



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

***EFECTO DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE INSULINA Y  
GLUCAGÓN EN TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y DORADA  
(*Sparus aurata*) Y CARACTERIZACION DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA  
DE DORADA***

**TESIS DOCTORAL**  
**PABLO CESAR ROJAS MELÉNDEZ**  
*Barcelona. Octubre, 2005*

---



---

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

***EFECTO DE LA DIETA SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE INSULINA Y  
GLUCAGÓN EN TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y DORADA  
(*Sparus aurata*) Y CARACTERIZACION DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA  
DE DORADA***

*Memoria presentada por  
Pablo César Rojas Meléndez  
Para optar al grado de Doctor en Biología*

*Tesis realizada bajo la dirección de los Drs. Isabel Navarro Álvarez y Joaquim  
Gutiérrez Frutos del Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia.  
Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia,  
Universitat de Barcelona, programa de Fisiologia (bienio 2000-2001).*

*Dra. Isabel Navarro Dr. Joaquim Gutiérrez Pablo Rojas*

*Barcelona. Octubre, 2005*

---



*A Juanita por todo*



*Es curioso para llegar a este punto, he recorrido un largo camino que me ha llevado incluso literalmente a cruzar medio mundo, y para lo cual he contado con el apoyo de muchas personas, que me han enseñado tantas cosas a nivel profesional pero sobretodo a nivel personal, por lo que quisiera agradecerles profundamente a todas aquellas personas y amigos por compartir parte de sus experiencias.*

*A mis directores de tesis la Dra. Isabel Navarro Alvarez y Dr. Joaquim Gutiérrez Fruitós por brindarme su apoyo y amistad en cada momento, así como la oportunidad de realizar la tesis doctoral en un estupendo ambiente de trabajo a lo largo de estos años.*

*Al Dr. Josep Planas por su ayuda y orientación en la parte del clonaje del bendito transportador de glucosa de dorada.*

*Gracias a mis compañeros del laboratorio con los que he compartido el trabajo entre risas y música que han hecho más placentera mi estancia en el laboratorio. A Amaya, Mónica y Núria con las que prácticamente inicié y culminaré esta experiencia. Gracias también a Bárbara, Dani, Encarni, Joaán, Jordi, Juan, Lamia, Lourdes y Marta por su ayuda y los buenos momentos pasados en estos años.*

*Agradecer por el apoyo y los gratos momentos a Giovanni, Jean Charles, Ina, Laia, Leire, María Laura, Nerea y Oxana durante sus estancias en el laboratorio a lo largo de estos años.*

*Gracias a Pedro Gómez, Jaume Pérez y Becarios del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal por su amistad y todo su apoyo en los largos y a veces interminables muestreos.*

*Agradecer a mis amigos Xavi petit y Ayalke por compartir aficiones y risas durante estos años. Así como a Arantxa, Arnau, Begoña, Berta, Cleo, David, Eli, Jordi, Kelly y Núria por las risas y los gratos momentos.*

*Gracias a Beguito y Enric por su amistad y apoyo, así como por los excelentes días pasados en la Font del Ferro y Valencia.*

---

*A Yzita y Quino por su amistad y compañía. A Eli, Gerardo, Julio y Liz por los buenos momentos.*

*A mis amigos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por su apoyo y la amistad en todo momento.*

*Agradecer a Alex, Antonio, Angel, Carlos, Gustavo, Hadi, Hugo, Lema, Luchin, Manolo, Oscar, Rene, Wendi Fro y los hermanos Zalamea por la amistad y las risas de los viernes.*

*Gracias a Franc, Joan, Jordi, Ignasi, Ismael, Lluís, Rauliño, Jordi, Victor y Xavi por compartir risas y el partidillo de los jueves.*

*Agradecer a todos los integrantes del Amateur Futbol Club y no comienzo a nombrarlos porque sino no acabaría nunca, ya saben que los aprecio y disfrutamos del futbol y tardes de un buen asado argentino en el coloso del Prat del Llobregat.*

*Gracias a mis amigos concontinentales Nancy, Natalia, Alejandro, Sergio y Santiago, con sus respectivas familias, por la amistad y los buenos momentos vividos en nuestras reuniones, y que me confirman que tenemos más cosas que nos unen de las que nos separan.*

*Agradecer a todos los profesores, becarios y secretarias del Departament de Fisiología que siempre han sido muy amables conmigo durante estos años.*

*Gracias a Cristina, Gabriel, Luchin y Matty por formar parte de mi familia y hacerme sentir como en casa.*

*Agradecer a mis padres, hermanos y familia, aunque no entienden lo que hago en la ciencia siempre me han apoyado para recorrer mi propio camino.*

*Gracias a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), por las becas AECI y MAE-AECI del año 2000 al 2003 y el año 2005. Agradecer también a la Universitat de Barcelona por la ayuda del año 2004.*

*A tots i cada un de vosaltres moltes gràcies*

*Pablo*

---

---

# **INDICE**

---



<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1.- ACUICULTURA Y LA NUTRICIÓN EN PECES. ....	3
1.1.1.- Generalidades de la trucha arco iris. ....	4
1.1.1.- Generalidades de la dorada. ....	6
1.2.- SISTEMA DE INSULINA, FACTORES DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGF-I) Y GLUCAGÓN. ....	8
1.2.- SISTEMA DE INSULINA, FACTORES DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGF-I) Y GLUCAGÓN. ....	8
1.2.1.- Insulina. ....	8
1.2.2.- Factores de crecimiento tipo insulina (IGF-I). ....	10
1.2.3.- Receptores de insulina e IGF-I. ....	10
1.2.5.- Efectos biológicos de la insulina e IGF-I. ....	14
1.2.6.- Glucagón. ....	17
1.2.6.- Efectos biológicos del glucagón. ....	18
1.3.- TRANSPORTE DE GLUCOSA. ....	20
1.3.1.- La glucosa en peces. ....	20
1.3.1.- Transportadores de glucosa. ....	21
<b>2.- OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1.- ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES. ....	31
3.1.1.- BLOQUE EXPERIMENTAL I: Efectos de dietas con diferentes perfiles de aminoácidos en trucha arco iris y dorada. ....	31
3.1.2.- BLOQUE EXPERIMENTAL II: Efectos de la sustitución de la proteína animal por la proteína vegetal en la dieta de trucha arco iris y dorada.....	37
3.1.3.- BLOQUE EXPERIMENTAL III: Inyección de arginina y glucosa en dorada ....	42
3.1.4.- BLOQUE EXPERIMENTAL IV: Caracterización y clonaje del transportador de glucosa (GLUT4) del músculo esquelético de dorada. ....	42
3.2.- EXTRACCIÓN DE SANGRE Y TEJIDOS. ....	43
3.3.- PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y EFICIENCIA DE UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES Y ENERGÍA. ....	43

---

---

3.4.- DETERMINACIÓN DE LA GLUCOSA EN PLASMA.	44
3.5.- FUNDAMENTO DEL RADIOINMUNOENSAYO DE INSULINA Y GLUCAGÓN EN PLASMA.	45
3.6.- RADIOINMUNOENSAYO DE INSULINA.	46
3.6.1.- <i>Marcaje de insulina de bonito.</i>	46
3.6.2.- <i>Cuantificación de la insulina plasmática.</i>	47
3.7.- RADIOINMUNOENSAYO DE GLUCAGÓN.	49
3.7.1.- <i>Material y reactivos</i>	49
3.7.2.- <i>Procedimiento</i>	50
3.8.- RADIOINMUNOENSAYO DE IGF-I.	51
3.9.- SEMIPURIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE INSULINA E IGF-I EN EL MÚSCULO BLANCO.	51
3.9.1.- <i>Fundamento.</i>	51
3.9.2.- <i>Material.</i>	51
3.9.3.- <i>Procedimiento.</i>	52
3.10.- ENSAYO DE UNIÓN DE LA HORMONA A SU RECEPTOR.	53
3.10.1.- <i>Material y métodos.</i>	53
3.10.2.- <i>Procedimiento</i>	53
3.11.- CLONAJE DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (GLUT4) DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA.	55
3.11.1.- <i>Extracción del ARN del músculo rojo de dorada.</i>	55
3.11.2.- <i>Aislamiento del ARNm del músculo rojo de dorada.</i>	56
3.11.3.- <i>Síntesis de ADNc por la transcriptasa reversa.</i>	57
3.11.4.- <i>Amplificación del ADNc por PCR y PCR anidada..</i>	58
3.11.5.- <i>Separación de los fragmentos de ADN amplificados.</i>	59
3.11.6.- <i>Aislamiento y ligación de los fragmentos de ADN amplificados.</i>	60
3.11.7.- <i>Transformación y selección de las bacterias con los fragmentos de ADN amplificados.</i>	61
3.10.8.- <i>Secuenciación y alineamiento de los fragmentos de ADN amplificados.</i>	63

---

3.12.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (GLUT4) DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE TRUCHA	... 64
3.12.1.- <i>Obtención de las membranas.</i>	..... 64
3.12.2.- <i>Prehibridación y marcaje de la sonda btGLUT de trucha común.</i>	..... 65
3.13.- CUANTIFICACIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (GLUT4) DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA.	..... 66
3.13.1.- <i>Extracción de las proteínas del tejido muscular de dorada.</i>	..... 66
3.13.2.- <i>Cuantificación de proteínas: método de Bradford.</i>	..... 66
3.13.3.- <i>Electroforesis de proteínas.</i>	..... 67
3.13.4.- <i>Geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).</i>	..... 67
3.13.5.- <i>Detección con anticuerpos (“western-blot”).</i>	..... 69
3.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	..... 72
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
4.1.- BLOQUE I: EFECTOS DE DIETAS CON DIFERENTES PERFILES DE AMINOÁCIDOS EN TRUCHA ARCO IRIS Y DORADA.	..... 75
4.1.1.- <i>Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en trucha arco iris.</i>	..... 76
4.1.2.- <i>Niveles de glucosa, insulina y glucagón en el plasma sanguíneo de la trucha arco iris</i>	..... 78
4.1.3.- <i>Caracterización de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco de trucha arco iris.</i>	..... 80
4.1.4.- <i>Efecto de la alimentación forzada sobre los niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la trucha arco iris.</i>	..... 82
4.1.5.- <i>Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en dorada.</i>	..... 85
4.1.6.- <i>Niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la dorada.</i>	..... 87
4.1.7.- <i>Caracterización de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco de doradas.</i>	..... 89
4.1.8.- <i>Efecto de la alimentación forzada sobre los niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la dorada.</i>	..... 91
4.1.9.- <i>Discusión.</i>	..... 94
4.2.- BLOQUE II: EFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN DE LA PROTEÍNA ANIMAL POR LA PROTEÍNA VEGETAL EN LAS DIETAS DE TRUCHA ARCO IRIS Y DORADA.....	102

---

4.2.1.- Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en trucha arco iris.	103
4.2.2.- Niveles de glucosa, insulina y glucagón en el plasma sanguíneo de la trucha arco iris.	105
4.2.3.- Efectos de las dietas experimentales sobre la expresión del transportador de glucosa (GLUT4) en el músculo rojo de trucha arco iris.	107
4.2.4.- Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en dorada	108
4.2.5.- Niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de las doradas.	110
4.2.6.- Discusión.	112
4.3.- BLOQUE III: TRATAMIENTOS DE ARGININA Y GLUCOSA EN DORADA.	117
4.3.1.- Crecimiento y eficiencia alimenticia de las doradas.	118
4.3.2.- Niveles plasmáticos de glucosa en dorada: efectos de la administración de glucosa y arginina.	119
4.3.3.- Niveles de insulina en el plasma de las doradas: efectos de la administración de glucosa y arginina.	120
4.3.3.- Niveles plasmáticos de glucagón en la dorada: efectos de la administración de glucosa y arginina.	121
4.3.3.- Niveles del IGF-I en el plasma de dorada: efectos de la administración de glucosa y arginina.	122
4.3.4.- Caracterización de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco de las doradas: efectos de la administración de glucosa y arginina	123
4.3.5.- Discusión.	125
4.4.- BLOQUE IV: CARACTERIZACIÓN Y CLONAJE DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA (GLUT4) DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DORADA.	130
4.4.1.- Clonaje del transportador de glucosa (saGLUT) del músculo esquelético de dorada.	131
4.4.2.- Expresión tisular del transportador de glucosa de dorada (saGLUT).	133
4.4.3.- Validación del anticuerpo para la determinación del transportador de glucosa de dorada (saGLUT).	134
4.4.4.- Efecto del ayuno sobre el transportador de glucosa del músculo esquelético de dorada (saGLUT).	134
4.4.5.- Efectos de la administración intraperitoneal de insulina sobre el transportador de glucosa (saGLUT) de dorada.	136

---

4.4.5.- Efectos de la administración de glucosa y arginina sobre el transportador de glucosa en el músculo blanco de dorada (saGLUT).	.....137
4.4.6.- Discusión.	.....138
<b>5.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>143</b>
<b>6.- BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>147</b>
<b>7.- PUBLICACIONES</b> .....	<b>165</b>

---



---

## **LISTA DE TABLAS**

---



---

<b>Tabla 1.1.-</b> Estructura primaria de las secuencias de aminoácidos del glucagón en peces. ....	17
<b>Tabla 3.1.1.-</b> Composición de dietas experimentales con diferentes perfiles de aminoácidos para trucha arco iris .....	33
<b>Tabla 3.1.2.-</b> Composición de dietas experimentales con diferentes perfiles de aminoácidos para dorada .....	34
<b>Tabla 3.1.3.-</b> Composición de aminoácidos en las dietas experimentales con diferentes perfiles de aminoácidos para trucha arco iris .....	35
<b>Tabla 3.1.4.-</b> Composición de aminoácidos en las dietas experimentales con diferentes perfiles de aminoácidos para dorada. ....	36
<b>Tabla 3.1.5.-</b> Composición de dietas experimentales con sustitución de la proteína animal por la proteína vegetal para trucha arco iris.....	38
<b>Tabla 3.1.6.-</b> Composición de dietas experimentales con sustitución de la proteína animal por la proteína vegetal para dorada.....	39
<b>Tabla 3.1.7.-</b> Composición de aminoácidos en las dietas experimentales con sustitución de la proteína animal por la proteína vegetal para trucha arco iris.....	40
<b>Tabla 3.1.8.-</b> Composición de aminoácidos en las dietas experimentales con sustitución de la proteína animal por la proteína vegetal para dorada.....	41
<b>Tabla 3.6.1.-</b> Protocolo del radioinmunoensayo de insulina. ....	49
<b>Tabla 3.7.1.-</b> Protocolo del radioinmunoensayo de glucagón. ....	50
<b>Tabla 3.11.1.-</b> Protocolo de la reacción de la transcriptasa reversa (RT).....	57
<b>Tabla 3.11.2.-</b> Secuencia de cebadores degenerados utilizados para la clonación y secuenciación del Glut4 de dorada. ....	58
<b>Tabla 3.11.3.-</b> Protocolo de las reacciones de PCR.....	59
<b>Tabla 3.11.4.-</b> Protocolo de ligación de los fragmentos ADN aislados.....	61
<b>Tabla 4.1.1.-</b> Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las trucha arco iris alimentadas con dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos .....	76
<b>Tabla 4.1.2.-</b> Composición corporal y utilización de nutrientes de trucha arco iris alimentadas con dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos .....	77
<b>Tabla 4.1.3.-</b> Características de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco de trucha arco iris alimentadas con dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos.....	80
<b>Tabla 4.1.4.-</b> Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las dorada alimentadas con dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos .....	85

---

---

<b>Tabla 4.1.5.-</b> Composición corporal y utilización de nutrientes de las doradas alimentadas con dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos .....	86
<b>Tabla 4.1.6.-</b> Características de los receptores de insulina en el músculo blanco de doradas alimentadas con dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos.....	89
<b>Tabla 4.1.7.-</b> Características de los receptores de IGF-I en el músculo blanco de doradas alimentadas con dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos.....	90
<b>Tabla 4.2.1.-</b> Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las truchas arco iris alimentadas con dietas experimentales de diferentes grados de sustitución de proteína animal por proteína vegetal .....	103
<b>Tabla 4.2.2.-</b> Composición corporal y utilización de nutrientes de las truchas arco iris alimentadas con dietas experimentales de diferentes grados de sustitución de proteína animal por proteína vegetal .....	104
<b>Tabla 4.2.3.-</b> Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las doradas alimentadas con dietas experimentales de diferentes grados de sustitución de proteína animal por proteína vegetal .....	108
<b>Tabla 4.2.4.-</b> Composición corporal y utilización de nutrientes en las doradas alimentadas con dietas experimentales de diferentes grados de sustitución de proteína animal por proteína vegetal .....	109
<b>Tabla 4.3.1.-</b> Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las doradas alimentadas con las dietas experimentales D0 y D75 .....	118
<b>Tabla 4.3.2.-</b> Características de los receptores de insulina e IGF-I en los músculo blancos de doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina después de 3 horas del tratamiento.....	123
<b>Tabla 4.4.1.-</b> Características corporales y parámetros en plasma de las doradas en el experimento de ayuno después de 2 semanas .....	135

---

---

## **LISTA DE FIGURAS**

---



<b>Figura 1.1.-</b> Principales países productores de trucha arco iris .....	5
<b>Figura 1.2.-</b> Principales países productores de dorada .....	6
<b>Figura 1.3.-</b> Representación esquemática de la estructura de la insulina de salmón.....	9
<b>Figura 1.4.-</b> Representación esquemática de la estructura del factor de crecimiento tipo insulina de salmón .....	10
<b>Figura 1.5.-</b> Representación esquemática de la estructura de los receptores de insulina e IGF-I.....	11
<b>Figura 1.6.-</b> Cascada de la transmisión de la señal a partir de los receptores de insulina e IGF-I.....	14
<b>Figura 1.7.-</b> Productos del gen de glucagón en mamíferos y peces en el páncreas y en el intestino.....	18
<b>Figura 1.8.-</b> Diagrama esquemático de la estructura de los transportadores de glucosa de difusión facilitada .....	21
<b>Figura 3.1.-</b> Representación de la ecuación básica del radioinmunoensayo .....	45
<b>Figura 3.2.-</b> Protocolo de semipurificación de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco .....	52
<b>Figura 3.3.-</b> Protocolo del ensayo de <i>binding</i> de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco .....	54
<b>Figura 4.1.1.-</b> Niveles plasmáticos de glucosa sanguínea de trucha arco iris alimentadas con las dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos.....	78
<b>Figura 4.1.2.-</b> Niveles de insulina plasmática de truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos.....	79
<b>Figura 4.1.3.-</b> Valores de glucagón en el plasma sanguíneo de las truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos.	79
<b>Figura 4.1.4.-</b> <i>Binding</i> específico de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco de trucha arco iris alimentadas con dietas de diferentes perfiles de aminoácidos.....	81
<b>Figura 4.1.5.-</b> Valores de glucosa en plasma sanguíneo de trucha arco iris en el experimento de alimentación forzada con las dietas TM y TMGlu .....	82
<b>Figura 4.1.6.-</b> Niveles del insulina en el plasma de trucha arco iris en el experimento de alimentación forzada con las dietas TM y TMGlu.....	83

---

---

<b>Figura 4.1.7.-</b> Valores de glucagón plasmático en trucha arco iris en el experimento de alimentación forzada con las dietas TM y TMGlu.....	84
<b>Figura 4.1.8.-</b> Niveles plasmáticos de glucosa de las doradas alimentadas con las dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos .....	87
<b>Figura 4.1.9.-</b> Niveles de insulina plasmática de doradas alimentadas con las dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos .....	88
<b>Figura 4.1.10.-</b> Valores de glucagón en el plasma sanguíneo de las doradas alimentadas con las dietas experimentales de diferentes perfiles de aminoácidos.....	88
<b>Figura 4.1.11.-</b> <i>Binding</i> específico de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco de las doradas alimentadas con dietas de de diferentes perfiles de aminoácidos.....	90
<b>Figura 4.1.12.-</b> Niveles de glucosa en plasma de las doradas en el experimento de alimentación forzada con las dietas DM y DMGlu.....	91
<b>Figura 4.1.13.-</b> Niveles del insulina en plasma de doradas en el experimento de alimentación forzada con las dietas DM y DMGlu.....	92
<b>Figura 4.1.14.-</b> Valores de glucagón plasmático de las doradas en el experimento de alimentación forzada con las dietas DM y DMGlu.....	93
<b>Figura 4.2.1.-</b> Niveles plasmáticos de glucosa sanguínea de trucha arco iris alimentadas con las dietas experimentales de sustitución de la proteína animal por proteína vegetal.....	105
<b>Figura 4.2.2.-</b> Niveles de insulina plasmática de truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales de sustitución de la proteína animal por proteína vegetal.	106
<b>Figura 4.2.3.-</b> Valores de glucagón en el plasma sanguíneo de las truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales de sustitución de la proteína animal por proteína vegetal .....	106
<b>Figura 4.2.4.-</b> Análisis de la expresión del ARNm del GLUT4 en el músculo blanco de trucha arco iris alimentadas con dietas de sustitución de la proteína animal por proteína vegetal .....	107
<b>Figura 4.2.5.-</b> Niveles plasmáticos de glucosa de las doradas alimentadas con dietas experimentales de sustitución de proteína animal por proteína vegetal .....	110
<b>Figura 4.2.6.-</b> Valores de insulina en el plasma sanguíneo de doradas alimentadas con las dietas experimentales de sustitución de proteína animal por proteína vegetal.....	111
<b>Figura 4.2.7.-</b> Niveles de glucagón plasmático de las doradas alimentadas con las dietas experimentales de sustitución de proteína animal por proteína vegetal .....	111

---

<b>Figura 4.3.1.-</b> Niveles plasmáticos de glucosa sanguínea de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina .....	119
<b>Figura 4.3.2.-</b> Niveles de insulina en el plasma sanguíneo de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina.....	120
<b>Figura 4.3.3.-</b> Niveles plasmáticos de glucagón en las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina.....	121
<b>Figura 4.3.4.-</b> Niveles del IGF-I en el plasma sanguíneo de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina .....	122
<b>Figura 4.3.5.-</b> <i>Binding</i> específico de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina.....	124
<b>Figura 4.4.1.-</b> Secuencias de nucleótidos y aminoácidos deducida del transportador de glucosa de dorada (saGLUT).....	131
<b>Figura 4.4.2.-</b> Alineamiento de aminoácidos del transportador de glucosa de dorada (saGLUT) con secuencias de las secuencias de transportadores de glucosa de diferentes especies .....	132
<b>Figura 4.4.3.-</b> Distribución tisular del saGLUT de dorada a partir de RT-PCR utilizando cebadores específicos de saGLUT y 18S .....	133
<b>Figura 4.4.4.-</b> Inmunodetección del saGLUT mediante western blot en el músculo rojo de dorada, utilizando diferentes concentraciones de proteínas y diluciones del anticuerpo btGLUT4. ....	134
<b>Figura 4.4.5.-</b> Efecto del ayuno de 2 semanas sobre los niveles de proteínas del saGLUT en los músculos rojos y blancos de dorada.....	135
<b>Figura 4.4.6.-</b> Efectos de la insulina sobre los niveles de proteína del saGLUT en los músculos rojos y blancos de dorada a las 3 horas de la inyección .....	136
<b>Figura 4.4.7.-</b> Efectos de la insulina sobre los niveles de proteína del saGLUT en los músculos rojos y blancos de dorada a las 24 horas de la inyección .....	136
<b>Figura 4.4.8.-</b> Efectos de la glucosa y arginina sobre los niveles de proteínas del saGLUT en los músculos blancos de dorada.....	137

---



---

# **1.- INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1.- Acuicultura y la nutrición en peces.

La producción de la acuicultura constituye un aporte importante de la demanda de peces y organismos acuáticos para consumo humano. Así, en el 2002 la contribución de la acuicultura fue del 30 % del total consumido, y se calcula que en el 2015 podría llegar hasta al 41 % (FAO, 2004). Este aumento en la producción acuícola estaría limitado por el alimento requerido para sostener estos incrementos. Actualmente, en las dietas utilizadas, la principal fuente de proteínas es la harina de pescado, lo cual eleva el costo de elaboración de la dieta ya que proviene de la explotación de los recursos marinos naturales. El uso de fuentes de proteínas alternativas o la mejora del aprovechamiento de los carbohidratos (Baños et al., 1998) son estrategias que podrían reemplazar o sustituir en parte a la harina de pescado, y así evitar la dependencia de la acuicultura de esta fuente de proteína animal. Además, de forma indirecta disminuiría el esfuerzo pesquero sobre los bancos de peces naturales y evitaría la transformación innecesaria en algunos casos de proteínas en forma de harina y promovería el consumo directo de las especies explotadas.

Los peces se caracterizan por requerir altos niveles de proteínas en la dieta, y los requerimientos energéticos de los peces, debido a su poiquilothermia, son más bajos en comparación a los animales homeotermos, ya que estos últimos gastan mucha energía en mantener su temperatura corporal, una vez cubierta sus necesidades estructurales, la proteína restante es dirigida al catabolismo (Walton y Cowey, 1982). Estudios previos, sobre el reemplazo parcial o total de la harina de pescado en la dieta de la trucha arco iris, proponen la posibilidad de sustituir hasta un 66% de contenido de proteína animal por proteínas de origen vegetal, sin causar efectos negativos en el crecimiento de los animales (Gomes et al., 1995; Kaushik et al., 1995). Sin embargo, los niveles de sustitución pueden variar mucho en función de la especie y la composición de la dieta. Las fuentes vegetales de nutrientes incluidas en las dietas de peces cultivados, contienen una gran variedad de sustancias “antinutricionales” que interfieren en el aprovechamiento del alimento. Además, los ingredientes vegetales suelen ser deficientes en algunos aminoácidos (Clarke y Wiseman, 2000), por lo que la formulación de las dietas debe compensar posibles desequilibrios en la proporción de aminoácidos. Muchos de estos compuestos como el gossypol, ácido fítico, inhibidores

de proteasas y saponinas pueden ser degradados o inhibidos con tratamientos previos a su utilización. Algunos tratamientos que se aplican son la defitinización (Vielma et al., 2002), procesos de calor, así también por la interacción entre ellas mismas (Francis et al., 2001).

El aumento de la incorporación de proteína vegetal en la dieta de la trucha arco iris, podría estar también favorecido por la suplementación de la dieta con algunos amino ácidos esenciales, como la lisina que aumenta la digestibilidad de los componentes de las dietas (Cheng et al., 2003a; Cheng et al., 2003b). Según Kim (1997), las dietas con proporciones de proteínas menores (básicamente caseína y gelatina) y suplementadas con algunos aminoácidos (arginina y metionina), cubren los requerimientos de aminoácidos en trucha arco iris. Estudios en *Ictalurus punctatus* de dietas con insuficiencia de arginina indican que la suplementación con ácido glutámico favorece la síntesis de arginina endógena, cubriendo los requisitos nutricionales de los animales. Aunque en algunos casos, el aumento del ácido glutámico en la dieta también podría ser un factor del incremento de la excreción de amonio de los animales. Debido a que por una serie de transformaciones, el ácido glutámico puede ser utilizado como sustrato para la formación endógena de arginina a través del ciclo de la urea, que incrementaría la formación de amonio (Buentello y Gatlin, 2001).

A pesar de estos estudios, la información es limitada por ejemplo para la dorada, por lo que es de gran interés estudiar, el efecto de la composición de la dieta sobre el crecimiento y parámetros fisiológicos de los animales, que permita obtener el conocimiento necesario para obtener o mejorar el rendimiento actual en el cultivo de estas especies.

### **1.1.1.- Generalidades sobre la trucha arco iris.**

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), es un pez perteneciente a la familia Salmonidae, orden Salmoniformes y clase Actinopteri. La trucha arco iris es nativa de la parte occidental de Norteamérica, desde Alaska hasta México. Desde 1874, la trucha arco iris fue introducida para el cultivo y uso recreacional en las aguas de todos los continentes excepto en la Antártida. Según la

FAO en 2002, la producción de trucha arco iris fue proveída por 64 países, de los cuales destacan los países Europeos, Norteamericanos, Chile, Japón y Australia (Figura 1.1).



**Figura 1.1.-** Principales países productores de trucha arco iris (FAO, 2002)

La naturaleza anádroma de la trucha arco iris le permite ocupar diferentes habitats, vive en mar abierto y para el desove se traslada a zonas de flujo rápido del agua y muy oxigenadas de los ríos, aunque también puede habitar permanentemente en lagos. La trucha arco iris tiene un crecimiento rápido, en 3 años consigue entre 7 y 10 kg en el mar, y los 4,5 kg en agua dulce, puede vivir en un amplio rango de temperatura (0-27 °C), pero el desove y desarrollo de los huevos se da entre los 9-14 °C. La temperatura óptima para el crecimiento de la trucha arco iris está por debajo de los 21 °C. La temperatura y disponibilidad del alimento influyen sobre el crecimiento y la maduración sexual de los individuos, siendo usualmente entre el tercer y cuarto año (Cowx, 2005).

La formulación y procedimiento de elaboración de las dietas para la alimentación de la trucha arco iris han evolucionado a lo largo del tiempo, los procesos de compactación del alimento (pellet) permiten la alimentación en los diferentes estadios de vida de los animales. En cultivo, la dieta posee una energía alta por el contenido de lípidos elevado (16-22%), el contenido de proteína de la dieta oscila entre los 35 y 45%. En la elaboración de la dieta se utiliza harina de pescado, aceite de

pescado, granos vegetales y otros componentes. La trucha arco iris posee una tasa de conversión alimenticia cercana a la proporción 1:1 (Cowx, 2005).

### 1.1.1.- Generalidades sobre la dorada.

La dorada (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758), es una especie que pertenece a la familia de los Espáridos, orden Perciformes y clase Actinopteriĝios. La dorada es común del mar mediterráneo, aunque también se encuentra distribuida a lo largo de la costa oriental del Atlántico desde Senegal hasta Gran Bretaña, y raramente en el Mar Negro. Hasta el desarrollo de los sistemas de cultivos intensivos en los años 80 en los diferentes países del mediterráneo (Figura 1.2), tradicionalmente, el cultivo de dorada se realizó en lagunas costeras y estanques de agua de mar. La producción a gran escala de dorada fue conseguida por España, Italia y Grecia entre 1988 y 1989. Esta especie presentó una alta adaptabilidad a las condiciones de cultivo del sistema intensivo, tanto en estanques como en jaulas flotantes, así pues, la producción anual de la dorada se incrementó regularmente hasta el 2000, cuando el pico de producción alcanzó las 87 000 toneladas (Colloca y Cerasi, 2005).



**Figura 1.2.-** Principales países productores de dorada (FAO, 2002)

La dorada es una especie de naturaleza euritermia y eurisalina, habita zonas litorales en ambiente marinos, lagunas costeras y zonas de estuarios en particular durante las primeras fases del ciclo de vida. En la vida silvestre, la dorada nace en mar abierto entre Octubre y Diciembre, los juveniles típicamente migran hacia las zonas costeras a principios de la primavera, porque la dorada es muy sensible a las bajas temperaturas (letal a 4° C), y a finales de otoño vuelve a mar abierto. En el mar abierto, la dorada es encontrada usualmente sobre rocas o campos de *Posidonea oceanica*, pero es capturada generalmente en fondos arenosos. La dorada es una especie hermafrodita proterándrica, la madurez sexual se alcanza en machos a los 2 años (20-30 cm) y las hembras maduran entre el 2-3 año (33-40 cm). La dorada es un pez carnívoro que presenta una diversidad alimenticia que está relacionada con la talla de los individuos; los juveniles se alimentan de poliquetos y pequeños crustáceos, y los animales más grandes de moluscos, lamelibranquios, gasterópodos y crustáceos (Arias, 1980; Colloca y Cerasi, 2005). En el cultivo de dorada, las dietas comerciales están basadas en harina de pescado, y el contenido de proteína oscila entre el 40 y el 48,5%, y las dietas poseen un alto nivel de lípidos (15-24%) (Capilla et al., 2002; Company et al., 1999; Marcouli et al., 2004; MartiPalanca et al., 1996).

