DIFERENCIAS TERMO-ADAPTATIVAS EN ENZIMAS DESHIDROGENASAS NAD- DEPENDIENTES DE PECES MARINOS PELAGICOS TEMPLADOS Y TROPICALES

López-Lemus, L. G.
División de Investigación Biología Marina. Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, AC. La Paz, México.

RESUMEN

Sobre la base de que la adaptación de las proteínas al ambiente físico juega un papel crítico en la determinación de los patrones de distribución geográfica de las especies, se comparó la sensibilidad térmica de la constante aparente de Michaelis (K_m) con respecto al sustrato para dos enzimas NAD- dependientes purificadas del músculo blanco de tres especies de sardinas habitantes de entornos térmicos diferentes. Dos de las especies son cogenéricas (*Opisthonema*) y ocurren desfasadas, espacial y temporalmente, en la porción sur del Golfo de California, de acuerdo con el régimen de variación térmica en el área. La tercera, *Sardinops sagax*, es de afinidad netamente templada y ocurre en las porciones media y alta del mismo Golfo. Las enzimas comparadas fueron malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37, NAD+: 1- lactato oxidorreductasa) y lactato deshidrogenasa (LDH,EC 1.1.1.27, NAD+: 1- lacto oxidorreductosa). Los resultados de estos estudios mostraron diferencias termocompensadoras, y de carácter adaptativo en las enzimas de la especie templada (*S. sagax*), templado-tropical (*O. libertate*) y tropical (O. *bulleri*). Estas adaptaciones se reflejan en una fuerte conservación de las características funcionales de las enzimas a las temperaturas medias de los hábitats de estas especies, los cuales difieren por 6°C, en promedio. Estos resultados señalan, una vez más, que las diferencias en la temperatura del hábitat (cuerpo) favorecen la evolución de adapataciones funcionales en las enzimas de las especies involucradas. Consecuentemente, esta reducción de la sensibilidad térmica en los K_m, con respecto al sustrato de enzimas deshidrogenasas NAD- dependientes, bien puede tener un carácter importante y de ubicuidad en la adaptación a entornos térmicos particulares y, por tanto, en la determinación de los patrones de distribución de las especies.
Palabras clave: Enzimas deshidrogenasas NAD- dependientes, constante aparente de Michaelis, adaptación térmica, peces marinos pelágicos, *Opisthonema*; *Sardinops*, Golfo de California- México.

ABSTRACT

On the basis of the critical role that protein adaptations may play in the determination of the geographical distribution patterns of species, the temperature sensitivities of the apparent Michaelis constant (K_m) of substrate were compared for two NAD- dependent enzymes purified from the white muscle of three sardine species inhabiting different thermal environments. Two of them are congeneric (*Opisthonema*) and occur differentially, in space and time, in the southernmost region of the Gulf of California, according to the thermal variation regime of the area. The third one, *Sardinops sagax*, has a true temperate distribution and occurs in the upper and middle regions of the Gulf. The enzymes malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37, NAD+: 1- malate oxidoreductase), and lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27, NAD+: 1- lactate oxidoreductase) were compared. The results of these studies showed thermal adaptive differences in the enzymes of the temperate (*S. sagax*), temperate-tropical (*O. libertate*), and tropical species (*O. bulleri*). These kinetic adaptations are reflected in a strong conservation of the functional characteristics of the enzymes at the mean temperature of their habitats, which differ by 6°C, on average. These results point out, once more, that differences in the habitat (body) temperature favour the evolution of functional adaptations in the enzymes of the involved species. Consequently, this reduction of the temperature- sensitivity of the K^m of substrate in NAD- dependent dehydrogenase enzymes may be an important and ubiquitous feature of adaptation to certain thermal environment and in the determination of the distribution patterns of species, though.
Keywords: NAD- dependent dehydrogenase enzymes, apparent Michaelis constant, temperature adaptation, pelagic marine fish, *Opisthonema*, *Sardinops*; Gulf of California- Mexico.

INTRODUCCION

Las adaptaciones a la temperatura del entorno físico que los organismos experimentan tiene un papel importante en la determinación de los patrones de distribución de las especies (revisado por López-Lemus, 1987a). La temperatura afecta seriamente a la estructura y función de las proteínas, además de ser una fuerza selectiva importante en la evolución de las mismas (Somero, 1978; Hochachka y Somero, 1973, 1984).

