

EFFECTOS DEL ZINC Y EL CAMBIO DE SALINIDAD SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINAS, ARN, ADN Y LAS ACTIVIDADES MAXIMAS DE ENZIMAS CLAVES GLUCOLITICAS Y OXIDATIVAS EN TEJIDOS DE JUVENILES DE ORTHOPRISTIS RUBER PISCES: HAEMULIDAE.

JOSE CHOPITE y OSMAR A. NUSETTI.

Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

RESUMEN: El cambio de salinidad de 36‰ a 10‰ aumentó los niveles de proteínas en el músculo blanco de *Orthopristis ruber*, sin afectar su capacidad de síntesis (ARN/ADN); presumiblemente como reflejo de una adaptación al medio hipoosmótico. El zinc, en la salinidad de 36‰ a una dosis subletal, disminuyó la capacidad de síntesis protéica del tejido. El crecimiento por proliferación celular (niveles de ADN) no fue afectada por los factores de salinidad y zinc. Las actividades (U.g-1 peso húmedo) de las enzimas glucolíticas piruvato cinasa (PK), lactato deshidrogenasa (LDH), y de las oxidativas citrato sintetasa (CS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) en el músculo blanco e hígado de juveniles de *O. ruber* tratados con una dosis subletal de Zn (1,5 mg/l) a salinidades de 36‰ y 18‰ fueron afectados significativamente. En el músculo la actividad de LDH disminuyó a la salinidad de 36‰ en presencia del metal, mientras que la CS y la GDH aumentaron. Al bajar la salinidad a 18‰ en ausencia del contaminante, incrementaron las actividades PK, CS, GDH y disminuyó la LDH en comparación a los resultados obtenidos en los controles. Al añadir zinc a esta salinidad bajaron su actividad PK, CS y GDH y aumentó la LDH. En el hígado en condiciones de salinidad de 36‰ más zinc, las actividades de PK y CS aumentaron. A baja salinidad (18‰) las enzimas LDH y CS aumentaron su actividad; la presencia del metal a esta salinidad disminuyó las actividades de todas las enzimas estudiadas.

ABSTRACT: The salinity change from 36‰ to 18‰ promoted an increase in the protein content of the white muscle of *Orthopristis ruber*, without altering the protein synthesizing capacity (ARN/ADN ratio); probably as an adaptive response to the hypo-saline medium. The sublethal dosis of zinc at 36‰ of salinity decreased the capacity of protein synthesis of the tissue. The salinity change and sublethal dosis of the metals did not affect the muscle content of DNA or growth by cell proliferation. The activities (U/g wet wt.) of glucolytic enzymes i.e., pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH), and the oxidative citrate synthase (CS) and glutamate dehydrogenase (GDH) in the white skeletal muscle and liver of juvenile of *O. ruber* treated with a sub-lethal dosis of Zn (1.5 mg/l) at salinities of 36‰ and 18‰ were affected significantly. In the muscle, the activities of LDH decreased at salinity of 36‰ in the presence of the metal, while CS and GDH increase. On decreasing salinity to 18‰ in total absence of the contaminant, the activities PK, CS, and GDH increased and LDH decreased when compared to the results obtained in the controls. On adding zinc to this salinity, PK, CS, and GDH decreased their activity and LDH increased. In the liver at a salinity of 36‰ plus zinc, PK, and CS activities increased. At low salinity (18‰), the enzymes LDH y CS increased their activities. The presence of the metal in this salinity decreased the activities of the group of enzymes assayed in the tissue.

INTRODUCCION

El zinc es un metal esencial para los organismos, ya que viene en varios procesos enzimáticos relacionados con síntesis de proteínas y metabolismo de carbohidratos; sin embargo, un aumento en la concentración de este metal por encima de los niveles considerados como nor-

males para ciertas especies puede afectar procesos biológicos vitales (MERTS, 1970).

La contaminación del ambiente con este elemento puede resultar en la bioacumulación con efectos tóxicos. La concentración de zinc en el agua de mar oscila entre 0,001-0,02 ppm (RILEY, 1965) y en aguas costeras es ma-

yor de 0,4 ppm, pero su presencia puede incrementarse a través de efluentes provenientes de empresas galvanizadoras de hierro, bronce, fábrica de pinturas, papel, etc.

Siendo una realidad la contaminación progresiva de los ecosistemas marinos por el Zinc, se hace necesario estudiar los efectos producidos por la acumulación de este elemento sobre la fauna marina: particularmente peces, los cuales constituyen una de las mayores fuentes de alimento.