## **1.2.- Sistema de insulina, factores de crecimiento tipo insulina (IGF-I) y glucagón.**

El control endocrino desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento y la utilización de los nutrientes en peces (Duncan et al., 1998; Mommsen, 2001; Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999; Peter y Marchant, 1995). En mamíferos, la insulina actúa principalmente como hormona anabólica y estimula el acúmulo de reservas energéticas en diferentes tejidos. Incrementa la captación postprandial de glucosa en el hígado y el músculo esquelético así como la captación de glucosa y ácidos grasos en el tejido adiposo. Además, la insulina acelera la incorporación de los aminoácidos en proteínas en diversos tejidos, mientras que inhibe la gluconeogénesis y activa la síntesis de glucógeno. A nivel del metabolismo lipídico, la insulina es un activador de la lipogénesis y un importante inhibidor de la movilización lipídica (Hazelwood, 1993). En mamíferos se comprueba que muchos de los efectos de la insulina se dan a través de las cascadas de señalización intracelulares, que activan determinadas proteínas, muchas de ellas enzimas implicados en la regulación del metabolismo, y que estimulan las tasas de transcripción de diversos genes (Lloyd et al., 1987; Miller, 1989; Standaert y Pollet, 1988).

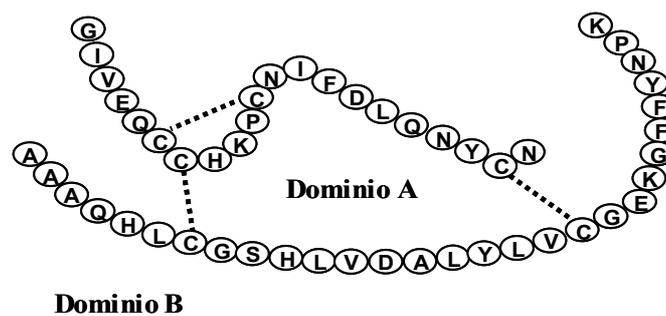
En mamíferos, la insulina y glucagón son hormonas secretadas en respuesta a la ingesta de nutrientes y la acción de hormonas gastrointestinales. Ambas hormonas pancreáticas coordinan la disposición de los nutrientes procedentes del alimento, así como el flujo de sustratos endógenos mediante acciones sobre el hígado, tejido adiposo y masa muscular. En teleósteos existen evidencias de que los niveles plasmáticos de insulina y glucagón incrementan tras la ingestión del alimento (Navarro et al., 1993; Navarro y Gutiérrez, 1995). Sin embargo, la respuesta de estas dos hormonas pancreáticas a diferentes dietas está muy poco estudiada en peces.

### **1.2.1.- Insulina.**

La insulina es una hormona pancreática que está muy conservada a lo largo de la evolución. En peces, se han descrito dos isoformas aisladas en diferentes especies, pero aún se desconoce las posibles diferencias funcionales entre estas 2 isoformas (Conlon, 2001; Mommsen et al., 2001b). La insulina es sintetizada como un precursor de cadena

única denominado preproinsulina en el las células  $\beta$  del páncreas. El fragmento N-terminal de 24 aminoácidos es eliminado enzimáticamente durante su paso por el retículo endoplasmático dando lugar a la proinsulina. La proinsulina es una molécula formada por las cadenas A y B de la insulina madura unidas por un péptido C. Este péptido C enlaza el extremo carboxi-terminal de la cadena B con el extremo N-terminal de la cadena A, y facilita la formación de los puentes disulfuro. Por eliminación proteolítica del péptido C, se genera la insulina madura, que tiene un peso molecular de 5600 Da aproximadamente (Hazelwood, 1993; Mommsen y Plisetskaya, 1991). En algunos peces, el péptido C se continúa procesando y es secretada finalmente aunque se desconoce su función (Conlon y Thim, 1986).

Las insulinas de peces presentan características comunes a la del resto de vertebrados, tienen de 51 a 58 aminoácidos, formados por una cadena A de 21 aminoácidos aproximadamente y una cadena B de 29 aminoácidos (Figura 1.3), las cuales están unidas mediante dos puentes disulfuro intercatenarios y un tercer puente disulfuro intracatenario que determina la estructura terciaria de esta proteína (Plisetskaya et al., 1994). La actividad biológica de la insulina se encuentra en la posición 22-26 de la cadena B (Bornfeldt et al., 1991; Simon, 1989).

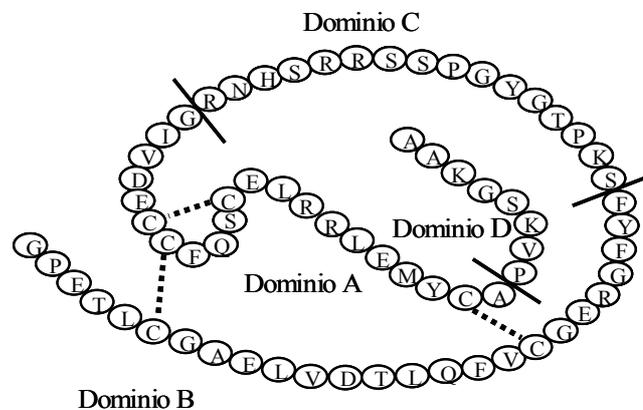


**Figura 1.3.**- Estructura de la insulina de salmón. Las líneas punteadas indican la posición de los puentes disulfuro (Modificado de Plisetskaya et al., 1994).

La familia de genes a la que pertenece la insulina es un grupo antiguo y muy diverso que incluye a los factores de crecimiento tipo insulina IGFs (IGF-I y IGF-II), el factor de crecimiento nervioso NGF y otras moléculas afines a la insulina de moluscos (Blundell y Humbel, 1980; Smit et al., 1988).

### 1.2.2.- Factores de crecimiento tipo insulina (IGF-I).

El IGF-I es una proteína monocatenaria de peso molecular de 7500 Da aproximadamente. El IGF-I al igual que el IGF-II, está constituido por cuatro dominios (B,A,C y D), que están relacionados estructuralmente con la proinsulina. El extremo amino-terminal de la cadena B está separado de la cadena por un dominio de conexión corto (dominio C). Los IGFs también contienen un dominio D en el extremo carboxi-terminal. La estructura terciaria del IGFs se mantiene por 3 puentes disulfuros en las mismas posiciones de la insulina (Figura 1.4).



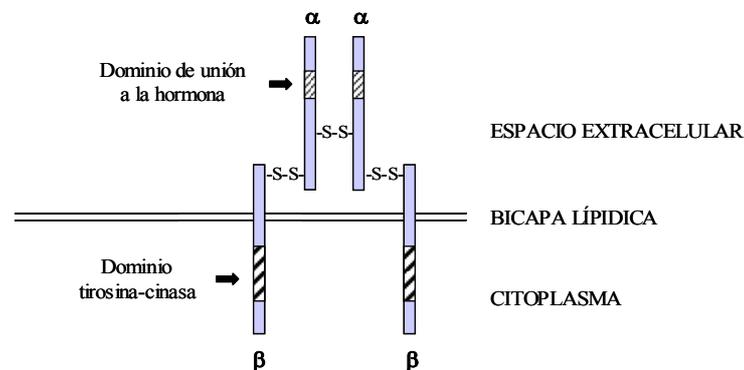
**Figura 1.4.-** Estructura del factor de crecimiento tipo insulina de salmón. Las líneas punteadas indican la posición de los puentes disulfuro (Modificado de Plisetskaya et al., 1994).

A diferencia de la insulina, que es sintetizada únicamente en el páncreas, el hígado es el principal órgano productor de IGF-I en todos los vertebrados estudiados hasta ahora, pero también el IGF-I es sintetizado localmente en gran cantidad de tejidos, de manera que el IGF-I presenta importantes funciones no solo a nivel endocrino sino también autocrino y paracrino (Daughaday et al., 1985; Humbel, 1990; Stewart y Rotwein, 1996).

### 1.2.3.- Receptores de insulina e IGF-I.

Los receptores de insulina (IR) e IGF-I (IGF-IR) son glucoproteínas de peso molecular aparente de 350 kDa, que forman parte de la superfamilia de receptores

tirosina quinasa. Cada receptor consiste de dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  que están unidos por puentes disulfuros que forman el heterotetrámero  $\alpha\beta-\alpha\beta$  (Figura 1.5). Las subunidades  $\alpha$  son las que contienen los sitios de unión (*binding sites*), y las subunidades  $\beta$  el dominio tirosina quinasa (Stewart y Rotwein, 1996). El ligando (insulina o IGF-I) causa la estimulación de la tirosina quinasa que es iniciada por la autofosforilación del receptor. Las subunidades  $\alpha$  de los receptores de insulina tienen un peso molecular de 130 a 150 kDa en aves y mamíferos, además de estar localizadas totalmente en el dominio extracelular. En el ovario de carpa, las subunidades  $\alpha$  de los IR e IGF-IR poseen un peso molecular de 125 y 120 kDa respectivamente (Maestro et al., 1997). Mientras que en el hígado de lampreas las subunidades  $\alpha$  tienen un peso de 130 kDa (Lappova y Leibush, 1995). En mamíferos, las subunidades  $\beta$  del IR poseen un peso molecular que va desde los 90 a 95 kDa. La subunidad  $\beta$  está localizada en la región transmembrana y en el dominio intracelular y es responsable de la actividad tirosina quinasa (Ullrich et al., 1986).



**Figura 1.5.-** Representación esquemática de la estructura de los receptores de insulina e IGF-I (Modificado de Stewart y Rotwein, 1996).

Los receptores de insulina e IGF-I son similares estructuralmente y poseen más de un 50 % de homología en la secuencia de aminoácidos. El dominio tirosina-quinasa es el que presenta mayor semejanza entre ambos receptores con un 84 % (Czech, 1989; Ullrich et al., 1986). Debido a las similitudes de las secuencias existentes entre la insulina y el IGF-I, se ha observado que existen uniones cruzadas entre ellos y sus receptores, pero siempre la afinidad del péptido a su propio receptor es superior a la

afinidad por el otro receptor. Así, la insulina se une con mayor afinidad a su receptor que el IGF-I, y la insulina se une con menor afinidad al receptor del IGF-I que el IGF-I (Cohick y Clemmons, 1993; Jones y Clemmons, 1995).

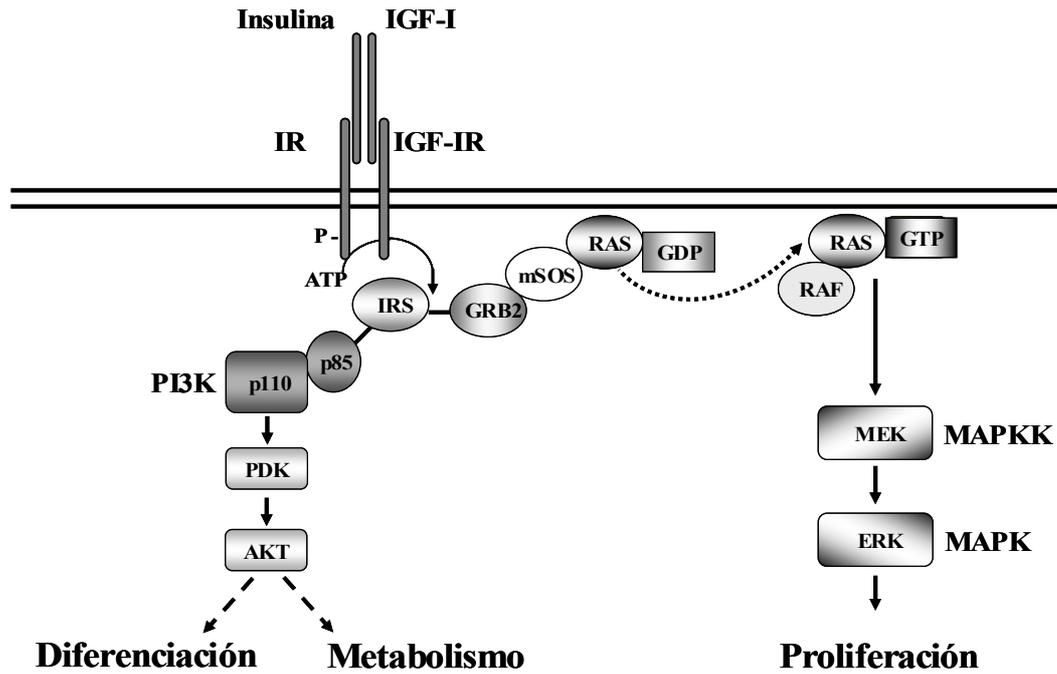
La especificidad y la afinidad de la unión de la insulina ó el IGF-I a sus receptores determinan el proceso de activación y la respuesta celular. Estos dos parámetros vienen definidos por las propiedades estructurales del dominio de unión cuando el ligando es presentado al receptor. Estudios de unión (*binding*) fueron los que demostraron la existencia de receptores de IGF-I diferentes al de insulina (Rechler et al., 1980). Estudios de *binding* normalmente dan como resultado curvas *Scatchard*, que ha sido el análisis más utilizado para el estudio de las propiedades del *binding* de los receptores de insulina e IGF-I (Gutiérrez et al., 1989; Gutiérrez et al., 1991). Las curvas *Scatchard* permiten calcular el binding específico (Bsp), el número de receptores (Ro) y la constante de disociación (Kd, inversamente proporcional a la afinidad). Altos valores de *binding* se obtienen cuando el número de receptores y la afinidad son altos. Estudios del *binding* del receptor de insulina en el músculo blanco de peces muestran que el binding es muy inferior al encontrado en los músculos de mamíferos y aves. El músculo de peces contiene entre 40 y 300 f mol/mg de receptores de insulina (Navarro et al., 1999; Párrizas et al., 1994c; Párrizas et al., 1995b), mientras en mamíferos el valor Ro está alrededor de los 1000 fmol/mg. Estructuralmente, los receptores de insulina están muy conservados a lo largo de la evolución (Muggeo et al., 1979a; Muggeo et al., 1979b). Receptores funcionales de insulina e IGF-I se han identificado en gran cantidad de tejidos de diversas especies (Drakenberg et al., 1993; Gutiérrez y Plisetskaya, 1991; Navarro et al., 1999; Planas et al., 2000c). En peces, al contrario de lo que se ha descrito en mamíferos (Zorzano et al., 1988), el número de receptores de IGF-I es superior al número de receptores de insulina (Castillo et al., 2002; Párrizas et al., 1995b; Párrizas et al., 1995c; Planas et al., 2000b).

En relación a la regulación de los receptores de insulina e IGF-I, los primeros estudios de Ablett y col., (1983) y Gutiérrez y col., (1991) describen que tratamientos alimentarios modifican las respuestas de los receptores de insulina en el hígado y en el tejido muscular de peces de forma paralela a los cambios de la insulina plasmática. Estudios de Baños y col., (1998) en trucha arco iris alimentadas con dietas enriquecidas con carbohidratos también describen incrementos en los niveles plasmáticos de glucosa,

insulina y los receptores de insulina en el músculo. Sin embargo, Capilla y colaboradores (2003) utilizando dietas, también con diferentes contenidos de carbohidratos, no observan cambios en la glucosa e insulina circulante, así como a nivel de receptores en el músculo. Por lo que, el efecto sobre los receptores de insulina estaría en función al grado de cambio de la composición de la dieta. Estudios llevados a cabo en carpa y trucha indican que el ayuno causa una disminución en los receptores de insulina tanto en el músculo como en el tejido adiposo (Párrizas et al., 1994a; Planas et al., 2000c).

Experimentos con inyecciones de arginina (inducción de hiperinsulinemia) o administración de dietas que producen el aumento de la insulina plasmática provocan un incremento (*up-regulation*) en el número de receptores de insulina en el músculo esquelético y en el tejido adiposo (Gutiérrez et al., 1991; Párrizas et al., 1994b; Planas et al., 2000c). Algunos experimentos con carpas y truchas en situaciones de hiperinsulinemia, muestran una disminución del número de receptores de insulina del músculo rojo (Baños et al., 1997). En experimentos “*in vitro*” con cardiomiocitos de trucha también se ha observado que el *binding* de insulina e IGF-I disminuyen (*down-regulation*), cuando las células son incubadas en altas concentraciones de insulina e IGF-I (Moon et al., 1996). Estos resultados demuestran la existencia de mecanismos que regulan los receptores de insulina e IGF-I por sus propios ligandos, y cuya dirección de la regulación depende del tejido (Gutiérrez et al., 2005).

A nivel de señalización intracelular, la unión del ligando, insulina o IGF-I a su receptor, produce la autofosforilación de la subunidad  $\beta$  (Pirola et al., 2004). La autofosforilación del IR y IGF-IR provoca la fosforilación posterior de otros substratos intracelulares y segundos mensajeros (Figura 1.6), que se han estudiado en diferentes especies de teleósteos (Gutiérrez et al., 1993; Gutiérrez et al., 1995; Maestro et al., 1997; Párrizas et al., 1994c), y de los cuales, el substrato del receptor de insulina (IRS) sería el inductor de la formación de complejos intracitoplasmáticos diversos responsables de la estimulación de las diferentes vías de señalización (Baumann y Saliel, 2001; Butler et al., 1998; Gutiérrez et al., 2005)



**Figura 1.6.-** Cascada de la transmisión de la señal a partir de los receptores de insulina e IGF-I (Modificado de Gutiérrez et al., 2005).

### 1.2.5.- Efectos biológicos de la insulina y el IGF-I.

En mamíferos, la insulina es la principal hormona anabólica y anticatabólica que estimula la captación de glucosa postprandial en el hígado y en el músculo esquelético, así como también la captación de glucosa y ácidos grasos libres en el tejido adiposo. La insulina acelera la incorporación de aminoácidos en varios órganos, en especial en el hígado y el tejido muscular, donde también activa la síntesis de glucógeno y la lipogénesis. Esta hormona juega un papel importante en el control de los niveles de glucosa, lo cual es necesario para el funcionamiento normal del sistema nervioso (Mommsen y Plisetskaya, 1991).

En muchos aspectos, la insulina de peces tiene un papel similar a la de la insulina de mamíferos. Los principales secretagogos de la insulina en peces son los mismos que en los mamíferos, pero en peces algunos aminoácidos poseen un efecto estimulador sobre la secreción de la insulina mayor que la glucosa (Ince, 1979; Matty y Lone, 1985; Navarro et al., 2002; Plisetskaya et al., 1991). También está descrito que la insulina en plasma varía en función del estado nutricional, de manera que incrementa

tras la ingesta del alimento y disminuye en respuesta al ayuno (Navarro et al., 1993; Navarro y Gutiérrez, 1995).

En todos los peces estudiados, los niveles de insulina se incrementan tras la ingesta del alimento, los niveles de insulina en plasma se incrementan entre la primera y tercera hora de la post ingesta del alimento, y disminuye progresivamente hasta los niveles basales a las 24 horas (Navarro et al., 1993; Sundby et al., 1991). En peces, la concentración de la insulina en el sistema circulatorio está dentro del rango de 1 a 30 ng/ml de plasma. Aunque en una misma especie, la concentración de la insulina varía en función de las condiciones fisiológicas y ocasionalmente en función del origen de la sangre estudiada (vena porta o venas periféricas) (Mommensen y Plisetskaya, 1991; Navarro y Gutiérrez, 1995). En algunos peces, dietas enriquecidas con carbohidratos también incrementan los niveles de insulina en plasma (Párrizas et al., 1994a), pero estos efectos no siempre son observados (Capilla et al., 2003; Novoa et al., 2004). Estudios “*in vivo*” con tratamientos de insulina e inyecciones de arginina (potente estimulador de la secreción de insulina), muestran el efecto hipoglucémico de la insulina (Navarro et al., 2002). Estudios *in vitro* en células musculares y adipocitos de peces han demostrado que la insulina estimula la captación de glucosa y alanina (Castillo et al., 2004; Capilla et al., 2004), e incrementa la deposición de glucógeno e inhibe la glucogenolisis en hepatocitos (Foster y Moon, 1989; Foster y Moon, 1990).

En mamíferos, el IGF-I posee efectos diversos sobre el crecimiento y la diferenciación celular (Le Roith et al., 1997), y cumple un papel metabólico importante similar al de la insulina en tejidos periféricos, particularmente en el músculo esquelético (Duclos et al., 1991; Jones y Clemmons, 1995). En peces, el IGF-I juega un papel importante en la regulación del crecimiento (Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999), estimulando la proliferación de diversos tipos celulares (Duan y Hirano, 1992; Negatu y Meier, 1995), como lo han comprobado Castillo y colaboradores (2004) en células musculares en cultivo, donde han descrito que el IGF-I estimula la proliferación celular, la captación de glucosa y la captación de alanina en mayor medida que la insulina, así como la captación de glucosa en adipocitos (Capilla et al., 2004a).

En dorada, Mingarro y colaboradores (2002), han observado que existe una correlación directa entre los niveles plasmáticos de IGF-I y las tasas de crecimiento, y

que existe una regulación estacional en los niveles de IGF-I en plasma. Los IGFs circulan por la sangre unidos a proteínas denominadas proteínas de unión a los IGFs (IGFBPs), cuya función principal es la de modular los efectos biológicos de los IGFs a nivel local (Bach y Rechler, 1995; Baxter, 1993; Cohick y Clemmons, 1993; Jones y Clemmons, 1995). La unión del IGF-I a las IGFBPs tiene como resultados prolongar la vida media del IGF-I y por otro lado limitar sus efectos biológicos reduciendo la accesibilidad al receptor (Duan y Xu, 2005; Ferry et al., 1999; Siharath et al., 1995). En peces, se ha demostrado la presencia de 3 formas diferentes de IGFBPs tanto en sangre como en diferentes tejidos (Kelley et al., 1992; Niu y LeBail, 1993; Siharath et al., 1996; Siharath et al., 1995). En peces, la forma predominante tiene entre unos 40-50 kDa y se ha visto que está regulada por la GH, por lo que se le ha correlacionado con el IGFBP3 de mamíferos (Kelley et al., 1992; Siharath y Bern, 1994). Las otras dos formas, de 29 y 31 kDa, se han relacionado con los IGFBP-1 y -2 respectivamente. Los niveles de IGFBPs observados en mamíferos son más altos a los encontrados en peces, debido quizás a que los mamíferos presentan niveles circulantes de IGFs superiores a la de los peces (Kelley et al., 2002).

Se ha demostrado que tanto la insulina como el IGF-I, poseen efectos importantes sobre la regulación de la osmolaridad (Epple y Brinn, 1987; Madsen y Bern, 1993; McCormick, 1996), así como a nivel reproductivo, regulando los efectos esteroideogénicos de la hormona luteinizante (LH) en células ováricas de carpa (Maestro et al., 1997) o induciendo la maduración del ovocito (Kagawa et al., 1994).

### 1.2.6.- Glucagón.

El glucagón es una hormona peptídica de cadena sencilla de 29 aminoácidos que tiene un peso molecular aproximado de 3485 Da, y cuya secuencia ha sido muy conservada a lo largo de la evolución (Navarro et al., 1991). En peces se han identificado la secuencia de aminoácidos del glucagón en diferentes especies (Plisetskaya y Mommsen, 1996a). Los análisis de las secuencias de aminoácidos del glucagón en teleósteos muestran que 12 aminoácidos son invariantes en todas las especies y otros 14 aminoácidos están presentes en la mayoría de especies y un solo aminoácido es alternativo en la misma posición (Tabla 1.1).

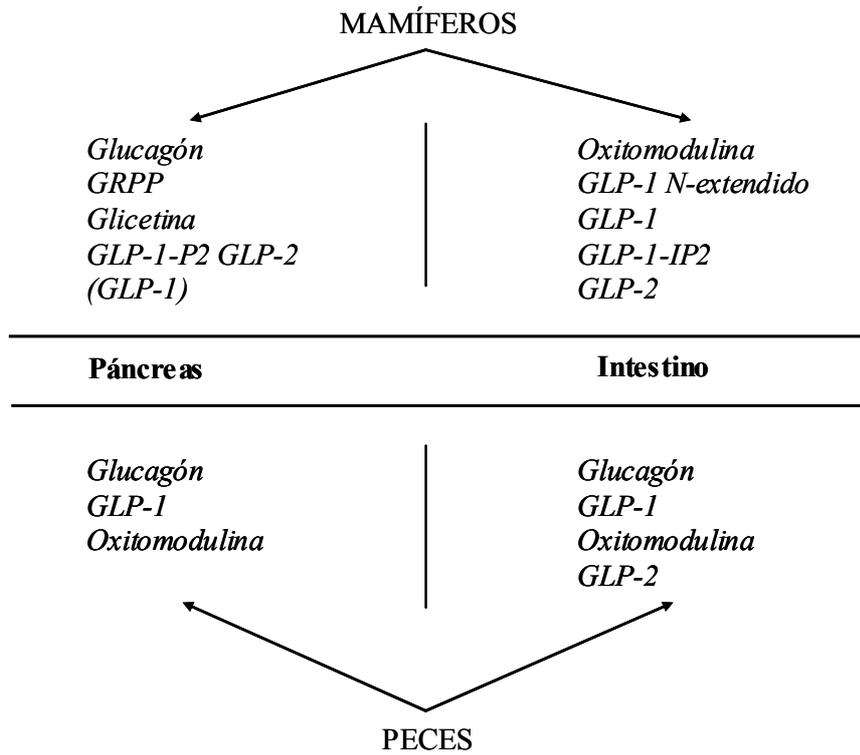
**Tabla 1.1.- Estructura primaria de las secuencias de aminoácidos del glucagón en peces.**

	1	10		20		29
Coho salmon	HSEGT	FSNDY	SKYQE	ERMAQ	DFVQW	LMNS
Anguila	HSQGT	FTNDY	SKYLE	TRRAQ	DFVQW	LMNS
Atún	HSEGT	FSNDY	SKYLE	TRRAQ	DFVQW	LKNS
<i>Aminoácidos del glucagón en teleósteos</i>						
	1	10		20		29
Más abundante	SE T	TS	LD	RR Q	D QW	MNT
Invariantes	H--G-	F--DY	SKY--	Ø--A-	-FV--	L---
Alternancia mayor	TQ M	SN	QE	KQ K	E ET	KSS

Ø Aminoácido variable

Tabla modificada de Plisetskaya y Mommsen (1996).

El glucagón forma parte de una familia de péptidos estructuralmente relacionados que son producidos especialmente por el páncreas y también en el intestino y cerebro. En mamíferos como en peces, los miembros de la familia del glucagón son derivados del proglucagón que es expresado en varios tejidos y que por procesos proteolíticos dan lugar a una serie de hormonas de acción específica (Figura 1.7). En mamíferos, el gen del glucagón codifica una serie de péptidos en los que se incluye el glucagón y dos *glucagón like peptides 1 y 2* (GLPs). Estos péptidos, especialmente el glucagón, muestran alto grado de conservación estructural durante la evolución de los vertebrados. En peces, el gen del glucagón por la pérdida de esta región específica no codifica el GLP-2 en el páncreas endocrino de los peces (Plisetskaya, 1995). Sin embargo, la región que codifica el GLP-2 está conservada en el intestino (Plisetskaya y Mommsen, 1996a).



**Figura 1.7.-** Productos del gen de glucagón en mamíferos y peces en el páncreas y en el intestino (Modificado de Plisetskaya y Mommsen, 1996).

**1.2.6.- Efectos biológicos del glucagón.**

En mamíferos, el efecto del glucagón se ha estudiado en gran detalle en diversos estudios (Plisetskaya y Mommsen, 1996a), y se conoce que interviene en los procesos glucogenolítico y gluconeogénicos, participa en el control de los lípidos, urea y en el metabolismo de los aminoácidos. El glucagón también suprime la ingesta del alimento (Morley, 2001) y acelera la saciedad postprandial (Geary et al., 1993).

En peces, el glucagón también está involucrado en múltiples procesos. En diferentes especies, los estudios sobre la función del glucagón señalan que esta hormona está implicada en la regulación de la glucosa, el glucógeno hepático y de algunas enzimas hepáticas; así como en las vías glucogenolíticas, gluconeogénicas y la glucólisis (Plisetskaya y Mommsen, 1996b). Experimentos “*in vivo*” muestran que el glucagón es hiperglucémico en la mayoría de estudios, y estimula el transporte de aminoácidos hacia el hígado y otros tejidos de anguila (Inui y Ishioka, 1983; Inui y

Yokote, 1977), incrementa la excreción de amonio (Mommsen et al., 1992), está involucrado en la regulación del metabolismo lipídico estimulando a la triacilglicerol lipasa en salmónidos (Sheridan, 1994) e incrementa la actividad lipolítica en adipocitos de dorada (Albalat et al., 2005). Además, dependiendo de la concentración de glucosa, el glucagón estimula la expresión del ARNm de las preprosomatostatinas (Ehrman et al., 2005). La unión de glucagón marcado  $I^{125}$  a los hepatocitos de anguila y pez gato sugieren la presencia de un receptor hepático específico del glucagón en ambas especies (Navarro y Moon, 1994; Moon, 2004); mientras que en trucha arco iris donde no se ha podido observar la presencia de este receptor, el efecto hiperglucémico del glucagón es inferior (Mommsen y Moon, 1989; Navarro y Moon, 1994).

En los peces estudiados hasta el momento, los niveles de glucagón oscilan entre los 0,01 y 4 ng/ml en plasma ( Gutiérrez et al., 1986; Carneiro et al., 1993; Plisetskaya y Mommsen, 1996b). La respuesta postprandial del glucagón presenta un patrón de incremento bifásico. En lubina, los dos picos de glucagón fueron observados a las 3 y 9 horas de la post ingesta (Pérez et al., 1988), y en trucha entre las 1-2 y 9-11 horas (Navarro et al., 1993; Novoa et al., 2004). La disminución del glucagón entre los 2 picos puede ser que este asociada con el efecto inhibitorio de la insulina sobre la secreción del glucagón (Navarro et al., 1993; Pérez et al., 1988). Los estudios sobre la regulación de la secreción postprandial del glucagón en peces son escasos y contradictorios. En bacalao y lubina, la alimentación con dietas con contenidos diferentes de carbohidratos y fuentes de proteínas no parecen afectar la respuesta del glucagón plasmático tras la ingesta de la alimentos (Hemre et al., 1990; Pérez et al., 1988). Mientras que Harmon y colaboradores (1991), señalan a diferencia de mamíferos, un incremento en el glucagón en plasma después de una inyección de glucosa. En trucha arco iris, el incremento postprandial de glucosa por dietas enriquecidas con carbohidratos provoca la disminución de la secreción de glucagón (Novoa et al., 2004).

El estado nutricional es otro factor importante que regula la respuesta del glucagón. En algunas especies, el ayuno de un corto período de tiempo, provoca el incremento de los niveles de glucagón del plasma (Navarro y Gutiérrez, 1995). En *Dicentrarchus labrax* y *Salmo trutta*, el aumento del glucagón plasmático ha sido observado después de un ayuno de 4 a 5 días (Navarro et al., 1992), y de 2 días en

*Brycon cephalus* (Figueiredo-Garutti et al., 2002). Estos incrementos transitorios del glucagón se han interpretado como señales para activar la degradación de las reservas durante los períodos de ayuno corto (Navarro et al., 1992). Sin embargo, al contrario que en mamíferos, el ayuno prolongado produce una disminución de los niveles de glucagón, que a pesar de todo, permite la movilización de las reservas energéticas, debido a que el ayuno produce una disminución más acusada en los niveles de insulina que en los de glucagón (Navarro y Gutiérrez, 1995). No obstante, se conoce muy poco de la respuesta del glucagón en dorada.