Las adaptaciones enzimáticas de peces costeros cogenéricos a entornos térmicos ligeramente diferentes ya ha sido bien estudiada para la isoenzima de tipo muscular (M_4 - LDH) lactato deshidrogenasa (López-Lemus, 1987b). Los homólogos de LDH de estas especies consideradas (género *Epinephelus*) difieren marcadamente en sus respuestas a diferencias térmicas moderadas. La constante aparente de Michaelis (K_m) con respecto al sustrato es particularmente susceptible a esta perturbación, debida a la temperatura; sin embargo, ¿serán otras enzimas sensibles a la temperatura de manera similar?

Aún no ha sido posible predecir *a priori* cuáles enzimas o qué pasos de una reacción enzimática son afectados por la temperatura. Somero (1975, 1978) desarrolló una interpretación razonable de los efectos de la temperatura en el acoplamiento del ligando y cofactor con el sustrato en términos de la modificación del sitio de acoplamiento, como consecuencia de alteraciones térmicas. Podría pensarse, por tanto, que aquellos sitios de acoplamiento similares y equivalentes, estructural y funcionalmente, sufren modificaciones similares y muestran susceptibilidades similares a la temperatura, aunque compartan poco de una estructura primaria común (López-Lemus, 1977a).

Los efectos de la temperatura en la constante aparente de Michaelis (K_m), con respecto al sustrato, se estudiaron para dos enzimas deshidrogenasas NAD- dependientes de dos especies cogenéricas de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*, Gunther, 1866; y *O. bulleri*, Regan, 1904), y de la sardina monterrey norteña (*Sardinops sagax caerulea*, Girard, 1854), habitantes de entornos térmicos diferentes y con patrones de distribución claramente definidos.

Estas enzimas fueron lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27, NAD+: 1- lactato oxidorreductasa) y malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37, NAD+: 1- malato oxidorreductasa). Mediante difracción de rayos X se han estudiado las formas homólogas de estas enzimas para otros organismos, y los resultados han mostrado que el dominio de acoplamiento del cofactor y estas enzimas posee una estructura super secundaria llamada "doblez Rossmann", la cual consiste en dos unidades de tres hojas beta traslapadas y unidas por hélices alfa (Rossmann y Argos, 1978).

Dado que la K_m con respecto al sustrato, en las formas homólogas de LDH de los peces cogenéricos costeros, es particularmente susceptible a la perturbación por diferencias moderadas en la temperatura (López-Lemus, 1987b), para este estudio se sometió una segunda enzima (MDH), con esta estructura super secundaria, a análisis cinético, en forma simultánea con aquella (LDH) que fue previamente estudiada en otras especies.

Las formas homólogas de estas enzimas se aislaron de individuos adultos de *O. libertate*, presumiblemente euritérmica (templada-tropical), y de *O. bulleri*, marcadamente tropical, las cuales experimentan temperaturas promedio en sus áreas de ocurrencia de 21°C y 25°C, respectivamente. Se estudió una tercera especie (*S. sagax*), de distribución templada neta, que experimenta temperaturas promedio de 17.5°C en su área de distribución dentro del Mar de Cortés. El desfasamiento en la ocurrencia, espacial y temporal, de las especies de *Opisthonema* en la porción más sureña del Golfo de California (área de captura) ha sido claramente documentado (G. Rodríguez, CICESE; com pers, 1986).

Los patrones adaptativos en la constante aparente de Michaelis (K_m) con respecto al sustrato, indican que las diferencias térmicas propias de las áreas de ocurrencia de estas especies, han favorecido la selección de diferencias termocompensadoras en las propiedades cinéticas de estas enzimas. Se discuten, finalmente, las implicaciones fisiológico-biogeográficas de estas adaptaciones moleculares de las especies de sardinas.

MATERIALES Y METODOS

Especímenes

Los especímenes adultos de las especies utilizadas para este estudio, se colectaron vivos a bordo de los buques sardineros de la flota comercial, en las áreas de pesca de los puertos de Mazatlán, Sin. y Guaymas, Son., (México). Los organismos se congelaron a bordo del barco y se transportaron en hieleras de campo al laboratorio donde se preservaron a —25°C hasta su procesamiento.