Estos organismos acumulan rápidamente el metal, siendo los niveles de captación afectados por el grado de contaminación del hábitaculo (KEARNS y ATKISON, 1979). Evidencias han sido presentadas indicando diferentes efectos de acumulación de Zinc sobre el crecimiento en una variedad de especies (BAL, 1967; BRUNGS, 1969; BENGTSOON, 1974; SINLEY, *et al.* 1974; SPEHAR, 1976; KEARNS & ATKISON, 1979). Otras investigaciones han sido orientadas a dilucidar el efecto contaminante de Zinc sobre funciones enzimáticas dependientes de este elemento, tales como la formación de metaloproteínas, actividades de transaminasas y algunas enzimas oxidativas (BRADLEY, *et al.* 1985); no obstante estos aspectos no han sido sistemáticamente investigados en una variedad de especies.

Estudios de los impactos de contaminación de Zinc, así como también otros metales pesados sobre los peces, han sido dirigidos principalmente a determinar efectos tóxicos sobre ciertas funciones fisiológicas o bioquímicas en condiciones naturales o de laboratorio, sin llegar a la apreciación de las posibles relaciones entre las perturbaciones funcionales y los atributos adaptativos que garantizan la sobrevivencia del organismo cuando varían las condiciones ecológicas, físico-químicas, climáticas y alimenticias. Para apreciar el impacto del contaminante sobre los recursos adaptativos del organismo, se deben considerar fundamentalmente las estructuras y/o funciones esenciales para todos los sistemas vivos susceptibles a perturbaciones por las características físico-químicas del ambiente.

Entre los factores ecológicos que ejercen presión selectiva entre los organismos acuáticos se incluye la salinidad, hecho que tiene implicaciones adaptativas importantes que ameritan atención en el contexto toxicológico. Ante una alteración de la salinidad, las especies promueven una diversidad de estrategias fisiológicas y bioquímicas que resultan en un estado osmótico favorable para garantizar la integridad funcional, el crecimiento y actividad en las condiciones ecológicas prevalecientes (HOCHACHKA & SOMERO, 1973; BALLANTYNE *et al.* 1987). La modificación de estas características en sus dis-

intos niveles de organización por un componente de toxicidad compromete la capacidad de sobrevivencia de las poblaciones en un ambiente particular. Así, la realización de investigaciones respecto a las influencias, o modo de acción, de los polutantes sobre la organización metabólica celular y los procesos bioquímicos determinantes del crecimiento de los organismos expuestos a salinidades dentro de su rango natural de tolerancia, puede aportar luces en el esclarecimiento de los problemas de contaminación de los ecosistemas acuáticos.

Consecuentemente, el objetivo de este estudio es determinar efectos posibles del zinc a una dosis subletal, sobre el metabolismo oxidativo anaeróbico y aeróbico del tejido hepático y musculatura blanca del pez *Orthopristis ruber*, expuesto a salinidades de 36 y 18‰ en condiciones de laboratorio. Las determinantes metabólicas se basan en las mediciones de las enzimas claves glucolíticas piruvato cinasa (PK), lactato deshidrogenasa (LDH) y de las enzimas deshidrogenasa (GDH). Bajo las mismas condiciones experimentales también se determinarán los efectos del metal sobre el crecimiento instantáneo del pez, parámetro biológico valorado por los contenidos de ADN y los cocientes ARN/ADN; Proteína/ADN del músculo blanco.

La concentración de ADN indica el crecimiento por proliferación celular, mientras que las relaciones ARN/ADN y Proteína/ADN reflejan el crecimiento por aumento de volumen asociado con la síntesis de proteínas (BULOW, 1987; NUSETTI & MORALES, 1988).

MATERIALES Y METODOS

Area de muestreo:

Los ejemplares juveniles de coro-coro *Orthopristis ruber* (CUVIER, 1830), de una longitud estandar promedio de 7 cm, utilizados para los bioensayos, se colectaron en la Playa de San Luis, Golfo de Cariaco, Edo. Sucre. Para la captura se utilizó una red de 50m x 3m y maya 0,64 cm.