### **1.3.- Transporte de glucosa.**

#### **1.3.1.- La glucosa en peces.**

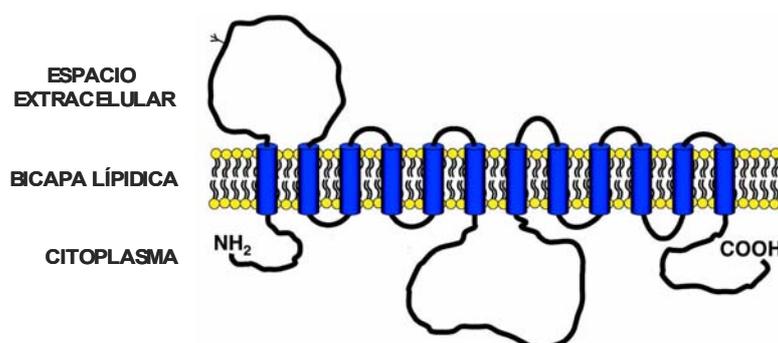
En muchos vertebrados, especialmente en mamíferos, la glucosa es la fuente principal de energía para las células (Stephens y Pilch, 1995) y constituye la molécula central en el metabolismo (Hemre et al., 2002). Sin embargo en peces, se ha hablado de la poca “tolerancia” a la glucosa en estos animales, debido a la escasa utilización y capacidad de almacenamiento de la glucosa encontrados en estudios con dietas de alto contenido de carbohidratos o tratamientos con glucosa. En dichos estudios se observa una reducción del crecimiento, hiperglucemia prolongada de los animales e incrementos elevados del glucógeno hepático (Hemre et al., 2002; Krogdahl et al., 2005; Legate et al., 2001; Moon, 2001; Peres et al., 1999). Aunque, la eficiencia en la utilización de los carbohidratos de la dieta de los peces está en función de la especie, como lo describen Panserat y colaboradores (2000a) sobre la capacidad del uso de carbohidratos donde ordenan las especies del modo siguiente: carpa>dorada>trucha. En peces se han determinado diversos factores que podrían estar afectando la utilización de los carbohidratos de la dieta en comparación con los resultados encontrados en mamíferos, como la actividad menor de algunos enzimas implicados en la asimilación de la glucosa, los niveles plasmáticos de insulina, el escaso número de receptores de insulina y las diferencias en los mecanismos de regulación de los transportadores de glucosa (Moon, 2001). En todas las especies de peces estudiadas se ha encontrado el mismo mecanismo enzimático para la hidrólisis, así como de las rutas de digestión y absorción de los carbohidratos que en general son las mismas para las especies herbívoras, omnívoras y carnívoras; sin embargo, los resultados de las actividades de algunos enzimas como la

amilasa y glucoquinasas indican la existencia de diferencias en las actividades enzimáticas entre especies (Krogdahl et al., 2005; Panserat et al., 2002).

En trucha común, Navarro y colaboradores (1993), observaron aumentos significativos de los niveles de glucosa plasmática durante las primeras horas del postprandial y estudios “*in vivo*” han demostrado que el incremento de la glucosa postprandial es proporcional al contenido de carbohidratos de la dieta (Capilla et al., 2003; Novoa et al., 2004; Panserat et al., 2002; Papatryphon et al., 2001). La glucosa plasmática aumentada durante la ingesta del alimento tiene como destino principal tejidos como el músculo blanco, músculo rojo e hígado (Blasco et al., 1996; Blasco et al., 2001).

### 1.3.1.- Transportadores de glucosa.

En mamíferos, la glucosa necesita de la presencia de proteínas transportadoras en la membrana para ser asimilada por las células. En las células de mamíferos se han descrito dos familias de proteínas de transportadores: 1) los transportadores dependientes de energía sodio/glucosa (SGLTs), que transportan la glucosa en contra su gradiente de concentración, y 2) los transportadores de glucosa de difusión facilitada (GLUTs), que trabajan en la dirección del gradiente de concentración de glucosa. Los SGLTs median la captación de la glucosa procedente de la dieta en el lumen intestinal y reabsorción renal de la glucosa (Hediger y Rhoads, 1994; Stephens y Pilch, 1995). En mamíferos, la familia de los GLUTs está formada 13 miembros y son proteínas que están altamente relacionadas entre sí (Watson et al., 2004). Todos los miembros de la familia de los GLUTs poseen 12 dominios transmembrana (Figura 1.8).



**Figura 1.8.-** Diagrama esquemático de la estructura de los transportadores de glucosa de difusión facilitada (Modificado de Watson et al., 2004).

Los GLUTs se han clasificado en 3 clases según sus características estructurales (Joost et al., 2002), la clase I (GLUTs 1-4), la clase II (GLUTs 5, 7, 9 y 11) y la clase III (GLUTs 6, 8, 10, 12 y el HMIT1). En mamíferos superiores, la clase I es la que ha sido más estudiada.

El GLUT1 está considerado como un transportador constitutivo de glucosa, porque se expresa prácticamente en todos los tejidos (James, 1995; Pessin y Bell, 1992), y con alta expresión en vasos sanguíneos del cerebro y en eritrocitos de humanos donde representa el 5% del contenido de proteína total de la membrana (Watson et al., 2004). El GLUT2 posee una distribución restringida al hígado, el intestino delgado, el riñón y las células  $\beta$  del páncreas. El GLUT2 forma parte del sistema sensorial de glucosa de las células  $\beta$  del páncreas e interviene en la absorción intestinal de la glucosa (Olson et al., 1997). El GLUT3 se expresa principalmente en neuronas y conjuntamente con el GLUT1 son los que permiten la llegada de la glucosa a las células nerviosas (Vannucci y Simpson, 2003). El GLUT4 es expresado especialmente en el tejido muscular y tejido adiposo, y es el responsable de la captación de glucosa en respuesta a la insulina, producto de la traslocación del GLUT4 desde las vesículas intracelulares hacia la membrana celular (Khan y Pessin, 2002; Stephens y Pilch, 1995; Watson et al., 2004; Zorzano et al., 2005).

En mamíferos superiores, existen numerosos estudios sobre la regulación de los GLUTs, debido principalmente al papel que podrían cumplir en el desarrollo de tratamientos para contrarrestar la diabetes tipo 2 (no dependiente de insulina). En el músculo esquelético de mamíferos, la expresión del GLUT4 es regulada por el metabolismo y la insulina (Zorzano et al., 2005). Existen diferentes estudios que señalan que la regulación del GLUT4 está en función de la fibra muscular, y las fibras del músculo rojo expresan el transportador en mayor medida que el músculo blanco (Camps et al., 1992; Stephens y Pilch, 1995). Estudios en ratas diabéticas evidencian que la regulación hormonal y metabólica a nivel de expresión y proteína del GLUT4 en músculo rojo es más rápida que en el blanco (Neufer et al., 1993)). Estados de insuficiencia de insulina como el ayuno, provocan la disminución de los niveles de proteína del GLUT4 en el músculo rojo, y que no es causada por cambios en la expresión del ARNm del GLUT4. En músculo blanco, el ayuno no provoca cambios en

el nivel de proteínas del GLUT4, a pesar de observarse un incremento la expresión ARNm de GLUT4 (Camps et al., 1992).

En peces, existe escasa información sobre los transportadores de glucosa de difusión facilitada, se han identificado y caracterizado algunas isoformas de GLUTs y la mayoría en salmónidos. Planas y colaboradores (2000a) clonaron un transportador de glucosa del músculo esquelético de *Salmo trutta* que actualmente es denominado btGLUT4 y que presentó una homología elevada a los GLUT4 de mamíferos. Según estos autores, el patrón de expresión tisular del btGLUT4 está en función de las zonas de captación de glucosa, así el btGLUT presenta una mayor expresión en tejidos como el músculo esquelético y branquias. Estudios *in vivo* de la expresión del btGLUT4 muestran que es regulada por los niveles de insulina plasmática en el músculo rojo (Capilla et al., 2002), sugiriendo que la similitud con el GLUT4 de mamíferos no es solo estructural, sino también funcional. Otro dato que apoya la funcionalidad es que el transportador de glucosa clonado en *Oncorhynchus kisutch* (okGLUT4), se logra translocar en adipocitos 3T3-L1 tras la estimulación con la insulina (Capilla et al., 2004a). En embriones de trucha arco iris, Teerijoki y colaboradores (2001a) clonaron un transportador de glucosa (OnmyGLUT1), cuya secuencia de aminoácidos deducida mostró una homología estructural del 77-79% al de los GLUT1s de mamíferos y aves. A partir de una línea celular de carpa también ha sido clonado el transportador (CyiGLUT1) que tiene una similitud estructural y funcional a la del GLUT1 de mamíferos superiores, como lo indican los experimentos de selección de sustrato e inhibidores de captación de carbohidratos (Teerijoki et al., 2001b). En el hígado de trucha arco iris, se ha clonado un transportador (OnmyGLUT2) homólogo al GLUT2, cuya secuencia de aminoácidos deducida presentó una homología del 58% y 52% con el GLUT2 de aves y mamíferos respectivamente (Krasnov et al., 2001).



---

## **2.- OBJETIVOS**

---



La presente tesis ha sido desarrollada dentro de un proyecto europeo, cuyo objetivo general fue el de evaluar las perspectivas del uso de proteínas de origen vegetal en la acuicultura. Para ello se ha estudiado el crecimiento y control endocrino de dos especies carnívoras de gran interés comercial en la comunidad europea, la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y la dorada (*Sparus aurata*), alimentadas con diferentes dietas en comparación con los parámetros obtenidos en animales alimentados con dietas basadas en harina de pescado.

A partir de este objetivo general se definieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Establecer en trucha arco iris y dorada, si la alimentación con dietas basadas en los perfiles de aminoácidos esenciales del músculo (M) pueden mejorar el crecimiento con respecto a animales alimentados con dietas basadas en la composición de aminoácidos esenciales corporales (C).
- 2) Determinar el efecto sobre el crecimiento de dietas que contienen diferente relación de aminoácidos esenciales (IAA) y aminoácidos no esenciales (DAA) en trucha arco iris y dorada.
- 3) Establecer el efecto sobre el crecimiento de dietas con distintos grados de sustitución de proteína animal por proteína vegetal en la dieta de trucha arco iris y dorada.
- 4) Determinar los efectos de las diferentes dietas sobre los niveles de glucosa y los perfiles hormonales de insulina y glucagón del plasma sanguíneo en trucha arco iris y dorada.

- 5) Establecer las adaptaciones a las dietas del sistema hormona/receptor de insulina en el músculo esquelético blanco de trucha arco iris y dorada.
- 6) Determinar los efectos de la administración de glucosa y arginina sobre los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y glucagón en dorada.
- 7) Caracterizar en la dorada el transportador de glucosa de difusión facilitada tipo GLUT4, similar al descrito en otras especies, clonando dicho transportador de glucosa y estudiando su posible regulación a nivel de ARNm y proteína en diferentes condiciones experimentales *in vivo*.

---

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### 3.1.- ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.

#### 3.1.1.- BLOQUE EXPERIMENTAL I: Efectos de dietas con diferentes perfiles de aminoácidos en trucha arco iris y dorada.

##### *Dietas experimentales.*

Se elaboraron cuatro dietas experimentales para cada especie, trucha arco iris (T) y dorada (D). Las dietas fueron diseñadas considerando los diferentes perfiles de aminoácidos esenciales que reflejan el contenido de aminoácidos esenciales de la composición corporal (C) y músculo (M). Las dietas estaban compuestas por harina de pescado, ingredientes de origen vegetal y suplementados con aminoácidos libres (Tablas 3.1.1 y 3.1.2). En las dietas TM, TC, DM y DC, el balance de aminoácidos esenciales (IAA) y aminoácidos no esenciales (DAA), fue similar para las dietas basadas en los perfiles de aminoácidos esenciales corporales y del músculo en cada especie (Tabla 3.1.3 y 3.1.4). En las dietas TMGlu, TCGlu, DMGlu y DCGlu, la proporción DAA fue incrementado con la adición de ácido glutámico (Tabla 3.1.3 y 3.1.4). La relación IAA/DAA tuvo una variación entre 0,7 y 1,03 en dietas de trucha y de 0,8 a 1,13 en las dietas de dorada. Las dietas de ambas especies tuvieron la misma proporción de proteínas (42 a 44 % DM en trucha y alrededor de 52 % en dorada), fueron isoenergéticas (22,1 a 22,5 kj energía/g DM), y estuvieron establecidas de acuerdo al National Research Council (NRC, 1993).

##### *Animales y tratamiento.*

##### Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Los animales fueron mantenidos en la instalación del INRA (Donzacq, Landes, Francia). Cada dieta experimental fue administrada por triplicado en tres tanques a grupos de 75 peces (peso medio inicial =  $14,1 \pm 0,04$  g). Los peces fueron mantenidos en tanques circulares de fibra de vidrio de  $1 \text{ m}^3$ , alimentados *ad libitum* dos veces al día. Cada tres semanas, los peces fueron contados y pesados por grupos. El experimento se realizó durante 12 semanas (de marzo a junio de 2001) a temperatura constante de  $17 \pm 1$  °C.

*Dorada (*Sparus auratus*)*

Los animales fueron mantenidos en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal-CSIC (Torre de la sal, España). Doradas en grupos de 90 peces (peso medio inicial =  $14,7 \pm 0,1$  g), se distribuyeron en 3 tanques circulares de fibra de vidrio de  $0,5 \text{ m}^3$ , en sistemas con agua de mar a temperaturas entre 17 y 25 °C. Los animales fueron alimentados dos veces al día, cada tres semanas los peces fueron contados y pesados en grupos, hasta las 12 semanas que duró el experimento (entre abril y julio de 2001).

*Alimentación forzada*

Después de las 12 semanas de alimentación con las dietas TM, TMGlu y DM, DMGlu en trucha arco iris y dorada respectivamente, 50 peces de cada especie y grupo de dieta fueron anestesiados brevemente con MS-222 (0,1 g /l), pesados y utilizando una jeringa alimentados con el 1% de su peso corporal de la misma dieta que consumió durante las 12 semanas, y separados en grupos de 10 animales en tanques de 90 l. Los peces fueron muestreados a las 1, 3, 6, 12 y 24 horas tras las alimentación forzada

Tabla 3.1.1.- Composición de dietas experimentales para trucha arco iris

	TM	TMGlu	TC	TCGlu
<b>Ingredientes(g/Kg)</b>				
Harina de pescado (PC 70%)	389,93	316,39	459,96	363,27
Gluten de Trigo (Amylum)	71,39	0	50	100
Extrusionado de Trigo	135,71	71,78	200	200
Extrusionado de Guisantes	215,09	56,82	166,34	158,47
Harina de soja	25,26	331,25	0	0
Aceite de pescado	101,59	109,48	93,7	104,07
Ligante	10	10	10	10
Mezcla Mineral <sup>1</sup>	10	10	10	10
Mezcla Vitaminas <sup>1</sup>	10	10	10	10
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18%)	10,89	16,06	0	0
L-His	1,77	1,75	0	0
L-Lys	6,46	5,94	0	0
DL-Met	0,91	1,99	0	0
L-Thr	1,53	1,73	0	0
L-Ile	5,92	4,1	0	0
L-Val	3,54	2,71	0	0
L-Glu	0	50	0	44,19
<b>Composición aproximada</b>				
Materia seca (DM, %)	92,2	90,5	93,5	92,1
Proteínas (% DM)	45,1	46,3	43,7	44,1
Lípidos (% DM)	15,6	16,4	15,7	15,8
Energía total (kJ/g DM)	22,4	22,1	22,2	22,4

<sup>1</sup>De acuerdo a NRC (1993), PC: Proteína cruda.

Tabla 3.1.2.- Composición de dietas experimentales para dorada

	DM	DMGlu	DC	DCGlu
<b>Ingredientes(g/Kg)</b>				
Harina de pescado (PC 70%)	499,98	478,06	529,33	484,13
CPSP G <sup>1</sup>	50	0	0	0
Gluten de Trigo (Amylum)	0	0	100	100
Extrusionado de Trigo	0	56,08	147,98	138,50
Extrusionado de Guisantes	199,15	0	100	100
Harina de soja	121,89	300	0	0
Aceite de pescado	83,61	94,51	89,23	94,29
Ligante	10	10	10	10
Mezcla Mineral <sup>2</sup>	10	10	10	10
Mezcla Vitaminas <sup>2</sup>	10	10	10	10
L-His	2,04	2,00	0	0
L-Lys	3,14	4,85	0	0
DL-Met	0,95	1,18	3,46	0
L-Thr	0,60	1,54	0	0
L-Ile	5,57	4,58	0	0
L-Val	3,07	2,61	0	0
L-Glu	0	24,58	0	53,09
<b>Composición aproximada</b>				
Materia seca (DM, %)	92,1	93,7	89,3	92,7
Proteínas (% DM)	52,7	53	52,1	50,9
Lípidos (% DM)	15,7	16,4	15,9	15,2
Energía total (kJ/g DM)	22,5	22,5	22,5	22,4

<sup>1</sup> Proteínas de pescado solubles, <sup>2</sup> De acuerdo a NRC (1993).

**Tabla 3.1.3.- Composición de aminoácidos (g/100 g de materia seca) en las dietas experimentales para trucha arco iris.**

Aminoácidos (% DM)	TM	TMGlu	TC	TCGlu
ARGININA	2,60	2,58	2,70	2,28
HISTIDINA	1,10	1,12	1,01	0,86
ISOLEUCINA	1,98	1,85	1,72	1,43
LEUCINA	3,05	2,96	3,33	2,92
LISINA	3,21	3,54	3,14	2,43
METIONINA	1,01	1,02	1,04	0,87
CISTEINA	0,49	0,47	0,49	0,50
FENILALANINA	1,71	1,63	1,84	1,66
TIROSINA	1,32	1,30	1,45	1,27
TREONINA	1,81	1,89	1,81	1,53
TRIPTOFANO	0,43	0,53	0,45	0,41
VALINA	2,19	1,97	2,14	1,78
Alanina	2,21	2,18	2,48	2,05
Ácido aspártico	3,40	3,97	3,79	3,09
Ácido glutámico	8,09	13,27	7,64	13,95
Glicina	2,37	2,29	2,66	2,23
Prolina	2,25	1,87	2,36	2,46
Serina	1,89	1,94	1,97	1,82
IAA <sup>1</sup>	20,90	20,86	21,12	17,95
DAA <sup>2</sup>	20,21	25,52	20,90	25,60
IAA/DAA	<b>1,03</b>	<b>0,82</b>	<b>1,01</b>	<b>0,70</b>

<sup>1</sup> Aminoácidos esenciales (en mayúscula)

<sup>2</sup> Aminoácidos no esenciales (en minúscula)

Tabla 3.1.4.- Composición de aminoácidos (g/100 g de materia seca) en las dietas experimentales para dorada.

Aminoácidos (% DM)	DM	DMGlu	DC	DCGlu
ARGININA	3,26	3,25	3,14	2,76
HISTIDINA	1,41	1,33	1,23	1,09
ISOLEUCINA	2,60	2,84	2,32	2,03
LEUCINA	3,68	3,85	4,01	3,50
LISINA	4,05	4,05	3,60	3,14
METIONINA	1,29	1,30	1,70	1,15
CISTEINA	0,49	0,53	0,63	0,56
FENILALANINA	2,04	2,09	2,28	2,02
TIROSINA	1,56	1,57	1,66	1,48
TREONINA	2,16	2,18	2,15	1,83
TRIPTOFANO	0,56	0,59	0,59	0,52
VALINA	2,78	2,84	2,75	2,39
Alanina	2,98	2,85	3,05	2,64
Ácido aspártico	4,80	4,84	4,55	3,91
Ácido glutámico	6,87	9,74	9,64	13,57
Glicina	3,10	2,86	3,15	2,73
Prolina	3,00	3,16	3,68	3,14
Serina	2,09	2,12	2,27	1,96
IAA <sup>1</sup>	25,86	26,42	26,06	22,44
DAA <sup>2</sup>	22,86	25,57	26,34	27,95
IAA/DAA	<b>1,13</b>	<b>1,03</b>	<b>0,99</b>	<b>0,80</b>

<sup>1</sup> Aminoácidos esenciales (en mayúscula)

<sup>2</sup> Aminoácidos no esenciales (en minúscula)

### 3.1.2.- BLOQUE EXPERIMENTAL II: Efectos de la sustitución de la proteína animal por la proteína vegetal en la dieta de trucha arco iris y dorada.

#### *Dietas experimentales.*

Se elaboraron para cada especie cuatro dietas experimentales, trucha arco iris (T) y dorada (D). Las dietas fueron diseñadas considerando el perfil de aminoácidos esenciales que reflejan el contenido de aminoácidos esenciales de la harina de pescado y con sustituciones de proteína animal del 0, 50, 75 y 100 % por proteína vegetal. Por lo que las dietas estuvieron compuestas por diferentes proporciones de harina de pescado, ingredientes de origen vegetal y suplementados con aminoácidos libres (Tablas 3.1.5 y 3.1.6). Las dietas de ambas especies estuvieron establecidas de acuerdo al NRC (1993) tuvieron la misma proporción de proteínas (49 a 52 % DM en trucha y alrededor de 47 a 48 % en dorada), fueron isoenergéticas (22,7 a 24 kJ energía/g DM) (Tabla 3.1.7 y 3.1.8).

#### *Animales y tratamiento.*

##### Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Los animales fueron mantenidos en la instalación del INRA (Donzacq, Landes, Francia). Cada dieta experimental fue aplicada a un grupo de 75 peces (peso medio inicial =  $19,2 \pm 0,02$  g). Los peces fueron mantenidos en tanques circulares de fibra de vidrio de 1 m<sup>3</sup>, alimentados dos veces al día hasta observar la inapetencia de los animales. Cada tres semanas, los peces fueron contados y pesados por grupos. El experimento se realizó durante 12 semanas (entre marzo y junio de 2002) a temperatura constante de  $17 \pm 1$  °C. Cada dieta fue ensayada por triplicado en tres tanques diferentes.

##### Dorada (*Sparus auratus*)

Los animales fueron mantenidos en el CSIC (Torre de la sal, España). Durante 12 semanas (entre abril y julio de 2002), grupos de 90 peces (peso medio inicial =  $16,5 \pm 0,2$  g), se distribuyeron en tanques circulares de fibra de vidrio de 0,5 m<sup>3</sup>, en sistemas con agua de mar a temperaturas entre 17 y 25 °C, fueron alimentados dos veces al día. Cada tres semanas los peces fueron contados y pesados en grupos. Las dietas fueron administradas por triplicado.

Tabla 3.1.5.- Composición de dietas experimentales para trucha arco iris

	T0	T50	T75	T100
<b>Ingredientes(g/Kg)</b>				
Harina de pescado	637,9	319,0	159,5	0
Harina de gluten de maíz	0	116	177,1	232,4
Gluten de trigo	0	100	150	200
Extrusionado de guisantes (Aquatex)	0	80	120	163,3
Harina de colza (Primo 00)	0	46,9	75	100
Extrusionado de trigo	203,4	110,2	42,5	0
Aceite de pescado	128,7	143,6	151,1	158,7
Ligante (Alginato de sodio)	10	10	10	10
Mezcla Mineral <sup>1</sup>	10	10	10	10
Mezcla Vitaminas <sup>1</sup>	10	10	10	10
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18% P)	0	16,1	37,8	40
L-Arg	0	6,2	9,4	12,5
L-His	0	1,9	3,0	4,0
L-Lys	0	13,8	20,8	27,6
DL-Met	0	2,0	3,1	4,1
L-Trp	0	1,3	2,1	2,7
L-Thr	0	4,1	6,2	8,3
L-Ile	0	3,5	5,3	7,1
L-Val	0	4,7	7,0	9,4
<b>Composición aproximada</b>				
Materia seca (DM, %)	92,0	93,1	93,7	94,2
Proteínas (% DM)	43,1	43,9	44,4	44,7
Lípidos (% DM)	18	18	18	18
Energía total (kJ/g DM)	20,5	21,1	21,2	21,6

<sup>1</sup>De acuerdo a NRC (1993).

Tabla 3.1.6.- Composición de dietas experimentales para dorada

	D0	D50	D75	D100
<b>Ingredientes(g/Kg)</b>				
Harina de pescado	703,7	352	176	0
Harina de gluten de maíz	0	120	180	250
Gluten de trigo	0	120	180	250
Extrusionado de guisantes (Aquatex)	0	60	90	120
Harina de colza (Primo 00)	0	30,9	67,2	27,3
Lupino dulce	0	0	0	6,9
Extrusionado de trigo	142	94,9	30,6	15,5
Aceite de pescado	124,3	141,3	149,8	158
Ligante (Alginato de sodio)	10	10	10	10
Mezcla Mineral <sup>1</sup>	10	10	10	10
Mezcla Vitaminas <sup>1</sup>	10	10	10	10
CaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (18% P)	10	6,5	30,7	51,1
L-Arg	0	7,6	11,3	15,9
L-His	0	2,3	3,4	4,8
L-Lys	0	15,9	23,6	32,5
DL-Met	0	2,5	3,6	5,4
L-Trp	0	1,4	2,2	2,9
L-Thr	0	5,0	7,4	10,4
L-Ile	0	4,2	6,2	8,4
L-Val	0	5,4	8,0	11,1
<b>Composición aproximada</b>				
Materia seca (DM, %)	92,1	93,0	93,6	94,5
Proteínas (% DM)	46,7	47,3	47,9	48,4
Lípidos (% DM)	18	18	18	18
Energía total (kJ/g DM)	20,4	21,3	21,4	21,7

<sup>1</sup>De acuerdo a NRC (1993).

**Tabla 3.1.7.- Composición de aminoácidos (g/100 g de materia seca) en las dietas experimentales para trucha arco iris.**

Aminoácidos (% DM)	T0	T50	T75	T100
ARGININA	3,03	3,03	3,03	3,03
HISTIDINA	1,24	1,24	1,24	1,24
ISOLEUCINA	2,20	2,20	2,20	2,20
LEUCINA	3,70	3,90	4,03	4,11
LISINA	3,79	3,79	3,79	3,79
METIONINA	1,43	1,29	1,22	1,14
CISTEINA	0,47	0,61	0,68	0,76
METIOCISTEINA	1,90	1,90	1,90	1,90
FENILALANINA	2,03	2,16	2,24	2,30
TIROSINA	1,55	1,53	1,52	1,50
FENILTROSINA	3,58	3,68	3,76	3,80
TREONINA	2,13	2,13	2,13	2,13
TRIPTOFANO	0,54	0,54	0,54	0,54
VALINA	2,61	2,61	2,61	2,61
Glicina	2,91	1,93	1,43	0,94
Serina	2,02	1,77	1,64	1,51
Ácido aspártico	4,69	3,08	2,26	1,45
Ácido glutámico	6,86	7,74	8,16	8,57
Prolina	1,97	2,37	2,69	2,78
Alanina	3,20	2,49	2,14	1,78
IAA <sup>1</sup>	24,71	25,02	25,22	25,36
DAA <sup>2</sup>	21,65	19,39	18,23	17,03
IAA/DAA	<b>1,14</b>	<b>1,29</b>	<b>1,38</b>	<b>1,49</b>

<sup>1</sup> Aminoácidos esenciales (en mayúscula)

<sup>2</sup> Aminoácidos no esenciales (en minúscula)

**Tabla 3.1.8.- Composición de aminoácidos (g/100 g de materia seca) en las dietas experimentales para dorada.**

<b>Aminoácidos (% DM)</b>	<b>D0</b>	<b>D50</b>	<b>D75</b>	<b>D100</b>
ARGININA	3,26	3,26	3,26	3,26
HISTIDINA	1,33	1,33	1,33	1,33
ISOLEUCINA	2,38	2,38	2,38	2,38
LEUCINA	3,99	4,14	4,22	4,32
LISINA	4,12	4,12	4,12	4,12
METIONINA	1,56	1,41	1,33	1,28
CISTEINA	0,49	0,64	0,72	0,77
METIOCISTEINA	2,05	2,05	2,05	2,05
FENILALANINA	2,18	2,26	2,34	2,27
TIROSINA	1,68	1,63	1,61	1,60
FENILTROSINA	3,86	3,89	3,95	3,86
TREONINA	2,30	2,30	2,30	2,30
TRIPTOFANO	0,54	0,54	0,54	0,54
VALINA	2,82	2,82	2,82	2,82
Glicina	3,14	2,12	1,57	1,12
Serina	2,17	1,94	1,80	1,77
Ácido aspártico	5,08	3,36	2,45	1,69
Ácido glutámico	7,32	8,60	9,12	10,22
Prolina	2,17	2,64	2,87	3,24
Alanina	3,46	2,70	2,29	2,00
IAA <sup>1</sup>	26,69	26,85	27,01	27,02
DAA <sup>2</sup>	23,34	21,36	20,11	20,04
IAA/DAA	<b>1,14</b>	<b>1,26</b>	<b>1,34</b>	<b>1,35</b>

<sup>1</sup> Aminoácidos esenciales (en mayúscula)

<sup>2</sup> Aminoácidos no esenciales (en minúscula)

### **3.1.3.- BLOQUE EXPERIMENTAL III: Inyección de arginina y glucosa en dorada**

Los animales fueron mantenidos en el CSIC (Torre de la sal, España). Durante 6 semanas (entre agosto y setiembre de 2002), grupos de 40 peces (peso medio entre 98 y 100 g), se distribuyeron en tanques circulares de fibra de vidrio de 0,5 m<sup>3</sup>, en sistemas con agua de mar a temperaturas entre 23 y 25 °C, los peces fueron alimentados una vez al día con las dietas D0 y D75 del bloque experimental II. Una semana antes del tratamiento con arginina y glucosa, los peces fueron separados en grupos de 10 animales en tanques de 90 l, siguiendo con la alimentación con la misma dieta. Al inicio del experimento los peces fueron anestesiados brevemente con MS-222 (0,1 g /l), después los animales fueron inyectados con 0,5 ml de arginina (1,4 mg/g de pez), 0,5 ml de D-glucosa (0,5 mg/g de pez) y 0,5 ml de solución salina. Los peces fueron muestreados a las 3 y 6 horas tras las inyecciones.

### **3.1.4.- BLOQUE EXPERIMENTAL IV: Caracterización y clonaje del transportador de glucosa (GLUT4) del músculo esquelético de dorada.**

#### *Animales y condiciones experimentales*

Doradas obtenidas del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de San Carles de la Ràpita (Tarragona, España), fueron aclimatadas durante 15 días en el estabulario de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, en tanques circulares de fibra de vidrio de 0,5 m<sup>3</sup> con sistemas cerrados de agua de mar a una temperatura constante de 20 ± 1 °C. Una vez al día, los animales fueron alimentados hasta observar la inapetencia. Los peces fueron mantenidos a fotoperíodos de día:noche de luz artificial de 12:12 horas.

#### *Ayuno*

Al finalizar el período de aclimatación, las doradas de peso medio inicial de 125,5 ± 4,9 g fueron separadas en dos grupos en tanques de 0,5 m<sup>3</sup> diferentes, un grupo de 6 peces diariamente fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial. El otro grupo de 7 animales se mantuvo en ayuno durante 2 semanas. El muestreo de los peces se realizó a las 24 horas después de la ingesta.

### *Inyección de Insulina*

Doradas con un peso medio de  $126,3 \pm 3,9$  g, al inicio del experimento los peces fueron anestesiados con MS-222 (0,1 g /l) y pesados, los animales recibieron una inyección intraperitoneal con insulina porcina (2,16 nmol/100 g de pez) y una solución salina (1  $\mu$ l/g de pez). Los peces fueron muestreados a las 3 y 18 horas de las inyecciones.

### **3.2.- Extracción de sangre y tejidos.**

En ambas especies, al final de los ensayos de crecimiento de los bloques experimentales I y II, se tomaron cuatro peces por tanque a las 6 y 24 horas de post ingesta. Se les sacrificó de un golpe en la cabeza, tomo el peso y se procedió a la extracción de sangre mediante punción en la vena caudal utilizando jeringas heparinizadas. Después de realizar una centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos, el plasma fue separado en alícuotas y congeladas a  $-20$  °C para el posterior análisis en el laboratorio.

Las muestras de tejido muscular, fueron obtenidas tanto en trucha como en dorada, inmediatamente después de la extracción de la sangre. Los trozos de músculo blanco y músculo rojo fueron lavados con una solución de NaCl 0,7% para eliminar los restos de sangre y congelados en nitrógeno líquido. Los tejidos fueron almacenados en nitrógeno hasta el momento de ser utilizados.

En los experimentos en dorada, bloques experimentales III y IV, las muestras de sangre y tejidos fueron obtenidas de la misma forma como se ha descrito anteriormente para los otros dos bloques experimentales.

