INTERACCIÓN LIPIDOS-CARBOHIDRATOS: EFECTOS SOBRE LA ALIMENTACIÓN DEL SALMON ATLANTICO (S. SALAR)

D. Menoyo[1], J.M. Bautista[2], C.J. López-Bote[3], A. Diez[2] y A. Obach[4]
[1] Departamento de Producción Animal, Universidad Politécnica de Madrid, ETS Ingenieros Agrónomos, 28040, Madrid. [2]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV y [3]Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid; [4]Nutreco Aquaculture Research Centre, N-4001 Stavanger, Noruega

Introducción

Los salmónidos utilizan los carbohidratos de manera deficiente, sin embargo, con el empleo de la tecnología adecuada se puede incluir hasta un 20% en su dieta sin afectar negativamente a la digestibilidad. Una vez absorbida los niveles de glucosa en sangre permanecen elevados durante largo tiempo. Esta lenta tasa de captación de la glucosa por los tejidos no parece ser causada por una deficiente respuesta de la insulina, sino más bien a un deficiente transporte al interior celular, causado probablemente por la escasa presencia de carbohidratos en su dieta natural, asemejándose a lo que en mamíferos se denomina resistencia a la insulina o diabetes tipo dos (Moon 2001). La captación celular de la glucosa se realiza mediante la actuación de proteínas integrales de membrana agrupadas en dos familias: proteínas co-transportadoras de glucosa Na^+ dependientes (SGLT) y los transportadores de glucosa Na^+ independientes (GLUT) (Wood y Trayhurn 2003)

Los transportadores de glucosa GLUT4 han suscitado especial interés en los últimos años debido al importante papel que desempeñan en la homeostasis celular de la glucosa en el tejido muscular, en respuesta al estímulo producido por la insulina (Wood y Trayhurn 2003). Estudios realizados en mamíferos han demostrado que la expresión del gen GLUT4 parece estar modulada por el tipo de grasa de la dieta (Zorzano et al., 1998). Por otro lado, es de sobra conocida la influencia del balance de ácidos grasos n-6/n-3 de la dieta sobre la fisiología celular, producción de eicosanoides y el desarrollo de enfermedades metabólicas del tipo de la diabetes mellitus (Storlien et al., 1991; Bruckner 1992).

Recientemente hemos clonado dos isoformas funcionales del gen GLUT4 en el músculo blanco del salmón Atlántico (*Salmo salar*) (Menoyo 2004). En el presente estudio se analiza el efecto de la fuente de grasa sobre la expresión del gen GLUT4 en el músculo blanco del salmón Atlántico con el fin de comprobar si la relación n-6/n-3 de la dieta afecta sobre el metabolismo de la glucosa en salmónidos.

Material y métodos

Dietas. Los piensos se diseñaron para obtener un amplio rango en la relación n-6/n-3, para ello se fabricaron cuatro dietas con la misma ración base donde el aceite de pescado rico en n-3 fue parcialmente sustituido por aceite de girasol rico en n-6 (Tabla 1). Todas las dietas se formularon para alcanzar los niveles deseados de proteína 37% y grasa 36%.

Animales. El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de acuicultura de la empresa Nutreco, Jørpeland, Noruega. Salmones atlánticos, 176 animales en total, de peso medio aproximado de 220g fueron distribuidos en ocho tanques (dos por dieta experimental) de 1m x 1m de diámetro provistos de agua salada.

Durante el experimento se sometió a los animales a un programa de 18h de luz y 6h de oscuridad, y la temperatura osciló entre los 8-9ºC.

Periodo experimental. La prueba de alimentación duró 12 semanas momento en el que se sacrificaron los animales. Inmediatamente se recogió una muestra de músculo blanco en un eppendorf que contenía la solución conservante (RNA later; AMBION).

PCR cuantitativo a tiempo real. Para determinar la expresión del gen GLUT 4 se empleó la técnica de PCR cuantitativo a tiempo real. Para ello se aisló ARN total del músculo de cuatro peces por dieta siguiendo el protocolo general para tejidos animales proporcionado por Applied Biosystems (total RNA chemistry and nucleic acid purification), utilizando el ABI P_{RISM}® 6100 Nucleic Acid Prepstation (Applied Biosystems). Una vez aislado se determinó su concentración siguiendo el protocolo del RiboGreen RNA-Specific Quantitation kit (Molecular Probes). El ADNc se obtuvo mediante la transcripción inversa de 90-130ng de ARN total de cada muestra, manteniendo en paralelo una reacción control con 150ng de ARN estándar a fin de obtener una curva patrón mediante sucesivas diluciones. Se diseñaron dos juegos de cebadores y una sonda común para las dos isoformas de GLUT 4 utilizando el programa informático Primer Express® v.2 (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores fueron F-GLUT-i1: 5´-CGT TTT CTC TAC ATC ATC CGC TG-3´ y R-GLUT-i1 5´-CAT ATC CCC CAC CTC CTG C-3´; F-GLUT-i2 5´-CGC TTC CTC TAC ATC ATC CGT TC-3´ y R-GLUT-i2 5´-AGC ATA TCC CCC ACT TCC TGT-3´. La secuencia de la sonda fué, 5´-CCA CGC CAA GAG CGG CTT GAG-3´, y se utilizó el termociclador con detector láser ABI PRISM 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) para la cuantificación.