Pre-tratamiento de los peces:

En el laboratorio, los peces fueron colocados en acuarios (60 x 40 x 40 cm) con agua de mar natural (36‰) y aircadores President ECN-III, donde permanecieron no menos de 15 días a 25°C en período de aclimatación. Este proceso se llevó a cabo en dos etapas, una primera fase (1 semana) donde los peces no ingirieron alimento y la segunda en la cual los peces comieron con naturalidad. Se determinó la mediana del límite de tolerancia (LTm, 96

horas) para el zinc (sulfato) de acuerdo a FARBER (1963) en agua de mar a 36‰ y 25°C empleando bioensayos estáticos, a fin de tener una referencia experimental en la selección de la dosis subletal del metal a utilizar en el presente estudio. El agua de mar y la cantidad de sulfato de zinc se renovaron cada 48 horas después de iniciado el bioensayo. El valor de la concentración letal del zinc (LC50) fue de 7,6 mg/l. Aparentemente, concentraciones mayores de 10 mg/l no son compatibles con la vida de estos organismos en salinidades de 36‰ y temperaturas de 25°C en un lapso de tiempo mayor a 96 horas.

Cuarenta peces, previamente aclimatados a 36‰ se distribuyeron en número de 10 en 4 acuarios (30 x 30 x 50 cm) con agua de mar aireada de salinidad 18‰ por un período de tiempo de 15 días. Durante este lapso de tiempo los peces se alimentaron 3 veces por día con comida comercial y cambio de agua cada 48 horas, previamente filtrada con filtro de diatomeas (DIATOM). El traspaso inmediato de los peces aclimatados a 36‰ a la salinidad de 18‰ ocurrió normalmente sin alteraciones apreciables en su comportamiento, particularmente en la actividad e interés por el alimento.

Tratamiento experimental:

Cuarenta peces aclimatados en agua de mar a 36‰ y 40 aclimatados a 18‰, se dividieron respectivamente en subgrupos de cuatro, distribuidos en 10 acuarios. Al término de 8 días se sacrificaron 20 individuos a cada salinidad y los restantes se utilizaron seguidamente para el bioensayo de toxicidad del zinc, por el mismo lapso de tiempo. La dosis subletal de zinc empleada fue de 1,5 mg/l. Los peces se alimentaron diariamente, con cambio de agua y dosis del metal cada 48 horas hasta concluir el experimento.

Diseción y preparación de los tejidos:

Diez peces controles (36‰) y 10 peces por cada tratamiento experimental (18‰, 36‰ + Zn y 18‰ + Zn) fueron sacrificados por decapitación, y de inmediato, se les disectó el hígado y una porción de músculo blanco de la región dorsal superior, entre la parte posterior del opérculo y la parte inferior de la aleta dorsal por encima de la línea media. Seguidamente, ambos tejidos se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -40°C hasta el momento de hacer las determinaciones bioquímicas correspondientes.

Extracción y cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos:

El músculo blanco fue homogenizado al 10% p/v en

frío (0-4°C), con un homogenizador Potter Elvehjem. Aliquotas de 4 ml de los homogenizados fueron usadas para la extracción de proteínas y ácidos nucleicos, ajustándose a los métodos de BUCKLEY y BULOW (1987). También, muestras fueron secadas a 80°C por 72 horas para determinar el peso seco.

Las proteínas fueron cuantificadas según el método de LOWRY *et al.* (1951). El ARN se determinó mediante el reactivo de orcinol, y el ADN por la reacción de difenilamina; ambos valorizados en fósforo inorgánico (BUCKLEY & BULOW, 1987). Se usaron como patrones en las determinaciones respectivas albúmina de bovino (sigma IV), ARN de levadura (Sigma), y ADN de espermatozoos de Sardina (Sigma).

Actividad enzimática:

Las actividades de las enzimas piruvato cinasa (PK), lactato deshidrogenasa (LDH), citrato sintetasa (CS) y glutamato deshidrogenasa (GDH) se midieron en extractos de hígado y músculo blanco de peces sometidos a los diferentes tratamientos y en los controles. Las muestras de hígado y músculo congelados a -40°C se homogenizaron a 30% p/v en una solución tampónada constituida por Imidazol-HCl 50 mM, KCl 40 mM, sacarosa 150 mM, EDTA 1 mM y glutatión reducido 2 mM, pH= 6,8, a 0-4°C. Los homogenizados se centrifugaron a 2000 x g por 15 minutos a 0-4°C. Las actividades enzimáticas de los sobrenadantes se midieron espectrofotométricamente a 25°C, de acuerdo a los procedimientos de GUDERLEY *et al.* (1986); siguiendo el cambio de absorbancia de NADH a 340 en el curso de las reacciones, excepto para citrato sintetasa, la cual se midió a 412 nm, monitoreando la sulfidrilación de 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB). Las actividades de las enzimas se expresaron en unidades por gramo de peso fresco. Una unidad de actividad es la cantidad de enzima que produce 1 µmol de producto por minuto a 25°C.

