

DEPARTAMENTOS INTERFACULTATIVOS DE BIOQUIMICA
Y FISIOLOGIA ANIMAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA

INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES SANGUINEOS
Y HEPATICOS DE DIFERENTES METABOLITOS EN LA TRUCHA

P. MORATA, M. GARCÍA, G. CARDENETE, S. ZAMORA
y F. SÁNCHEZ-MEDINA

RESUMEN

Se han determinado los niveles sanguíneos de glucosa, lactato, colesterol, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos así como los de glucógeno hepático en truchas a intervalos de dos horas durante un ciclo de 24 y tras suministrarles una dieta comercial de piscifactoría.

Ninguno de los parámetros estudiados ha mostrado una respuesta clara a la comida, en contraste con lo que ocurre para alguno de ellos en mamíferos, lo cual pone de manifiesto una vez más las peculiaridades digestivas y metabólicas de la trucha.

SUMMARY

The evolution of the blood levels of glucose, lactate, cholesterol, free fatty acids, ketonic bodies and liver glycogen content were determined in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at fixed intervals (2 hrs.) during a 24 hrs. period after a meal consisting in a commercial diet.

None of the parameters studied show a definite response to food in contrast to that observed for some of these parameters in mammals.

This fact provides a further evidence about the metabolic and digestive peculiarities of the trout.

INTRODUCCION

Existen abundantes indicios de que los peces en general y los carnívoros en particular, presentan una serie de peculiaridades digestivas y metabólicas con respecto a animales superiores.

En el caso concreto de los salmónidos, a la lentitud de los procesos digestivos (20) y mala utilización de los hidratos de carbono de la dieta (12) (17) se unen algunas características propias en las vías metabólicas de los principios inmediatos. El caso más patente es el referente a la regulación del metabolismo glucídico, aspecto en el que estos animales parecen ser deficitarios, quizá debido a un proceso adaptativo impuesto por una dieta natural rica en proteínas y con escaso nivel de hidratos de carbono (15).

En orden a investigar estos comportamientos anómalos, y en el caso concreto de la trucha arcoiris, se han estudiado las respuestas de diversos metabolitos sanguíneos a la administración oral, mediante sonda, de soluciones de glucosa (15), o, buscando aproximarse más a las condiciones normales de crianza de las truchas, con dietas experimentales granuladas de composición variable (2). En todos estos casos se trata de respuestas a, en cierto modo, alimentaciones "forzadas", distintas en todo caso a las consumidas por esta especie en su hábitat natural o durante su explotación comercial en piscifactoría.

Resulta interesante, a nuestro entender, determinar cuál es esta respuesta frente a una dieta estándar que es consumida habitualmente durante períodos prolongados de tiempo y que no supone ningún "choque" especial para estos animales. Con este fin hemos diseñado esta experiencia en la que se han controlado durante un período dilatado de tiempo (impuesto por la lentitud de las respuestas antes citadas) los niveles sanguíneos de diversos metabolitos tras una comida.

MATERIAL Y METODOS

Animales y mantenimiento

En la realización del presente estudio se han utilizado 136 truchas arcoiris (*Salmo gairdneri*) de trece meses de edad y

110 g de peso medio. En el laboratorio se mantuvieron en cuatro cubas de plástico de $120 \times 60 \times 50$ cm, provistas de agua decolorada y suficientemente aireada, termorregulada a $14 \pm 1^\circ \text{C}$.

Los animales fueron adaptados durante 30 días a las condiciones de laboratorio, siendo alimentados una vez al día "ad libitum", con una dieta comercial de piscifactoría cuya composición fue:

Proteínas	41 % \pm 2 %
Grasas	5 % \pm 1 %
Minerales	10 % \pm 1 %
Humedad	10 % \pm 1 %
Carbohidratos	34 % \pm 2 %

Las materias primas usadas en su elaboración fueron: Harina de carne, harina de sangre, harina de pescado, solubles de destilería, harinas bajas de trigo y harina de maíz.

Diseño experimental

Tras un ayuno de 72 horas, que consideramos necesario para establecer los valores basales de los metabolitos a determinar y tras la extracción de las muestras correspondientes a estas determinaciones (dos muestras de ocho animales cada una) se les suministró a los demás animales la dieta comercial antes aludida que fue ingerida "ad libitum", resultando un nivel de ingesta de aproximadamente el 1 por 100 del peso corporal.