### **3.3.- Parámetros de crecimiento y eficiencia de utilización de nutrientes y energía.**

Al finalizar los períodos de adaptación a las dietas en los bloques experimentales I, II y III, se procedió al cálculo de los distintos parámetros con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Tasa de crecimiento específico} = \frac{[100 \times [\text{Ln}(\text{peso final corporal}) - \text{Ln}(\text{peso inicial corporal})]]}{\text{días}}$$

$$\text{Tasa de conversión alimenticia} = \frac{\text{peso húmedo ganado}}{\text{peso de alimento seco ingerido}}$$

$$\text{Tasa de eficiencia proteica} = \frac{\text{peso húmedo ganado}}{\text{peso neto de proteínas ingeridas}}$$

$$\text{Índice Hepatosomático} = \frac{100 \times \text{peso del hígado}}{\text{peso corporal}}$$

En ambas especies, la utilización de nutrientes y energía, se evaluó usando el análisis comparativo de la carcasa. La composición del cuerpo se determinó en grupos de 10 peces a comienzos del experimento y en grupos de cinco peces por tanque al finalizar el experimento. El análisis se realizó siguiendo los procedimientos estándares: el contenido de materia seca manteniendo a 110° C durante 24 horas, la proteína cruda según el método de Kjeldahl después de una digestión ácida y los lípidos después de la hidrólisis utilizando la extracción de éter. En trucha arco iris, el análisis de los animales fue realizado por el personal del INRA (Donzacq, Landes, Francia). En dorada, el análisis fue llevado a cabo por el personal del CSIC (Torre de la sal, España).

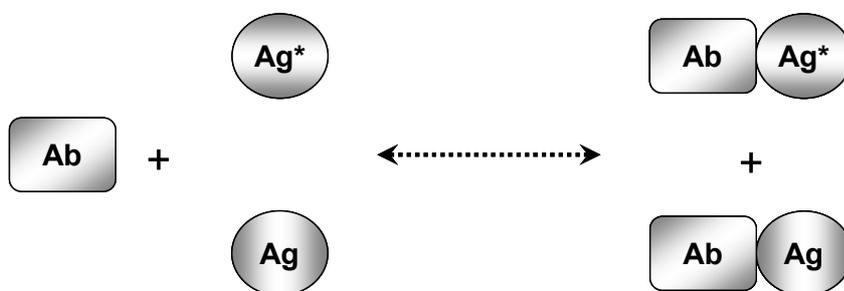
### 3.4.- Determinación de la glucosa en plasma.

La cuantificación de glucosa en plasma, se realizó mediante la reacción de la glucosa-oxidasa que oxida a la glucosa en ácido glucónico, con formación de peróxido de hidrógeno que en presencia de la peroxidasa reacciona con Fenol y 4-Aminofenazona, originando un compuesto de color rojo, con una absorbancia máxima a 505 nm (Menagent Glucofix, Menarini diagnostics). Los niveles en plasma de glucosa, son presentados como promedio  $\pm$  error estándar, los análisis de glucosa por muestra se han llevado a cabo por duplicados.

### 3.5.- Fundamento del radioinmunoensayo de insulina y glucagón en plasma.

Los niveles de insulina y glucagón en plasma se cuantificaron por radioinmunoensayos. Este ensayo se fundamenta en la competencia entre hormona fría y hormona marcada isotópicamente por los lugares de unión a un anticuerpo. En este sistema, la hormona marcada sirve como un trazador de la reacción antígeno – anticuerpo.

La hormona marcada es el antígeno específico ( $Ag^*$ ) para la unión al anticuerpo ( $Ab$ ), cuando entran en contacto se establece un equilibrio dinámico entre el complejo antígeno-anticuerpo y sus componentes libre ( $Ag^*$  y  $Ab$ ). La adición de hormona no marcada ( $Ag$ ) desplaza hormona del complejo ( $Ag^* - Ab$ ), la fracción de  $Ag^*$  desplazado es proporcional a la cantidad de  $Ag$  añadido. Así, la relación entre hormona ligada al anticuerpo ( $Ag^* - Ab$ ) y hormona libre ( $Ag^*$ ) disminuye al aumentar la concentración de la hormona fría, que compite con la marcada por la unión al anticuerpo (Figura 3.1).



**Figura 3.1.-** Representación de la ecuación básica del radioinmunoensayo. Anticuerpo ( $Ab$ ), hormona marcada ( $Ag^*$ ) y hormona fría ( $Ag$ )

Para realizar una curva estándar a cantidades fijas de anticuerpo y antígeno marcada, se agregan cantidades crecientes de antígeno no marcado (hormona fría). De esta manera, la radioactividad de la fracción ligada al anticuerpo, variará inversamente a la concentración de hormona fría. La cuantificación de la radioactividad y la concentración de antígeno permite construir una curva patrón, y los valores de las muestras problemas son determinados sobre esta curva.

### 3.6.- Radioinmunoensayo de insulina.

#### 3.6.1.- Marcaje de insulina de bonito.

##### **Material y reactivos para la columna de celulosa**

- Tampón de marcaje (pH 7,5): 0,25 M tampón fosfato  
Solución A: 0,25 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
Solución B: 0,25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
19 ml (solución A) + 81 ml (solución B)
- Tampón de lavado (pH 7,5): 50mM de tampón fosfato
- Tampón de elución (pH 7,5): Tampón de lavado al 6 % de albúmina bovina (BSA)
- Cloramina T: 2,5 mg/ml de tampón de marcaje
- Metabisulfito de sodio: 7,5 mg/ ml de tampón de marcaje
- Insulina de bonito: 4  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  de solución  
100  $\mu\text{l}$  (0,75 mg de insulina/ml de HCl 0,01N) + 85  $\mu\text{l}$  de tampón de marcaje
- $^{125}\text{I}$ Na de Amersham (ref. IMS30): 1 mCi
- Columna de celulosa en una pipeta pasteur

##### **Material y reactivos para la columna de Sephadex G-75**

- Tampón de elución (pH 7,5): 0,04 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,04 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
0,1 M de NaCl  
0,01 % de  $\text{NaN}_3$   
0,1 % de BSA
- Tampón de equilibrado (pH 7,5): tampón de elución al 0,5 % de BSA
- Columna de Sephadex (G-75 superfina)

##### **Procedimiento**

Se utilizó el método descrito por Gutiérrez y colaboradores (1984), la insulina de bonito fue marcada utilizando como agente oxidante a la cloramina T que permite la incorporación del  $^{125}\text{I}$  a la insulina. El metabisulfito de sodio para detener la reacción. La solución de esta reacción fue pasada por una columna de celulosa para la eliminación de los excesos de  $^{125}\text{I}$  libre y la separación de fracciones de 1 ml de solución, en estas fracciones se cuantificó la radioactividad mediante un contador  $\gamma$  se identificó el

segundo pico de radioactividad que corresponde a la fracción donde estuvo el porcentaje mayor de proteína marcada y que después fue cromatografiada en la columna de Sephadex G-75 previamente equilibrada con el tampón de elución al 0,5 % de BSA.

Para la purificación de la insulina marcada, añadimos tampón de elución a la columna de Sephadex G-75. Recolectamos fracciones de 1 ml de solución, y cuantificamos la radioactividad de las fracciones hasta identificar el pico de radioactividad de la insulina marcada (alrededor de la fracción 20). A partir de la cual se procedió a realizar las pruebas de unión (*binding*) de la insulina marcada al anticuerpo anti-insulina y las pruebas de desplazamientos de las curvas patrones. El procedimiento de marcaje de insulina de bonito se detalla en los siguientes pasos:

- En un tubo de 1,5 ml añadimos 100  $\mu$ l de tampón de marcaje, 1mCi de  $^{125}$ I<sub>Na</sub>, 10  $\mu$ l de insulina de bonito (4  $\mu$ g) y 10  $\mu$ l de cloramina T (25  $\mu$ g) e incubamos esta solución agitando a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Después agregamos 10  $\mu$ l de metabisulfito de sodio y 30  $\mu$ l de tampón de elución y pasamos la solución a la columna de celulosa.
- En la columna de celulosa añadimos 6 ml de tampón de lavado y 5 ml de tampón de elución y recogimos las fracciones para la cuantificación de la radioactividad y seleccionamos la fracción que pasamos por la columna de sephadex.
- En la columna de Sephadex G-75, agregamos tampón de elución aproximadamente 30 ml, colectamos e identificamos las fracciones del segundo pico de radioactividad y procedimos a realizar las pruebas de *binding* y de desplazamiento de curva para determinar la alícuota a utilizar para el radioinmunoensayo de insulina.

### 3.6.2.- Cuantificación de la insulina plasmática.

#### **Material y reactivos**

- Tampón FAM (pH 7,5): 0,04 M de tampón fosfato  
0,024 % de NaN<sub>3</sub>  
0,3 % de BSA
- Tampón NaFAM (pH 7,5): Tampón FAM al 6 % de BSA y 0,6 % de NaCl
- Anticuerpo anti-insulina de bonito, obtenido de conejo (Gutiérrez, 1979), dilución 1/ 30 000 en tampón NaFAM.

- Insulina de bonito suministrada por Kodama Ltd., Tokio. Utilizada como hormona fría a diferentes concentraciones en tampón NaFAM, para la elaboración de las curvas patrones.
- Insulina de bonito marcada con  $^{125}\text{I}$ , diluida en FAM hasta una concentración de 10 000 cpm/100  $\mu\text{l}$ .

### **Procedimiento**

Las pruebas de *binding* y las muestras se valoraron por triplicado. La separación del complejo antígeno - anticuerpo se realizó utilizando etanol al 80 % (Merck), después de una centrifugación a 3000xg durante 30 minutos, el sobrenadante fue decantado y la radioactividad cuantificada con un contador  $\gamma$ .

En las pruebas de *binding* de las fracciones de insulina de bonito marcada, en cada fracción se analizó el porcentaje de *binding* específico (% BE) y el porcentaje de *binding* no específico (% BNE). Después de la incubación a 4° C durante 24 horas, para el radioinmunoensayo de insulina se seleccionaron las fracciones con % BE superiores al 30 % y % BNE entre 7 y 14 %.

$$\% \text{ BE} = \frac{\text{Bo} - \text{F}}{\text{CT}} \times 100 \quad \% \text{ BNE} = \frac{\text{F}}{\text{CT}} \times 100$$

Donde: BC = *Binding* máximo entre la insulina marcada y el anticuerpo anti-insulina de bonito (expresada en cpm).  
 F = Blanco (cpm).  
 CT = Cuentas totales de radioactividad/minuto (cpm).

Los niveles insulina plasmática son presentados como promedio  $\pm$  error estándar, los análisis de insulina por muestra se han llevado a cabo por triplicados. El procedimiento de la cuantificación de la insulina en plasma queda resumido en la tabla 3.6.1.

Tabla 3.6.1.- Protocolo del radioinmunoensayo de insulina.

	BC	F	Patrón	Muestra
NaFAM	100 µl	200 µl	-	90 µl
Anticuerpo	100 µl	-	100 µl	100 µl
Patrón	-	-	100 µl	-
Muestra	-	-	-	100 µl
<i>Incubación a 4° C durante 48 horas</i>				
<sup>125</sup> Insulina	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<i>Incubación a 4° C durante 24 horas</i>				
EtOH 80%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<i>Centrifugación a 3000xg durante 30 minutos a 4° C y cuantificación del precipitado</i>				

### 3.7.- Radioinmunoensayo de glucagón.

#### 3.7.1.- Material y reactivos

- Tampón de ensayo (pH 8,8): 0,2 M de glicina  
0,25 % de albúmina humana
- Tampón charcoal-dextrano (pH 8,8): 0,2 M de glicina  
1 % de Charcoal (Noria A)  
0,5 % de Dextrano T-70
- Anticuerpo anti- glucagón bovino porcino, 30K (Unger et al., 1962), dilución 1/ 30 000 en tampón de ensayo.
- Glucagón bovino porcino suministrada por el “Nacional Institute for Biological Standard y Control”. Utilizada como hormona fría a diferentes concentraciones en tampón de ensayo, para la elaboración de las curvas patrones.
- Glucagón marcado con <sup>125</sup>I (Amersham ref. IM 160), diluida en buffer de ensayo hasta una concentración de 10 000 cpm/500 µl.
- Trasylol (Bayer)
- Suero de caballo (Sigma)

### 3.7.2.- Procedimiento

El glucagón plasmático fue medido según el método de Unger, validado para ambas especies por Navarro y colaboradores (1995). Se utilizó glucagón marcado con  $^{125}\text{I}$ , y un anticuerpo anti-glucagón 30K (Unger et al., 1962). Las muestras se valoraron por duplicado en 100  $\mu\text{L}$  de plasma. La hormona libre se precipitó utilizando una solución charcoal-dextrano y una centrifugación durante 30 minutos a 3000xg, se cuantificó la radioactividad del sobrenadante que contenía el complejo antígeno-anticuerpo mediante un contador  $\gamma$ .

Los niveles en plasma glucagón son presentados como promedio  $\pm$  error estándar. En la tabla 3.10.1 se describe el procedimiento de la cuantificación del glucagón plasmático.

**Tabla 3.7.1.- Protocolo del radioinmunoensayo de glucagón.**

	<b>CT</b>	<b>BC</b>	<b>F</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
<b>Tampón de ensayo</b>	600 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$	600 $\mu\text{l}$	-	100 $\mu\text{l}$
<b>Trasylol</b>	100 $\mu\text{l}$				
<b>Patrón</b>	-	-	-	200 $\mu\text{l}$	-
<b>Muestra</b>	-	-	-	-	100 $\mu\text{l}$
<b>Anticuerpo</b>	-	400 $\mu\text{l}$	-	400 $\mu\text{l}$	400 $\mu\text{l}$
<b>Glucagón <math>^{125}\text{I}</math></b>	500 $\mu\text{l}$				
<b><i>Incubación a 4° C durante 24 horas</i></b>					
<b>Suero de caballo</b>	-	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	-	100 $\mu\text{l}$
<b>Tampón de ensayo</b>	-	-	-	-	100 $\mu\text{l}$
<b>Charcoal-dextrano</b>	-	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$	500 $\mu\text{l}$
<b><i>Incubación a 4° C durante 45 minutos</i></b>					
<b><i>Centrifugación a 3000xg durante 30 minutos a 4° C y cuantificación del sobrenadante</i></b>					

### 3.8.- Radioinmunoensayo de IGF-I.

El análisis del IGF-I plasmático fue llevado a cabo por el personal del CSIC (Torre de la sal, España). Después de una precipitación ácida-etanol, el IGF-I del plasma fue cuantificado usando el RIA de IGF-I de pez. Este ensayo está basado en el uso del IGF-I de *Pagrus major* (GroPep) como estándar y un anticuerpo IGF-I anti-barramundi (*Lates calcarifer*) dilución 1:8000 como primer anticuerpo y un anticuerpo secundario de anti-conejo IgG dilución 1:20 (Biogenesis, Poole, UK), ya que la secuencia de aminoácidos del IGF-I del *Pagrus major* y el IGF-I de dorada es similar al 100 %.

### 3.9.- Semipurificación de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco.

#### 3.9.1.- Fundamento.

Los receptores de insulina e IGF-I se han purificado por cromatografía de afinidad, previa homogenización del músculo y solubilización del homogenado utilizando tritón al 2% como detergente. La aglutinina de germen de maíz (wheat germ agglutinin, WGA) unida a la agarosa como soporte inerte (WGA-agarose, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), ha sido demostrada como el mejor ligando para la cromatografía de afinidad de los receptores de insulina e IGF-I, ya que permite la unión de glucoproteínas con una alta afinidad.

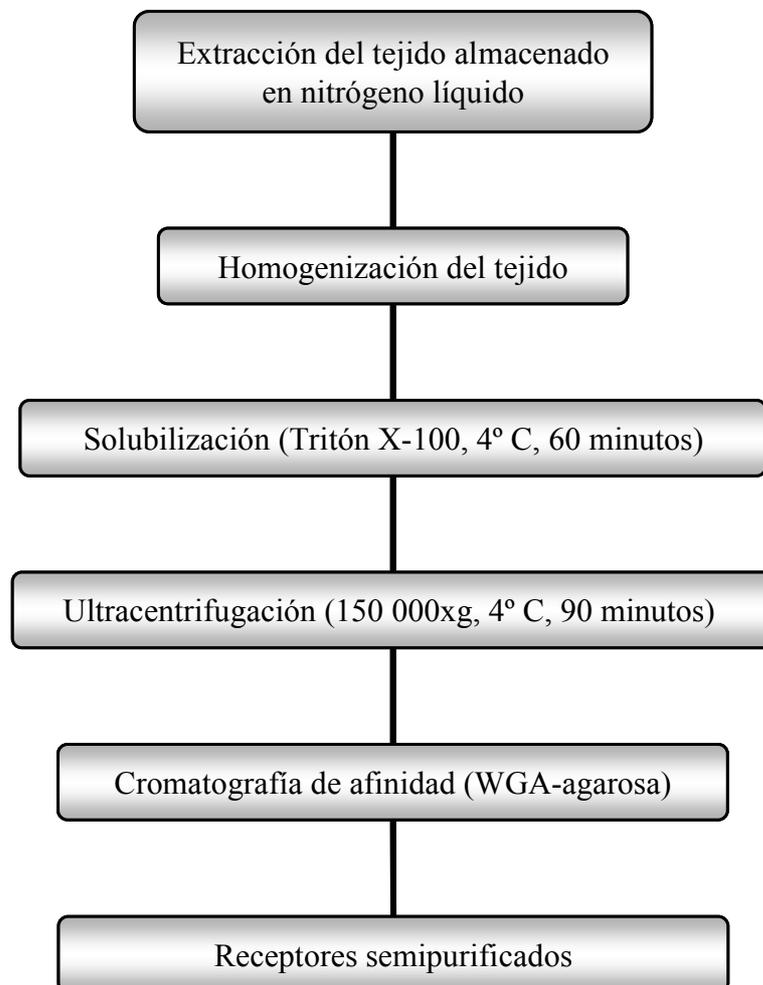
#### 3.9.2.- Material.

- Tampón de homogenización (pH 7,5): 25 mM de hepes  
4 mM de EDTA  
4 mM de EGTA  
2 mM de PMSF  
25 mM de benzamidina  
1 mM de leupeptina  
1 mM de bacitracina  
1 mM de pepstatina
- Tampón de lavado (pH 7,5): 25 mM de hepes  
0,1 % de Tritón X-100
- Tampón de columna 1 (pH 8,5): 50 mM de trizma  
0,2 % de Tritón X-100  
1 M de NaCl

- Tampón de columna 2 (pH 4,5):
  - 20 mM de  $\text{NaN}_3$
  - 50 mM de  $\text{CH}_3\text{COONa}$
  - 0,2 % de Tritón X-100
  - 1 M de  $\text{NaCl}$
- Tampón de columna 3 (pH 7,5):
  - 20 mM de  $\text{NaN}_3$
  - 50 mM de hepes
  - 0,2 % de Tritón X-100
  - 20 mM de  $\text{NaN}_3$

### 3.9.3.- Procedimiento.

La semipurificación de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco (figura 3.2), se va a realizar según el método descrito por Párrizas y colaboradores (1994a).



**Figura 3.2.-** Protocolo de Semipurificación de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco.

El músculo blanco (entre 7 y 9 gramos) fue pulverizado mecánicamente y mantenido en el mismo nitrógeno líquido durante el proceso. A continuación se realizó la homogenización del pulverizado en un homogenizador (POLYTRON PT 3000), diluyendo la muestra en 3 volúmenes por cada unidad de peso (3 v/p) en tampón de homogenización. Al homogenizado se le añadió tritón X-100, hasta llegar a una solución final del 2 % de tritón que fue incubada a 4° C en agitación durante 1 hora, después la solución fue ultracentrifugada ( 150 000xg a 4° C durante 90 minutos). El sobrenadante fue pasado 3 veces por la columna de WGA-agarosa a 4° C. Las columnas fueron lavadas con 80 ml de tampón de lavado y los receptores fueron recuperados con una solución al 0,3 M de N-acetil-D-glucosamina en tampón de lavado.

La solución eluida fue recogida en 3 fracciones, la primera de 0,5 ml, la segunda de 1,5 ml y la tercera fracción de 0,5 ml. Se cuantificó la cantidad de proteínas de las fracciones mediante el método de Bradford (1976), la fracción de mayor cantidad de proteínas correspondió a la más enriquecida de receptores y que se utilizó para los ensayos de unión (*binding*) a la hormona a su receptor.

### **3.10.- Ensayo de unión de la hormona a su receptor.**

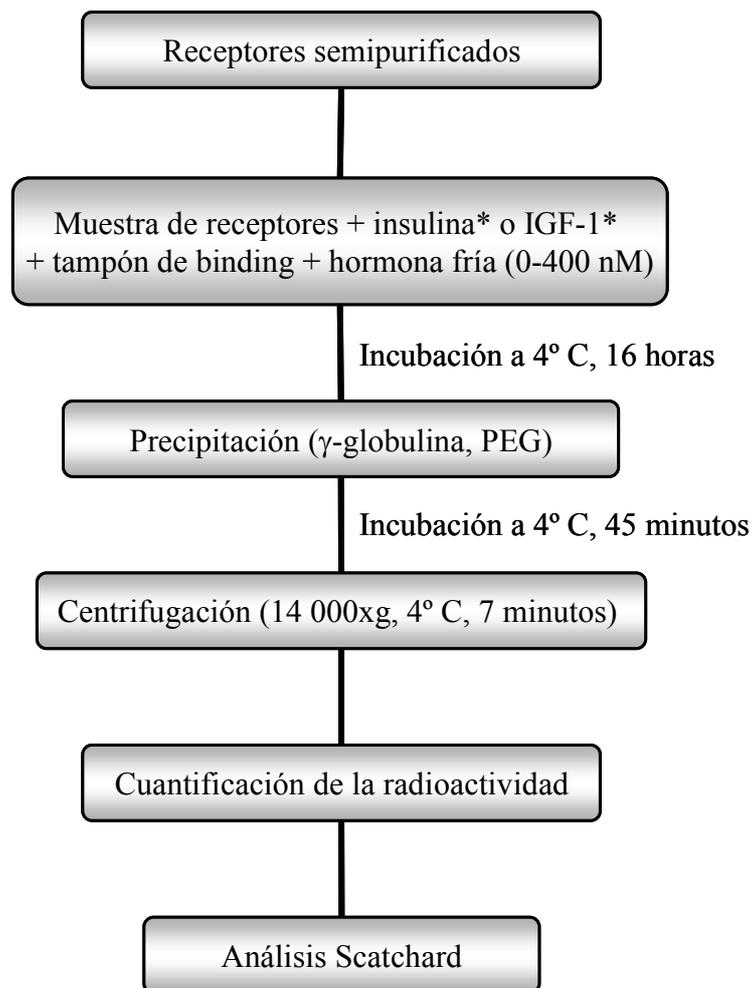
#### **3.10.1.- Material y métodos.**

- Tampón de *binding* (pH 7,5): 25 mM de hepes  
0,15 % de bacitracina  
0,3 % de BSA
- Tampón fosfato (pH 7,5): 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,2 %  $\gamma$ -Globulina bovina en 50 mM de tampón fosfato
- 25 % de PEG 8.000 en 10 mM de tampón fosfato
- <sup>125</sup>I-Tyr-A<sup>14</sup>- insulina e <sup>125</sup>I -IGF-I (ambos de AE=2 000 Ci/mmol, Amersham Life Sci.)

#### **3.10.2.- Procedimiento**

En la figura 3.3 se muestra el protocolo descrito por Párrizas y colaboradores (1994a). La muestra eluida de la columna de WGA (30-50  $\mu$ g de glucoproteína), se

incuba en el tampón de *binding* con el ligando marcado ( $35 \text{ pM } ^{125}\text{I-insulina}$  o  $^{125}\text{I-IGF-I}$ , que corresponde a  $20\,000 \text{ cpm}/100 \text{ }\mu\text{l}$  de insulina o  $15\,000 \text{ cpm}/100 \text{ }\mu\text{l}$  en el caso del IGF-I) y concentraciones crecientes de hormona fría (de  $0,0125$  a  $100 \text{ nM}$  de insulina porcina Sigma, o IGF-I humano recombinante, proporcionado por Ciba-Geigy-Basel-Suiza).



**Figura 3.3.-** Protocolo del ensayo de *binding* de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco.

La incubación se realizó a  $4^{\circ} \text{ C}$  durante 16 horas. Después de este período se precipitaron los receptores añadiendo la  $\gamma$ -globulina bovina y PEG 8 000 incubados a  $4^{\circ} \text{ C}$  durante 45 minutos. Tras este período de incubación las muestras fueron

centrifugadas a 14 000xg 5 minutos a 4° C. El sobrenadante fue descartado por aspiración y se procedió a la cuantificación de la radioactividad del precipitado.

Los resultados son analizados por el método de Scatchard (1949), obteniéndose para cada punto de desplazamiento, la insulina unida (B, *bound*) y libre (F, *free*). Tanto en el caso de la insulina como para el IGF-I se obtuvieron las curvas Scatchards, que pueden explicarse por dos hipótesis: a) la existencia de dos clases de receptores con diferentes afinidades o b) la existencia de cooperatividad negativa en una misma población de receptores. Los cálculos se realizaron en función de la primera hipótesis, más aceptada para la mayoría de investigadores (Gutiérrez y Plisetskaya, 1994), teniendo en cuenta la primera parte de curva, correspondiente a los receptores de alta afinidad y baja capacidad.

### **3.11.- Clonaje del transportador de glucosa (GLUT4) del músculo esquelético de dorada.**

#### ***3.11.1.- Extracción del ARN del músculo rojo de dorada.***

Para obtener el ARN total a partir de las muestras de músculo rojo se utilizó el kit comercial TriReagent de Molecular Research Center, INC. Este método combina el fenol y tiocianato de guanidina en una solución de una sola fase para facilitar la inhibición efectiva de la actividad RNAsa. Las muestras fueron homogenizadas con la utilización de un politron. El brazo del homogenizador se trató previamente con agua peroxigenada al 30% y entre cada muestra se realizaron lavados de 20 segundos con tampón de homogenización y agua al 0,1 % de dietilpirocarbonato (agua DEPC). Por cada 100 mg de muestra se añadieron 1 ml de TriReagent, posteriormente el homogenado se separó en una fase acuosa y orgánica con cloroformo (0,2 veces la cantidad del volumen inicial de TriReagent) seguido de una centrifugación (12000 xg, 4°C, 15 min). El ARN que quedó en la fase acuosa, se precipitó con isopropanol (0,5 veces la cantidad del volumen inicial de TriReagent) centrifugando (12000 xg, 4°C, 8 min). El precipitado se lavó con etanol 75% (el mismo volumen inicial de TriReagent) y se centrifugó (7500 xg, 4° C, 5 min). El precipitado se solubilizó con 100 µl de Formazol (Molecular Research Center) a 55°C durante 15 minutos.

La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría leyendo 2  $\mu$ l de cada muestra a una longitud de onda de 260 nm. Una vez determinada la concentración, las muestras se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.11.2.- Aislamiento del ARNm del músculo rojo de dorada.

#### *Material y reactivos*

- Tampón de unión: 0,5 M de LiCl  
50 mM de citrato de sodio  
0,1 % de SDS
- Tampón de elución: 1 mM de citrato de sodio  
0,1% de SDS
- Otros reactivos: 1% de SDS, 75 % de etanol, 1 M de Tris, 5 M de NaCl e isopropanol

Todas las soluciones y materiales utilizados en el aislamiento fueron elaborados y tratados con H<sub>2</sub>O DEPC.

#### *Procedimiento*

La purificación del ARN mensajero se llevó a cabo en columnas de oligo (dT)-celulosa (Molecular Research Center, INC), diseñadas para el aislamiento de la fracción de poli A ARN mensajero del ARN total purificado mediante el TriReagent. El procedimiento se detalla en los siguientes pasos:

- 1) Antes de su utilización las columnas fueron lavadas con 0,5 ml de tampón de unión.
- 2) El ARN total de la muestra fue llevada a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con el tampón de unión.
- 3) La muestra fue eluida 2 veces por la columna y lavada 2 veces con el tampón de unión.
- 4) A la columna se le agregó 600  $\mu\text{l}$  del tampón de elución y se recuperó el sobrenadante.
- 5) El sobrenadante fue llevado a una concentración 0,3 M y se le añadió 8  $\mu\text{l}$  del Polyacryl carrier (incluido en el kit de las columnas).
- 6) El ARN fue precipitado por una centrifugación a 12000xg a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos después de una incubación a temperatura ambiente con isopropanol (1,5 volúmenes del paso 5) durante 5 minutos.

- 7) El precipitado fue resuspendido con 12  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC. Una vez determinada la concentración, las muestras se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.11.3.- Síntesis de ADNc por la transcriptasa reversa.

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit comercial First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences). Antes de la reacción de la transcriptasa reversa (RT), el ARNm aislado fue llevado con agua DEPC a una concentración de 18,8 ng/ $\mu\text{l}$ , y 8  $\mu\text{l}$  de la solución de ARNm fue incubado a  $65^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. El procedimiento de la RT se resume en la siguiente tabla:

**Tabla 3.11.1.- Protocolo de la reacción de la transcriptasa reversa.**

	ARNm	Not I-d(T) <sup>1</sup>	MIX <sup>2</sup>	DTT <sup>3</sup>	H <sub>2</sub> O DEPC
<b>Control -</b>	-	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$
<b>Control +</b>	150 ng/8 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	-
<b>Muestra</b>	150 ng/8 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	-

Incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora

Incubación a  $90^\circ\text{C}$  durante 5 minutos

<sup>1</sup> Cebador Not I-d(T)18 en solución acuosa a 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

<sup>2</sup> Mezcla de reacción (Bulk first-strand cDNA reaction mixes)

<sup>3</sup> Solución 200 mM de dithiothreitol (DTT)

### 3.11.4.- Amplificación del ADNc por PCR y PCR anidada..

A partir del alineamiento de las secuencias de nucleótidos del transportador de glucosa GLUT4 disponibles en las bases de datos públicas, se diseñaron algunos cebadores degenerados para amplificar fragmentos de ADN de diferentes tamaños (tabla 3.11.2).

**Tabla 3.11.2.- Secuencia de cebadores degenerados utilizados para la clonación y secuenciación del Glut4 de dorada.**

Cebadores	Secuencia	Dirección	PCR
<b>DGlut1</b>	5'-CAT GCC RNC TGG RTT TCA GCA WCT-3'	sentido	primera
<b>DGlut2</b>	5'-RTA RTA RAA NAC NGC RTT-3'	antisentido	primera
<b>DGlut3</b>	5'-TTT CAG CAW CTY GGA GGG GAG AC-3'	sentido	anidada
<b>DGlut4</b>	5'-GRC TYT CRG GRC ARA ARG-3'	antisentido	anidada
<b>DGlut5</b>	5'-TWC GAR ATG CTN ATH CTN G-3'	sentido	anidada

En el ADNc de la reacción de RT se realizó una primera reacción de PCR, cuyo producto fue un fragmento de ADN correspondiente a 891 pb, en esta PCR se realizó un procedimiento de "HOT STAR" que consistió en incorporar los cebadores degenerados cuando el resto de los componentes de la PCR alcanzaron los 94 °C. En esta PCR se llevaron a cabo 39 ciclos con las siguientes fases: desnaturalización (94 °C - 1 minuto), emparejamiento (50 °C - 2 minutos) y extensión (65 °C - 2 minutos) y al acabar los ciclos una extensión final a 65 °C durante 7 minutos.