Análisis estadístico:

El análisis de varianza doble (ANOVAII) fue utilizado para determinar efectos de los factores salinidad y zinc sobre los contenidos de las biomoléculas y actividades enzimáticas de los tejidos, y la prueba de Tukey fue usada para establecer diferencias entre las medidas de los parámetros bioquímicos (SOKAL & ROHLF, 1969).

RESULTADOS

Las influencias de los tratamientos experimentales

sobre los contenidos de las proteínas, ácidos nucleicos e índices de crecimiento del músculo blanco se ilustran en la tabla 1. Se observó efectos significativos ($P \leq 0,05$) del cambio de salinidad, de la dosis subletal del zinc y las interacciones de estos factores sobre los contenidos de ARN-P y proteínas; no sucediendo así con el ADN-P. El índice proteína/ADN fue influenciado por la salinidad ($P \leq 0,01$) y el ARN/ADN fue influenciado por el metal ($P \leq 0,01$). El contenido de ARN-P fue menor a salinidad de 36‰ en presencia de Zinc, en relación a los otros 3 grupos, que no exhibieron diferencias entre sí. Las proteínas y el cociente proteína/ADN presentaron valores más elevados en salinidad de 18‰ y 18‰ + Zn en comparación con los otros dos grupos, que fueron esencialmente similares. A salinidad de 36‰ con el contaminante se observó una disminución de ARN-P/ADN-P, con respecto a los otros grupos, en los cuales ésta se mantuvo relativamente similar.

Las actividades máximas de las enzimas PK, LDH, CS y GDH en el músculo blanco fueron afectadas significativamente ($P \leq 0,01$) por los factores salinidad y zinc, hubo una acción conjunta de los factores sobre las actividades enzimáticas ($P \leq 0,05$ (Tabla 2). Piruvato cinasa, presentó mayor actividad en los grupos de salinidad de 18‰ y 18‰ + Zn en comparación con los otros dos grupos (36‰ y 36‰ + Zn). El zinc a 18‰ inhibió a Pk en relación al grupo de 18‰ sin el metal, mientras que a 36‰ no produjo mayor efecto. LDH fue mucho más activa en 18‰ + Zn que en los otros grupos experimentales. Respecto al control, el zinc a 36‰ y la salinidad a 18‰ inhibieron LDH, siendo el efecto de inhibición ma-

yor a la salinidad más baja. Las actividades de las enzimas CS y GDH resultaron ser más elevadas a 18‰, pero el zinc ejerció una acción inhibitoria en ambas enzimas a esta salinidad. A 36‰, CS aumentó su actividad en presencia del zinc, mientras que en esta misma condición, el metal no afectó a GDH.

En el hígado, las actividades máximas de LDH y CS fueron afectadas significativamente ($P \leq 0,01$) por la acción de los factores salinidad y zinc, mientras que las de PK y GDH fueron alteradas ($P \leq 0,05$) sólo por el metal (Tabla 3). La acción conjunta de ambos factores afectó las actividades de las enzimas LDH y CS (Tabla 3). La enzima PK resultó ser mucho más activa en el grupo de 36‰ + Zn e inhibida en 18‰ + Zn, al compararse con los grupos 18‰ y 36‰, los cuales no mostraron diferencias entre sí. Lactato deshidrogenasa presentó su máxima actividad en el grupo de 18‰ y la menor en 18‰ + Zn, y no varió a 36‰ por influencia del zinc. La CS resultó ser más activa en el grupo de 18‰ seguido por el de 36‰ + Zinc. GDH fue inhibida en 18‰ + Zinc, respecto a los otros grupos, que no exhibieron diferencia entre ellos.

DISCUSION

La relación ARN/ADN del músculo de peces ha sido ampliamente empleada como un indicador del estado fisiológico asociado con la cantidad de síntesis de proteínas, y por ende con el crecimiento (BULOW, 1970; 1987). En base a este concepto, no se evidenció efectos aparentes

TABLA 1.- CONTENIDO DE ARN-P, ADN-P, PROTEINAS EN $\mu\text{g}/\text{mg}$ PESO SECO, Y LAS RELACIONES PROTEINA/ADN, ARN-P/ADN-P EN EL MUSCULO DE JUVENILES DE *O. ruber* EXPUESTOS A DISTINTAS SALINIDADES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE ZINC. LOS VALORES REPRESENTAN LAS MEDIAS $\pm$ SD DE 10 DETERMINACIONES.

