

Efectos de una dieta inmunoestimuladora y de la permanencia en temperatura constante sobre el metabolismo hepático de carbohidratos en dorada *Sparus aurata* L., 1758

R. Laiz-Carrión¹, M. P. Martín del Río¹, J. L. Soengas² y J. M. Mancera¹

¹ Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España. Correo electrónico: raul.laiz@ca.ieo.es

² Laboratorio de Fisiología Animal. Departamento de Biología Funcional e Ciencias da Saúde. Facultade de Biología. Edificio de Ciencias Experimentais. Universidade de Vigo. E-36310 Vigo (Pontevedra), España.

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de una dieta inmunoestimuladora, usada frecuentemente en acuicultura para mitigar los efectos de la denominada enfermedad de invierno, y del mantenimiento a temperatura constante sobre el metabolismo hepático, los niveles de lisozimas y la mortalidad en dorada *Sparus aurata* L., 1758. El experimento se desarrolló durante un periodo de 230 días, observándose un incremento en los potenciales glucolítico y glucogenolítico, así como en el potencial gluconeogénico en el hígado de los ejemplares alimentados con la dieta inmunoestimuladora en relación al grupo de control. Estos resultados sugieren un aumento de la actividad metabólica hepática derivada de la dieta inmunoestimuladora. Asimismo, se observaron valores más elevados de los niveles de lisozimas simultáneos a una reducción de la mortalidad en el grupo tratado con inmunoestimuladores, lo que induce a concluir que esta dieta enriquecida fortalecería los mecanismos defensivos inespecíficos, disminuyendo la mortalidad. En el grupo de permanencia a temperatura constante de 20 °C se consiguió mantener el apetito de los peces y, por tanto, favorecer la prevención del posible síndrome de invierno, obteniéndose mejores valores en las distintas variables de producción estudiadas (peso final, ganancia de peso y mortalidad) con respecto al grupo de control.

Palabras clave: Metabolismo intermediario, síndrome de invierno, dorada.

ABSTRACT

Impact of an immunostimulant diet and constant temperature on liver carbohydrate metabolism in the gilthead seabream *Sparus aurata* Linnaeus, 1758

The impact of an immunostimulant diet –frequently used to avoid winter syndrome in aquaculture– on liver carbohydrate metabolism was assessed over a period of 230 days in the gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758. An enhancement of liver glycolytic, glycogenolytic and gluconeogenic potential in fish fed with immunostimulant diet was found, compared to a control group, suggesting an increase in liver metabolic activity. Moreover, immunostimulant-treated fish also showed higher values of lysozyme activity, along with a decrease in mortality, suggesting an increase in the nonspecific defence mechanism. The group kept at a 20 °C constant temperature maintained appetite at normal levels, avoiding possible winter syndrome and obtaining better values for the production parameters studied (final weight, weight gain and mortality), compared with the control group.

Keywords: Intermediary metabolism, winter syndrome, gilthead seabream.

INTRODUCCIÓN

El cultivo intensivo de la dorada *Sparus aurata* L., 1758, espárido cultivado en diversos países mediterráneos, se ha visto afectado en diferentes años y regiones por una mortalidad elevada asociada a descensos en la temperatura del agua (Bovo *et al.*, 1995; Doimi, 1996; Tort, Rotllant y Rovira, 1998). En España, este fenómeno se manifiesta principalmente en zonas donde, durante el invierno, la temperatura del agua disminuye a valores por debajo de 14-15 °C, produciendo importantes pérdidas en la producción (Padrós, Tort y Crespo, 1996; Tort, Rotllant y Rovira, 1998). Esta mortalidad durante la época invernal se ha relacionado con una condición patológica denominada síndrome o enfermedad de invierno debida, principalmente, a las bajas temperaturas del agua, aunque puede ser originada por varias causas, como desequilibrios en el balance energético, inmunodepresión o agentes infecciosos (Tort, Rotllant y Rovira, 1998; Sarusic, 1999; Gallardo *et al.*, 2003). Se ha demostrado que el síndrome de invierno aumenta los niveles plasmáticos de cortisol, reduce la actividad del complemento y de las lisozimas y disminuye los niveles circulantes de linfocitos (Tort, Rotllant y Rovira, 1998). Dado que durante el invierno los peces no se alimentan, manifiestan alteraciones en el metabolismo energético y en la síntesis de moléculas necesarias para el sistema inmune (Blazer y Wolke, 1984; Hardie, Fletcher y Secombes, 1990). El objetivo de este trabajo es experimentar una estrategia de prevención de la aparición del síndrome de invierno mediante la alimentación con un pienso comercial enriquecido con un complejo polivitamínico o bien mediante el mantenimiento en una temperatura constante, y determinar el efecto de estos tratamientos sobre el metabolismo energético de la dorada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo experimental