El producto de la primera PCR (dilución 1:10 de la muestra), fue utilizado como sustrato para realizar una segunda PCR (nested PCR). Los ciclos de esta PCR fueron: desnaturalización (94 °C - 1 minuto), emparejamiento (55 °C - 1 minuto) y extensión (65 °C - 1 minutos) y la extensión final a 65 °C durante 7 minutos. Para los controles negativos y positivos de ambas PCR se utilizaron cebadores específicos de  $\beta$ -actina

(proteína constitutiva y de expresión elevada en el tejido muscular). El procedimiento y la descripción de los ciclos de la primera y segunda PCR se detallan en la tabla 3.11.3:

**Tabla 3.11.3.- Protocolo de las reacciones de PCR.**

	ADN de la RT	Tampón de PCR <sup>1</sup>	dNTPs <sup>2</sup>	Taq Pol. <sup>3</sup>	Cebadores <sup>4</sup>	H <sub>2</sub> O mili-Q
<b>Control -</b>	-	5 µl	1 µl	1,25 µl	2 µl	40,75 µl
<b>Control +</b>	4 µl	5 µl	1 µl	1,25 µl	2 µl	36,75 µl
<b>Muestra</b>	4 µl	5 µl	1 µl	1,25 µl	2 µl	36,75 µl

<sup>1</sup> Tampón de PCR 10x (Biotools)

<sup>2</sup> Mezcla de dNTPs a 20 mM (Biotools)

<sup>3</sup> Taq polimerasa a 1U/µl (Biotools)

<sup>4</sup> Cebadores sentido y antisentido a concentraciones de 200 pM/µl

### 3.11.5.- Separación de los fragmentos de ADN amplificados.

#### *Material y reactivos*

- Tampón de carga:
  - 0,25 % de azul de bromofenol
  - 0,25 % de cianol xileno FF
  - 40 % de sucrosa en H<sub>2</sub>O mili-Q
  
- Tampón de TAE 50x (pH 8,8):
  - 242 g de tris base
  - 57,1 g de ácido acético glacial
  - 100 ml de EDTA 0,5 M
  - Para 1l de solución

#### *Procedimiento*

Para la separación e identificación de los fragmentos de ADN amplificados, se tomaron 40 µl de los productos de las reacciones de PCR y se les agregó 8 µl de tampón de carga, después las muestras fueron cargadas en geles al 1% de agarosa y 1% TAE y separadas con la ayuda de una fuente electroforética. Al finalizar la separación, el gel fue sumergido en una solución de bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta para la identificación de las fragmentos de ADN esperados, teniendo como referencia los pesos moleculares patrones cargados en los mismo geles.

### 3.11.6.- Aislamiento y ligación de los fragmentos de ADN amplificados.

#### *Material y reactivos*

- Kit comercial *GENECLEAN turbo kit* (Q.BIOgene)
- Kit comercial *InsT/Aclone™ PCR Producto Cloning Kit* (Fermentas)

#### *Procedimiento*

Después de la separación mecánica de las bandas del gel, que correspondían a los fragmentos de ADN del tamaño esperado, se procedió al aislamiento del ADN utilizando el kit comercial *GENECLEAN* y que consistió en el siguiente protocolo:

- 1) Por cada 100 mg de gel de agarosa se añadió un volumen de 100 µl de la solución *GENECLEAN Turbo Salt Solution*.
- 2) Se incubó a 55 °C en un baño maría durante 5 minutos hasta observar la disolución de la agarosa (agitando cada minuto durante la incubación).
- 3) La mezcla se transfirió a un tubo *GENECLEAN Turbo Cartridge* unido a un tubo de 2 ml y se centrifugó a 14 000xg durante 5 segundos.
- 4) Se agregó 500 µl de la solución *GENECLEAN Turbo Wash* y se centrifugó a 14 000xg durante 5 segundos, este paso se repitió dos veces más.
- 5) Después se centrifugó a 14 000xg durante 4 minutos y se agregó 30 µl de la solución *GENECLEAN Turbo Elution Solution* y se centrifugó a 14 000xg durante 1 minuto y se recuperó la solución eluida que contenía el ADN.
- 6) Una alícuota de 2 µl de la solución eluida fue cargada en gel de agarosa al 1% de manera similar al punto 3.4.5, la concentración del ADN aislado de la muestra fue cuantificado teniendo en cuenta la intensidad de la señal y como referencia a los pesos moleculares patrones (concentración conocida de ADN).

La ligación del ADN aislado (inserto) se realizó con el kit comercial *InsT/Aclone*, previamente de acuerdo al peso molecular del inserto se calculó la cantidad de ADN necesaria para mantener la relación molar 3:1 (inserto:vector) para aumentar el número de ligaciones positivas. La ligación se realizó a 4 °C durante toda una noche (ON), el control positivo fue un fragmento de ADN incluido en el kit. El protocolo de la ligación se resume en la siguiente tabla:

Tabla 3.11.4.- Protocolo de ligación de los fragmentos ADN aislados.

	Inserto <sup>1</sup>	Vector <sup>2</sup>	Tampón de ligación <sup>3</sup>	PEG 4000 <sup>3</sup>	BSA <sup>3</sup>	Ligasa T4 <sup>4</sup>	H <sub>2</sub> O mili-Q
<b>Control</b> +	4 µl	3 µl	3 µl	3 µl	0,75 µl	1 µl	15,25 µl
<b>Muestra</b>	X µl	3 µl	3 µl	3 µl	0,75 µl	1 µl	Y µl

<sup>1</sup> El volumen utilizado está en función del tamaño del inserto lo cual modifica el volumen de H<sub>2</sub>O

<sup>2</sup> Vector pTZ57R(2886 bp)

<sup>3</sup> Soluciones del kit

<sup>4</sup> Ligasa T4 ADN (5U/µl)

### 3.11.7.- Transformación y selección de las bacterias con los fragmentos de ADN amplificados.

#### Material y reactivos

- Kit comercial *InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit* (Fermentas)

- Medio SOC (100 ml):  
 2 g de Bacto-triptona  
 0,5 g de Extracto de levadura (Bacto-yeast extract)  
 1 ml de NaCl 1M  
 0,25 ml de KCl 1M  
 1 ml de solución de Mg<sup>2+</sup> 2M, filtrada y estéril  
 1 ml de solución de glucosa 1M, filtrada y estéril

Se añadió todos los componentes excepto el Mg<sup>2+</sup> y la glucosa y completamos hasta un volumen de 97 ml con agua destilada. Se disolvió y autoclavó la solución y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se Agregó el Mg<sup>2+</sup> y la glucosa, y por último se filtró el medio SOC con un filtro de 0,2 µm.

- Medio LB (pH 7):  
 10 g de Bacto-tryptone  
 5 g de Bacto-yeast extract  
 5 g de NaCl  
 Hasta 1l con H<sub>2</sub>O destilada

- Placas LB-Ampicilina:  
 15 g de agar  
 Hasta 1l con medio LB

Se autoclavó y cuando la solución alcanzó aproximadamente los 50 °C se añadió la ampicilina hasta llegar a una concentración final 100 µg/ml y rápidamente se distribuyó en placas petris.

#### Procedimiento

Después de la ligación del inserto con el vector, se procedió a la transformación de las bacterias competentes DH5 $\alpha$  como se describe en el siguiente protocolo:

- 1) En un tubo de 1,5 ml se añadió 5  $\mu$ l ligación y 50  $\mu$ l de bacterias competentes DH5 $\alpha$ , y se incubó en hielo durante 20 minutos
- 2) Después se incubó a 42 °C durante 1 minuto y 45 segundos, y el tubo se volvió a incubar en hielo 2 minutos.
- 3) Al tubo se le agregó 950  $\mu$ l de medio SOC y se cultivó a 37 °C con una agitación de 150 RPM durante 90 minutos.
- 4) Se centrifugó a 500 x g 4 °C por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.
- 5) Se resuspendió el precipitado en 100  $\mu$ l de medio SOC y se plaqueó en las placas de LB-Ampicilina, previamente a su uso a la placa se le añadió 100  $\mu$ l de IPTG 100mM y 20  $\mu$ l de la solución de X-Gal (50mg de X-gal/ml de N,N'-dimetil-formamida).
- 6) Las placas se cultivaron a 37° C durante toda la noche (ON) hasta observar la formación de colonias.

La identificación de las colonias positivas se dio por selección de color, ya que el vector posee el gen *lacZ*. Además se realizó una comprobación por PCR (screening por PCR), ya que el inserto pudo ser amplificado utilizando cebadores específicos M13F/M13R que se unen a regiones del vector, que después fueron separados en un gel de agarosa para comprobar el peso molecular esperado. El primer paso de la reacción del screening por PCR fue de 94 °C durante 1 minuto, con 25 ciclos de 94 °C - 30 segundos, 55 °C – 30 segundos y 72 °C 1 minuto.

A partir de las colonias positivas, se realizó un cultivo líquido de 16 a 24 horas (ON) a 37 °C en 4 ml de medio LB más 4  $\mu$ l de ampicilina (100mg/ml). A partir del cultivo líquido se obtuvo un stock de las colonias (850  $\mu$ l del cultivo líquido + 150  $\mu$ l de glicerol). Después se procedió a la purificación de los plásmidos recombinantes utilizando el kit comercial *Plasmid DNA Purification* siguiendo el siguiente protocolo:

- 1) El cultivo líquido se centrifugó a 11000 x g durante 30 seg. y se descartó el sobrenadante
- 2) El precipitado fue resuspendido con 250  $\mu$ l del tampón A1, después se agregó 250  $\mu$ l del tampón A2 y se mezcló suavemente por inversión 6-8 veces y la

mezcla se incubó a temperatura ambiente durante un máximo de 5 minutos, y a continuación agregamos 300 µl del tampón A3.

- 3) Se centrifugó a 11000 x g por 10 minutos y el sobrenadante fue traspasado a una columna del *NucleoSpin Plasmid QuickPure* acoplado a un tubo recolector.
- 4) Se centrifugó a 11000 x g durante 1 minuto, posteriormente a la columna se agregó 450 µl del tampón AQ y se centrifugó a 11000 x g 4 minutos.
- 5) Se añadió a la columna 50 µl de tampón AE y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente, después se centrifugó por 1 minuto a 11000 x g y se recuperó el líquido precipitado de la columna.

### **3.10.8.- Secuenciación y alineamiento de los fragmentos de ADN amplificados.**

A partir del plásmido recombinante purificado se realizó una digestión para liberar el inserto del vector, para lo cual se utilizó 5 µl del plásmido purificado y se añadió 1 µl de los enzimas EcoR1 y Hind III, 2 µl del tampón de EcoR1 y 11 µl de H<sub>2</sub>O mili-Q, esta digestión fue incubada a 37 °C por 3 horas y después cargada en un gel de agarosa al 1 % para comprobar la presencia del inserto y del vector.

Una vez comprobada la existencia del plásmido recombinante se realizó una reacción de secuenciación utilizando el kit *ABI Pris BIGDYE Terminador V3.1*, utilizando 0,5 µl del plásmido más 0,5 µl de los cebadores (M13F ó M13R), 4 µl de la mezcla del kit y 15 µl de H<sub>2</sub>O mili-Q. El primer paso de la reacción de secuenciación se realizó durante 1 minuto a 96 °C, con 25 ciclos de 96 °C - 30 segundos, 50 °C – 15 segundos y 60 °C por 4 minutos.

De la reacción de secuenciación se precipitó el ADN siguiendo el siguiente protocolo:

- 1) Se añadió los 20 µl de la reacción de secuenciación en un tubo de 1,5 ml.
- 2) Se agregó 5 µl de EDTA (125nM) y 60 µl de etanol al 100 %, se agitó la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante un máximo de 15 minutos.
- 3) Se centrifugó la solución a 4 °C-14 000 x g durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante.
- 4) Se añadió 200 µl de etanol al 70 %, y se centrifugó a 4 °C-14000 x g por 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con el etanol al 70 %.

- 5) Se centrifugó a 4 °C-14000 x g durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante al máximo utilizando una pipeta y si fue necesario se volvió a centrifugar para eliminar el etanol.

Después el precipitado fue enviado a secuenciar a los servicios científico-técnicos de la Universitat de Barcelona, las secuencias de los fragmentos de ADN, fueron introducidas en las bases públicas (BLAST, PUBMED).

### **3.12.- Análisis de la expresión del ARN mensajero del transportador de glucosa (GLUT4) del músculo esquelético de trucha mediante Northern Blot.**

#### **3.12.1.- Obtención de las membranas.**

En un gel de formaldehído-agarosa al 1,1 % se cargaron 15 µg del ARN total del músculo rojo de trucha (aislados de manera similar al de dorada punto 3.4.4), con tampón de carga (MOPS X 20, 0,25%, azul de bromofenol en 50% glicerol, formaldehído 37%, bromuro de etidio 1 mg/ml) y Formazol® (50% del volumen final de la muestra). Antes de cargar las muestras se incubaron durante 15 minutos a 55°C. Después se separaron bajo un campo constante de 50 V utilizando un tampón de electroforesis MOPS X 1 (MOPS 4 M, 1 M NaOH, 1 mM EDTA a pH 7 , autoclavado).

Se comprobó que la electroforesis se realizó correctamente visualizando el gel con luz UV de longitud de onda de 312 nm. Después se realizaron tres lavados al gel para desnaturalizar el ARN: NaOH 0,5 mM (30 minutos), Tris HCl 0,1 M pH 7.5 (20 minutos), SSC X 10 (NaCl 1,5 M, citrato sódico tribásico deshidratado 0,15 M, a pH 7 ajustado con HCl) (10 minutos).

Después de estos lavados al gel, el ARN se transfirieron a una membrana Nytran®N (Scheiler y Schuell) previamente normalizada con agua DEPC. La transferencia del ARN se realizó por capilaridad con tampón SSC X10 durante 18 horas.

Después de la transferencia, la membrana se irradió 5 minutos con luz UV con una potencia de 50 KJ. Los pesos moleculares (Ambion®) que también se habían

cargado en el gel fueron cortados de la membrana y teñidos con una solución de ácido acético 5% (2 min en agitación) y azul de metileno 0,4%-acetato de sodio 0,5 M (3 min en agitación) y se comprobó que el ARN se transfirió correctamente.

### **3.12.2.- Prehibridación y marcaje de la sonda btGLUT de trucha común.**

Para la prehibridación de la membrana se utilizaron 10 ml de tampón comercial (UltraHyb, Ambion Austin, TX). La prehibridación de la membrana se realizó en agitación ligera en horno de hibridación a 42 °C durante 2 horas.

Para el marcaje de 15 µg de la sonda de btGLUT (2,3 Kb, Nucleótidos 151-2472, GenBank AF247395), Se utilizó el kit comercial de marcaje Standard Labeling Protocol (Invitrogen) y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>-P] dCTP 3000 Ci/mmol (Amersham).

El producto de la reacción se purificó con las columnas Microspin Columns (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó 1 µl del producto marcado con un contador  $\beta$ . La membrana fue hibridada con 10<sup>6</sup> cpm/ml a 42°C durante 16 horas. Después se realizaron 3 lavados de la membrana con una solución de 2X SSC - 0,1% SDS a temperatura ambiente durante 15 minutos, dos lavados con 1X SSC - 0,1 % SDS de 15 minutos y por último 2 lavados 1X SSC - 0,1 % SDS por 15 minutos. Después las membranas fueron expuestas durante un tiempo de 14 días con películas fotográficas (X-OMAT AR Kodak). Para hacer el control de carga del ARN total, la membranas fueron rehibridadas con una sonda de 200 pb de ADN de la subunidad ribosómica 18S que provenía de un clon de ADN obtenido por RT-PCR utilizando ARN de ovario de *Salmo trutta*.

Después se realizaron tres lavados de 15 minutos con 2X SSC - 0,1% SDS, dos lavados de 15 minutos con 1X SSC - 0,1% SDS y por último dos lavados con 0,1X SSC - 0,1 % SDS a 42 °C. Las membranas estuvieron expuestas durante un día a películas fotográficas (X-OMAT AR Kodak). En todas las exposiciones se utilizaron pantallas intensificadores (Dupont); posteriormente a la exposición de las películas, se procedió a la cuantificación de la bandas utilizando el programa *TOTAL LAB*.

### **3.13.- Cuantificación a nivel de proteína del transportador de glucosa (GLUT4) del músculo esquelético de dorada.**

#### **3.13.1.- Extracción de las proteínas del tejido muscular de dorada.**

##### *Material y reactivos*

- Tampón de lisis: 1 mM de ortovanadato de sodio  
10 mM de tris-HCl  
1 % de SDS  
1 mM de benzamidina  
0,96 µg/µl de leupeptina  
0,34 µg/µl de pepstatina

##### *Procedimiento*

A partir de las muestras de tejido muscular obtenidas en los diferentes experimentos se realizó la extracción de proteínas realizando siguiente protocolo:

- 1) En tubo de vidrio (pirex) se peso 1 gramo de tejido y se añadió 5 ml de tampón de lisis hirviendo.
- 2) Se homogenizó el tejido en un politron y después se hirvió la muestra durante 10 segundo en un microondas.
- 3) Se centrifugó la mezcla a 12000 x g-15 °C durante 5 minutos.
- 4) Se recuperó el sobrenadante y si fue necesario se centrifugó hasta observar el sobrenadante limpio.

#### **3.13.2.- Cuantificación de proteínas: método de Bradford.**

La determinación de la concentración de proteínas se realizó con un “kit” comercial basado en el método espectrofotométrico de Bradford (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Lab., Germany). El método se basa en el cambio de diferencial de color del azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a la concentración de proteínas. El azul brillante de Coomassie G-250 tiene un máximo de absorbancia a 465 nm, éste máximo cambia a 595 nm cuando se une a la proteína. El procedimiento del ensayo tiene su linealidad para concentraciones de proteínas entre 1µg/ml a  $\leq 25$  µg/ml.

### 3.13.3.- Electroforesis de proteínas.

El método de separación electroforética se basa en la migración diferencial de las moléculas en solución a través de un campo eléctrico. Este método es de amplia aplicación en la biología molecular, especialmente en la purificación y caracterización de proteínas. La velocidad de migración o movilidad electroforética de las moléculas en el campo eléctrico depende de su intensidad, del tamaño, forma y carga de las proteínas, y también de la fuerza iónica y temperatura del medio en que se desplazan.

Actualmente, el soporte más frecuentemente utilizado para separar electroforéticamente proteínas, es el gel de poliacrilamida. Estos geles se forman por la polimerización de largas cadenas de monómeros de acrilamida unidas covalentemente en presencia de bisacrilamida que actúa como agente entrecruzador. La polimerización se inicia por la presencia de radicales libres que se forman al reaccionar el persulfato de amonio (APS) con el catalizador N,N,N',N'-tretametililenodiamida (TEMED).

### 3.13.4.- Geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

#### *Fundamento.*

Inicialmente, el sistema fue desarrollado por Laemmli (1970) y modificado por Thomas y Koemberg (1978). En este tipo de electroforesis tanto el soporte (gel) como el tampón de electroforesis tienen entre otros componentes al sodio dodecilsulfato (SDS) como agente tensioactivo. Por otro lado, las proteínas se mezclan con tampón de muestra, uniéndose al detergente aniónico SDS. Finalmente, todas las proteínas desnaturalizadas se encuentran solubilizadas y cargadas negativamente por la unión del SDS, la cantidad de SDS que se asocia a una proteína es aproximadamente proporcional a su tamaño o mejor dicho a su peso molecular. Así, este método electroforético permite estimar el peso molecular aparente (MW<sub>ap</sub>) de una proteína en forma relativa al peso molecular y movilidad electroforética de las proteínas estándares.

#### *Material y reactivos.*

- Tampón de carga:                    para 20 ml de LSBx3  
   1ml de tris-HCl 1,5 M (pH 6,8)  
   12 ml de glicerol  
   1,2 g de SDS  
   4 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

Antes de utilizar se agregó 23 mg de DTT/0,5 ml de LSBx3 (calentando a 100° C para disolver el DTT)

- Tampón de electroforesis: para 500 ml  
1,53 g de trizma base  
7,2 g de glicina  
0,5 g de SDS
- Tampón de transferencia: para 2 l  
7,88 g de tris-HCl  
28,52 g de glicina  
400 ml de metanol
- Tampón de lavado: para 2 l  
1,48 g de tris-HCl  
5,84 g de NaCl
- Tampón de bloqueo: Tampón de lavado con 5% de leche en polvo sin grasas.
- Gel apilador o concentrador (Stacking):  
325 µl de Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0,8%  
625 µl de Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)  
1,52 ml de H<sub>2</sub>O  
25 µl de SDS al 10%  
12,5 µl de APS al 10%  
2,5 µl de TEMED
- Gel separador (Resolving) al 12 %:  
4 ml de Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0,8%  
2,5 ml de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)  
3,5 ml de H<sub>2</sub>O  
100 µl de SDS al 10%  
33,3 µl de APS al 10%  
6,6 µl de TEMED

### *Procedimiento*

- 1) Los geles fueron preparados en lámina (“slab”) para electroforesis vertical de tipo discontinuo (gel apilador y gel separador). El tamaño del gel fue de 13x12,5 cm (ancho x altura) y con un espesor de 1,5 mm.
- 2) Las placas, peines y espaciadores fueron lavados en agua, secados y desengrasados con etanol. Para la electroforesis se utilizaron aparatos y sistemas comerciales (Hoefer-Biorad).
- 3) Primero se prepara el gel separador y se vierte entre las placas de vidrio, se deja reposar en posición vertical hasta que polimerice. El oxígeno es un inhibidor de

la polimerización, por está razón se añade suavemente agua, lo suficiente para cubrir el gel. Cuando el gel polimeriza (15 minutos aprox.) se vierte el agua. Después se añadió el gel apilador y se inserta el peine para formar los pozos, quedando que no queden burbujas de aire atrapadas, se deja polimerizar durante 5-10 minutos. Se retira el peine y se lavan los pozos con tampón de electroforesis.

- 4) Los lisados de proteínas fueron llevados a volúmenes de 10  $\mu$ l con tampón de lisis con concentraciones de 25  $\mu$ g de proteínas para el músculo rojo y 50  $\mu$ g para músculo blanco, después se les añadió 5  $\mu$ l de tampón de carga. El tampón de carga tiene dos funciones, por un lado desnaturaliza las proteínas, y por otro apantalla las proteínas cargándolas negativamente (el SDS se une a los dominios hidrofóbicos formando micelas aniónicas). Finalmente, las proteínas se terminan de desnaturalizar a 100 °C durante 5 minutos; de está forma las proteínas oligoméricas son desmontadas en subunidades monoméricas
- 5) Las muestras fueron cargadas en el gel y se realizó la electroforesis a 125 V durante 90 minutos con el tampón de electroforesis.

### **3.13.5.- Detección con anticuerpos (“western-blot”).**

#### *Fundamento.*

La electrotransferencia de proteínas desde un gel a una membrana se conoce como “Western-blotting”. Este método combina la capacidad de resolución de la separación de las proteínas con la especificidad de la identificación inmunológica. Estas características hacen del western-blot un método rápido y altamente sensible. Para conseguir resultados óptimos, las proteínas deben ser transferidas de manera eficiente desde el gel a la membrana. Diferentes tipos de membranas se han utilizado como soporte para inmovilizar proteínas; sin embargo, las ampliamente utilizadas son las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), nitrocelulosa (NC) y nylon.

El reconocimiento específico con una fuerte afinidad de unión entre el antígeno (proteína inmovilizada) y el anticuerpo es la base de la técnica. La proteína blanco es localizada por anticuerpo policlonal o monoclonal específico. Después, un anticuerpo secundario reconoce al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario debe de ser especie-específico, y contiene la marca para producir la imagen visual final.

*Material y reactivos.*

- Tampón de transferencia: para 2 l  
7,88 g de tris-HCl  
28,52 g de glicina  
400 ml de metanol
- Tampón de lavado: para 2 l  
1,48 g de tris-HCl  
5,84 g de NaCl

Antes de utilizar se agregó a la solución Tween20 hasta llegar a una concentración final de 0,1% de Tween20.

- Tampón de bloqueo: Tampón de lavado con 5% de leche desnatada
- Anticuerpo primario btGLUT4 dilución 1:500 en tampón de bloqueo
- ECL™ Western Blotting System (Amersham, ref. RPN2108)

*Procedimiento*

- 1) Finalizada la electroforesis se montó el sistema para transferir las proteínas del gel a la membrana; para ello se realizaron los siguientes pasos:
- 2) Sobre uno de los soportes, se colocó un estropajo humedecido con el tampón de transferencia.
- 3) Se colocó 1 hoja de Whatman 3MM empapada con tampón de transferencia.
- 4) Se cubrió con una membrana de PVDF (previamente hidratada con metanol y lavada con tampón de transferencia).
- 5) Sobre la membrana se colocó el gel que previamente fue hidratado con tampón de transferencia (evitando la formación de burbujas entre la membrana y el gel).
- 6) Se cubrió el gel con otra hoja de papel Whatman y otro estropajo humedecidos con tampón de transferencia formando de esta manera el “sandwich” y que se montó en el equipo de transferencia.
- 7) La transferencia fue llevada a cabo en una cámara fría (4 °C) con agitación magnética a 0,1 amperios (constante) durante toda una noche.
- 8) Se desmontó el sándwich. Se marcaron los pozos para la identificación de los carriles de las muestras y la membrana fue incubada en el tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 horas.

- 9) La membrana fue incubada en agitación en un falcón con 5 ml del anticuerpo primario btGLUT4 durante 2 horas y media.
- 10) Se lavó la membrana 3 veces con tampón de lavado durante 10 minutos.
- 11) Después se incubó la membrana en agitación en un falcón con 5 ml de anticuerpo secundario anti-IgG para conejo conjugada con peroxidasa durante 1 hora.
- 12) Se lavó la membrana 3 veces con tampón de lavado durante 10 minutos.
- 13) La detección de la proteína fue realizada por quimioluminiscencia. Tras la incubación de la membrana con los reactivos del ECL durante 1 minuto.
- 14) La membrana después de la incubación con el ECL fue expuesta a una película fotográfica (X-OMAT AR Kodak) en una cámara oscura, y el film revelado dependiendo de la intensidad de la marca, para la posterior identificación y cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes al transportador GLUT4 utilizando el programa *TOTAL LAB*.
- 15) En la misma membrana se realizó un segundo western-blot de actina, para la normalización de los valores de proteína del transportador de glucosa, realizando los siguientes pasos:
- 16) Después de acabar con el western de GLUT4, la membrana fue lavada 3 veces en agitación con tampón de lavado durante 5 minutos.
- 17) Se lavó la membrana a 4 °C en agitación con tampón de lavado durante toda una noche.
- 18) La membrana fue incubada en tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora y se realizaron 3 lavados en agitación de 5 minutos con tampón de lavado.
- 19) Durante 1 hora en agitación se incubó la membrana con el anticuerpo primario de actina (JAL-20) dilución 1:20000 en tampón de lavado y se realizaron 3 lavados en agitación con tampón de lavado de 5 minutos.
- 20) Después se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgM dilución 1:20000 en tampón de lavado durante 1 hora, la membrana fue lavada 3 veces en agitación con tampón de lavado durante 5 minutos y se procedió a la incubación con los reactivos del ECL y a la exposición de las películas de forma similar a la detección y cuantificación del GLUT4.

### **3.15. Análisis estadístico.**

Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico SPSS 11.5.1. Las diferencias significativas entre grupos se calcularon mediante las pruebas T-Student y Students Newman-Keuls, considerando una significancia a  $p < 0,05$ . En algunos casos se realizó la prueba ANOVA HSD Tukey (realizando previamente una prueba de homogeneidad de varianzas). En el caso de que no hubo homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba ANOVA Games-Howell, en ambos casos a niveles de significancia de  $p < 0,05$ .

---

## **4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



#### **4.1.- BLOQUE I: Efectos de dietas con diferentes perfiles de aminoácidos en trucha arco iris y dorada.**

Este bloque experimental formó parte de la primera etapa de un proyecto multidisciplinario, cuyo objetivo principal fue el de evaluar el uso en la dieta de proteínas de origen vegetal en el cultivo de dos especies carnívoras, la trucha arco iris y la dorada. En peces carnívoros en cultivo existe mucha información sobre el efecto de los componentes principales de la dieta sobre el crecimiento de los animales, pero eran escasos los estudios sobre el efecto de la composición de aminoácidos de la dieta y en concreto de dietas que contienen proteína de origen vegetal.

En el presente bloque experimental tanto en trucha arco iris (T) como en dorada (D), los animales fueron alimentados con 4 dietas experimentales durante 12 semanas (*punto 3.1.1*). Las dietas TM y DM basadas en los perfiles de aminoácidos esenciales del músculo (M) y las dietas TC y DC diseñadas a partir del perfil de aminoácido esencial corporal (C) de cada especie, estas dietas fueron elaboradas con la finalidad observar si la dieta del perfil de aminoácidos del músculo, puede mejorar el crecimiento de los peces respecto a animales alimentados con una dieta basada en el perfil corporal de aminoácidos esenciales. Las dietas TMGlu, TCGlu, DMGlu y DCGlu fueron diseñadas para evaluar los efectos sobre el crecimiento de la variación del balance entre aminoácidos esenciales (IAA) y aminoácidos no esenciales (DAA) de la dieta (relación IAA/DAA), debido al incremento del aminoácido no esencial ácido glutámico (Glu) en estas dietas.

En ambas especies, además de los parámetros de crecimientos analizados en los animales alimentados con las distintas las dietas, también se evaluó los efectos de estas dietas sobre los niveles plasmáticos postprandiales de glucosa, insulina y glucagón, así como, la respuesta de los receptores de insulina e IGF-I a los tratamientos con dichas dietas (*puntos 3.4, 3.6, 3.7 y 3.9*). En truchas arco iris y doradas alimentadas con las dietas TM, TMGlu y DM, DMGlu respectivamente, también se evaluaron los cambios de los niveles de glucosa, insulina y glucagón en plasma tras una alimentación forzada con la dieta correspondiente en una cantidad del 1% del peso corporal del pez a lo largo de distintos períodos de tiempo de la post ingesta del alimento (1, 3, 6, 12 y 24 horas).

#### 4.1.1.- Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en trucha arco iris.

Las diferentes dietas experimentales utilizadas en trucha arco iris durante 12 semanas, no provocaron efectos significativos en el peso corporal final ni en la tasa de crecimiento específico de los animales. En comparación con las otras dietas, los peces alimentados con la dieta TMGlu presentaron valores inferiores del índice hepatosomático que los grupos de las dietas TM y TC; además, los peces del grupo TMGlu consumieron una mayor cantidad de alimento. Los peces alimentados con la dieta TMGlu basada en los perfiles de aminoácidos del músculo y suplementada con DAA, presentaron una menor tasa de conversión alimenticia y menor tasa de eficiencia proteica. (Tabla 4.1.1).

**Tabla 4.1.1.- Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las truchas arco iris alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	TM	TMGlu	TC	TCGlu
Peso corporal inicial (g)	14,1 ± 0,04	14,1 ± 0,03	14,1 ± 0,05	14,1 ± 0,06
Peso corporal final (g)	110,0 ± 2,0	100,1 ± 3,9	110,1 ± 8,1	103,6 ± 2,5
Índice Hepatosomático	1,87 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,87 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,84 ± 0,10 <sup>ab</sup>
Tasa de crecimiento específico (%)	2,54 ± 0,02	2,42 ± 0,05	2,53 ± 0,09	2,46 ± 0,03
Tasa de conversión alimenticia	1,00 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,02 <sup>a</sup>
Tasa de eficiencia proteica	2,22 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,28 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,30 ± 0,05 <sup>a</sup>

Los datos son medias (n=3) ± E.S.

Tasa de crecimiento específico =  $[100 \times [\ln(\text{peso final corporal}) - \ln(\text{peso inicial corporal})]] / \text{días}$

Tasa de conversión alimenticia = peso húmedo ganado / peso de alimento seco ingerido

Tasa de eficiencia proteica = peso húmedo ganado / peso neto de proteínas ingeridas

Índice Hepatosomático =  $100 \times (\text{peso del hígado}) / (\text{peso corporal})$

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05; prueba Student Newman-Keuls).

La composición corporal de los peces al final del experimento, las ganancias diarias de nitrógeno, lípidos y la eficiencia de la retención de proteínas y lípidos se muestran en la tabla 4.1.2. La composición química corporal de los peces y las ganancias diarias entre dietas no fueron significativamente diferentes, excepto en la dieta TMGlu que presentó una menor tasa de retención de proteínas y lípidos. Los niveles de excreción de amonio de los animales alimentados con la dieta TMGlu fueron significativamente superiores a los registrados con las otras dietas experimentales.

