rowell, E.W.; Carnie, J.A.; Wahbi, S.D., Al-Tai, A.H. y Rowell, K.V. (1979) L-serine dehydratase and L-serine-pyruvate aminotransferase activities in different animals species. *Comp. Biochem. Physiol.* **63B**, 543-555.

## S

Sakai, A.; Watanabe, F. y Furuya, E. (1994) Cloning of cDNAs for fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase from frog skeletal muscle and liver, and their expression in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**, 1099-1106.

- Sakata, J. y Uyeda, K. (1990). Bovine heart fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4951-4955.
- Sakata, J.; Abe, Y. y Uyeda, K. (1991) Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate,2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **266**, 15764-15770.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sand, O. (1988) The effect of fructose 1,6 diphosphate on pyruvate kinase from the liver of the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **90B**, 401-407.
- Sheridan, M.A. y Muir, N.A. (1988) Effects of epinephrine and norepinephrine on glucose release from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) liver incubated *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **248**, 155-159.
- Shimeno, S. y Shikata, T. (1993) Effects of acclimation temperature and feeding rate on carbohydrate-metabolizing enzyme activity and lipid content of common carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 661-666.
- Shimeno, S.; Ming, D.C. y Takeda, M. (1993) Metabolic response to dietary carbohydrate and lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 827-833.
- Shirakihara, Y. y Evans, P.R. (1988) Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* **204**, 973-994.
- Smith, R.R. (1989) Nutritional energetics. En: *Fish nutrition* (ed. Halver, J.E.), pp. 1-29, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press Inc., San Diego.
- Soderling, T.R.; Schworer, C.M.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1986) Phosphorylation of liver pyruvate kinase by Ca<sup>++</sup>/calmodulin dependent protein kinase: Characterization of two phosphorylation sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1017-1023.
- Söling, H.D.; Kuduz, J. y Brand, I.A. (1981) Inactivation of liver phosphofructokinase by phosphatase or by low pH is inhibited by fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* **130**, 309-313.
- Staal, G.E.; Koster, J.F. y Veeger, C. (1975) Human erythrocyte pyruvate kinase. *Meth. Enzymol.* **42**, 182-186.
- Stapleton, S.R.; Stevens, G.J.; Teel, J.F.; Rank, K.B.; Berg, E.A.; Wu, J.Y.; Ginsberg, L.C. y Kletzien, R.F. (1993) Effects of acetaldehyde on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and mRNA levels in primary rat hepatocytes in culture. *Biochimie* **75**, 971-976.
- Steffens, W. (1989). En: *Principles of fish nutrition*, pp. 66-183. Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Stewart, H.B.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1985) Evidence for a phosphoenzyme intermediate in the reaction pathway of rat hepatic fructose-2,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* **260**, 12935-12941.

Storey, K.B. (1987a) Regulation of liver metabolism by enzyme phosphorylation during mammalian hibernation. *J. Biol. Chem.* **262**, 1670-1673.

Storey, K.B. (1987b) Tissue-specific controls on carbohydrate catabolism during anoxia in goldfish. *Physiol. Zool.* **60**, 601-607.

Stryer, L. (1995). En: *Bioquímica*. 4ª edición, Editorial Reverté, Barcelona.

Suarez, R.K. y Mommsten, T.P. (1987) Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.* **65**, 1869-1882.

Suárez, M.D.; Hidalgo, M.C.; García Gallego, M.; Sanz, A. y de la Higuera, M. (1995) Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the european eel. *Comp. Biochem. Physiol.* **111A**, 421-428.

SuperANOVA, Abacus concepts, Inc. Berkeley, California, 1989.

## T

Tauler, A.; Rosenberg, A.H.; Studier, F.W. y Pilkis, S.J. (1988) Expression of the bisphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6642-6646.

Tauler, A.; Lange, A.J.; El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1989) Expression of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and its kinase domain in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7316-7320.

Tauler, A.; Lin, K. y Pilkis, S.J. (1990) Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: Use of site-directed mutagenesis to evaluate the role of His-258 and His-392 in catalysis. *J. Biol. Chem.* **265**, 15617-15622.

Tejwani, G.A. (1983) Regulation of fructose-bisphosphatase activity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **54**, 121-194.

Toyoda, Y. y Sy, J. (1984) Purification and phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Biol. Chem.* **259**, 8718-8723.

Tsuchya, Y. y Uyeda, K. (1994) Bovine heart fructose 6-phosphate, 2-kinase: fructose 2,6-bisphosphatase mRNA and gene structure. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 467-474.

## U

Uyeda, K.; Furuya, E. y Luby, L.J. (1981) The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J. Biol. Chem.* **256**, 8394-8399.

## V

Valera, A. y Bosch, F. (1994) Glucokinase expression in rat hepatome cells induces glucose uptake and is rate limiting in glucose utilization. *Eur. J. Biochem.* **222**, 533-539.

Van Schaftingen, E.; Hue, L. y Hers, H.G. (1980a) Study of the fructose-6-phosphate/fructose-bisphosphate cycle in the liver *in vivo*. *Biochem. J.* **192**, 263-271.