A continuación se cambió el agua de las cubas siguiendo así el procedimiento establecido durante el período de adaptación. A partir de ese momento y cada dos horas durante un ciclo completo de 24 se tomaron muestras de sangre y tejido hepático para la determinación de los siguientes metabolitos: glucosa, lactato, colesterol, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos en sangre y glucógeno en hígado (10 animales en total).

En cada muestreo se capturaron los animales al azar con una red, procurando alternar las cubas de origen con objeto de evitar el estrés acumulativo. Tras un golpe en la cabeza se tomó la muestra de sangre de la vena caudal (aproximadamente 1 ml) con el auxilio de una jeringa heparinizada; se sacrificó el animal y se hizo una extracción rápida del hígado para la toma de muestras.

En ningún caso transcurrieron más de 50 segundos entre la extracción del animal de la cuba y el final de la toma de muestras.

Métodos analíticos

Una fracción de la sangre extraída (0,5 ml) fue desproteinizada con ClO_4H al 2 por 100 y posteriormente centrifugada a 5.000 xg. El sobrenadante obtenido se neutralizó con KOH al 20 por 100; el precipitado de ClO_4K fue eliminado mediante centrifugación a 5.000 xg y en el sobrenadante se determinó glucosa por el método de la Glucosa-oxidasa (10), (11). El lactato fue determinado por el método de GUTMAN y WAHLEFELD (8); el acetoacetato por el método de MELLAMBY y WILLIAMSON (13); β -hidroxibutirato por el método de WILLIAMSON y MELLAMBY (19).

Del resto de la muestra de sangre se separó el suero y en él se determinaron ácidos grasos libres por el método de DUNCOMBE (7) y colesterol por el test de Boheringer-Manheim.

El glucógeno hepático fue determinado como glucosa tras hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa según el método descrito por KEPPLER y DECKER (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles basales de glucosa en sangre resultan algo más bajos que los reportados por la mayoría de los autores, diferencia que no podemos atribuir a la duración del ayuno previo (72 h.) ya que está ampliamente establecido que la glucemia en peces es bastante estable incluso para ayunos considerablemente más largos (14). El hecho de que la bibliografía muestre una gran variabilidad para la glucemia de estos animales dependiendo de la subespecie, fase del ciclo biológico, condiciones de mantenimiento, etcétera, nos hace pensar en alguno de estos factores como causa posible de esta diferencia.

Por lo que concierne a la respuesta a la comida, quizá lo más notable, sea precisamente su ausencia, hecho que está en abierto contraste con la elevación postprandial de este metabolito, propia de animales superiores, siempre que ingieran una dieta con un determinado nivel de glúcidos.

Cuando a la trucha se le suministra una solución de glucosa por una sonda gástrica (15) o una dieta con un alto contenido de glucosa (2) se produce una hiperglucemia rápida y con un dilatado período de recuperación; sin embargo, cuando la glucosa va