**Tabla 4.1.2.- Composición corporal y utilización de nutrientes de trucha arco iris alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	TM	TMGlu	TC	TCGlu
<i>Composición corporal</i> (% ó kJ/g peso húmedo)				
Agua	68,1 ± 0,5	68,0 ± 0,5	67,8 ± 0,6	68,1 ± 0,6
Proteínas	16,5 ± 0,4	16,4 ± 0,3	16,6 ± 0,2	16,3 ± 0,5
Lípidos	12,3 ± 0,4	12,5 ± 0,8	12,5 ± 0,6	12,4 ± 1,0
<i>Ganancia (/g peso corporal/día)</i>				
Nitrógeno (mg)	483,6 ± 10,9	467,3 ± 12,1	489,8 ± 13,8	467,3 ± 17,1
Lípidos (g)	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2
<i>Retención (% crudo ingerido)</i>				
Proteínas	37,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	32,9 ± 1,6 <sup>b</sup>	38,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	37,8 ± 2,3 <sup>a</sup>
Lípidos	83,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	73,6 ± 3,7 <sup>b</sup>	83,4 ± 5,8 <sup>a</sup>	83,9 ± 5,9 <sup>a</sup>
<i>Excreción (mg/kg/24 horas)</i>				
Amonio	308 ± 71 <sup>a</sup>	517 ± 72 <sup>b</sup>	243 ± 34 <sup>a</sup>	293 ± 38 <sup>a</sup>

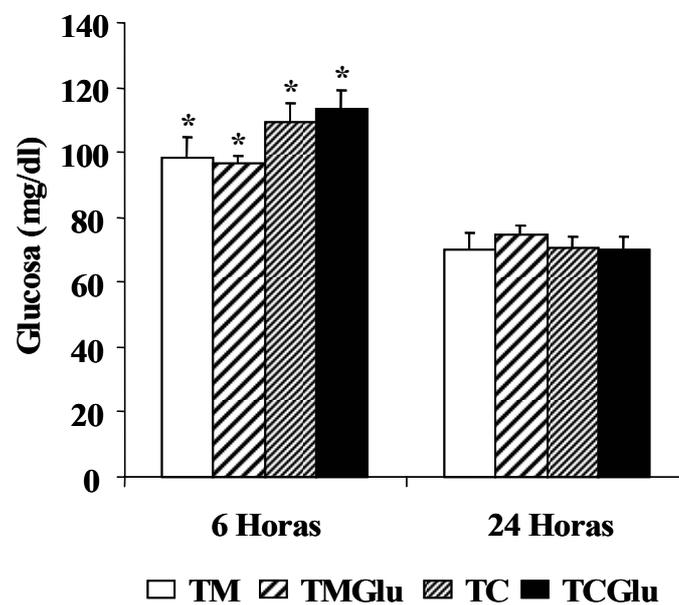
Los datos son medias (n=3) ± E.S.

Composición corporal de los peces al inicio del experimento: Agua 73,5 %; Proteínas 15,03 %; Lípidos 8,89 %.

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba Student Newman-Keuls).

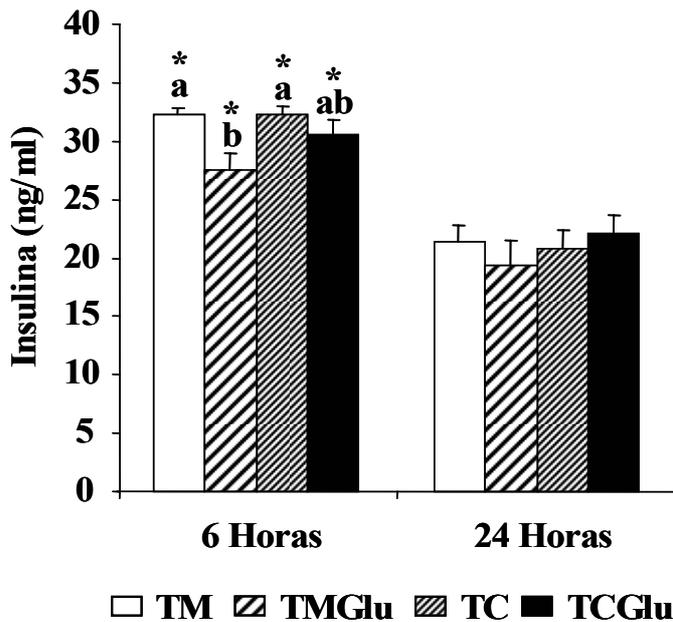
#### 4.1.2.- Niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la trucha arco iris.

En todos los grupos experimentales, los niveles plasmáticos de glucosa sanguínea a las 6 horas de la ingesta fueron superiores a los registrados a las 24 horas. Los valores de glucosa en plasma de los peces alimentados con las diferentes dietas estuvieron comprendidos entre  $96,7 \pm 2,4$  y  $113,3 \pm 6,0$  mg/dl a las 6 horas y de  $70,0 \pm 5,1$  a  $74,7 \pm 2,7$  mg/dl a las 24 horas de la ingesta. Los niveles plasmáticos de glucosa en ambos puntos del muestreo postprandial no mostraron diferencias significativas entre dietas (Figura 4.1.1).



**Figura 4.1.1.-** Niveles plasmáticos de glucosa sanguínea de trucha arco iris a las 6 y 24 horas de la ingesta. No existen diferencias significativas en los valores de glucosa en plasma entre dietas. El asterisco indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

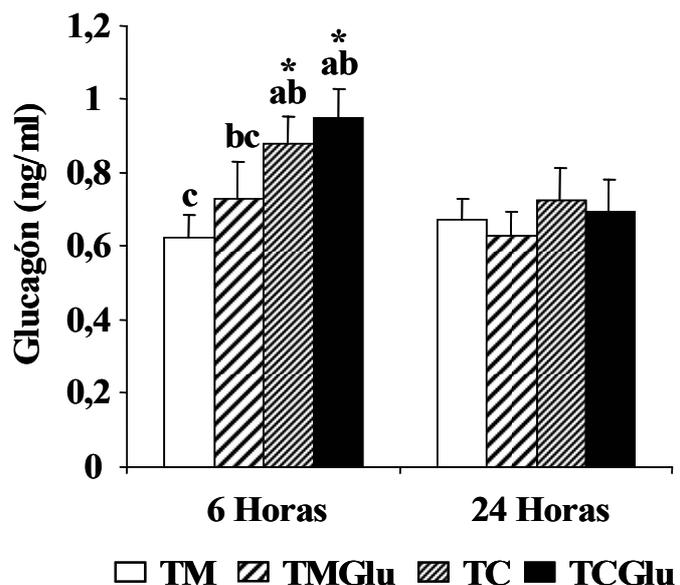
Los niveles de insulina a 24 horas post ingesta, variaron dentro del rango de  $19,3 \pm 2,3$  a  $21,4 \pm 1,5$  ng/ml siendo por lo tanto muy similares entre grupos alimentados con las diferentes dietas. A las 6 horas de la ingesta del alimento, se observaron valores elevados de insulina ( $27,5 \pm 1,5$  a  $31,9 \pm 0,7$  ng/ml), que fueron superiores en cerca del 30 % con respecto a los niveles a las 24 horas. La insulina circulante de los animales alimentados con las dieta TMGlu y TCGlu (menor relación entre IAA/DAA), fueron inferiores a los de los peces de las dietas TM y TC respectivamente, aunque la diferencia solo fue significativa para la dieta TMGlu (Figura 4.1.2).



**Figura 4.1.2.-** Niveles de insulina plasmática de truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales. <sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas y el asterisco indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

Los niveles de glucagón en plasma a las 24 horas de la ingesta, oscilaron en el rango de  $0,6 \pm 0,1$  a  $0,7 \pm 0,1$  ng/ml y fueron similares entre los diferentes grupos experimentales. A las 6 horas de la ingesta, los peces alimentados con las dietas TC y TCGlu, tuvieron valores de glucagón plasmáticos más altos que los grupos de las dietas TM y TMGlu, aunque la diferencia solo fue significativa entre los grupos de la dieta TM ( $0,6 \pm 0,1$  ng/ml) y TCGlu ( $1,0 \pm 0,1$  ng/ml). Los valores de glucagón en plasma sanguíneo a las 6 horas fueron superiores a los valores encontrados a las 24 horas en los grupos de las dietas TC y TCGlu (Figura 4.1.3).

**Figura 4.1.3.-** Valores de glucagón en el plasma sanguíneo de las truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales. <sup>a,b,c</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas y el asterisco indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).



#### 4.1.3.- Caracterización de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco de trucha arco iris.

Los distintos parámetros de caracterización de los receptores de insulina del músculo blanco de trucha, no presentaron diferencias significativas entre las dietas experimentales. La constante de disociación de los receptores de insulina varió entre  $0,11 \pm 0,02$  y  $0,34 \pm 0,10$  nM. El número de receptores osciló en el rango de los  $22,3 \pm 10,1$  a  $59,1 \pm 17,6$  fmol/mg de glucoproteína (Tabla 4.1.3). La unión de la hormona a su receptor (*binding*) específico de insulina fue similar entre los diferentes grupos de animales alimentados con las dietas experimentales. Aunque las diferencias no fueron significativas en las que se observó una tendencia a que el *binding* fuera más alto en las dietas Glu, los valores del *binding* de insulina estuvieron en el rango de  $1,2 \pm 0,3$  a  $2,3 \pm 0,5$  % para 20  $\mu$ g de glucoproteína (Figura 4.1.4).

El valor promedio del *binding* específico del IGF-I fue superior al nivel del *binding* de insulina en todos los grupos de animales (Figura 4.1.4). La constante de disociación de los receptores de IGF-I fue de  $0,05 \pm 0,02$  a  $0,24 \pm 0,08$  nM y no se encontraron diferencias significativas entre dietas. En el *binding* de IGF-I tampoco se observaron diferencias significativas entre dietas (valores entre  $2,5 \pm 0,6$  y  $3,5 \pm 1,2$  % para 20  $\mu$ g de glucoproteína). El número de receptores de IGF-I varió entre los  $29,9 \pm 10,7$  y  $72,0 \pm 4,6$  fmol/mg de glucoproteína. Los animales de la dieta TM presentaron un mayor número de receptores de IGF-I que las otras dietas, siendo esta diferencia significativa solo con los grupos de las dietas TMGlu y TCGlu (Tabla 4.1.3).

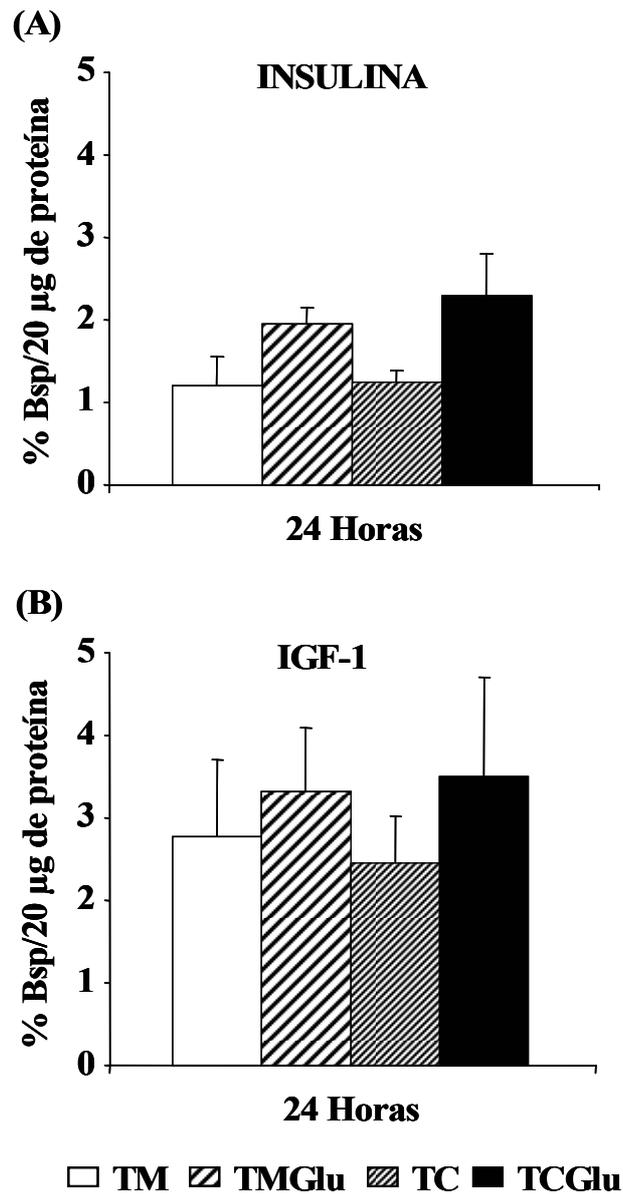
**Tabla 4.1.3.- Características de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco de trucha arco iris alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	TM	TMGlu	TC	TCGlu
Kd INS	$0,34 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,09$
Kd IGF-1	$0,24 \pm 0,08$	$0,06 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,04$	$0,05 \pm 0,02$
Ro INS	$59,1 \pm 17,6$	$25,3 \pm 2,5$	$22,3 \pm 10,1$	$38,8 \pm 5,5$
Ro IGF-1	$72,0 \pm 4,6^a$	$29,9 \pm 10,7^b$	$32,0 \pm 12,8^{ab}$	$41,5 \pm 5,5^b$

Kd, Constante de disociación (nM); Ro, Número de receptores (fmol/mg de glucoproteína)

No existen diferencias significativas entre dietas a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

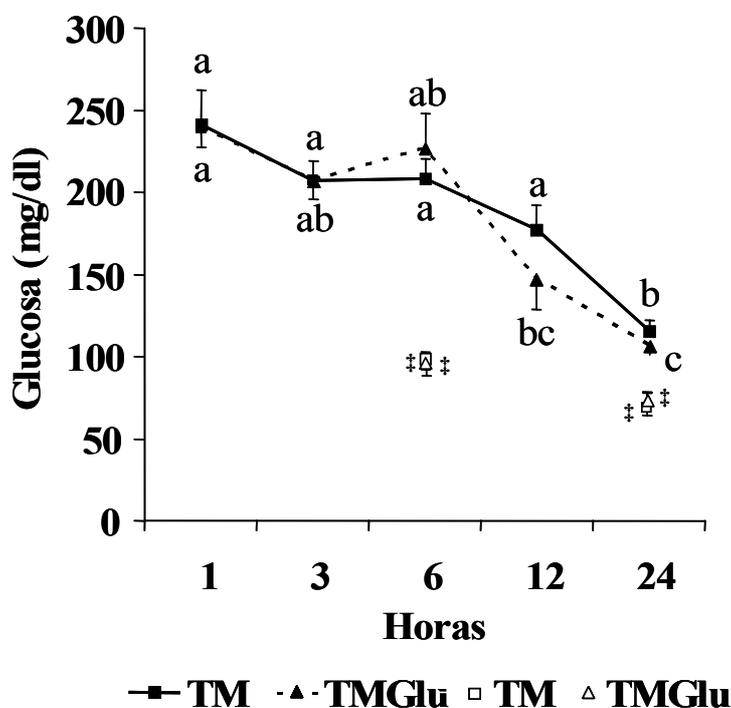
<sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas



**Figura 4.1.4.-** Binding específico de los receptores de insulina (A) e IGF-I (B) del músculo blanco de trucha arco iris. No existen diferencias significativas entre dietas a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

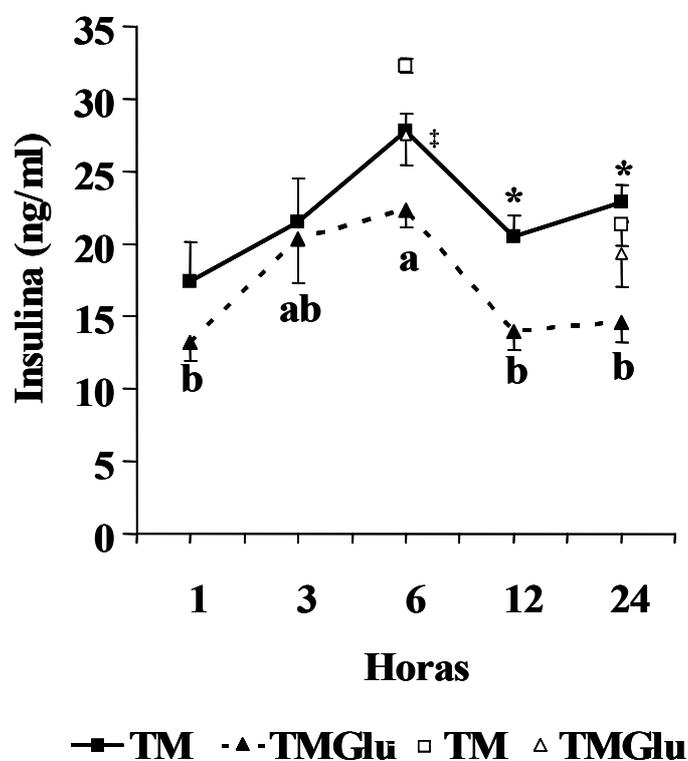
#### 4.1.4.- Efecto de la alimentación forzada sobre los niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la trucha arco iris.

Durante la alimentación forzada de trucha, los niveles de glucosa plasmáticos alcanzaron los valores máximos de  $241,1 \pm 21,2$  mg/dl (dieta TM) y  $239,4 \pm 12,1$  mg/dl (dieta TMGlu) a una hora después de la ingestión del alimento. Estos incrementos significativos observados a lo largo del período post prandial, fueron disminuyendo de forma paulatina hasta llegar a alcanzar los niveles basales de glucosa en plasma (24 horas). Los valores de glucosa en plasma en la alimentación forzada, fueron significativamente superiores a los valores encontrados en la administración normal de las dietas tanto a las 6 horas como a las 24 horas de la ingesta (Figura 4.1.5).



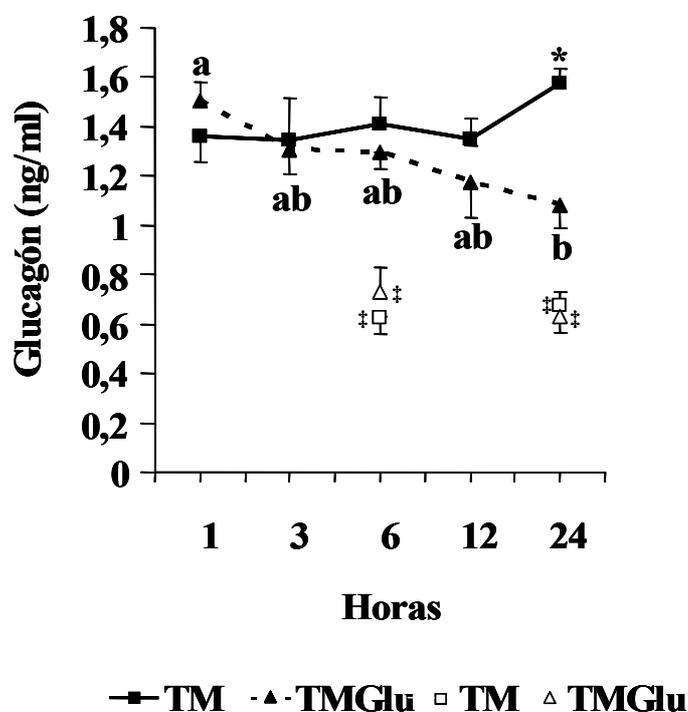
**Figura 4.1.5.-** Valores de glucosa en plasma sanguíneo de trucha arco iris en el experimento de alimentación forzada con las dietas TM (■) y TMGlu (▲). Niveles de glucosa en animales con administración normal con las dietas TM (□) y TMGlu (△). <sup>a,b,c</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre animales alimentados con la misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba HSD Tukey, ANOVA) y (‡) indica diferencias significativas entre el postprandial normal y la alimentación forzada de animales alimentados con una misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

La insulina plasmática mostró el mismo perfil de respuesta a lo largo del período postprandial en los peces alimentados con las dos dietas. Sin embargo, los animales alimentados con la dieta TM presentaron niveles más altos de insulina en plasma que el grupo de la dieta TMglu, siendo esta diferencia significativa a las 12 y 24 horas del inicio del experimento. Los valores más altos de insulina fueron observados a las 6 horas de la ingesta con  $27,8 \pm 2,3$  ng/ml para la dieta TM y  $22,4 \pm 1,2$  ng/ml para el grupo de la dieta TMGlu. En ambas dietas, la insulina en plasma de este tratamiento, solo fue significativamente inferior al observado en el postprandial de alimentación normal en el grupo de la dieta TMGlu a las 6 horas de la post ingesta (Figura 4.1.6).



**Figura 4.1.6.-** Niveles del insulina en el plasma de trucha arco iris en el experimento de alimentación forzada con las dietas TM (■) y TMGlu (▲). Valores de insulina en animales con administración normal con las dietas TM (□) y TMGlu (△). <sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre animales alimentados con la misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba HSD Tukey, ANOVA). El asterisco indica diferencias significativas entre animales alimentados con dieta diferente a la misma hora en la alimentación forzada y (‡) indica diferencias significativas entre el postprandial normal y la alimentación forzada de animales alimentados con una misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

En los niveles plasmáticos de glucagón para el grupo la dieta TM, no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo, el glucagón en plasma osciló entre  $1,35 \pm 0,17$  y  $1,58 \pm 0,06$  ng/ml. Los valores de glucagón en plasma de los animales alimentados con la dieta TMGlu, estuvieron en el rango de  $1,08 \pm 0,09$  a  $1,50 \pm 0,08$  ng/ml. El glucagón mostró perfiles algo distintos para las dos dietas, pero no se observaron diferencias entre dietas a lo largo del período postprandial, excepto a las 24 horas donde el glucagón plasmático del grupo de la dieta TM fue superior al de los animales de la dieta TMGlu. En ambos casos, los niveles de glucagón fueron más altos en comparación con los valores observados en los animales en los que se administro el alimento de forma normal (Figura 4.1.7).



**Figura 4.1.7.-** Valores de glucagón plasmático en trucha arco iris en el experimento de alimentación forzada con las dietas TM (■) y TMGlu (▲). Niveles de glucagón en animales con administración normal con las dietas TM (□) y TMGlu (△). <sup>a,b,c</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre animales alimentados con la misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba Games-Howell, ANOVA). El asterisco indica diferencias significativas entre animales alimentados con dieta diferente a la misma hora en la alimentación forzada y (‡) indica diferencias significativas entre el postprandial normal y la alimentación forzada de animales alimentados con una misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

#### 4.1.5.- Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en dorada.

Las doradas alimentadas con dietas basadas en los perfiles de aminoácidos de la composición corporal y de músculo no mostraron diferencias significativas en el peso corporal final de los animales. Los peces alimentados con las dietas del perfil de aminoácidos corporales, presentaron valores mayores del índice hepatosomático que los peces de las dietas del perfil del músculo, especialmente los del grupo de la dieta DMGlu. La tasa de crecimiento específico y la tasa de eficiencia proteica no fueron diferentes entre dietas; sin embargo, la tasa de conversión alimenticia de los peces alimentados con la dieta DM fue significativamente superior al grupo de la dieta DCGlu. (Tabla 4.1.4).

**Tabla 4.1.4.- Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las dorada alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	DM	DMGlu	DC	DCGlu
Peso corporal inicial (g)	14,7 ± 0,16	14,7 ± 0,02	14,6 ± 0,09	14,1 ± 0,11
Peso corporal final (g)	74,9 ± 0,67	70,9 ± 1,37	72,9 ± 1,35	70,9 ± 1,24
Índice Hepatosomático	1,36 ± 0,04 <sup>bc</sup>	1,20 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,54 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,10 <sup>ab</sup>
Tasa de crecimiento específico (%)	1,98 ± 0,003	1,91 ± 0,002	1,96 ± 0,03	1,90 ± 0,02
Tasa de conversión alimenticia	0,85 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,82 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,05 <sup>b</sup>
Tasa de eficiencia proteica	1,61 ± 0,03	1,51 ± 0,08	1,59 ± 0,03	1,50 ± 0,05

Los datos son medias (n=3) ± desviación estándar

Tasa de crecimiento específico =  $[100 \times (\ln(\text{peso final corporal}) - \ln(\text{peso inicial corporal}))] / \text{días}$

Tasa de conversión alimenticia = peso húmedo ganado / peso de alimento seco ingerido

Tasa de eficiencia proteica = peso húmedo ganado / peso neto de proteínas ingeridas

Índice Hepatosomático =  $100 \times (\text{peso del hígado}) / (\text{peso corporal})$

<sup>a,b,c</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba Student Newman-Keuls).

En la dorada, la ganancia de nitrógeno no varió significativamente entre los peces alimentados con las diferentes dietas experimentales. Los animales alimentados con la dieta DMGlu presentaron los porcentajes más bajos de retención de lípidos en comparación con las otras dietas y la retención de proteínas fue ligeramente mayor en las dietas DM y DC. Los niveles de excreción de amonio de los animales alimentados con la dieta DMGlu fueron significativamente superiores a los registrados con las otras dietas experimentales (Tabla 4.1.5).

**Tabla 4.1.5.- Composición corporal y utilización de nutrientes de las doradas alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	DM	DMGlu	DC	DCGlu
<i>Composición corporal</i> (% peso húmedo)				
Agua	67,1 ± 0,2	67,4 ± 0,1	66,9 ± 0,2	66,9 ± 0,3
Proteínas	16,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	17,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	16,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	15,9 ± 0,2 <sup>b</sup>
Lípidos	11,8 ± 0,2	10,7 ± 0,2	11,5 ± 0,3	11,7 ± 0,4
<i>Ganancia (/g peso corporal/día)</i>				
Nitrógeno (mg)	409,4 ± 0,8	416,1 ± 2,9	398,3 ± 4,6	369,8 ± 13,8
Lípidos (g)	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,72 ± 0,2
<i>Retención (% crudo ingerido)</i>				
Proteínas	27,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	25,2 ± 1,6 <sup>ab</sup>	26,5 ± 0,4 <sup>ab</sup>	24,3 ± 0,7 <sup>b</sup>
Lípidos	65,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	48,3 ± 3,1 <sup>b</sup>	61,1 ± 2,9 <sup>a</sup>	60,0 ± 1,6 <sup>a</sup>
<i>Excreción (mg/kg/24 horas)</i>				
Amonio	811 ± 33 <sup>b</sup>	953 ± 12 <sup>a</sup>	759 ± 45 <sup>b</sup>	792 ± 53 <sup>b</sup>

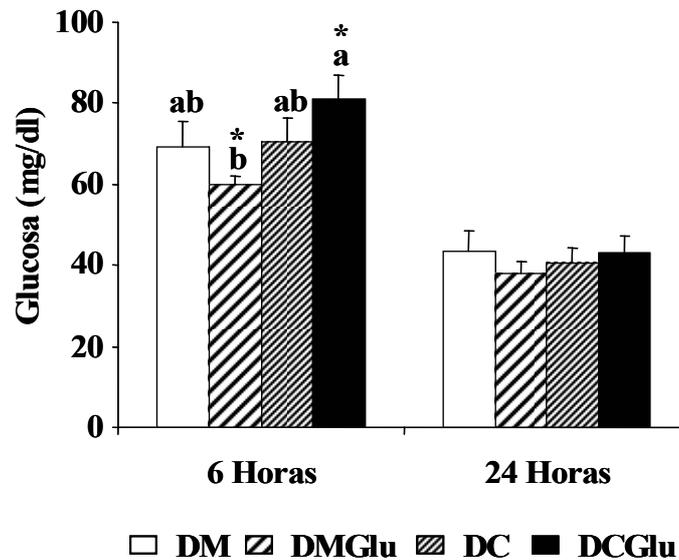
Composición corporal de los peces al inicio del experimento: Agua 68,82 %; Proteínas 14,96 %; Lípidos 11,12 %.

Los datos son medias (n=3) ± E.S.

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba Student Newman-Keuls).

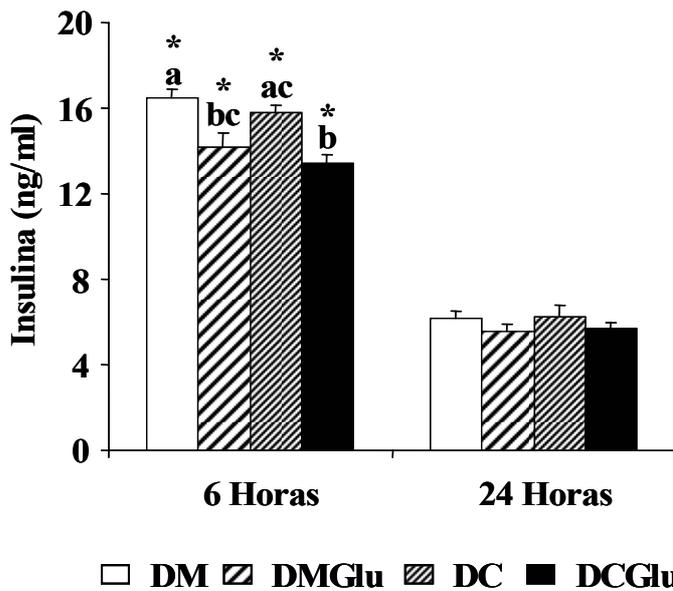
#### 4.1.6.- Niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la dorada.

Los niveles de glucosa fueron más altos a las 6 horas que a las 24 horas, siendo esta diferencia significativa en las dietas Glu. En las doradas alimentadas con la dieta DMGlu, el valor de glucosa a las 6 horas de la ingesta fue inferior al registrado para las otras dietas. A las 24 horas, no se observaron diferencias en los diferentes grupos y la glucosa basal osciló entre los  $38,1 \pm 2,2$  y  $43,6 \pm 2,6$  ng/ml (Figura 4.1.8).



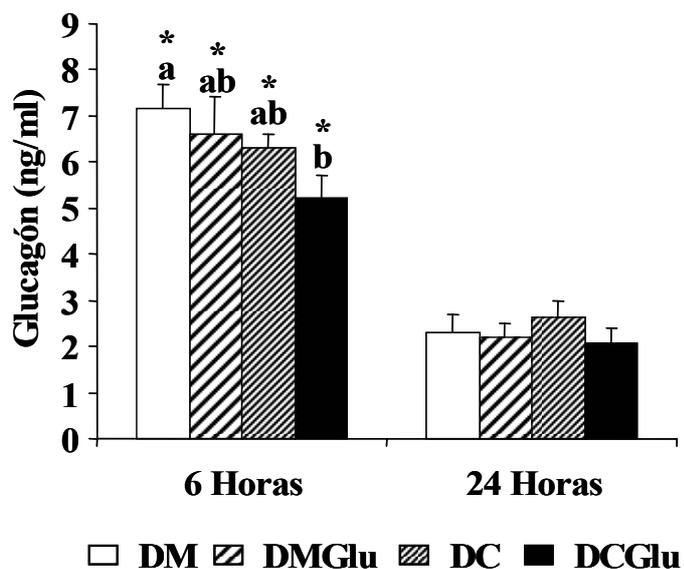
**Figura 4.1.8.-** Niveles plasmáticos de glucosa de las doradas alimentadas con las dietas experimentales. <sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas y asterisco indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

Los niveles de insulina plasmática a las 24 horas post ingesta fueron similares entre los grupos de peces alimentados con las diferentes dietas; y los valores estuvieron comprendidos entre  $5,6 \pm 0,3$  y  $6,2 \pm 0,6$  ng/ml (Figura 4.1.9). El incremento de la insulina postprandial (6h) con relación al basal (24h) fue más pronunciado que el observado en trucha. Los niveles de insulina a las 6 horas fueron hasta dos veces superiores a los encontrados a las 24 horas en esta especie (valores entre  $13,8 \pm 0,5$  y  $16,1 \pm 0,5$  ng/ml). Los niveles de insulina en los grupos alimentados con las dietas DM y DC fueron mayores a los de las dietas DMGlu y DCGlu.