El experimento se realizó en las instalaciones que la empresa Acuinova posee en Ayamonte (Huelva). Se utilizaron tres estanques de 3 000 m³

de capacidad, con 26 000 ± 1 200 ejemplares de dorada de 269 ± 39 g de peso medio inicial. El experimento se realizó durante un periodo de 230 días, desde el 03-10-2000 al 29-05-2001. La alimentación se realizó ad libitum de acuerdo a los siguientes tratamientos.

- Grupo de control, alimentado con pienso Mistral 25 (de ProAqua) y mantenido a temperatura ambiente.
- Grupo inmunoestimulado, alimentado con pienso Europa-Elite 25 enriquecido con Trouvitol-Plus (de Trouw) y mantenido a temperatura ambiente.
- Grupo a temperatura constante, alimentado con pienso Mistral 25 y mantenido a temperatura constante de 20 °C.

La temperatura y la salinidad ambiental en los grupos de control e inmunoestimulado fueron incrementándose en el transcurso del experimento, fluctuando en un rango de 12,8 a 19,4 °C y de 13 a 28 respectivamente. La temperatura constante (20 °C) se obtuvo gracias a una planta de cogeneración adyacente a los estanques de cultivo. Los ejemplares muertos se retiraron diariamente de cada uno de los estanques.

Muestreo

Los ejemplares de cada grupo se muestrearon (n = 8) al final del experimento, obteniéndose plasma, suero e hígado, que fueron inmediatamente congelados en hielo seco y guardados a -80 °C hasta su posterior análisis. Los peces se anestesiaron con 2-fenoxietanol (1 ml l⁻¹ agua), se pesaron y midieron. Las muestras de sangre se tomaron del pedúnculo caudal mediante jeringas heparinizadas. Para la obtención de plasma, la sangre se centrifugó (1 min a 10 000 G). En plasma se evaluaron diversos registros metabólicos (glucosa, lactato y proteína), mientras que en suero se analizaron los niveles de lisozimas.

Técnicas analíticas

La glucosa y el lactato plasmáticos se determinaron utilizando kits comerciales (Sigma

#16-20UV y Sigma #735, respectivamente) adaptados a microplacas (Stein, 1963; Iwama, McGeer y Pawluk, 1989). La proteína plasmática se midió utilizando el método del ácido bicinchonínico (Smith *et al.*, 1985) con el kit de proteínas BCA (Pierce, Rockford, USA) para microplacas, con albúmina bovina como estándar. Esta analítica se realizó en un lector de microplacas automático Bio Kinetics EL-340i Reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EEUU), utilizando el software DeltaSoft3 para Macintosh (BioMetallics Inc. NJ). Los niveles de lisozima se determinaron utilizando un método turbidimétrico basado en la disminución de la absorbancia producida por la lisis del *Micrococcus luteus* para determinar la actividad enzimática de la lisozima (Rotlant *et al.*, 1997).

El análisis de las actividades enzimáticas en el hígado se llevó a cabo tras homogeneizar en frío el tejido con un disruptor ultrasónico con 10 volúmenes/peso de un tampón de parada: 50 mmol l⁻¹ imidazol-HCl (pH 7,5), 1 mmol l⁻¹ 2-mercaptoetanol, 50 mmol l⁻¹ NaF, 4 mmol l⁻¹ EDTA, 250 mmol l⁻¹ sacarosa y 0,5 mmol l⁻¹ p-methyl-sulphonyl-fluoride (PMSF, añadido como cristales secos inmediatamente antes de la homogenización). El homogenado se centrifugó (2 min a 13 000 G, con Eppendorf 5415R) obteniéndose el sobrenadante para los ensayos enzimáticos.