	CONDICIONES EXPERIMENTALES				ANOVA II		
	36‰	36‰ + Zn	18‰	18‰ + Zn	Fs S‰	Fs Zn	Fs S + Zn
ARN-P	0,46 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02	***	***	***
ADN-P	0,34 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,03	NS	NS	
PROTEINAS	318,35 $\pm$ 2,03	300,87 $\pm$ 1,99	353,51 $\pm$ 2,33	387,22 $\pm$ 2,56	***	**	*
PROT/ADNP-	922,60 $\pm$ 24,37	967,57 $\pm$ 34,61	1209,46 $\pm$ 39,56	1192,30 $\pm$ 36,36	***	NS	
ARN-P/ADN-P	1,42 $\pm$ 0,18	1,09 $\pm$ 0,21	1,39 $\pm$ 0,15	1,37 $\pm$ 0,15	NS	**	

* = $P < 0,05$

** = $P < 0,01$

*** = $P < 0,001$

NS = no significativo

TABLA 2.- ACTIVIDADES (U/g TEJIDO FRESCO) DE PIRUVATO CINASA (Pk), LACTATO DESHIDROGENASA (LDH), CITRATO SINTETASA (CS) Y GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN MUSCULO DE JUVENILES DE *O. ruber* EXPUESTOS A DISTINTAS SALINIDADES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL ZINC. LOS VALORES REPRESENTAN LOS PROMEDIOS $\pm$ SD DE 5 DETERMINACIONES.

ENZIMA	CONDICIONES EXPERIMENTALES				ANOVA II		
	36‰	36‰ + Zn	18‰	18‰ + Zn	Fs S‰	Fs Zn	Fs S + Zn
PK	51,28 $\pm$ 2,28	45,26 $\pm$ 6,88	133,56 $\pm$ 16,28	100,77 $\pm$ 8,24	***	***	*
LDH	175,22 $\pm$ 10,50	96,63 $\pm$ 7,80	79,14 $\pm$ 4,63	481,69 $\pm$ 61,34	***	***	***
CS	20,08 $\pm$ 2,27	37,70 $\pm$ 6,91	63,53 $\pm$ 2,10	29,68 $\pm$ 2,33	***	***	***
GDH	9,70 $\pm$ 0,82	13,36 $\pm$ 2,56	18,07 $\pm$ 1,66	4,66 $\pm$ 0,99	**	**	**

* = $P < 0,05$

** = $P < 0,01$

*** = $P < 0,001$

del cambio de salinidad en el potencial de síntesis de proteínas del tejido muscular (Tabla 1). No obstante, los niveles de proteínas expresados en base de ADN y unidad de masa muscular se elevaron en la salinidad de 18‰; lo que manifiesta, por lo tanto, una disminución de la movilización y utilización de proteínas de la musculatura. Posiblemente, esta respuesta bioquímica es la expresión de una adaptación metabólica que mantiene en balance el flujo energético entre los requerimientos del crecimiento y de las actividades fisiológicas básicas, tales como la osmoregulación, en el medio hiposmótico.

El Zinc disminuyó la relación ARN/ADN en 36‰, Tabla 1) reflejando un decrecimiento de la capacidad de síntesis de proteínas debido a un bajo contenido de ARN; esto significa una alteración del crecimiento por cambios de volumen celular (NUSETTI & MORALES, 1988). Los valores promedios de ADN permanecieron inalterados por los tratamientos experimentales, mostrando que el crecimiento por proliferación celular fue insensible al cambio de salinidad y a la dosis subletal del zinc (Tabla 1).