Sustancias y reactivos

Las sustancias y reactivos químicos utilizados para electroforesis y las resinas para cromatografía se obtuvieron de la compañía Sigma Chemical, Co- EUA, MERCK y Pharmacia Fine Chemicals, Co- Holanda y Suecia, respectivamente. La concentración de proteínas se determinó mediante el método tradicional de Lowry *et al.* (1952), utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

Purificación parcial de las enzimas

Se llevó a cabo una purificación parcial simultánea de ambas enzimas, mediante cromatografía de afinidad de acuerdo con los métodos de López-Lemus (1978b), modificados para este fin, los cuales se describen de manera general a continuación:

Porciones del músculo blanco congelado del pez se homogeneizaron manualmente en tres volúmenes de solución amortiguadora sobre un baño de hielo. El tejido homogeneizado se centrifugó a 10,000 g durante 15 min a 4°C para quitar restos y lípidos, y obtener un homogeneizado claro y limpio. El sobrenadante claro resultante se llevó a una columna cromatográfica de Fractgel-azul reactivo (MERCK) para aislar las enzimas NAD- depen-

dientes, que se acoplan bioespecíficamente por afinidad a la resina. Mediante la variación gradual de la fuerza iónica o pH (utilizando un gradiente de concentración de NaCl, o ácidos o álcali), o bien por desacoplamiento competitivo (utilizando un gradiente creciente de NAD+) en la solución amortiguadora de elusión, se eluyen diferencialmente las fracciones con actividad para MDH o LDH.

Las fracciones así identificadas se concentran para su almacenamiento mediante diálisis contra una solución saturada de sulfato de amonio a 4°C, o bien, por ultrafiltración utilizando una membrana Amicon/pm 30.

Las preparaciones así obtenidas contienen 2-3 mg/ml. de proteína.

Justamente antes de ser utilizadas en los ensayos enzimáticos, las preparaciones se dializaron exhaustivamente contra una solución amortiguadora análoga a la que se utiliza en tales ensayos. La homogeneidad de las preparaciones se probó utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio, según los procedimientos de Laemmli (1970). Las preparaciones de las enzimas homólogas de las distintas especies comigraron con preparaciones comerciales de la misma enzima, y mostraron una banda única en geles de almidón al 12%, teñidos para probar la actividad de las enzimas, las cuales mostraron diferencias alélicas electroforéticamente detectables (Hedgecock *et al.*, 1987).

Ensayos enzimáticos

La actividad enzimática se registró utilizando un espectrofotómetro Spectronic 2000 (Bausch & Lomb-USA), equipado con graficador bidimensional y termoceldas acopladas a un baño de agua circulante con termostato ajustable automático y termómetro digital. La constante de Michaelis (K_m) con respecto al sustrato se obtuvo cinéticamente determinando la relación entre la velocidad inicial de reacción y la concentración del sustrato, de acuerdo con los procedimientos de López-Lemus (1987b).

De tal reacción se obtiene una aproximación de la afinidad de la enzima por su sustrato a diferentes temperaturas. La solución para el ensayo enzimático en LDH (2 ml) tuvo 2mM de NADH y concentraciones de sustrato (piruvato) dentro del intervalo de 0.6 mM y 1.2 mM. Para MDH, las concentraciones de oxaloacetato (sustrato) utilizadas estuvieron dentro del intervalo de 3 mM y 6 mM y 3.75 mM de NADH. En ambos ensayos se utilizó una solución amortiguadora con 80 mM de imidazol, pH 7.0 a 20°C para asegurar que el pH en cada temperatura de medición fuera fisiológicamente apropiado; el pH de las soluciones de imidazol cambia —0.017 unidades de pH, aproximadamente, por cada grado centígrado aumentado de temperatura, relación paralela al decremento de pH al aumentar la temperatura en los fluidos de la mayoría de los ectotermos (Reeves, 1977; Yancey y Somero, 1978; Somero, 1981). Las soluciones *stock* de sustratos y NADH se utilizaron siempre frescas.

Los valores de K_m (aparente) se determinaron gráficamente a cinco temperaturas: 10, 15, 20, 25 y 30°C. La temperatura en la cubeta de reacción fue mantenida con el equipo mencionado variando ±0.4°C. Las mediciones se hicieron por triplicado para cada una de las cuatro concentraciones de sustrato ensayadas, utilizando la misma preparación de la enzima o preparaciones múltiples del mismo individuo resultando una reproducibilidad experimental del 80%.

Los valores teóricos de K_m se determinaron utilizando métodos de regresión no- lineal de gráficos Lineweaver- Burk (Page, 1987), de acuerdo con los métodos de Wilkinson (1961).