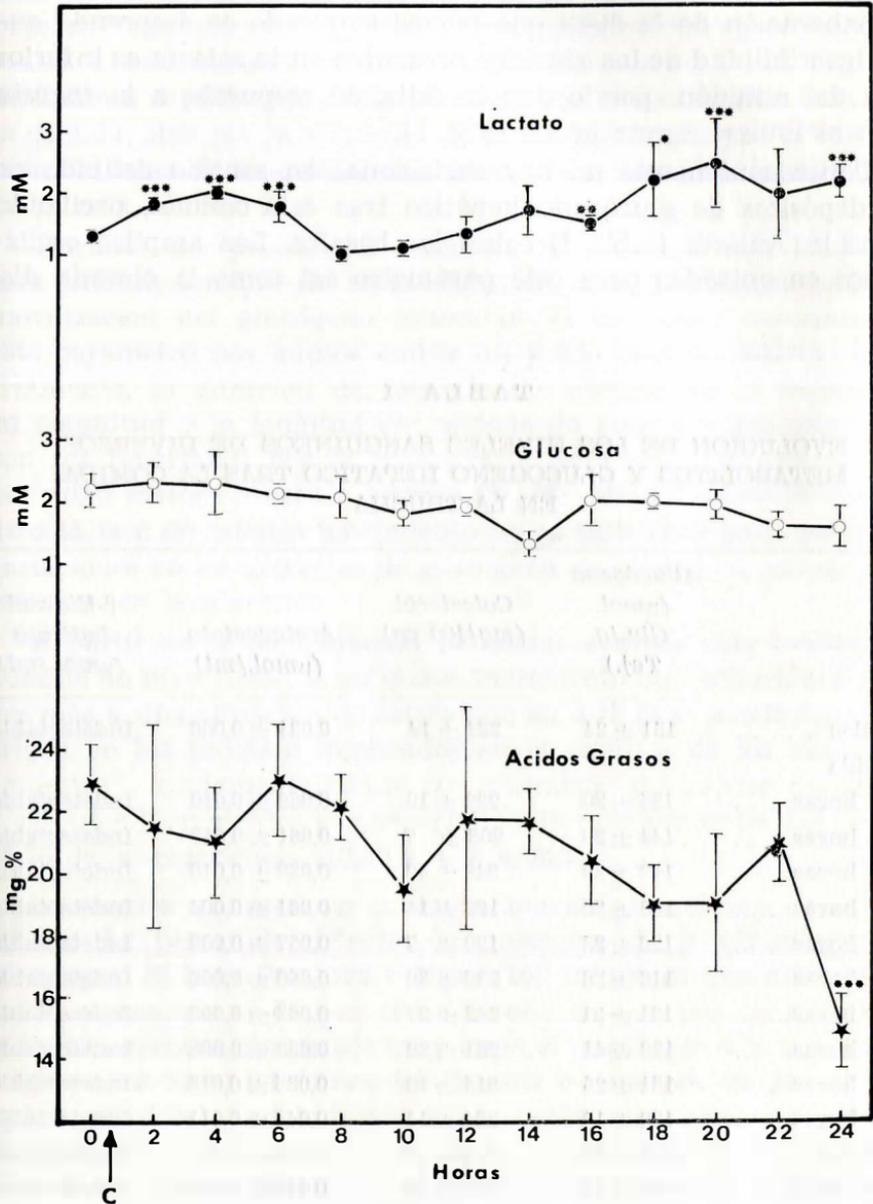


FIGURA 1

en la dieta en forma de almidón, la respuesta se atenúa considerablemente (2), lo cual es un índice más de la reducida digestibilidad que los hidratos de carbono tienen para los salmónidos en general.

De la observación de las fuentes hidrocarbonadas utilizadas en la elaboración de la dieta que hemos empleado se desprende que la digestibilidad de los glúcidos presentes en la misma es inferior a la del almidón, por lo que la falta de respuesta a la ingesta debe atribuirse a este hecho (Fig. 1).

Consecuentemente no hay variaciones en sentido definido en los depósitos de glucógeno hepático tras esta comida, oscilando todos los valores (tabla I) sobre los basales. Las amplias oscilaciones encontradas para este parámetro así como la elevada dis-

TABLA I

EVOLUCION DE LOS NIVELES SANGUINEOS DE DIVERSOS METABOLITOS Y GLUCOGENO HEPATICO TRAS LA COMIDA EN LA TRUCHA

	<i>Glucógeno</i> ($\mu\text{mol.}$ <i>Glu./g</i> <i>Tej.</i>)	<i>Colesterol</i> ($\text{mg}/100 \text{ cc}$)	<i>Acetoacetato</i> ($\mu\text{mol./ml}$)	β - <i>Hidroxi-</i> <i>butirato</i> ($\mu\text{mol./ml}$)
Basales... ..	151 \pm 24	234 \pm 14	0,031 \pm 0,006	Indetectable
Comida				
2 horas... ..	125 \pm 20	229 \pm 19	0,068 \pm 0,010	Indetectable
4 horas... ..	144 \pm 20	203 \pm 7	0,061 \pm 0,013	Indetectable
6 horas... ..	142 \pm 38	245 \pm 42	0,039 \pm 0,010	Indetectable
8 horas... ..	138 \pm 20	196 \pm 14	0,081 \pm 0,004	Indetectable
10 horas... ..	128 \pm 23	199 \pm 7	0,057 \pm 0,009	Indetectable
12 horas... ..	116 \pm 6	239 \pm 30	0,050 \pm 0,008	Indetectable
14 horas... ..	121 \pm 31	263 \pm 27	0,063 \pm 0,003	Indetectable
16 horas... ..	128 \pm 41	281 \pm 38	0,052 \pm 0,006	Indetectable
18 horas... ..	151 \pm 25	215 \pm 19	0,035 \pm 0,015	Indetectable
20 horas... ..	139 \pm 19	254 \pm 11	0,048 \pm 0,011	Indetectable
22 horas... ..	131 \pm 18	246 \pm 23	0,051 \pm 0,008	Indetectable
24 horas... ..	136 \pm 37	264 \pm 32	0,045 \pm 0,005	Indetectable