El cambio de salinidad y el Zinc ocasionaron variaciones en los procesos enzimáticos asociados con el metabolismo de la musculatura blanca y el hígado de *O. ruber*, en condiciones de laboratorio. Estos cambios se manifestaron por el efecto de estos dos factores sobre las actividades máximas de las enzimas claves glucolíticas piruvato cinasa (PK) y lactato dehidrogenasa (LDH), y de las oxidativas citrato sintetasa (CS) y glutamato deshidrogenasa (GDH); es resaltante la interacción de ambos fac-

tores sobre las actividades máximas de las enzimas bajo determinadas condiciones experimentales (Tabla 2 y 3). El aumento de las actividades de las enzimas PK, CS y GDH y disminución de LDH en el músculo a 18‰, en relación a 36‰ (Tabla 2), refleja un incremento de la actividad metabólica del pez donde la estimulación de la capacidad glucolítica se engrana con un incremento de la actividad oxidativa. Esto puede ser considerado como la utilización por parte de estos organismos de las rutas metabólicas anaeróbicas y oxidativas, posiblemente para conformar un estado metabólico que les permita enfrentar un alto costo energético requerido para sostener las actividades esenciales del tejido en el medio hiposmótico. Un aspecto contrario a este comportamiento enzimático se observó en esta misma salinidad en presencia del zinc; las actividades de PK, CS y GDH disminuyeron y aumentó la LDH. Probablemente, el metal provocó una perturbación funcional asociada con una reducción de la tasa metabólica que conduce a la mayor producción de lactato. Efectos similares han sido descritos en otras especies de peces (BURTON *et al.* 1972; GAE, 1984).

El efecto del metal en la salinidad de 36‰ en el músculo se manifestó en un aumento de CS y GDH y una disminución de PK y LDH (Tabla 2). Esta situación sugiere un aumento del metabolismo aeróbico y una disminución del anaeróbico. Esto puede ser el resultado de un ajuste metabólico del tejido, asociado con un cambio en la conducta motora del pez hacia una actividad de reducida intensidad, relativamente independiente de una alta tasa de producción anaeróbica de energía; presumiblemente tal alteración es fundamental para la sobrevivencia en

el ambiente contaminado. Para enfrentar el estrés ante el elemento tóxico, el organismo recurrió a una ruta más productiva energéticamente (HOCHACHKA & SOMERO, 1984).

Aparentemente, el efecto tóxico del zinc sobre el metabolismo del músculo a una concentración subletal es menor a salinidad de 36‰ que a salinidad de 18‰, en la cual el tejido experimentó una inhibición global en sus potenciales de producción de energía. En experimentos con peces de agua dulce se ha encontrado que el zinc resulta tóxico a concentraciones relativamente baja (SPRAGUE *et al.*, 1985; CORREA, 1987). Probablemente, el hecho de que *O. ruber* proviene de un medio natural de salinidad de 36‰, y como en los peces marinos se han encontrado mayor concentración de metales bioesenciales (entre ellos el zinc) que en los de agua dulce (FORSTNER & WITTMANN, 1981), *O. ruber*, posca mayor potencialidad para la tolerancia y resistencia a la acción del metal a esta salinidad que a 18‰. Otro aspecto relacionado con esta situación sería la tendencia que tienen los peces a mantener una baja actividad osmoregulatoria cuando el medio es isoosmótico, ocurriendo lo contrario cuando el medio es hipoosmótico, ya que el pez tiende a mantener un mayor flujo de intercambio hidroiónico entre él y el medio externo (TOWLE, 1981; CRESPO, 1984).

En el hígado, las enzimas PK y GDH no variaron a baja salinidad, pero incrementaron las actividades de PDH y CS (Tabla 3), lo que refleja una modificación de la or-

ganización metabólica del tejido promovida por el medio hiposalino. La activación de ambas enzimas posiblemente se relaciona con una elevación de la actividad anabólica hepática, puesto que las enzimas PK y GDH, fundamentalmente catabólicas, no fueron alteradas a 18‰ de salinidad. Normalmente LDH del hígado funciona en la conversión del lactato extrahepático en piruvato con fines anabólicos (BLACK, *et al.* 1962; HOCHACHKA, 1969). Citrato sintetasa, además de desempeñar una función clave en el ciclo tricarboxílico, juega un papel importante en la utilización anabólica del piruvato y sustratos dicarboxílicos en la biosíntesis de reservas energéticas (ATKINSON, 1966; SUAREZ & HOCHACHKA, 1981), las cuales se pueden constituir en fuentes de energía libre para el sostenimiento del balance metabólico del organismo en ambientes que impongan un activo proceso de osmoregulación.

El ajuste de compensación metabólica del hígado provocado por la reducida salinidad, fue perturbado por la dosis subletal del zinc, resultando en un descenso de los potenciales glucolíticos y oxidativos (Tabla 3). El metal también pudo afectar el metabolismo de los aminoácidos al modificar la conducta catalítica de GDH (HILMY *et al.* 1985). La acción del zinc a la salinidad de 36‰, promovió un aumento en las actividades de PK y CS; esto implica aparentemente una estimulación en la capacidad de degradación glucolítica por vía oxidativa, que podría favorecer una mayor producción energética para compensar el gasto energético que se asocia con el metabolismo del zinc.