RESULTADOS

Para determinar si ocurrió evolución molecular funcional significativa en respuesta a los diferentes entornos térmicos de estas especies, se investigó la respuesta funcional de un par de genes con distintos alelos en ellos (LDH y MDH). Algunos otros sistemas enzimáticos mostraron diferencias entre estas sardinas (Hedgecock *et al.*, 1987). Se restringieron los análisis a estas dos enzimas por su gran actividad en el músculo blanco del pez, su estabilidad en el tejido congelado y porque existe una gran cantidad de información de apoyo en la literatura (Hochachka y Somero, 1984), lo cual no es el caso de cualquier otro sistema enzimático que mostrase diferencias alélicas fijadas entre las especies de *Opisthonema* y *Sardinops*.

Aunque se detectaron tres formas electroforéticamente distintas para este par de enzimas, cada una para cada especie, *Opisthonema* comparte dos de ellas en MDH, pero no en LDH; y la tercera es exclusiva de *Sardinops*. Cada especie fue polimórfica para estos alelos, a excepción de *O. libertate* que fue monomórfica para LDH (Hedgecock *et al.*, 1987).

Las enzimas, electroforéticamente idénticas a MDH y a las de LDH de *Opisthonema* mostraron

Tabla 1: Valores de K_m con respecto al sustrato de dos enzimas deshidrogenasas NAD-dependientes en tres especies de sardinas (CLUPEIDAE), medidos a 20°C y a las temperaturas medias (TM) del hábitat de cada especie. Los valores de K_m a las TM's son interpolaciones de gráficos de Arrhenius y gráficos de K_m *vs* temperatura (Figuras 1 y 2).

	LDH		
	O. libertate	*O. bulleri*	*S. sagax*
K_m @ 20°C	0.03120 M	0.01330 M	0.01880 M
TM	21°C	25°C	17.5°C
K_m @ TM	0.02970 M	0.02970 M	0.3000 M
	MDH		
	O. libertate	*O. bulleri*	*S. sagax*
K_m @ 20°C	0.01810 M	0.03420 M	0.01154 M
TM	21°C	25°C	17.5°C
K_m @ TM	0.01630 M	0.1400 M	0.0336 M

diferentes valores de K_m con respecto al sustrato a 20°C, al igual que las *Sardinops* (Tabla 1). Tales diferencias se hacen más notorias al revisar las figuras 1 y 2.

DISCUSION

En la misma proporción con la que las metodologías para cuantificar la variación en los sistemas de proteínas, se han hecho más poderosas, ha sido posible demostrar gran variabilidad en la composición y secuencia de sus aminoácidos. Sin embargo, no está bien claro actualmente cuánto de esta variación tiene cierta significancia biológica o, mejor dicho, si es que es adaptativa en algún sentido. Además, permanece aún oscuro qué cantidad o grado de variación ambiental (digamos temperatura) se requiere para promover diferentes formas de proteínas, adaptativamente modificadas.

Esta última pregunta, a la que me refiero en términos de "umbrales medio-ambientales" vale la pena que sea analizada por ciertas razones. Primero, identificando los cambios mínimos en un factor del entorno capaz de perturbar la estructura y función proteica (tal como la temperatura), los cuales son además necesarios en la selección de nuevas variantes de proteínas, estaremos en la posición de poder predecir cuándo debe ocurrir un cambio evolutivo si es que la especie ha de sobrevivir y deambular en un régimen medio-ambiental alterado. Segundo, implícito en el argumento anterior, los patrones biogeográficos pueden explicarse sobre esta base bioquímica, por lo menos en parte, si podemos identificar cómo se relaciona la adaptación de las proteínas, a escala fina, con los patrones de distribución de las especies a lo largo de gradientes medio-ambientales, digamos térmicos.

Conservación de los valores de la constante aparente de Michaelis

El efecto principal de la variación térmica sobre las formas homólogas de este par de enzimas de especies habitantes de diferentes entornos térmicos, es la perturbación del K_m con respecto al sustrato (Figs. 1-2). La importancia de este *stress* se enfatiza por la observación de que las enzimas de la especie de entorno tropical, *O. bulleri*, no están preadaptadas a funcionar a bajas temperaturas (MDH) o a temperaturas ligeramente mayores del límite promedio superior, que experimenta en su área de ocurrencia (LDH). El efecto inverso es muy notorio para la especie templada *S. sagax* para ambos sistemas enzimáticos. La especie templado-tropical, o subtropical, *O. libertate*, muestra una sensibilidad térmica reducida, comparativamente, en la afinidad de sus enzimas por sus sustratos (K_m).