persión en cada punto son achacables a la variabilidad individual condicionada por el estado nutritivo previo a la experiencia, de cada animal.

La figura 1 nos muestra que la lactacidemia alcanza un máximo a las cuatro horas tras la comida, duplicando los valores basales. Tras una revisión atenta de los datos bibliográficos referentes a este metabolito en la sangre de peces (3), (4), (6), nos inclinamos a pensar que esta respuesta no viene condicionada por la comida, sino por la situación de estrés provocada por la renovación del agua de las cubas, operación que es inmediatamente posterior a la comida.

Durante este proceso los animales realizan una actividad motora intensa aunque de corta duración, que podría provocar la movilización del glucógeno muscular (el no haber determinado este parámetro nos impide emitir un juicio más definitivo); efectivamente, la duración del período de latencia de la respuesta, su magnitud y la longitud del período de recuperación coinciden con los reportados por la bibliografía para otras situaciones de actividad motora brusca e intensa (3), (4), (6). La escasa duración de esta fase de intenso movimiento no es suficiente para provocar variaciones en los depósitos de glucógeno en hígado ni, consecuentemente, en la glucemia.

A partir de la recuperación (8 horas) aparece una tendencia, aunque no muy firme, a un nuevo incremento que achacamos una vez más a una situación de estrés que en este caso puede tener su origen "muestra", fundamentalmente por alteración del reposo nocturno y así estos incrementos son especialmente notables entre las horas 16-20 de la experiencia (12,00 a 4,00 a. m.).

La técnica utilizada en la determinación de cuerpos cetónicos no nos ha permitido detectar la presencia de β -hidroxibutirato en sangre. Si bien PHILLIPS y HIRD (16) informan que este metabolito representa el 66 por 100 del total de cuerpos cetónicos en la trucha arcoiris, no parece muy claro el papel que esta sustancia juega en los peces teleósteos, así ZAMMIT y NEWSHOLME (21) no detectan actividad de β -hidroxibutirato deshidrogenasa ni en el corazón ni en el músculo de tres especies de teleósteos ni tampoco niveles apreciables de β -hidroxibutirato en la perca, observando asimismo una constancia en los niveles de acetoacetato incluso en

ayunos de 150 días. Dado que, por una parte los elasmobranquios carecen de la capacidad de utilización tisular de ácidos grasos no esterificados y, por tanto, tienen como combustible graso casi únicamente a los cuerpos cetónicos; y por otra, que los vertebrados superiores utilizan ambos sistemas, los autores arriba mencionados concluyen que los teleósteos ocupan una posición intermedia, ya que, aun disponiendo del equipo enzimático necesario para su síntesis y utilización, no recurren a los cuerpos cetónicos como fuente de energía. Coincidiendo con esto, los valores de acetoacetato en plasma encontrados por nosotros (tabla I) son variables, sin mostrar una tendencia definida ni a causa del ayuno previo ni en respuesta a la comida.

La razón antes apuntada de la escasa significación que 72 horas de ayuno tienen en el metabolismo de animales que normalmente pasan, en el transcurso de su ciclo ayuno considerablemente más largos, puede aplicarse a la hora de considerar los niveles basales de ácidos grasos libres, que no se muestran particularmente elevados en los animales considerados control.