Van Schaftingen, E.; Hue, L. y Hers, H.G. (1980b) Fructose-2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochem. J.* **192**, 897-901.

Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1980) Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase, most likely fructose-2,6-bisphosphate, from phosphoric acid and fructose-6-phosphoric acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1524-1531.

Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1981) Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2861-2863.

Van Schaftingen, E.; Lederer, B.; Bartrons, R. y Hers, H.G. (1982) A kinetic study of pyrophosphate: Fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to microassay of fructose-2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* **129**, 191-195.

Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1982) Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur. J. Biochem.* **124**, 143-149.

Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1983) The role of fructose-2,6-bisphosphate in the long-term control of phosphofructokinase in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 548-554.

Van Schaftingen, E. (1984) Fructose 2,6-bisphosphate. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. Bergmeyer, H.U.) vol. VI, pp. 335-341, Verlag Chemie, Weinheim.

Van Schaftingen, E.; Opperdoes, F.R. y Hers, H.G. (1985) Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose-2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* **153**, 403-406.

Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1986) Purification and properties of phosphofructokinase 2/fructose-2,6-bisphosphatase from chicken liver and from pigeon muscle. *Eur. J. Biochem.* **159**, 359-365.

Van Schaftingen, E.; Opperdoes, F.R. y Hers, H.G. (1987) Effects of various metabolic conditions and the trivalent arsenical melarsen oxide on the intracellular levels of fructose-2,6-bisphosphate and on glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **166**, 653-661.

Van Schaftingen, E. (1987) Fructose 2,6-bisphosphate. *Adv. Enzymol.* **59**, 314-395.

Van Schaftingen, E. (1990) Role of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of hepatic carbohydrate metabolism. En: *Fructose-2,6-bisphosphate* (ed. Pilkis, S.J.), pp. 65-85, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Van Schaftingen, E.; Mertens, E. y Opperdoes, F.R. (1990) Fructose-2,6-bisphosphate in primitive systems. En: *Fructose-2,6-bisphosphate* (ed. Pilkis, S.J.), pp. 229-244, CRC Press, Boca Raton, Florida.

Vaulont, S.; Munnich, A.; Decaux, J.F. y Kahn, A. (1986) Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *J. Biol. Chem.* **261**, 7621-7625.

Vaulont, S. y Kahn, A. (1994) Transcriptional control of metabolic-regulation genes by carbohydrates. *FASEB J.* **8**, 28-35.

Vázquez-Illanes, M.D. y Ramos-Martínez, J.I. (1991) Phosphorylation-activated 6-phosphofructo-2-kinase from mantle tissue of marine mussels. *FEBS Lett.* **295**, 176-178.

Vázquez-Illanes, M.D.; Barcia, R.; Ibarguren, I.; Villamarín, J.A. y Ramos-Martínez, J.I. (1992) Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in mantle tissue of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* **112**, 277-281.

Ventura, R.; Rosa, J.L.; Ambrosio, S.; Pilkis, S.J. y Bartrons, R. (1992) Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Evidence for a neural-specific isozyme. *J. Biol. Chem.* **267**, 17939-17943.

Ventura, F.; Ambrosio, S.; Bartrons, R.; El-Maghrabi, M.R.; Lange, A.J. y Pilkis, S.J. (1995) Cloning and expression of a catalytic core bovine brain 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 1140-1148.

Vidal, H.; Crepin, K.M.; Rider, M.H.; Hue, L. y Rousseau, G.G. (1993) Cloning and expression of novel isoforms of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from bovine heart. *FEBS Lett.* **330**, 329-333.

Villamarín, J.A.; Rodríguez-Torres, I.; Ibarguren, I. y Ramos-Martínez, J.I. (1990) Phosphofructokinase in the mantle of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *J. Exp. Zool.* **255**, 272-279.

Vora, S. (1983) Isozymes of phosphofructokinase. En: *Isozymes: Current topics in biological and medical research* (ed. Rattazzi, M.C.; Scandalios, J.G. y Whitt, G.S.), pp. 119-167, Liss, New York.

## W

Wakelam, M.J.O.; Murphy, G.J.; Hruby, V.J. y Houslay, M.D. (1986) Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature* **323**, 68-71.

Walker, J.E.; Saraste, M.; Runswick, M.J. y Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.

Wall, S.R.; Von den Hove, M.F.; Crepin, K.M.; Hue, L. y Rousseau, G.G. (1989) Thyroid hormone stimulates expression of 6-phosphofructo-2-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* **257**, 211-214.

Walton, M.J. y Cowey, C.B. (1979) Gluconeogenesis by isolated hepatocytes from rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* **62B**, 75-79.

Y

Yamauchi, T.; Stegeman, J.J. y Goldberg, E. (1975) The effects of starvation and temperature acclimation on pentose phosphate dehydrogenases in brook trout liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **167**, 13-20.

Z

Zanuy, S.; Carrillo, M.; Pérez, J.; Gutiérrez, J. y Planas, J. (1993) Enviromental and nutritional influences on the endocrine controls of growth and metabolism. En: *Recent Advances in Aquaculture IV* (ed. Muir, J.F. y Roberts, R.J.),pp. 140-152, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