Las notables variaciones de K_m debidas a la diferencia térmica reflejan un efecto apreciable sobre la función enzimática. Se piensa que, *in vivo*, estas deshidrogenasas se saturan de cofactor y sustrato (Atkinson, 1977). Las estimaciones de las concentraciones intracelulares de estos componentes (Tischler *et al.*, 1977), junto con sus valores de K_m indican que esto es así (Greaney y Somero, 1980). Las variaciones térmicas que experimenta la especie subtropical, *O. libertate*, perturban notablemente a las deshidrogenasas de las especies: tropical, *O. bullery*, y templada *S. sagax*, examinadas (Figs. 1-2). El marcado efecto que las variaciones térmicas ejercen sobre el sitio de acoplamiento enzima/cofactor-sustrato es por ello un factor importante para las especies habitantes de entornos térmicos templados o tropicales.

Sin embargo, es pronunciada la conservación de los valores de la constante aparente de Michaelis (K_m) del sustrato para LDH a las temperaturas fisiológicas de cada especie (Tabla 1 y Fig. 1). A pesar de que este parámetro fue dependiente de la temperatura en todos los casos, los valores de K_m observados a las temperaturas medias de los hábitats de las tres especies fueron extremadamente similares para LDH, y un poco dispares para

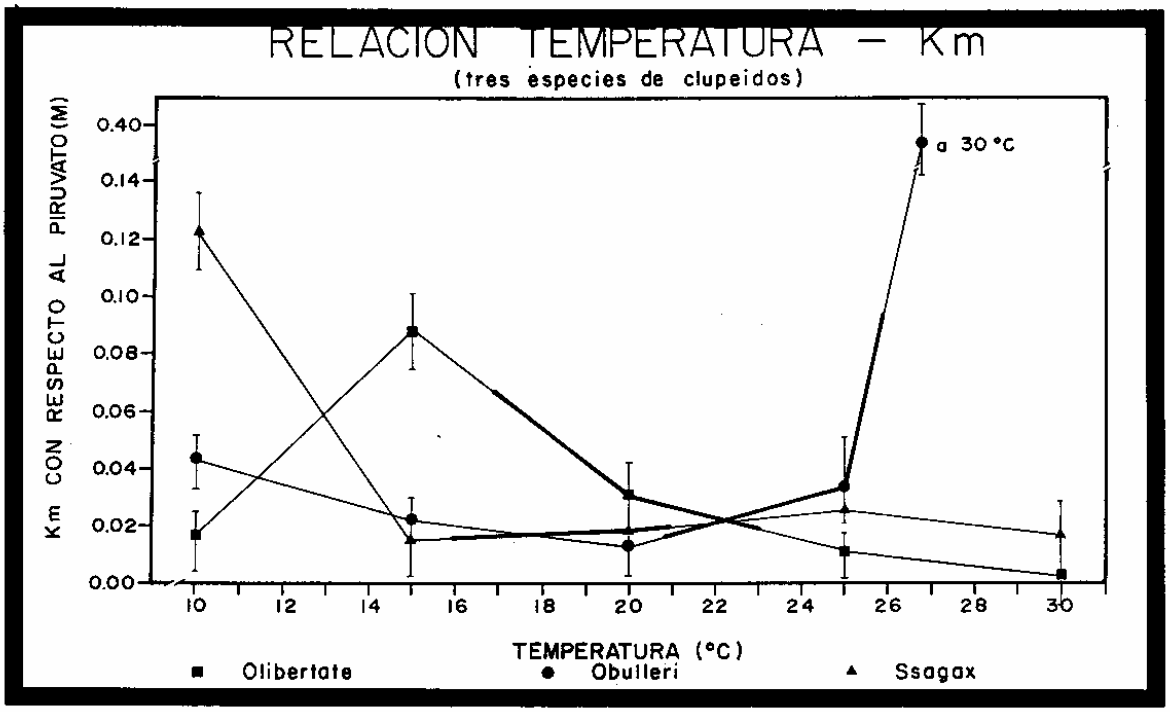

Figura 1. Efecto de la temperatura en la constante aparente de Michaelis (K_m) con respecto al piruvato para la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de tres especies de sardina del Golfo de California. Las barras verticales representan desviaciones estándar. Cada punto representa un promedio de los valores de K_m determinados con, al menos, tres preparaciones de la enzima de diferentes individuos de cada especie. Los procedimientos de ensayo se detallan en la sección **Materiales y Métodos**. Las porciones gruesas de las líneas que conectan los valores de K_m indican los intervalos de temperatura en el hábitat de las especies.