**Figura 4.1.9.-** Niveles de insulina plasmática de doradas alimentadas con las dietas experimentales. <sup>a,b,c</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas y asterisco indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

Los valores basales (a las 24 h) de glucagón fueron similares entre grupos y oscilaron en el rango de  $2,1 \pm 0,4$  a  $2,6 \pm 0,4$  ng/ml. Los niveles circulantes de glucagón a las 6 horas post ingesta muestran la tendencia inversa a los observados en trucha; así, los animales alimentados con las dietas DC y DCGlu presentaron valores inferiores de glucagón que los peces alimentados con las dietas DM y DMGlu, aunque la diferencia solo fue significativa entre las dietas DM y DCGlu. El glucagón en plasma a las 6 horas fue aproximadamente tres veces superior al de 24 horas (Figura 4.1.10). Los niveles de glucagón en plasma fueron más altos que en trucha, en ambos puntos del muestreo postprandial.



**Figura 4.1.10.-** Valores de glucagón en el plasma sanguíneo de las doradas alimentadas con las dietas experimentales. <sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas y asterisco indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

#### 4.1.7.- Caracterización de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco de doradas.

La constante de disociación y el número de los receptores de insulina en el músculo blanco, no mostraron diferencias significativas entre las dietas experimentales. En todos los grupos se observó una elevada variabilidad en estos parámetros. A las 6 horas de la ingesta, la constante de disociación de los receptores de insulina varió entre los  $0,15 \pm 0,05$  y  $0,29 \pm 0,05$  nM, y el número de receptores fue de  $70,5 \pm 6,7$  a  $129,2 \pm 18,6$  fmol/mg de proteína. La constante de disociación del receptor de insulina a las 24 horas postprandial fue de  $0,08 \pm 0,03$  a  $0,38 \pm 0,10$  nM, el número de receptores de insulina varió entre los  $34,8 \pm 6,7$  y  $124,5 \pm 36,1$  fmol/mg de glucoproteína (Tabla 4.1.6). Independientemente de la hora de la ingesta (6 y 24 horas), la unión de la hormona a su receptor (*binding*) específico no mostró diferencias entre dietas, y los valores del *binding* estuvieron entre los  $2,7 \pm 1,1$  y  $5,1 \pm 0,5$  % para 20  $\mu$ g de glucoproteína (Figura 4.1.11).

**Tabla 4.1.6.- Características de los receptores de insulina en el músculo blanco de doradas alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	DM	DMGlu	DC	DCGlu
Kd INS (6 Horas)	$0,15 \pm 0,05$	$0,18 \pm 0,09$	$0,16 \pm 0,09$	$0,29 \pm 0,05$
Kd INS (24 Horas)	$0,08 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,10$
Ro INS (6 Horas)	$70,5 \pm 26,8$	$107,7 \pm 46,6$	$87,3 \pm 37,1$	$129,2 \pm 18,6$
Ro INS (24 Horas)	$34,8 \pm 6,8$	$101,1 \pm 32,9$	$96,2 \pm 34,6$	$124,5 \pm 36,1$

Kd, Constante de disociación (nM); Ro, Número de receptores (fmol/mg de glucoproteína)

No existen diferencias significativas entre dietas a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

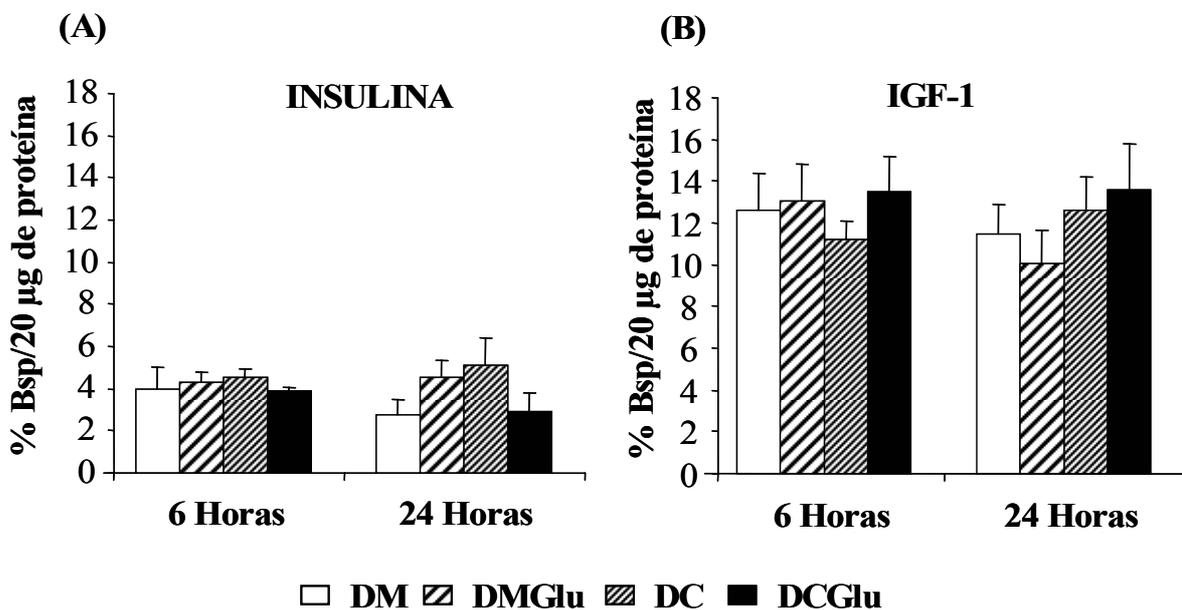
En los receptores de IGF-I, la constante de disociación del receptor de IGF-I fue menor al de los receptores de insulina, la Kd del IGF-I estuvo en el rango de  $0,01 \pm 0,00$  a  $0,11 \pm 0,07$  nM. El número de receptores de IGF-I varió entre los  $49,0 \pm 9,3$  y  $137 \pm 34,3$  fmol/mg de proteína (Tabla 4.1.7). El *binding* específico de IGF-I fue similar entre los diferentes grupos de animales alimentados con las dietas experimentales (valores entre  $11,1 \pm 1,8$  y  $13,6 \pm 2,2$  % para 20  $\mu$ g de glucoproteína).

Los valores del *binding* específico de los receptores de IGF-I fueron muy superiores a los observados (del orden de 3 veces más) para los receptores de insulina (Figura 4.1.11).

**Tabla 4.1.7.- Características de los receptores de IGF-I en el músculo blanco de doradas alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	DM	DMGlu	DC	DCGlu
Kd IGF-1 (6 Horas)	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,08
Kd IGF-1 (24 Horas)	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,02
Ro IGF-1 (6 Horas)	76,6 ± 20,1	84,2 ± 29,5	73,0 ± 10,9	79,4 ± 15,4
Ro IGF-1 (24 Horas)	115,3 ± 12,5	49,0 ± 9,3	54,6 ± 7,3	138,0 ± 34,3

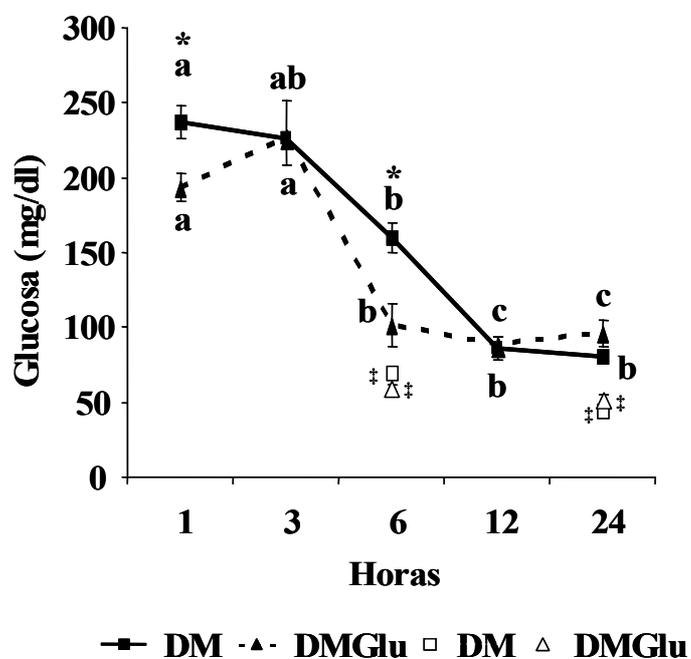
Kd, Constante de disociación (nM); Ro, Número de receptores (fmol/mg de glucoproteína)  
 No existen diferencias significativas entre dietas a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).



**Figura 4.1.11.-** Binding específico de los receptores de insulina (A) e IGF-I (B) del músculo blanco de las doradas en el experimento de dietas. No existen diferencias significativas entre dietas a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

#### 4.1.8.- Efecto de la alimentación forzada sobre los niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la dorada.

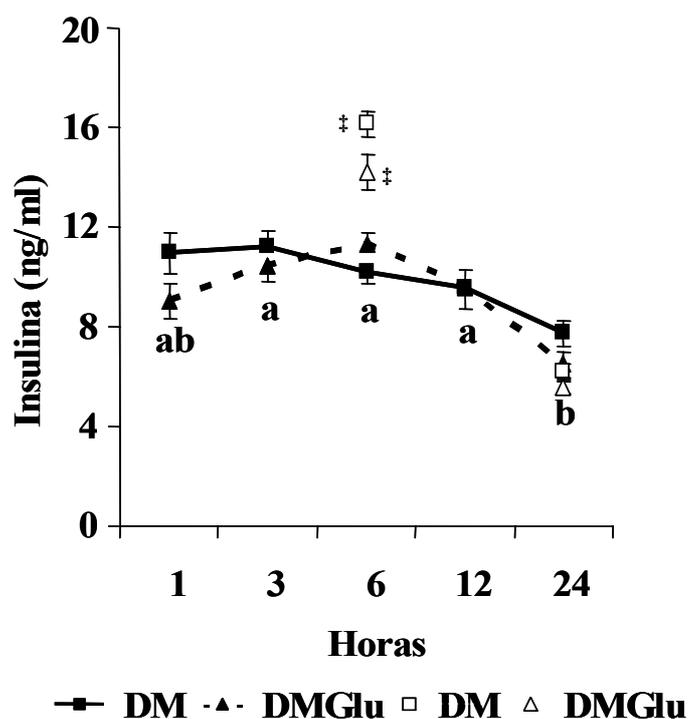
Los niveles de glucosa plasmática en la dorada a 1 hora tras la ingestión del alimento fueron de  $237,2 \pm 11,2$  mg/dl para la dieta DM y  $225,7 \pm 25,3$  mg/dl para la dieta DMGlu; estos valores de glucosa fueron disminuyendo a lo largo del período postprandial en ambas dietas. Los animales alimentados con la dieta DM presentaron mayores valores de glucosa que el grupo de la dieta DMGlu (1 y 6 horas). Los valores de glucosa plasmática registrados en la alimentación forzada fueron superiores a los observados a las 6 y 24 horas post ingesta de la administración normal de las dietas (Figura 4.1.12).



**Figura 4.1.12.-** Niveles de glucosa en plasma de las doradas en el experimento de alimentación forzada con las dietas DM (■) y DMGlu (▲). Valores de glucosa en animales con administración normal con las dietas DM (□) y DMGlu (△). <sup>a,b,c</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre animales alimentados con la misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba HSD Tukey, ANOVA). Asterisco indica diferencias significativas entre animales alimentados con dieta diferente a la misma hora en la alimentación forzada y (‡) indica diferencias significativas entre el postprandial normal y la alimentación forzada de animales alimentados con una misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

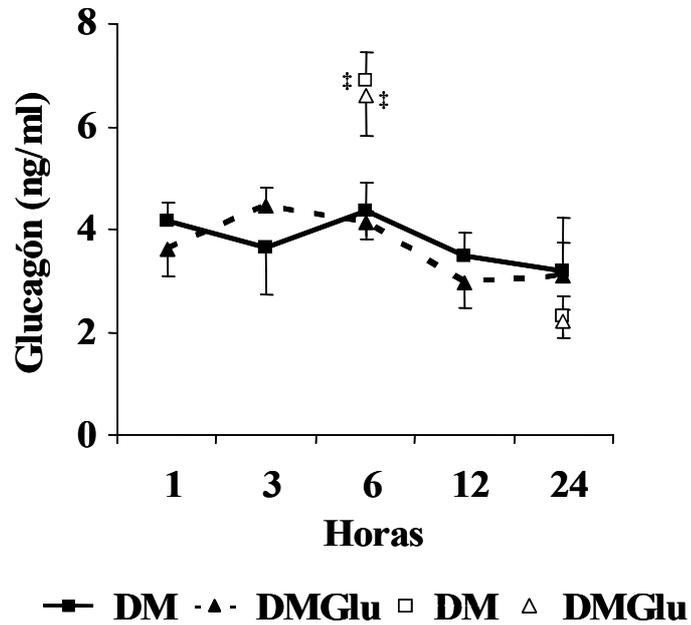
No se observaron diferencias significativas en los niveles de insulina plasmática de los peces alimentados con la dieta DM, a lo largo del período postprandial; los valores de insulina de este grupo estuvieron en el rango de  $7,7 \pm 0,5$  a  $11,2 \pm 0,6$  ng/ml. Los valores de insulina en plasma de los animales alimentados con la dieta DMGlu,

mostraron un incremento a partir de las 3 horas y se mantuvieron así hasta la 12 horas de la post ingesta (valores entre  $9,6 \pm 0,7$  y  $11,3 \pm 0,5$ ). A las 6 horas del postprandial, la insulina plasmática de la alimentación forzada para ambas dietas, fue significativamente menor a los valores de insulina encontrados tras la ingesta normal de las dietas (Figura 4.1.13).



**Figura 4.1.13.-** Niveles del insulina en plasma de doradas en el experimento de alimentación forzada con las dietas DM (■) y DMGlu (▲). Valores de insulina en animales con administración normal con las dietas DM (□) y DMGlu (△). <sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre animales alimentados con la misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba HSD Tukey, ANOVA). (‡) Indica diferencias significativas entre el postprandial normal y la alimentación forzada de animales alimentados con una misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

Los niveles de glucagón plasmático para ambas dietas no presentaron en este experimento variaciones significativas a lo largo del postprandial. Los valores de glucagón en plasma de los animales alimentados con la dieta DM, estuvieron en el rango de  $3,5 \pm 0,5$  a  $4,4 \pm 0,6$  ng/ml. En el grupo de la dieta DMGlu, el glucagón en plasma osciló entre  $3,0 \pm 0,5$  y  $4,5 \pm 0,4$  ng/ml. En ambas dietas, el glucagón en plasma a las 6 horas de este tratamiento, fue significativamente inferior al observado en el postprandial de la administración normal del alimento (Figura 4.1.14).



**Figura 4.1.14.-** Valores de glucagón plasmático de las doradas en el experimento de alimentación forzada con las dietas DM (■) y DMGlu (▲). Niveles de glucagón en animales con administración normal con las dietas DM (□) y DMGlu (△). No existen diferencias significativas entre animales alimentados con la misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba Games-Howell, ANOVA). (‡) Indica diferencias significativas entre el postprandial normal y la alimentación forzada de animales alimentados con una misma dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

#### **4.1.9.- Discusión.**

En general, las tasas de crecimiento observadas tanto en trucha como en dorada estuvieron de acuerdo con el crecimiento esperado, según el tamaño y la temperatura de las condiciones de cultivo (MartíPalanca et al., 1996; Company et al., 1999; Capilla et al., 2002). Así, aunque las tasas de crecimiento fueron correctas tanto para trucha arco iris como dorada, no se han encontrado diferencias en el crecimiento de los peces alimentados entre las dietas que poseían los perfiles de aminoácidos similares a la composición corporal total o a la del músculo. Por lo tanto, la dieta con el perfil de aminoácidos del músculo no mejoró el crecimiento de los animales de las 2 especies, como cabría esperar según la hipótesis preliminar del presente estudio.

Los resultados obtenidos en el crecimiento en ambas especies, mostraron que el incremento de las cantidades de aminoácidos no esenciales (ácido glutámico) en la dieta, que afectaron la relación aminoácidos esenciales/no esenciales (IAA/DAA), no produjo una mejora en el crecimiento de los animales. Incluso la tendencia observada fue que estos grupos presentaban crecimientos ligeramente inferiores. Por lo tanto, el aumento del contenido de aminoácidos no esenciales no mejoró el aprovechamiento o la utilización de los aminoácidos esenciales de la dieta por parte de las especies en la etapa de crecimiento estudiada.

Diferentes estudios en trucha arco iris con dietas suplementadas con algunos aminoácidos esenciales como lisina o arginina, donde la relación IAA/DAA se vio incrementada, muestran una mejora en el crecimiento de los animales (Plisetskaya et al., 1991). Pero parece ser que este incremento en el crecimiento de los animales estaría más relacionado con la composición y proporciones de los aminoácidos esenciales de la dieta, como se ha descrito también en dorada (Marcouli et al., 2004), que en la relación IAA/DAA en sí misma. Estos datos están de acuerdo con la ausencia de diferencias en el crecimiento entre las dietas de relación de IAA/DAA mayor y las de relación IAA/DAA menor en ambas especies en el presente experimento, habiendo resultado una composición de aminoácidos esenciales adecuada para cada especie.

La eficiencia de las dietas basadas en los perfiles de aminoácidos corporales y del músculo en trucha, es similar si consideramos el peso corporal final y la tasa de crecimiento específico de los peces. Sin embargo, la dieta TMGlu tuvo un efecto negativo sobre la utilización de proteínas y la tasa conversión alimenticia, a pesar de que se observó un aumento en la cantidad de alimento ingerido. Esta baja eficiencia podría ser debida a que está dieta estuvo compuesta por un alto contenido de harina de soja (331g/Kg), que contiene factores antinutricionales que afectarían el aprovechamiento del alimento (Francis et al., 2001; Kaushik et al., 1995). Si este efecto negativo fue por consecuencia de la relación IAA/DAA, este hubiera sido más pronunciado en la dieta TCGlu (basada en los perfiles de aminoácidos corporales), porque posee una relación IAA/DAA menor. Sin embargo, en dorada los animales alimentados con la dieta DMGlu, no mostraron diferencias significativas en los distintos parámetros de crecimiento respecto a los registrados en los peces alimentados con las otras dietas experimentales. Teniendo en cuenta el alto contenido de harina de soja de la dieta DMGlu, similar en proporción al de la dieta TMGlu, podemos sugerir que en trucha existe una sensibilidad mayor a los factores antinutricionales de la harina de soja que en dorada.

Las dietas experimentales utilizadas en ambas especies tuvieron un efecto diferencial sobre la excreción de nitrógeno. En trucha, la excreción de amonio del grupo TMGlu fue aproximadamente dos veces superior a los valores registrados para las otras dietas. En dorada, la excreción de amonio en el grupo DMGlu fue superior en un 20% a los niveles de excreción registrados para las otras dietas. Estudios previos en trucha arco iris (Medale et al., 1998), nos indican que estos incrementos en la excreción de nitrógeno de ambas especies, serían producto del aumento en el catabolismo de las proteínas (Martin et al, 2003), debido muy probablemente al alto porcentaje de soja presente en las dietas TMGlu y DMGlu. Aunque en algunos casos, el aumento del ácido glutámico en la dieta también podría ser un factor del incremento de la excreción de amonio de los animales. Ello podría ser debido a que por una serie de transformaciones, el ácido glutámico puede ser utilizado como sustrato para la formación endógena de arginina a través del ciclo de la urea, lo que incrementaría la formación de amonio (Buentello y Gatlin, 2001). Las diferencias en las proporciones de excreción de amonio entre trucha y dorada, nos indican una mayor sensibilidad de la trucha a estos factores que afectan la excreción de amonio.

En trucha, los niveles de glucosa post ingesta fueron superiores a los niveles encontrados en dorada, coincidiendo con los valores observados en la comparación entre estas especies (Panserat et al., 2002). Novoa y colaboradores (2004), utilizando dietas con elevado contenido de carbohidratos en trucha arco iris, han observado que el incremento de la glucosa postprandial en plasma es proporcional al contenido de carbohidratos de la dieta. Tras diferentes períodos de adaptación a dietas suplementadas con carbohidratos (entre 8 y 20%), también se han registrado aumentos en los niveles postprandiales de glucosa respecto a los valores de los animales alimentados con una dieta sin carbohidratos (Panserat et al., 2000a; 2001a; Capilla et al., 2003). En la presente investigación, en trucha arco iris tras la ingesta del alimento, los valores de glucosa en plasma fueron similares entre los grupos de las diferentes dietas experimentales tanto a las 6 como a las 24 horas post ingesta. Ello sugiere que las diferencias entre las dietas experimentales en cuanto al contenido y digestibilidad de carbohidratos, no serían suficientes para originar cambios en las glucemias durante el período postprandial entre los distintos grupos. Conviene recordar que las dietas fueron diseñadas para obtener un perfil de aminoácidos determinado y mantener un contenido normal de carbohidratos similar en las diferentes dietas, aunque pueden existir diferencias en el tipo de carbohidratos.

En el presente estudio a las 6 horas post ingesta, las doradas alimentadas con la dieta DMGlu mostraron valores inferiores de glucosa en plasma que los peces de la dieta DCGlu. En la dorada, no parece existir una correlación tan clara entre la glucosa postprandial y el contenido de carbohidratos en la dieta. Así en doradas alimentadas con dietas de diferentes proporciones de carbohidratos (entre 20 y 40 %), los niveles plasmáticos de glucosa postprandial fueron similares a los valores de glucosa de animales alimentados con dietas sin carbohidratos (Panserat et al., 2000a; Capilla E., 2002). Por lo tanto, las diferencias en la glucosa post ingesta entre las dietas DCGlu y DMGlu posiblemente podrían estar originadas por las diferencias en la composición de aminoácidos u otros componentes que existen entre ambas dietas, que pudiera afectar el metabolismo o la utilización de la glucosa.

En la alimentación forzada, se observó en ambas especies aumentos significativos en los valores de glucosa en plasma en las dos dietas durante las primeras horas después del tratamiento. Tanto en trucha arco iris como en dorada, los

incrementos en los niveles de glucosa plasmática fueron significativamente superiores a los observados tras la ingesta normal de alimento. En ambas especies, se han descrito aumentos significativos de la glucemia de los animales, debido al aumento de la actividad gluconeogénica y una inhibición de la actividad de los enzimas glucolíticos en situaciones de stress (Balm y Pottinger, 1995; Jeney et al., 1997; Tort et al., 2001; Barton et al., 2005; Holloway et al., 2004; Trenzado et al., 2003; Wagner et al., 2003). Por lo que, el incremento de la glucosa plasmática podría haber sido originada por la manipulación de los animales durante el proceso de la alimentación forzada.

Estudios realizados en trucha y lubina (Navarro, et al., 1992; Pérez, et al., 1988), demuestran que al igual que en mamíferos, los niveles de insulina y glucagón plasmáticos desempeñan un papel importante en la regulación de los niveles de metabolitos circulantes y su entrada a los tejidos tras la ingestión de alimento. En el presente trabajo en la administración normal del alimento, los niveles basales plasmáticos de insulina en trucha fueron superiores a los observados en dorada. Sin embargo, independientemente de la dieta, el incremento postprandial relativo a los valores basales de insulina fue superior en la dorada. Por lo que en dorada, el efecto estimulador tras la ingesta normal del alimento sobre la insulina y glucagón cuantitativamente mayor, sugiere una sensibilidad mayor que en trucha, en términos de la respuesta de estas hormonas pancreáticas a la administración de estas dietas.

El efecto secretor de las diferentes dietas sobre los niveles plasmáticos de insulina presenta un patrón similar en ambas especies, tanto en el experimento de dietas en alimentación normal, como en la alimentación forzada. Considerando un mismo perfil de aminoácidos (corporal o muscular), las dietas de mayor relación IAA/DAA, presentaron niveles de insulina superiores a las 6 horas después de la ingesta. La presencia de diferentes proporciones de proteínas y algunos aminoácidos que constituyen las diferentes dietas, ejercerían un efecto estimulador sobre la secreción de la insulina (Cowey et al., 1977; Mommsen et al., 2001a; Plisetskaya et al., 1991; Van Loon et al., 2000). En comparación con los mamíferos, en peces teleósteos los aminoácidos estimulan la secreción de insulina en mayor proporción que la glucosa (Ronner y Scarpa, 1987). Se ha descrito que algunos aminoácidos como la arginina, lisina, leucina y fenilalanina estimulan especialmente la liberación de insulina en teleósteos (Ince y Thorpe, 1977; Matty y Lone, 1985; Navarro et al., 2002; Plisetskaya

et al., 1991). El hecho de que dichos aminoácidos sean todos esenciales está de acuerdo con una mayor estimulación de la secreción de insulina en los peces alimentados con las dietas con relación IAA/DAA mayor.

De acuerdo con lo encontrado por Gutiérrez y colaboradores (1986), los niveles de glucagón plasmáticos en dorada fueron superiores a los registrados en trucha. La única referencia sobre los niveles de glucagón en dorada durante muchos años ha sido la del estudio de Gutiérrez y colaboradores (1986). En dicho estudio sobre los niveles de glucagón de diferentes especies de peces, en dorada se encontraron que los niveles de glucagón fueron superiores (entre 2 y 8 veces) respecto a los valores de glucagón del resto de teleósteos estudiados. Recientemente, en dorada se ha demostrado que la arginina tiene un efecto estimulador en la secreción de glucagón superior al de la secreción de insulina (de Celis et al., 2004); efecto contrario al observado en salmónidos, donde la acción insulínica predomina sobre la secreción del glucagón (Carneiro et al., 1993; Navarro et al., 2002). Sin embargo, no existen datos disponibles del efecto de otros aminoácidos sobre la secreción del glucagón en peces. Incluso en mamíferos, la información es limitada, aunque se sabe que el incremento de la concentración de aminoácidos en plasma después de la ingesta estimula la liberación del glucagón (Navarro et al., 2002). Los principales aminoácidos gluconeogénicos están entre los más potentes estimuladores de las células alfa. En peces, los aminoácidos no esenciales como alanina, ácido aspártico y ácido glutámico son potencialmente importantes como sustratos gluconeogénicos (Jurss y Bastrop, 1995). En el presente trabajo en trucha, dentro de cada dieta de perfil de aminoácidos (músculo y corporal), los grupos alimentados con las dietas de menor IAA/DAA, con mayor proporción de alanina, ácido aspártico y especialmente ácido glutámico presentaron niveles mayores de glucagón en plasma. En mamíferos, se ha propuesto que la liberación del glucagón postprandial sirve para estimular la producción de la glucosa hepática, para evitar la hipoglucemia resultante de la acción de la insulina. En peces este control de la glucemia no ha sido confirmado. Sin embargo, la secreción del glucagón estimula la gluconeogenesis a partir de los aminoácidos en el hígado de la anguila y trucha (Inui y Ishioka, 1983; Inui y Yokote, 1977).

A diferencia de la trucha, en dorada la secreción postprandial del glucagón tuvo un patrón de respuesta similar al de la insulina. Los animales alimentados con las dietas

con el perfil de aminoácidos esenciales del músculo tuvieron niveles de glucagón superiores al de los grupos de las dietas con el perfil de aminoácidos corporales a las 6 horas del postprandial, siendo esta diferencia significativa entre los grupos de la dieta DM (relación IAA/DAA mayor) y el grupo de la dieta de DCGlu (relación IAA/DAA menor). Por tanto no se puede descartar en esta especie la posibilidad de que el glucagón tenga una sensibilidad mayor a los aminoácidos esenciales. En este sentido en dorada, la secreción del glucagón parece ser especialmente más sensible al aminoácido esencial arginina (de Celis et al., 2004).

Los experimentos de alimentación forzada se diseñaron para obtener los perfiles hormonales completos después de la ingesta. Además, este método nos permitió estar seguros de que todos los animales utilizados fueron alimentados con la misma ración y al mismo tiempo, para eliminar la variabilidad de la respuesta hormonal.

En la alimentación forzada de trucha, los perfiles de respuesta de insulina fueron similares entre dietas, pero con niveles de insulina más altos en el grupo de la dieta TM en concordancia con las diferencias observadas en la administración normal del alimento. Esto sugiere que las diferencias encontradas en los niveles de insulina a las 6 horas entre las dietas (TM y TMGlu), son debidas a la capacidad intrínseca insulínica de los componentes de la dieta y no debido a diferencias en las tasas de tránsito intestinal del alimento o a la distinta estimulación temporal en la secreción hormonal por los aminoácidos absorbidos de la dieta tras la ingesta del alimento.

Sin embargo, los perfiles de insulina observados, con un máximo a las 6 horas, en la alimentación forzada son distintos a los encontrados en la ingesta normal del alimento, donde los niveles elevados de insulina aparecen alrededor de la primera o segunda hora tras la ingesta (Pérez et al., 1988; Navarro et al., 1993; Novoa et al., 2004). Ello podría ser debido a la ausencia de una fase cefálica, que estimule la secreción de insulina en los peces en la alimentación forzada, que explicaría la diferencia respecto a los valores de insulina de animales con administración normal del alimento. La estimulación cefálica de la liberación de insulina, está relacionada con diversos factores como el estímulo visual al observar el alimento al acercarse la hora habitual de la ingesta, la distensión progresiva del estómago y a otros factores estimulantes de la secreción de la insulina (Papatryphon et al., 2001).

En trucha, la alimentación forzada no parece ser el método más adecuado para el estudio de la respuesta postprandial del glucagón. Los niveles de glucagón fueron muy superiores a los observados en animales alimentados en condiciones normales. Estos altos niveles de glucagón observados a lo largo del todo el período, sugieren que podrían ser causados por la situación de estrés a los que fueron sometidos los animales durante la manipulación para la alimentación forzada, ya que algunos estudios han relacionado alteraciones del glucagón en condiciones de estrés (Mommsen et al., 1999).

En dorada, los experimentos de alimentación forzada no produjeron cambios significativos en los niveles plasmáticos de insulina y glucagón. En esta especie, la ausencia de la fase cefálica sería al parecer más necesaria para la estimulación de la secreción de la insulina, debido a que tras la alimentación forzada en dorada, el incremento de la insulina es escaso en comparación al encontrado en trucha. A nivel de glucagón, los resultados en dorada nos indican que quizás nos exista la misma sensibilidad de esta hormona a situaciones de estrés como en trucha, ya que después de la alimentación forzada no se ha observado ningún cambio en el glucagón plasmático de la dorada.

En comparación con mamíferos y otros vertebrados, los peces poseen niveles menores de *binding* en los receptores de insulina en el músculo esquelético. Este hecho se ha relacionado con el papel menos importante de la insulina en la regulación metabólica del músculo en peces (Párrizas et al., 1994b). Además el *binding* y número de los receptores de IGF-I son superiores a los de insulina; mientras que en mamíferos los receptores de insulina predominan sobre los de IGF-I (Méndez et al., 2001; Navarro et al., 1999; Párrizas et al., 1995a; Párrizas et al., 1995c; Planas et al., 2000c). Este hecho sugiere que el IGF-I puede desarrollar un papel metabólico destacable en peces, como se ha demostrado recientemente en miocitos de trucha en cultivo (Castillo et al., 2004). En todos los grupos experimentales tanto para trucha arco iris como dorada, se observa que los valores del *binding* de los receptores de IGF-I, son superiores al de los receptores de insulina en el músculo blanco. En la comparación entre especies, los niveles de *binding* de los receptores de insulina e IGF-I en dorada fueron superiores a los encontrados en trucha arco iris. Asimismo en ambas especies, no parece existir regulación de la insulina plasmática sobre los receptores de insulina en el músculo esquelético, debido quizás a las diferencias escasas de la insulina en plasma entre los

distintos grupos. En este sentido, en estudios previos (Párrizas et al., 1994b), con dietas enriquecidas con carbohidratos, donde los niveles de insulina aumentaron, se observó en paralelo un mayor número de receptores de insulina en el músculo blanco. Así por ejemplo, aumentos en los niveles de insulina por tratamientos de arginina en trucha (de  $11,9 \pm 0,5$  a  $23,0 \pm 1,4$  ng/ml) y en carpa (de  $11,8 \pm 0,3$  a  $17,9 \pm 0,7$  ng/ml), son capaces de generar incrementos en el *binding* de los receptores de insulina. Por ello se ha propuesto la existencia de una “*up-regulation*” en los receptores de insulina por los niveles de insulina en plasma en el músculo blanco y tejido adiposo de estas especies (Párrizas et al., 1994b; Planas et al., 2000b; Planas et al., 2000c). A partir de estos resultados se deduce que esta regulación requiere un cambio suficientemente grande en los niveles de insulina, que no se alcanzó en las condiciones de los experimentos aquí presentados.