Se determinaron las actividades de varias enzimas representativas de las principales rutas del metabolismo de carbohidratos: fructosa 1,6-bifosfatasa (EC 3.1.3.11; FBPa); hexokinasa (EC 2.7.1.1; HK); glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49; G6PDH); glucógeno fosforilasa (EC 2.4.1.1; GPasa) y 6-fosfofructo 1-kinasa, (EC 2.7.1.11; PFK) utilizando un espectrofotómetro Unicam UV-2 (Thermo Unicam, Waltham, MA, EE UU). Las velocidades de reacción de las enzimas se determinaron por el incremento o disminución de la absorbancia del NAD(P)H a 340 nm. Las reacciones se iniciaron con la adición de los homogenados de hígado (0,05 ml), a concentraciones de proteína preestablecidas, omitiendo el sustrato en las cubetas de control (volumen final de 1,35 ml), y permitiendo que las reacciones procedieran a 15 °C para los tiempos preestablecidos. La actividad enzimática se expresa por mg de proteína, la

cual se determinó por triplicado según el método de Bradford (1976), utilizando albumina de suero bovino (Sigma, EE UU) como estándar. Para cada enzima se utilizaron las condiciones específicas descritas previamente para esta especie (Laiz-Carrión *et al.*, 2002 y 2003; Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003).

Estadística

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un anova de una vía tras verificar la homogeneidad de la varianza. Para cumplir las condiciones del análisis de la varianza se realizaron transformaciones logarítmicas de los datos cuando fue preciso, aunque los datos se presentan en sus valores decimales para mayor claridad. Las comparaciones se realizaron mediante un test de Tukey, en el que las diferencias se consideran estadísticamente significativas con $P < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados biométricos y plasmáticos se muestran en la tabla I. El grupo mantenido a temperatura constante de 20 °C fue el que más peso consumió (345 % respecto al de control), presentando: i) una ganancia de peso significativamente mayor ($241,2 \pm 28,3$ g, $P < 0,05$); ii) un índice hepatosomático superior ($1,58 \pm 0,07$); y iii) los valores más bajos de mortalidad (5,7 %). Sin embargo, el grupo alimentado con una dieta inmunoestimuladora, no mostró diferencias significativas para la ganancia de peso, aunque presentó valores de lisozima significativamente mayores ($150,1 \pm 52,0$ KU ml⁻¹, $P < 0,05$) y una mortalidad reducida respecto al grupo de control. En el plasma se observó un aumento significativo ($P < 0,05$) de la glucosa circulante en el grupo mantenido a temperatura constante respecto al grupo de control. No se apreciaron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales para los demás registros plasmáticos analizados.

Por otro lado, en el hígado, el tratamiento con dieta estimuladora produjo un incremento significativo ($P < 0,05$) en las actividades de las enzimas FBPa y GPasa (tabla II), representativas de la glu-

Tabla I. Variables biométricas y plasmáticas de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 8). Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos (anova una vía, $P < 0,05$).

Variable	Grupos		
	Control	Inmunoestimulado	Temperatura 20 °C
Pienso frente a control (%)	100	108	345
Mortalidad (%)	12,7	7,7	5,7
Longitud (cm)	25,7 \pm 0,8 a	26,4 \pm 0,6 a	26,2 \pm 0,4 a
Peso (g)	355 \pm 40 a	394 \pm 31 a	436 \pm 21 a
Ganancia en peso (g)	116,6 \pm 28,6 a	118,6 \pm 19,0 a	241,2 \pm 28,3 b
Índice hepatosomático	1,08 \pm 0,08 a	1,01 \pm 0,12 a	1,58 \pm 0,07 b
Glucosa (mmol l ⁻¹)	4,17 \pm 0,17 a	4,09 \pm 0,26 a	5,13 \pm 0,22 b
Lactato (mmol l ⁻¹)	4,85 \pm 0,25 a	4,23 \pm 0,42 a	5,40 \pm 0,38 a
Lisozimas (KU ml ⁻¹)	81,3 \pm 15,7 ab	150,1 \pm 52,0 b	33,3 \pm 12,4 a

coneogénesis y la glucogenolisis respectivamente, así como de la actividad de la PFK (típica enzima glucolítica). La actividad de la G6PDH, enzima clave de la ruta de las pentosas fosfato, disminuyó

significativamente ($P > 0,05$) en los ejemplares alimentados con la dieta inmunoestimuladora, mientras que no se observaron diferencias significativas en la actividad HK por efecto del tratamiento.

Tabla II. Variables metabólicas hepáticas de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n = 8). El registro % GPasa a representa el porcentaje de la forma activa (GPasa a) respecto a la total (GPasa a + b). La ratio de actividad para la PFK se calcula como el cociente entre la actividad a baja concentración (0,1 mmol l⁻¹) de sustrato (fructosa 6-fosfato) y la actividad a concentración alta (5 mmol l⁻¹). De igual modo, la ratio de activación para la fructosa 2,6-bifosfato se determina como el cociente entre la actividad medida con 1 y 5 μ mol l⁻¹ de fructosa 2,6-bifosfato y una concentración de sustrato de 0,1 mmol l⁻¹ de fructosa 6-fosfato. Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos (anova una vía, $P < 0,05$).