MDH, pero aún reflejan la conservación mencionada, que constituye un efecto a escala fina entre tres especies de clupeidos, dos de ellas cogenéricas, que habitan entornos térmicos diferentes, los cuales han sido de suficiente importancia selectiva para favorecer cambios evolutivos en los valores de K_m.

Este alto grado de conservación en K_m en las diferentes especies, a su temperatura corporal particular, ha sido interpretado como una adaptación que asegura que las enzimas retengan cierta capacidad para aumentar su tasa de catálisis cuando la concentración de sustrato aumenta durante activaciones metabólicas; por ejemplo, durante ejercicio vigoroso. Así, estabilizando los valores de K_m dentro de un intervalo cercano o, de alguna forma, mayor que las concentraciones fisiológicas del sustrato, la enzima será capaz de obtener una fracción significante de su velocidad potencial (v_{max}) bajo condiciones fisiológicas constantes e incrementar su actividad al aumentar los niveles de sustrato (Fersht, 1977; Hochachka y Somero, 1984).

En ausencia de adaptaciones compensadoras en las enzimas de estas especies, *O. bulleri*, la especie más tropical tendría, a su temperatura fisiológica, valores de K_m con respecto al sustrato mucho más altos que aquéllos de *S. sagax*, lo cual no es el caso en LDH y mucho menos para MDH; la sensibilidad a esta perturbación ambiental comparable para esta clase de enzimas (recuérdese que poseen una estructura super secundaria llamada "doblez Rossmann") sugiere que ambas proteínas pudieron adquirir una modificación adaptativa similar permitiéndoles así funcionar de manera óptima en su entorno térmico particular.

Posibles bases de la perturbación térmica

Las interacciones ligando-enzima (sustrato/cofactor-enzima) son severamente alteradas por incrementos o decrementos en la temperatura (Hochachka y Somero, 1973, 1984). Sin embargo, estas interacciones dependen de varias circunstancias, digamos las tasas de formación y rotura de enlaces covalentes durante la catálisis enzimática (que para la mayoría de las enzimas aumenta al doble ante un incremento de 10°C de temperatura bajo condiciones de saturación de sustrato) y el papel crítico de los enlaces químicos "débiles", o inte-