Análisis estadístico. Para determinar el efecto de la dieta sobre la expresión génica del GLUT 4 se realizó un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del programa estadístico SAS (SAS Institute Inc.). El test de Tukey se utilizó para separar estadísticamente las medias. Los análisis de regresión se realizaron siguiendo el procedimiento /solution del SAS.

Resultados y discusión

La expresión de las dos isoformas del transportador GLUT 4, referida como cantidad de ARNm vs. ARN total, en el músculo del salmón se vio modificada por la dieta (Tabla 2). La expresión de la isoforma denominada GLUT 4i1 resultó ser hasta cuatro veces superior de la GLUT 4i2. Para cuantificar el efecto de la inclusión (IL) del aceite de girasol se realizó un análisis de regresión obteniéndose un modelo de regresión lineal y cuadrático (GLUT 4i1 = 1.56 (± 0.14) + 0.04 (± 0.01) IL - 0.0006 (± 0.0001) IL^2, r^2=0.54; p<0.005). La expresión de la isoforma GLUT 4i2 también se vio modificada de manera significativa por la inclusión de aceite de girasol en la dieta, pero en este caso no se encontró un modelo significativo de regresión lineal ni cuadrático. Los salmónidos se originaron a partir de un proceso tetraploide que tuvo lugar hace 25 millones de años, lo que dio lugar a genoma complejo en el que persisten muchos genes duplicados y funcionales (Force et al., 1999), sin embargo hasta ahora se desconocen los posibles efectos de esta doble funcionalidad.

Por lo tanto, al alimentar al salmón con una combinación de aceite de pescado rico en n-3 de cadena larga con un 25-50% de aceite de girasol rico en n-6 observamos una mayor expresión del GLUT 4. Aunque una mayor producción de mRNA no implica necesariamente una mayor traducción de proteína y una mayor translocación y presencia de transportadores en las membranas celulares del músculo, puede que al modificar la relación n-6/n-3 en la dieta el transporte de la glucosa se vea favorecido como ocurre en esta clase de peces cuando, a acusa de la aclimatación al frío, reestructuran los lípidos de la membrana, y reducen el

consumo de oxígeno utilizando los carbohidratos como fuente energética (Moon et al., 1985).

Los resultados del presente estudio indican que el tipo de grasa utilizada en la dieta del salmón atlántico puede tener efectos sobre la utilización de los carbohidratos en el músculo, de tal manera que se propone que es preciso considerar la relación n-6/n-3 a la hora de formular la ración en salmónidos para conseguir que la utilización de la energía de los carbohidratos sea más eficiente.

Referencias

Bruckner, G. (1992) Fatty Acids and Cardiovascular Diseases. In: Fatty Acids in Foods and their Health Implications, (Chow, C.K., ed.), pp. 735-752. Marcel Dekker Inc. New York 10016.

Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, U.L. & Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. Genetics 151, 1531-1545.

Menoyo, D. (2004) Utilización de Aceites Vegetales en la Alimentación del Salmón Atlántico (Salmo salar): Efectos Sobre el Metabolismo y la Calidad. Tesis Doctoral Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Moon, T.W., Walsh, P.J. & Mommsen, T.P. (1985) Fish hepatocytes: a model metabolic system. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42: 1772-1782.

Moon, T.W. (2001) Glucose intolerance in teleot fish: fact or fiction?. Comp. Biochem. Physiol. 129B: 243-249.

Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Chisholm, D.J., Pascoe, W.S., Khouri, S. & Kraegen, E.W. (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats Relationship to muscle triglyceride and n-3 fatty acids in muscle phospholipid. Diabetes 40: 280-289.

Wood, I.S. & Trayhurn, P. (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. Br. J. Nutr. 89: 3-9.

Zorzano, A., Santalucia, T., Palacin, M., Gumà, A. & Camps, M. (1998) Searching for ways to upregulate GLUT4 glucose transporter expresión in muscle. Gen. Pharmac. 31: 705-713.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales

Dietas	1	2	3	4
Ingredientes (g/kg)				
Harina de pescado LT	632.1	632.1	632.1	632.1
Gluten de maíz	30.1	30.1	30.1	30.1
Trigo	70.0	70.0	70.0	70.0
Aceite de pescado	259.42	194.56	129.71	64.85
Aceite de girasol	-	64.85	129.71	194.56
Composición de ácidos grasos (g/100g)				
Saturados	32.01	27.01	22.64	17.56
Monoinsaturados	27.61	29.36	30.19	31.66
n-6	4.21	12.79	25.56	36.38
n-3	36.20	30.86	21.86	14.24
n-6/n-3	0.12	0.41	1.17	2.58

Tabla 2. Efecto de las dietas experimentales sobre la expresión de las dos isoformas del GLUT 4 en el músculo de salmón expresadas como abundancia de ARNm respecto al total de ARN.

Isoformas	1	2	3	4	SEM	P<F
GLUT 4i1	1.53^{b}	2.41^{a}	2.16^{ab}	1.47^{b}	0.20	0.01
GLUT 4i2	0.59^{ab}	0.51^{ab}	0.64^{a}	0.42^{b}	0.04	0.04