Registro	Grupos		
	Control	Inmunoestimulado	Temperatura 20 °C
Actividad FBPasa (U mg ⁻¹ proteína)	0,68 \pm 0,04 ab	0,74 \pm 0,03 b	0,53 \pm 0,06 a
Actividad HK (U mg ⁻¹ proteína)	0,026 \pm 0,004 a	0,025 \pm 0,004 a	0,025 \pm 0,004 a
Actividad G6PDH (U mg ⁻¹ proteína)	1,57 \pm 0,21 a	0,86 \pm 0,19 b	1,97 \pm 0,10 a
Actividad GPasa total (U mg ⁻¹ proteína)	0,13 \pm 0,012 a	0,24 \pm 0,029 b	0,07 \pm 0,01 a
% GPasa a	25,2 \pm 2,3 a	38,0 \pm 2,2 b	10,6 \pm 2,5 c
Actividad PFK total (U mg ⁻¹ proteína)	0,095 \pm 0,008 a	0,143 \pm 0,013 b	0,046 \pm 0,002 c
Ratio de actividad	0,049 \pm 0,009 a	0,039 \pm 0,010 a	0,046 \pm 0,010 a
Ratio de activación por fructosa 2,6-P ₂	0,120 \pm 0,023 a	0,103 \pm 0,024 a	0,101 \pm 0,027 a

DISCUSIÓN

La ingesta de alimento de un pez en los meses más cálidos oscila entre el 2 y el 4 % de su peso corporal al día, mientras que durante el invierno, cuando se produce un descenso de temperatura, pueden llegar a alimentarse entre 0,1-0,2 % o, incluso, dejar de alimentarse (Tort, Rotllant y Rovira, 1998; Tort *et al.*, 1998). Esta reducción en la ingesta puede causar desequilibrios en el balance energético y deficiencias en la síntesis de moléculas necesarias para el sistema inmune (Blazer y Wolke, 1984; Hardie, Fletcher y Secombes, 1990). En doradas afectadas por la enfermedad de invierno se han descrito patologías nutricionales (Ferguson, 1989; Tort *et al.*, 1998). Por otro lado, está demostrado que ciertas dietas enriquecidas específicamente con vitaminas o ácidos grasos pueden reforzar componentes del sistema inmune (Sheldon y Blazer, 1991; Thompson *et al.*, 1994; Verlhac *et al.*, 1996).

Bajo las condiciones de nuestro diseño experimental, se ha observado que manteniendo la temperatura constante se consigue prolongar el apetito de los peces y cubrir los requerimientos energéticos, y, de esta manera, eludir la aparición del posible síndrome de invierno provocado por el descenso de la temperatura. Así, se obtuvieron mejores registros en las variables de producción (peso final, ganancia de peso y mortalidad) en el grupo mantenido a temperatura constante respecto al grupo de control, mantenido a temperatura ambiente variable. Además, se apreció un impulso, aunque no significativo, en las variables de producción en el grupo inmunoestimulado respecto al grupo de control.

Por otro lado, con la dieta inmunoestimuladora se obtuvo una mejoría en la actividad de lisozima en suero, lo que se podría relacionarse con la disminución de la mortalidad respecto al grupo de control. Sin embargo, las respuestas inmunes no específicas son funcionales a temperaturas inferiores a 15 °C, como, por ejemplo, las proteínas de complemento, que son más eficientes a bajas temperaturas (Hayman *et al.*, 1991; Sunyer y Tort, 1995). Esto podría explicar los menores valores de la actividad de las lisozimas observados en el grupo aclimatado a 20 °C.