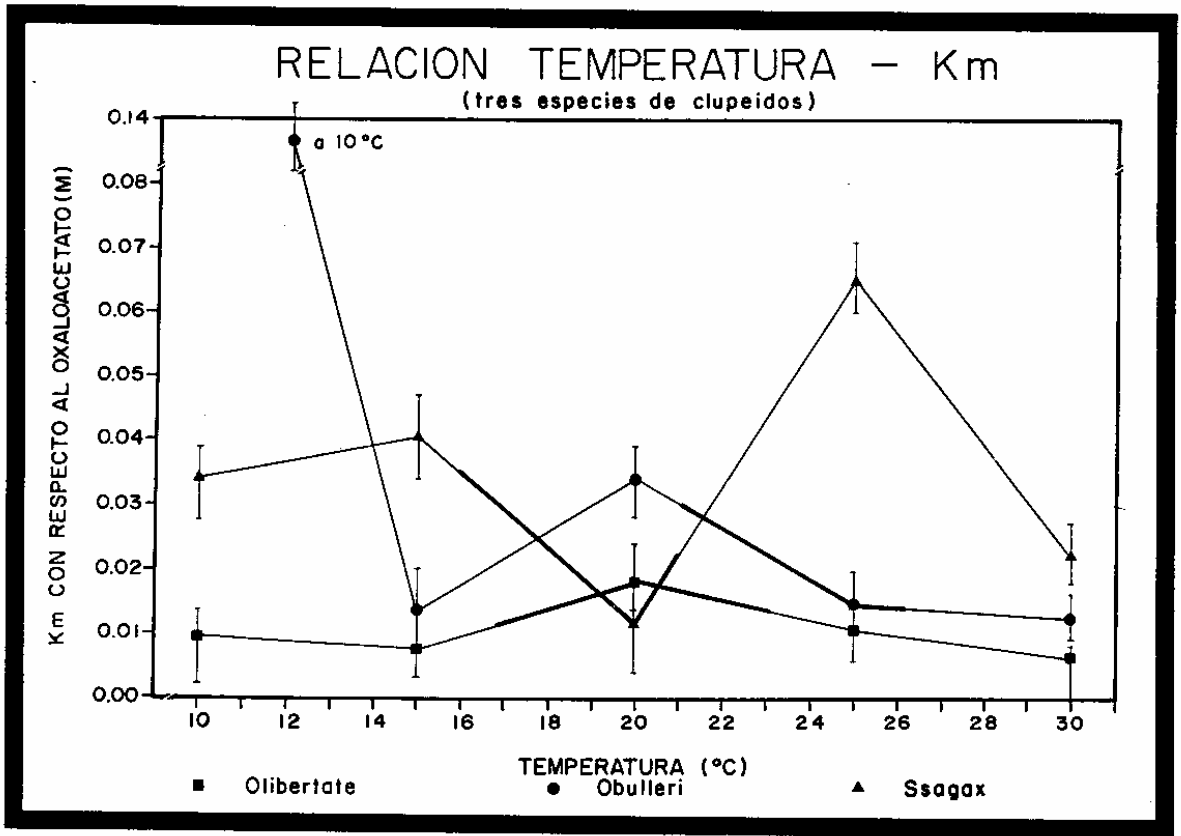

Figura 2. Efecto de la temperatura en la constante aparente de Michaelis (K_m) con respecto al oxaloacetato para la enzima malato deshidrogenasa (MDH) de tres especies de sardina del Golfo de California. Las barras verticales representan desviaciones estándar. Cada punto representa un promedio de los valores de K_m determinados con, al menos, tres preparaciones de la enzima de diferentes individuos de cada especie. Los procedimientos de ensayo se detallan en la sección **Materiales y Métodos**. Las proporciones gruesas de las líneas que conectan los valores de K_m indican los intervalos de temperatura en el hábitat de las especies.

racciones secundarias en la estabilidad de órdenes superiores de organización de la estructura enzimática y de los complejos enzima-ligando (Somero, 1975; Low y Somero, 1974).

El grado de perturbación térmica depende, para cada especie aquí estudiada, del intervalo de temperatura examinado (Figs. 1-2). Los efectos más acentuados son a temperaturas menores de 15°C y mayores de 25°C, por lo que las perturbaciones en la constante aparente de Michaelis (K_m) no pueden ser atribuidas a uno solo de los factores mencionados en el párrafo anterior. La respuesta a la temperatura en MDH de *O. libertate* es relativamente constante y refleja cierta insensibilidad térmica de sus enlaces químicos "débiles" en el complejo enzima-ligando (Fig. 2). Lo mismo puede decirse para LDH de *O. bulleri* a temperaturas menores de 25°C (Fig. 1).

En contraste, los valores de K_m de MDH y LDH de la especie tropical *O. bulleri* son severamente afectados por temperaturas menores o mayores de los límites, inferior y superior, respectivamente, del intervalo de temperatura del hábitat de la especie. Exactamente el mismo efecto se observa para ambas enzimas en la especie templada, *S. sagax*. *O. libertate*, la especie sub-tropical, parece experimentar cierta sensibilidad a temperaturas bajas en la enzima LDH (Figs. 1-2). Cuando la temperatura experimental de ensayo es extendida más allá del intervalo de temperatura del hábitat del organismo, son comunes los cambios de K_m en varios órdenes de magnitud.

Considero que estos cambios repentinos en la capacidad de acoplamiento enzima-sustrato, son un medio por el cual se establecen los límites de tolerancia térmica de los organismos. La pérdida en la eficiencia reguladora (respuestas fisiológicamente apropiadas de la enzima a cambios de su entorno físico- químico) afecta de manera severa el metabolismo aunque no disminuya la capacidad de la enzima para conducir su reacción a una tasa alta.

Como ya he mencionado en la sección anterior, el "sacrificio" de cierto poder catalítico, a través de la

conservación del K_m, es un compromiso que bien vale la pena. Los mecanismos para ajustar estos valores ante las variaciones térmicas pueden agruparse en dos categorías generales: (i) modificaciones en los sitios de acoplamiento del ligando y (ii) cambios en la entalpía acoplados a la compensación. Estos mecanismos ya han sido ampliamente discutidos por Somero (1975).