TABLA 3.- ACTIVIDADES (U/g TEJIDO FRESCO) DE PIRUVATO CINASA (PK), LACTATO DESHIDROGENASA (LDH), CITRATO SINTETASA (CS) Y GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH) EN HIGADO DE JUVENILES DE *O. ruber* EXPUESTOS A DISTINTAS SALINIDADES EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL ZINC. LOS VALORES REPRESENTAN LOS PROMEDIOS $\pm$ SD DE 5 DETERMINACIONES.

ENZIMA	CONDICIONES EXPERIMENTALES				ANOVA II		
	36‰	36‰ + Zn	18‰	18‰ + Zn	Fs S‰	Fs Zn	Fs S + Zn
PK	5,15 $\pm$ 0,38	16,54 $\pm$ 3,87	6,07 $\pm$ 0,76	1,34 $\pm$ 0,14	NS	***	
LDH	17,98 $\pm$ 2,42	19,59 $\pm$ 4,49	35,24 $\pm$ 3,63	1,38 $\pm$ 0,29	***	**	**
CS	17,24 $\pm$ 2,52	36,28 $\pm$ 7,21	50,51 $\pm$ 5,51	20,11 $\pm$ 1,28	***	***	***
GDH	3,31 $\pm$ 0,62	2,86 $\pm$ 0,83	4,65 $\pm$ 1,18	1,58 $\pm$ 0,16	NS	*	

* = $P < 0,05$

** = $P < 0,01$

*** = $P < 0,001$

NS = no significativo

Investigaciones relacionadas con la incorporación de metales en tejidos, indican una mayor acumulación de zinc en el hígado que en el músculo; probablemente, sea ésta una de las causas que influyen y limitan las actividades metabólicas propias de este tejido. (ZABA & HARRIS, 1978; SALANKI *et al.* 1982; TORT *et al.* 1984).

En general, las observaciones previas sugieren que el metabolismo energético de juveniles de esta especie a distintas salinidades, involucran una reorganización funcional de las enzimas claves de la glucólisis y del metabolismo oxidativo, de la musculatura e hígado, las cuales son susceptibles a modificaciones por dosis subletales de zinc en el ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Comisión Organizadora del Postgrado de Biología Aplicada y al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por los recursos aportados para llevar a cabo este trabajo. Así como también a la Lic. MAIRIN LEMUS por su colaboración en la realización del mismo. Expresamos las gracias a los Dres. MERCEDES ACUÑA y MARIO BELMAR por la lectura crítica del manuscrito.

REFERENCIAS

- ATKINSON, D. E. 1966. Regulation of enzyme activity. *Ann. Rev. Biochem.* 35: 85-124.
- BALL, I. R. 1967. The relative susceptibility of some species of freshwater fish to poisons- II. Zinc. *Water Res.* 1: 777-783.
- BALLANTYNE, J. S., C. D. MOYES & T. W. MOON. 1987. Compatible and counteracting solutes and the evolution of ion and osmoregulation in fishes. *Can. J. Zool.* 65: 1883-1888.
- BENGTSOON, B. E. 1974. Effect of Zinc of growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Oikos* 25: 370-373.
- BLACK, E. C., A. R. CONNOR, K. C. LAM & W. G. CHIU. 1962. Changes in glycogen, Pyruvate and Lactate in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during and following muscular activity. *J. Fish Res. Bd. Can.* 19(3): 409-437.
- BRADLEY, R., W. DUQUESNAY & J. B. SPRAGUE. 1985. Acclimatization of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, to Zinc: Kinetic and mechanism of enhanced tolerance induction. *J. Fish Biol.* 27: 367-379.
- BRUNGNS, W. A. 1969. Chronic toxicity of zinc to by fathed minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. *Trans. American Fish. Cos.* 98: 272-279.
- BUCKLEY, L. J. & F. J. BULLOW. 1987. Techniques for the estimation of RNA, DNA, and protein in fish. In: R. C. Summerfelt & G. E. Hall (Eds): *Age and growth of fish*. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 345-354.
- BULOW, F. J. 1970. RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of a fish. *J. Fish Res. Bd. Can.* 27: 2343-2349.
- BULOW, F. J. 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish. In: R. C. Summerfelt & G. E. Hall (Eds): *Age and growth in fish*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp 355-367.
- BURTON, D., A. H. JONES & J. CAIRNS. 1972. Acute zinc toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Confirmation of the hypothesis that death is related to tissue hypoxia. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 29: 1463-1466.
- CORREA, M. C. 1987. Bioconcentración de zinc y sus efectos tóxicos en *Asiianax bimaculatus*. Pisces: Charangidae. *Act. Cient. Venez.* 38: 94-98.
- CRESPO, S. 1984. An *in vitro* study of the effects of zinc on osmoregulatory processes. *Mar. Poll. Bull.* 15(9): 341-342.
- FARBER, E. 1963. *Métodos estandar para el manejo de aguas y aguas de desecho*. Edt. Interamericana. S.A. México. pp 598.
- FORSTNER, Q. & G. T. WITTMAN, 1981. *Metal pollution in the acuatic environment*. Edward D. Goldverg (Ed.). Springer. Verlag. New York. pp 270-323.
- GADE, G. 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish *Orconectis limo-*