La inmunoestimulación produce un incremento en los potenciales glucogenolítico (actividad GPasa) y gluconeogénico (actividad FBPase) hepáticos (tabla II), lo que redundará en una mayor producción endógena de glucosa, no alterándose la capacidad de usar glucosa exógena (reflejado por la actividad HK). Al menos una parte de esa glucosa disponible parece utilizarse en el propio hígado, dado que se observa un incremento en la capacidad glucolítica del tejido (actividad PFK) y un descenso de su uso a través de la ruta de las pentosas fosfato, no pudiendo descartarse un incremento en la capacidad de exportación para ser usada en otros tejidos aunque los niveles de glucosa en plasma no cambien. Todo esto sugeriría que el tratamiento con la dieta inmunoestimulante podría acrecentar la actividad metabólica hepática, lo cual, junto con el incremento de la producción endógena de glucosa, aumentaría la energía disponible. Esta energía fomentaría el equilibrio energético y podría contribuir a una respuesta inmune mejorada (actividad lisozima y mortalidad) con respecto al grupo de control, la cual podría favorecer la prevención de la enfermedad de invierno, aunque son necesarias nuevas investigaciones para evidenciar estos procesos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto PETRI PTR95-0431-OP concedido a J. M. M. en colaboración con la empresa AcuinoVA S. L. Los autores agradecen a D. Roberto Ferrón Cosme el apoyo técnico prestado en la realización del experimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Blazer, V. S. y R. E. Wolke. 1984. Effect of diet on the immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 41: 1244-1247.
- Bovo, G., F. Borghesan, M. Comuzzi, G. Ceschia y G. Giorgetti. 1995. 'Winter disease' in orata di allevamento: osservazioni preliminari. *Bolletino della Società Italiana di Patologia Ittica* 17: 2-11.
- 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.

- Doimi, M. 1996. A new winter disease in seabream (*Sparus aurata*): a preliminary report. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 16: 17-18.
- Ferguson, H. W. 1989. *Systemic pathology of fish*. Iowa State Univ. Press. Ames Iowa, EE UU: 134 pp.
- Gallardo, M. A., M. Sala-Rabanal, A. Ibarz, F. Padrós, J. Blasco, J. Fernández y J. Sánchez. 2003. Functional alterations associated with "winter syndrome" in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223 15-27.
- Hardie, L. J., T. C. Fletcher y C. J. Secombes. 1990. The effect of Vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 87: 1-13.
- Hayman, J. R., J. E. Bly, R. P. Levine y C. J. Loob. 1991. Complement deficiencies in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) associated with temperature and seasonal mortality. *Fish and Shellfish Immunology* 1: 183-92.
- Iwama, G. K., J. C. McGeer y M. P. Pawluk. 1989. The effects of five fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 67: 2065-2073.
- Laiz-Carrión, R., M. P. Martín del Río, J. M. Míguez, J. M. Mancera y J. L. Soengas. 2003. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *J. Exp. Zool.* 298A: 105-118.
- Laiz-Carrión, R., S. Sangiao-Alvarellos, J. M. Guzmán, M. P. Martín del Río, J. L. Soengas y J. M. Mancera. 2002. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 179-188.
- Padrós, F., L. Tort y S. Crespo. 1996. Winter disease in the gilthead seabream *Sparus aurata*: some evidences of a multifactorial etiology. En: *International Workshop on "Sea Bass and Sea Bream Culture: Problems and Prospects"* (16-18 de octubre, 1996. Verona, Italia). B. Chatain, M. Saroglia, J. Sweetman y P. Lavens (eds.): 305-307. European Aquaculture Society. Ostende, Bélgica.
- Rotllant, J., M. Pavlidis, M. Kentouri, M. E. Abad y L. Tort. 1997. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture* 156: 279-290.
- Sangiao-Alvarellos, S., R. Laiz-Carrión, J. M. Guzmán, M. P. Martín del Río, J. M. Míguez, J. M. Mancera y J. L. Soengas. 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am. J. Physiol.* 285: R897-R907.
- Sarusic, G. 1999. Clinical signs of the winter disease phenomenon in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 19: 113.
- Sheldon, W. M. y V. S. Blazer. 1991. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages. *J. Aquat. Anim. Health* 3: 87-93.
- Smith, O. K., R. I. Krohon, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson y D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Stein, M. W. 1963. D-Glucose, determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer (ed.): p. 117. Academic Press. Nueva York.
- Sunyer, J.O. y L. Tort. 1995. Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45: 335-345.
- Thompson, I., T.C. Fletcher, D.F. Houlihan y C. Secombes. 1994. The effect of dietary vitamin A on the immunocompetence of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 513-523.
- Tort, L., F. Padrós, J. Rotllant y S. Crespo. 1998. Winter syndrome in the gilthead seabream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish and Shellfish Immunology* 8: 37-47.
- Tort, L., J. Rotllant y L. Rovira. 1998. Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of northwest Mediterranean at low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A: 175-179.
- Verlhac, V., J. Gabaudan, A. Obach, W. Schüep y R. Hole. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 143: 123-133.