La respuesta a la temperatura de este par de enzimas, con una estructura super secundaria tipo "doblez Rossmann" en el sitio de acoplamiento, debe ser la modificación misma de este sitio. Es de esperarse que, dado que los cambios mínimos en la temperatura influyen notablemente al acoplamiento de las enzimas con sus sustratos (valores de K_m en LDH y MDH), las enzimas con tal estructura super secundaria respondan de tal manera análoga.

Todo esto juega, definitivamente, un papel importante en la determinación de los patrones biogeográficos de las especies involucradas. Pues la adaptación de los sistemas metabólicos es un factor crítico en la colonización de un hábitat térmico único.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue elaborado gracias a un convenio de apoyo financiero CIB-Conacyt*, y una beca académica Conacyt (PCECCNA- 040466 y 44182, respectivamente). Agradezco con gusto el constante apoyo del Dr. José Luis Ochoa (CIB-DIBE) al permitirme llevar a cabo los estudios descritos en sus laboratorios con su equipo, material y reactivos; y a Ana Luz Alvarez por su ayuda en la preparación del manuscrito. Esta es una porción de un trabajo de tesis sometida a la división de graduados del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR- IPN) como requisito parcial para la obtención del grado de maestría en ciencias, con especialidad en ictiología.

* Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología- MEXICO.

LITERATURA CITADA

ATKINSON, DE, 1977. *Cellular Energy Metabolism and its Regulation*. Academic Press, NY, 534 p.

FERSHT, A., 1977. *Enzyme Structure and Mechanism*. WH Freeman, San Francisco, 571 p.

GRANEY, GS y GN SOMERO. 1980. Distributions of binding and catalytic rate constants to evolutionary modifications in Km. of NADH for muscletype (M4) lactate dehidrogenases. *J. Comp Physiol* 137: 115-121.

HEDGECOCK, D., K. NELSON y LG. LOPEZ LEMUS. 1988. Biochemical genetic and morphological divergence among three sympatric species of thread herring (*Opisthonema*) from Northwest Mexico. *Calif. Coop. Ocean Fish Invest. Reports*. 29: 110-121.

HOCHACHKA, PW y GN SOMERO, 1973. *Strategies of Biochemical Adaptation*. Saunders, PA. 358 p.

HOCHACHKA, PW y GN SOMERO. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton Univ. Press, Princeton, 537 p.

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

LOPEZ-LEMUS, LG, 1987a. Aspectos adaptativos e implicaciones biogeográficas de la evolución molecular. *Ciencia Mex.* 38 (en prensa).

LOPEZ-LEMUS, LG, 1987b. Temperature-adaptive differences in the kinetic properties of muscle-type lactate dehydrogenases of congeneric rocky-shore fishes from the Sea of Cortez. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 11:. 255-205.

LOW, PS y GN SOMERO. 1974. Temperature-adaptation of enzymes: a proposed molecular basis for the different catalytic efficiencies of enzymes from ecto-therms and endotherms. *Comp. Biochem. Physiol.* 49B: 307-312.

LOWRY, OH, NJ ROSENBROUGH, AL FARR y RJ RANDALL, 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193: 265-275.

PAGE, A., 1987. A non-linear regression program in BASIC for estimating Km and Vmax. *CABIOS* 3: 49-51.

REEVES, RB. 1977. The interaction of body temperature and acid-base balance in ectothermic vertebrates. *Ann Rey Physiol.* 39: 559-586.

ROSSMANN, MG y P ARGOS. 1978. The taxonomy of binding sites of proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 21: 61-182.

SOMERO, GN. 1975. Temperature as a selective factor in protein evolution: the adaptational strategy of compromise. *J. Exp. Zool.* 194: 175-186.

SOMERO, GN. 1978. Temperature adaptation of enzymes; biological optimization through structure function compromises. *Ann Rev. Ecol. Syst.* 9: 1-29.

SOMERO, GN. 1981. pH- temperature interactions on proteins: principles of optimal pH and buffer system design. *Mar. Biol. Lett.* 12: 163-178.

TISCHLER, ME, D FRIEDRICHS, K COLL y JR. WILLIAMSON, 1977. Pyridine nucleotide distributions and enzyme mass action ratios in hepatocytes form fed and starved rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 184: 222-236.

WILKINSON, GN. 1961. Statiscal estimations in enzyme kinetics. *Biochem* J. 80, pp. 324-332.

YANCEY, PH y GN SOMERO. 1978. Temperature dependence of intracellular pH: its role in the conservation of pyruvate apparent Km. values of vertebrate lactate dehydrogenases. *J. Comp. Physiol* 125: 129-134.