- sus. *Comp. Biochem. Physiol.* 771: 495-502.
- GUDERLEY, H., P. BLIER & R. LORRAINE. 1986. Metabolic changes during the reproductive migration of to sympatric Coregonine. *Coregonus artedii* and *Coregonus clupeaformis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43: 1859-1865.
- HILMY, A. M., M. B. SHABANA & A. Y. DAABEES. 1985. Effects of cadmium toxicity upon the *in vivo* and *in vitro* activities of protein homogenates of *Mugil cephalus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 81C: 145-153.
- HOCHACHKA, P. W. 1969. Intermediary metabolism in fishes. In: W. Hoar & D. Randall (Eds): Vol 1, *Fish. Physiology*. Academic Press. New York pp. 456-487.
- HOCHACHKA, P.W. & G. N. SOMER. 1973. *Strategies of biochemical adaptation*. W. B. Saunderson Company. pp 358.
- HOCHACHKA, P. W. & G. N. SOMERO. 1984. *Biochemical adaptation*. Princeton University Press. Princeton. New York. pp 521.
- KEARNS, P. & J. ATCHINSON. 1979. Effects of trace metals on growth of yellow perch (*Perca flavescens*) and measured by RNA-DNA ratios. *Environ. Biol. Fish.* 4: 388-397.
- LOWRY, O. H., H. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 175-265.
- MERTZ, W. 1970. Some aspects of nutritional trace element research. *Federation Proceedings*. 29(4): 1482-1488.
- NUSETTI, O & D. MORALES. 1988. Crecimiento de algunos tejidos del mejillón *Perna perna* (L.1758): composición de ADN, relaciones ARN/ADN y reservas energéticas. *Act. Cient. Venez.* 39: 289-293.
- RILEY, J. 1965. Analytical chemistry of sea water. In J. Riley & J. Skirrow (Eds.): *Chemical Oceanography*. London, New York.
- SALANKI, J., V. KATALIN & B. ERZSEBEL. 1982. Heavy Metals in animals of Lake Balaton. *Water Res.* 16: 1147-1152.
- SINLEY, J. R., J. P. GOETT & P. H. DAVIES. 1974. The effects of zinc on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in hard and soft water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 193-201.
- SOKAL, R. & R. FOHLF. 1969. *Biometry*. W. H. Freeman & Co. San Francisco. pp 766.
- SPEHAR, R. C. 1976. Cadmium and zinc toxicity to flay-fish *Jornanella floridae*. *J. Fish. Res. Board. Can.* 34: 1551-1558.
- SPRAGUE, J. B., P. F. ELSON & R. L. SAUNDERS. 1965. Sublethal copper-zinc pollution in salmon river a field and laboratory study. *Inst. J. Air. Wat. Pollut.* 9: 531-543.
- SUAREZ, R. K. & P. W. HOCHACHKA. 1981. Preparation and properties of rainbow trout mitochondria. *J. Comp. Physiol.* 143B: 269-273.
- TORT, L., R. FLOS & J. BALASCH. 1984. Dogfish liver and kidney tissue respiration after zinc treatment. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C: 381-384.
- TOWLE, D. W. 1981. Role of Na⁺, K⁺-ATPase in ionic regulation by marine and estuarine animals. *Mar Biol. Lett.* 2: 107-122.
- ZABA, B. N. & E. J. HARRIS. 1978. Accumulation and effect of trace metal ions in fish liver mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.* 61: 89-93.