Tras la comida los niveles de ácidos grasos libres se mantienen bastante estables de tal forma que sólo en las últimas horas de la experiencia decaen significativamente. Este descenso podría ser debido a influencias hormonales, concretamente de la insulina cuya producción en estos animales es estimulada por la hiperaminoacidemia que sigue a la ingesta de una dieta con alto nivel proteico (1), (5), (18), como la suministrada en este ensayo. De todos modos una vez más se pone de manifiesto el dilatado período de latencia en la respuesta propio de una digestión extremadamente lenta.

El bajo nivel lipídico habitualmente pres estos animales minimiza los efectos de este parámetro sobre los niveles de colesterol circulantes.

Los datos hasta aquí comentados parecen tesis adelantada sobre la escasa repercusión inmediata que la ingesta de una dieta de composición estándar ejerce sobre el metabolismo de este animal, lo cual pone de manifiesto, al menos parcialmente y una vez más, las peculiaridades metabólicas de la trucha con respecto a vertebrados superiores.

AGRADECIMIENTO

A Industria Piscícola Navarra por la cesión de los animales de experimentación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—AHMAD, M. M.; MATTY, A. J. (1975): *Pak. J. Zool.*, 7 (1), 1-6.
- 2.—BERGOT, F. (1979): *Comp. Biochem. Physiol.*, 64 (A) 4, 543-547.
- 3.—BLACK, E. C.; MANNING, G. T.; HAYASHI, K. (1966): *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 23, 783-795.
- 4.—BLACK, E. C.; ROBERTSON, A. C.; HANSLIP, A. R.; CHIU, W. G. (1960): *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 17 (4), 487-500.
- 5.—COWEY, C. B.; DE LA HIGUERA, M.; ADRON, J. W. (1977): *Br. J. Nutr.*, 38, 385-395.
- 6.—DRIEDZIC, W. R.; KICENIUK, J. W. (1976): *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 33 (1), 173-176.
- 7.—DUNCOMBE, W. G. (1964): *Clin. Chim. Acta*, 9, 122-125.
- 8.—GUTMANN, I.; WAHLEFELD, A. W. (1964): En «Methods of enzymatic analysis», Ed. Bergmeyer, H. U., Academic Press, New York, 2.^a ed., vol. 3, pp. 1464-1468.
- 9.—KEPLER, D.; DECKER, K. (1974): En «Methods of enzymatic analysis», Ed. Bergmeyer, H. U., Academic Press, New York, 2.^a ed., vol. 3, páginas 1127-1131.
- 10.—KREBS, H. A.; BERNNET, D. A. H.; GASQUET, P.; GASCOYNET, T.; YOSHIDA, T. (1963): *Biochem. J.*, 93, 112-121.
- 12.—LUQUET, P. (1972): *Alimentation et la Vie*, 60 (5), 338-362.
- 13.—MELLANBY, J.; WILLIAMSON, D. H. (1974): En «Methods of enzymatic analysis», Ed. Bergmeyer, H. U., Academic Press, New York, 2.^a ed., vol. 4, pp. 1840-1843.
- 14.—MORATA, P. (1979): «Algunos aspectos de la regulación del metabolismo glucídico en la trucha (*Salmo gairdneri*)», Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- 15.—PALMER, T. N.; RYMAN, B. E. (1972): *J. Fish. Biol.*, 4, 311-319.
- 16.—PHILLIPS, J. W.; HIRD, F. J. R. (1977): *Comp. Biochem. Physiol.*, 57 B, 133-138.
- 17.—PHILLIPS, A. M. Jr.; TUNISON, A. V.; BROCKWAY, D. R. (1948): *Res. Bull. N. Y.*, 11, 44 pp.
- 18.—THORPE, A.; INCE, B. W. (1976): *Gen. Comp. Endocrinol.*, 30, 332-339.
- 19.—WILLIAMSON, D. H.; MELLANBY, J. (1974): En «Methods of enzymatic analysis», Ed. Bergmeyer, H. U., Academic Press, New York, 2.^a ed., vol. 4, pp. 1836-1839.
- 20.—WINDELL, J. T.; NORRIS, D. O. (1969): *Prog. Fish-Cult.*, 31, 20-26.
- 21.—ZAMMIT, V. A.; NEWSHOLME, E. A. (1979): *Biochem. J.*, 184, 313-322.