En resumen en el presente bloque experimental, tanto en trucha arco iris como en dorada, no observaron diferencias en los parámetros de crecimiento de los animales alimentados con las dietas basadas en los perfiles de aminoácidos esenciales del músculo y corporal, así como en las dietas donde hubo variación de la relación IAA/DAA en la dieta. En ambas especies, los niveles plasmáticos postprandiales de glucosa e insulina tampoco presentaron variaciones en función del perfil de aminoácidos esenciales de la dieta. Sin embargo, las dietas suplementadas con el ácido glutámico tuvieron un efecto estimulador menor sobre la secreción postprandial de la insulina en ambas especies, que no modifica la unión de la insulina a su receptor. Los niveles de glucagón fueron más elevados en dorada que en trucha arco iris. La respuesta postprandial del glucagón a las dietas con diferentes perfiles y contenido de aminoácidos fue distinta entre ambas especies. En trucha arco iris, la dieta con el perfil de aminoácidos esencial corporal posee un efecto secretor mayor sobre el glucagón postprandial que las dietas del perfil del músculo. Mientras en dorada, las dietas con el perfil de aminoácidos esenciales del músculo tuvieron un efecto secretor del glucagón mayor que las dietas con el perfil de aminoácidos esenciales corporales a las 6 horas del postprandial.

## **4.2.- BLOQUE II: Efectos de la sustitución de la proteína animal por la proteína vegetal en las dietas de trucha arco iris y dorada.**

En el presente bloque experimental, los objetivos fueron los de evaluar los efectos sobre los parámetros de crecimiento y utilización de los nutrientes de animales alimentados con dietas de distintos grados de sustitución de proteína animal por proteína vegetal en la dieta de trucha arco iris y dorada. Así como, analizar los niveles postprandiales de glucosa, insulina y glucagón de los animales alimentados con las diferentes dietas. Además en trucha, se analizó el efecto de la incorporación de la proteína vegetal en la dieta sobre la expresión del ARNm del transportador de glucosa en el músculo esquelético rojo. Para lo cual, los animales fueron alimentados con 4 dietas experimentales en trucha arco iris (T) y dorada (D) durante 12 semanas (*punto 3.1.2*). Para cada especie se elaboraron 3 dietas con diferentes grados de sustitución de proteína animal por proteína vegetal (50%, 75% y 100%). En trucha las dietas T50, T75 y T100 respectivamente y en dorada D50, D75 y D100 respectivamente y 2 dietas control sin reemplazo de la proteína animal T0 (trucha) y D0 (dorada).

#### 4.2.1.- Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en trucha arco iris.

En trucha arco iris, el reemplazo de la proteína animal por proteína vegetal en la dieta tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de los animales. Después de 12 semanas de alimentación con las dietas experimentales, los pesos y las tasas de crecimiento de los grupos de las dietas T75 y T100 fueron significativamente inferiores al de las truchas alimentadas con las dietas T0 y T50. La incorporación de proteína vegetal en la dieta en cualquiera de las proporciones estudiadas produjo una disminución en el índice hepatosomático. El incremento de la proporción de proteína vegetal en la dieta generó una menor tasa de conversión alimenticia y se observó además una menor eficiencia proteica de los animales alimentados con T75 y T100 (Tabla 4.2.1).

**Tabla 4.2.1.- Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las truchas arco iris alimentadas con las diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	T0	T50	T75	T100
Peso corporal inicial (g)	19,2 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,2 ± 0,1
Peso corporal final (g)	147,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	142,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	135,6 ± 2,5 <sup>b</sup>	111,1 ± 1,3 <sup>c</sup>
Índice Hepatosomático	2,08 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,29 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,44 ± 0,10 <sup>b</sup>
Tasa de crecimiento específico (%)	2,61 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,57 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,51 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,25 ± 0,01 <sup>c</sup>
Tasa de conversión alimenticia	1,33 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,01 <sup>c</sup>
Tasa de eficiencia proteica	2,58 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,42 ± 0,01 <sup>c</sup>

Tasa de crecimiento específico =  $[100 \times [\text{Ln}(\text{peso corporal final}) - \text{Ln}(\text{peso corporal inicial})]]/\text{días}$

Tasa de conversión alimenticia = peso húmedo ganado / peso de alimento seco ingerido

Tasa de eficiencia proteica = peso húmedo ganado / peso neto de proteínas ingeridas

Índice Hepatosomático =  $100 \times (\text{peso del hígado}) / (\text{peso corporal})$

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba Student Newman-Keuls).

El incremento en la proteína vegetal en la dieta produjo una disminución ligera en el contenido de proteínas de la composición corporal de los animales. El aumento de la proteína vegetal en la dieta mostró un efecto negativo sobre la ganancia diaria de nitrógeno de los peces. La retención de proteínas y de lípidos también se vio disminuida por el incremento de proteína vegetal en la dieta. Además, la incorporación de la proteína vegetal en la dieta generó un incremento progresivo de la excreción de amonio (Tabla 4.2.2).

**Tabla 4.2.2.- Composición corporal y utilización de nutrientes de las truchas arco iris alimentadas con las diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

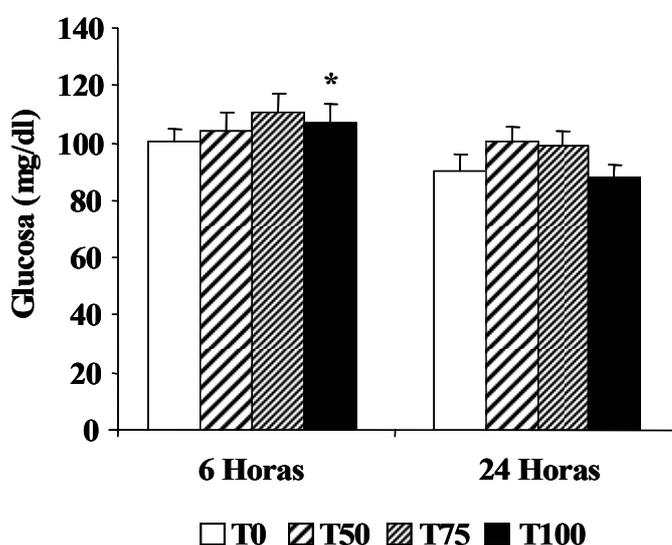
	T0	T50	T75	T100
<i>Composición corporal</i> (% ó kJ/g peso húmedo)				
Agua	66,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	67,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	67,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	68,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
Proteínas	17,4 ± 0,03 <sup>a</sup>	16,7 ± 0,15 <sup>b</sup>	16,5 ± 0,09 <sup>b</sup>	15,8 ± 0,30 <sup>c</sup>
Lípidos	12,6 ± 0,1	12,3 ± 0,4	12,8 ± 0,1	12,4 ± 0,2
<i>Ganancia (/g peso corporal/día)</i>				
Nitrógeno (mg)	552,8 ± 3,7 <sup>a</sup>	521,1 ± 5,3 <sup>b</sup>	507,6 ± 2,9 <sup>b</sup>	450,6 ± 12,3 <sup>c</sup>
Lípidos (g)	2,6 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	2,6 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,04 <sup>b</sup>
<i>Retención (% crudo ingerido)</i>				
Proteínas	48,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	46,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	44,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	40,3 ± 1,0 <sup>b</sup>
Lípidos	93,9 ± 2,0 <sup>a</sup>	59,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	57,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	56,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
<i>Excreción (mg/kg/24 horas)</i>				
Amonio	511 ± 12 <sup>d</sup>	545 ± 3 <sup>c</sup>	576 ± 5 <sup>b</sup>	612 ± 5 <sup>a</sup>

Composición corporal de los peces al inicio del experimento: Agua 74,59 %; Proteínas 15,9 %; Lípidos 7,17 %.

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba Student Newman-Keuls).

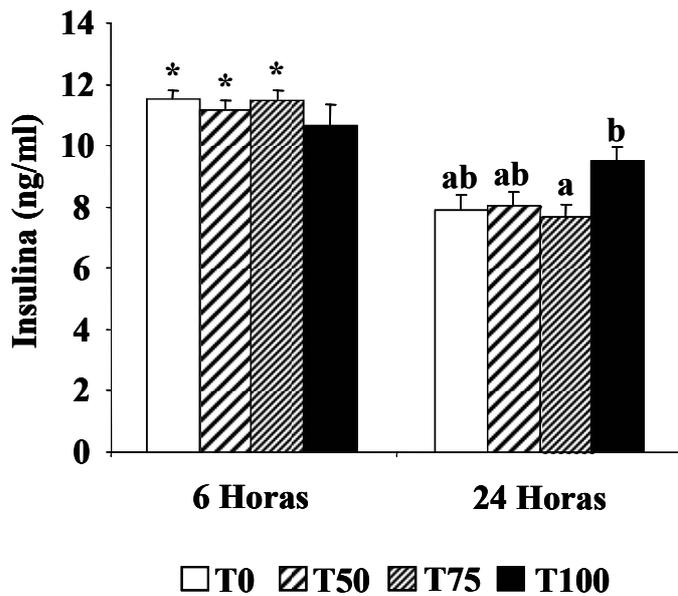
#### 4.2.2.- Niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de la trucha arco iris.

En los animales alimentados con las dietas con un alto contenido de proteína vegetal, los niveles basales de glucosa (24 h) fueron similares al grupo de la dieta T0, (valores de  $87,9 \pm 4,7$  a  $100,7 \pm 4,7$  mg/dl). A las 6 horas de la ingestión del alimento, la glucosa en plasma tampoco mostró diferencias significativas entre dietas (valores entre  $100,3 \pm 4,7$  y  $110,4 \pm 6,6$  mg/dl); los niveles de glucosa de las truchas fueron similares a los encontrados a las 24 horas en cada grupo, excepto en los animales de la dieta T100 en los que las diferencias son significativas (Figura 4.2.1).



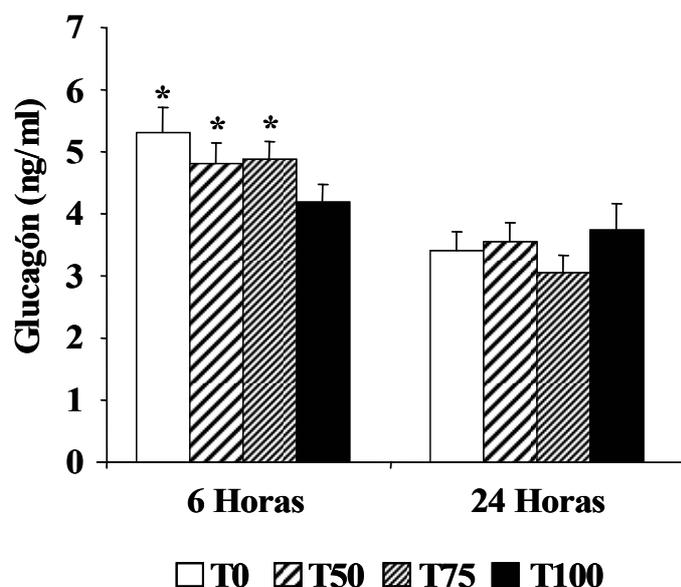
**Figura 4.2.1.-** Niveles plasmáticos de glucosa sanguínea de las truchas alimentadas con las dietas de diferentes proporciones de proteína vegetal a las 6 horas y 24 horas post ingesta. El asterisco indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

Los niveles de insulina plasmática a las 6 horas de la ingesta no mostraron diferencias significativas entre los grupos alimentados con las diferentes dietas. La insulina en plasma estuvo en el rango comprendido entre  $10,6 \pm 0,7$  y  $11,5 \pm 0,3$  ng/ml. 24 horas después de la ingesta los valores más altos se encontraron en el T100, siendo la diferencia significativa con respecto a la T75. En todos los grupos excepto en el T100 (Figura 4.2.2), los niveles de insulina en plasma sanguíneo a las 6 horas fueron superiores a los encontrados a las 24 horas para cada dieta (valores entre  $7,4 \pm 0,4$  y  $8,0 \pm 0,5$  ng/ml).



**Figura 4.2.2.-** Niveles de insulina plasmática de las truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales. <sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

A las 6 horas tras la ingesta del alimento, el glucagón plasmático fue similar entre dietas, oscilando los valores de glucagón en plasma sanguíneo entre  $3,9 \pm 0,3$  y  $5,0 \pm 0,5$  ng/ml. Los niveles basales de glucagón también fueron similares entre grupos, con valores comprendidos entre los  $3,0 \pm 0,2$  y  $4,3 \pm 0,5$  ng/ml. En todas la dietas excepto el grupo T100, los niveles de glucagón en plasma a las 6 horas fueron superiores a los valores registrados a las 24 horas después de la ingesta (Figura 4.2.3)

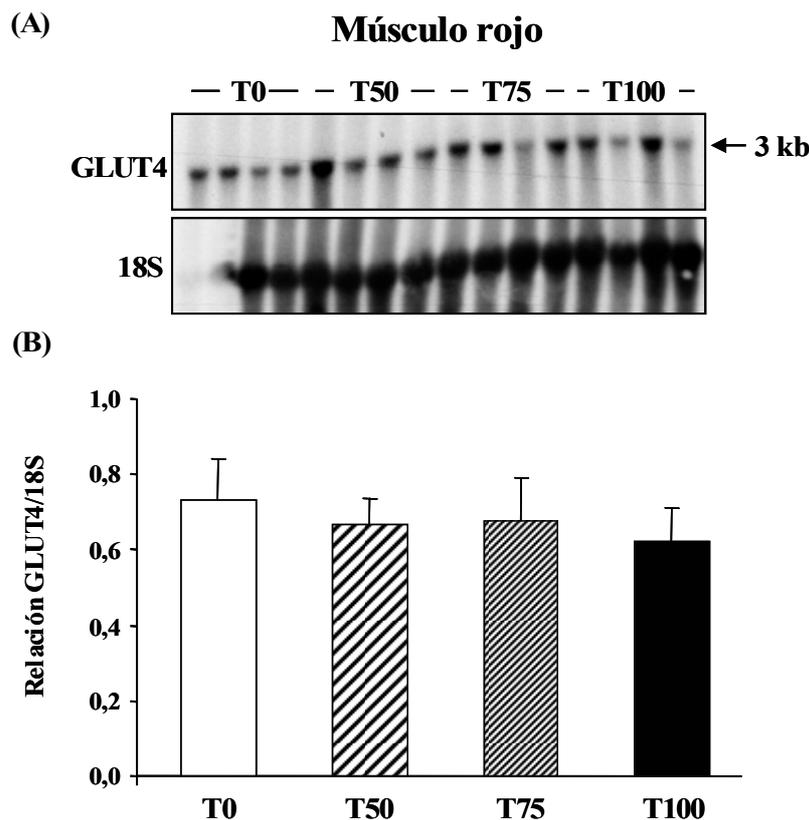


**Figura 4.2.3.-** Valores de glucagón en plasma sanguíneo de las truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales. (\*) Indica diferencias significativas en los valores de insulina entre 6 y 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

#### 4.2.3.- Efectos de las dietas experimentales sobre la expresión del transportador de glucosa (GLUT4) en el músculo rojo de trucha arco iris.

A partir del ARNm del músculo rojo de trucha arco iris alimentadas con las dietas T0, T50, T75 y T100 a las 24 horas del postprandial y utilizando la sonda de ADNc de trucha común (btGLUT), el *northern blot* mostró una banda de 3 kb, que correspondió al transportador de glucosa (GLUT4). Los niveles de expresión del GLUT4, no mostraron cambios significativos entre los distintos grupos de animales alimentados con las distintas dietas experimentales (Figura 4.2.4).

En dorada, el *northern blot* del transportador de glucosa del músculo rojo no mostró ninguna señal o banda de 3kb utilizando la sonda de ADNc de trucha común. Por lo que posteriormente se procedió a obtener la secuencia del GLUT4 en esta especie (ver apartado 4.4.1).



**Figura 4.2.4.-** (A) Northern blot del ARN total de los músculos rojos de las truchas arco iris alimentadas con las dietas experimentales a las 24 horas del postprandial utilizando las sondas de btGLUT y 18S. (B) Análisis densitométrico de la relación Glut4/18S. No existen diferencias significativas entre grupos a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

**4.2.4.- Crecimiento, eficiencia alimenticia y utilización de nutrientes en dorada.**

En dorada, el incremento de proteína vegetal en la dieta después de las 12 semanas mostró un efecto negativo sobre el crecimiento de los animales alimentados con las tres dietas experimentales. Los pesos corporales finales fueron menores en los animales alimentados con las dietas vegetales siendo el efecto más acusado cuanto mayor fue el nivel de sustitución; los índices hepatosomáticos fueron similares entre los animales de las distintas dietas. De acuerdo con el menor peso corporal en los grupos en los que se administraron las dietas vegetales, las tasas de crecimiento específico y tasas de conversión alimenticia fueron inferiores a las de la dieta control (D0); sin embargo, los animales alimentados con dichas dietas de sustitución presentaron valores mayores de las tasas de eficiencia proteica (Tabla 4.2.3).

**Tabla 4.2.3.- Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las doradas alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

	D0	D50	D75	D100
Peso corporal inicial (g)	16,4 ± 0,1	16,7 ± 0,1	16,5 ± 0,2	16,4 ± 0,2
Peso corporal final (g)	73,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	69,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	66,5 ± 0,5 <sup>c</sup>	58,1 ± 0,7 <sup>d</sup>
Índice Hepatosomático	1,23 ± 0,06	1,31 ± 0,09	1,31 ± 0,13	1,38 ± 0,11
Tasa de crecimiento específico (%)	1,85 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,72 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,56 ± 0,02 <sup>c</sup>
Tasa de conversión alimenticia	1,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,96 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>b</sup>
Tasa de eficiencia proteica	1,91 ± 0,01 <sup>c</sup>	2,09 ± 0,03 <sup>ab</sup>	2,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,04 <sup>b</sup>

Tasa de crecimiento específico =  $[100 \times (\ln(\text{peso corporal final}) - \ln(\text{peso corporal inicial}))] / \text{días}$

Tasa de conversión alimenticia = peso húmedo ganado / peso de alimento seco ingerido

Tasa de eficiencia proteica = peso húmedo ganado / peso neto de proteínas ingeridas

Índice Hepatosomático =  $100 \times (\text{peso del hígado}) / (\text{peso corporal})$

<sup>a,b,c</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba Student Newman-Keuls).

En la tabla 4.2.4, se muestran los resultados de la composición corporal y la utilización de nutrientes de las doradas alimentadas con las dietas experimentales después de las 12 semanas. La sustitución del 100% de la proteína animal por proteína vegetal en la dieta, produjo una disminución en el contenido de lípidos totales de los animales. Las ganancias de nitrógeno de los animales también se vieron afectadas por la alimentación con las distintas dietas, así grupos con porcentaje mayor de sustitución de proteína animal (D75 y D100), tuvieron ganancias menores de nitrógeno. Sin embargo, las dietas D75 y D100 dieron lugar a porcentajes mayores de retención de proteína que las dietas D0 y D50.

**Tabla 4.2.4.- Composición corporal y utilización de nutrientes en las doradas alimentadas con diferentes dietas experimentales durante 12 semanas.**

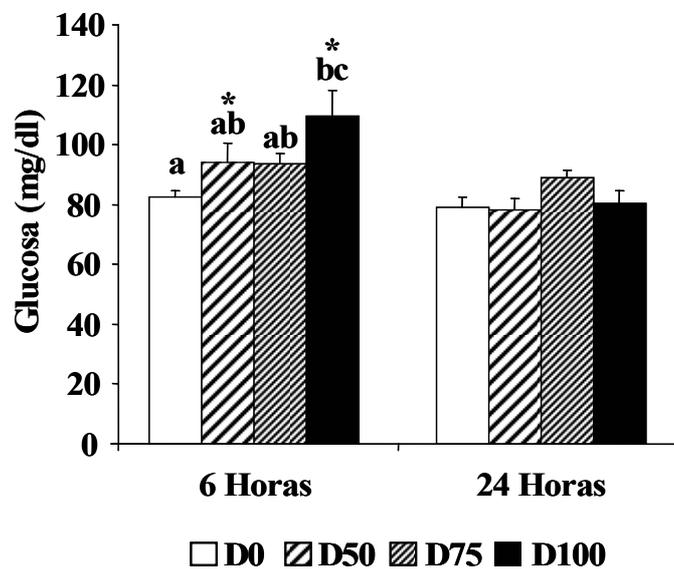
	D0	D50	D75	D100
<i>Composición corporal</i> (% ó kJ/g peso húmedo)				
Agua	67,4 ± 0,3	67,3 ± 0,2	67,7 ± 0,5	68,3 ± 0,1
Proteínas	16,1 ± 0,1 <sup>ab</sup>	15,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	16,1 ± 0,1 <sup>ab</sup>	16,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lípidos	11,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	11,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	11,4 ± 0,5 <sup>ab</sup>	10,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
<i>Ganancia (/g peso corporal/día)</i>				
Nitrógeno (mg)	385,5 ± 2,0 <sup>a</sup>	367,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	363,9 ± 3,0 <sup>b</sup>	344,6 ± 2,2 <sup>c</sup>
Lípidos (g)	1,8 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,02 <sup>b</sup>
<i>Retención (% crudo ingerido)</i>				
Proteínas	31,7 ± 0,21 <sup>a</sup>	33,6 ± 0,59 <sup>a</sup>	37,8 ± 0,27 <sup>b</sup>	38,9 ± 0,63 <sup>b</sup>
Lípidos	55,1 ± 0,8 <sup>ab</sup>	59,2 ± 1,4 <sup>a</sup>	58,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	49,2 ± 1,0 <sup>b</sup>
<i>Excreción (mg/kg/24 horas)</i>				
Amonio	525 ± 23 <sup>b</sup>	548 ± 6 <sup>b</sup>	553 ± 7 <sup>b</sup>	574 ± 9 <sup>a</sup>

Composición corporal de los peces al inicio del experimento: Agua 71,1 %; Proteínas 15,4 %; Lípidos 9,2 %.

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba Student Newman-Keuls).

#### 4.2.5.- Niveles de glucosa, insulina y glucagón plasmáticos de las doradas.

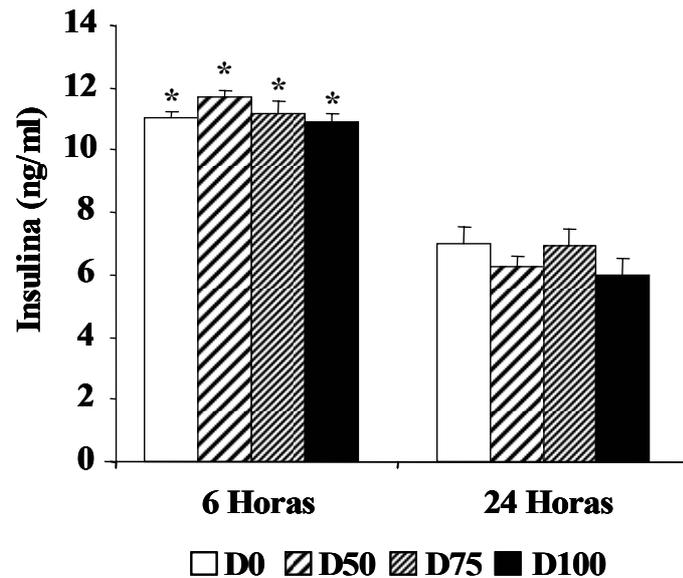
En las doradas, los valores de glucosa plasmática en los animales alimentados con las diferentes dietas oscilaron en el rango de  $82,3 \pm 2,4$  a  $109,4 \pm 8,9$  mg/dl a las 6 horas del período postprandial. Los animales de la dieta D100 fueron los que presentaron los valores mas elevados de glucemia y tanto en el grupo D100 como el D50 el incremento postprandial fue significativo. Los niveles basales de glucosa en plasma fueron similares entre dietas, y estuvieron comprendidos entre  $78,3 \pm 3,7$  y  $88,8 \pm 2,7$  mg/dl (Figura 4.2.5).



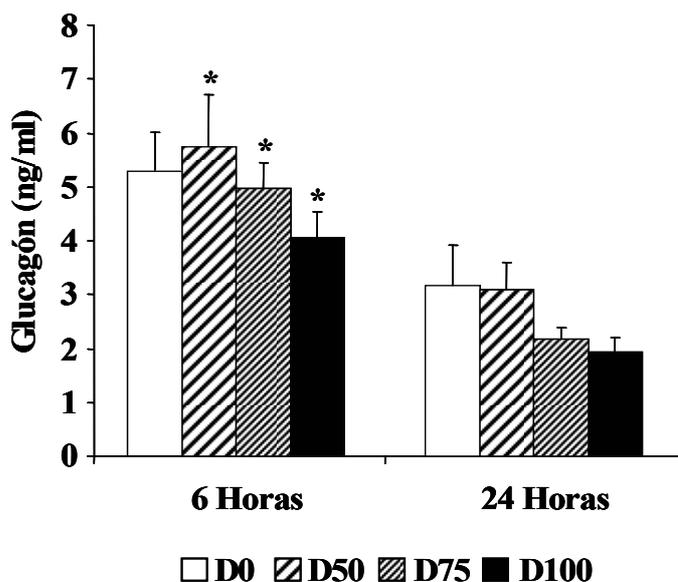
**Figura 4.2.5.-** Niveles plasmáticos de glucosa de las doradas alimentadas con las dietas experimentales. a,b Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre dietas. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

En todos los grupos de doradas alimentadas con las dietas experimentales, los niveles de insulina plasmática a las 6 horas fueron superiores a los registrados a las 24 horas de la ingestión del alimento. No se encontraron diferencias significativas entre dietas en los niveles de insulina ni a las 6 y ni a las 24 horas después de la ingesta. Los valores de insulina en plasma estuvieron comprendidos entre  $10,9 \pm 0,3$  y  $11,7 \pm 0,2$  ng/ml a las 6 horas del postprandial, mientras los niveles basales fueron de  $6,0 \pm 0,5$  a  $7,0 \pm 0,5$  ng/ml (Figura 4.2.6).

**Figura 4.2.6.-** Valores de insulina en plasma sanguíneo de doradas alimentadas con las dietas experimentales. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).



Los niveles de glucagón plasmáticos a la 6 horas de la administración del pienso fueron superiores a los valores de glucagón registrados a las 24 horas del postprandial excepto en el grupo D0. El glucagón en plasma osciló entre valores de  $4,1 \pm 0,5$  a  $5,8 \pm 1,0$  ng /ml a las 6 horas después de la ingesta del alimento. Los niveles basales de glucagón estuvieron comprendidos entre  $1,9 \pm 0,3$  y  $3,2 \pm 0,8$  ng /ml. Las diferencias en los valores de glucagón plasmáticos entre las dietas analizadas no fueron significativas (Figura 4.2.7).



**Figura 4.2.7.-** Niveles de glucagón plasmático en doradas alimentadas con las dietas experimentales. (\*) Indica diferencias significativas respecto a las 24 horas para cada dieta a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

#### **4.2.6.- Discusión.**

En este bloque experimental, se dan a conocer los resultados obtenidos en los experimentos en que se ha realizado la sustitución parcial o total de la proteína animal por la proteína de origen vegetal en las dietas de trucha arco iris y dorada, correspondiente a la segunda etapa del proyecto europeo.

En trucha, el reemplazo parcial o total de la proteína animal en la dieta tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de los animales excepto en el grupo de la dieta T50. Las truchas alimentadas con la dieta T50 alcanzaron pesos corporales finales, tasas de crecimiento específico y además tasas de eficiencia proteica similares a los del grupo control (dieta T0). Estos resultados de crecimiento en trucha con un 50 % de sustitución de proteína animal, están de acuerdo con los observados por Gomes y colaboradores (1995) que utilizó dietas con un rango de sustitución similar. Así el reemplazo parcial del 66 % de la proteína animal en la dieta, no produjo efectos negativos sobre el crecimiento de los animales. Sin embargo, otros estudios en trucha arco iris, muestran que la sustitución total de la proteína animal es posible a partir de concentrados de proteína de soja, ya que los pesos corporales finales y los parámetros de crecimiento obtenidos fueron similares al del grupo control tras las 12 semanas de alimentación (Kaushik et al., 1995). Por lo que, en la dieta de trucha arco iris, el grado de sustitución de la proteína animal óptimo variaría en función de la fuente de la proteína vegetal (Kaushik et al., 1995).

En trucha arco iris se ha señalado que puede existir una disminución en la ingesta del alimento, en los peces alimentados con dietas donde el reemplazo de la proteína animal está por encima del 66% (Gomes et al., 1995). Este consumo menor del alimento, genera una disminución del peso corporal (Gomes et al., 1995; Mambrini et al., 2004). Sin embargo, no parece ser nuestro caso ya que en los animales de las dietas T75 y T100, las cantidades de alimento ingerido fueron incluso superiores a la de los grupos T0 y T50. Por lo que los efectos negativos sobre el crecimiento de las dos dietas con mayor reemplazo de proteína animal, no parecen ser causados por las diferencias en el consumo del alimento. Sin embargo, cuando se incrementa la proteína vegetal en la dieta, aumenta la proporción de factores antinutricionales presentes en las fuentes

vegetales, y está podría ser una posible explicación del menor crecimiento de los animales; así, en estudios previos en truchas arco iris se han observado que factores antinutricionales como el gossypol, ácido fítico, inhibidores de proteasas y saponinas tienen efectos negativos sobre el crecimiento (Francis et al., 2001).

En dorada se observó un efecto negativo en el crecimiento de los animales alimentados con las dietas de proteínas vegetales en las dietas 75 o 100%. Los parámetros de crecimiento analizados en nuestro estudio, señalan que el porcentaje adecuado de sustitución con proteína vegetal en la dieta sería de alrededor del 50 % en nuestras condiciones de cultivo. Estudios previos del reemplazo de la proteína animal por diferentes proporciones de concentrados proteicos de soja y colza en la dieta de la dorada, muestran que la sustitución del 30 % de la proteína animal no produjo cambios en el crecimiento de los animales respecto a una dieta control (Kissil et al., 2000). En cambio, los resultados incorporando harina de maíz en la dieta, indican que se puede realizar hasta un 60% de sustitución de la proteína animal en la dieta, sin afectar el crecimiento de la dorada (Pereira y Oliva-Teles, 2003).

Como se ha descrito previamente en dorada (Kissil et al., 2000; Pereira y Oliva-Teles, 2003) y al contrario de lo observado en trucha, el aumento de la proporción de la proteína vegetal en la dieta, provocó un menor consumo del alimento de la dorada en este experimento. Esta menor ingesta podría ser debida a una baja palatabilidad del alimento, a deficiencias en algunos aminoácidos esenciales en la dieta o interacciones sinérgicas entre factores antinutricionales (Gómez-Requeni et al., 2003). No obstante, la sustitución de proteína animal en la dieta generó un aumento en la retención de proteínas en las doradas alimentadas con las dietas D75 y D100. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Company y colaboradores (1999), que señalan en esta especie, la existencia de un incremento de la retención de proteínas cuando los animales están sometidos a situaciones de restricción alimentaria.

En trucha arco iris, los niveles de excreción de amonio incrementaron a medida que aumentó la proporción de proteína vegetal en la dieta. Una posible explicación de estos incrementos en los niveles de excreción de amonio, podría ser el aumento del catabolismo de las proteínas, debido al incremento de la desaminación de los

aminoácidos en el hígado y riñón de las truchas alimentadas con las dietas de proteína vegetal (Cheng et al., 2003b; Medale et al., 1998; Robaina et al., 1995).

En ambas especies, los niveles de glucosa en plasma presentaron escasas diferencias entre las 6 y 24 horas tras la ingesta del alimento. En la glucemia de los animales no se observaron diferencias entre dietas. Ello probablemente sea debido a que en el diseño de las dietas no se pretendía alterar notablemente el nivel de carbohidratos. En trucha arco iris, estudios previos de Panserat y colaboradores (2000a) han descrito incrementos en la glucemia postprandial de animales alimentados con dietas que poseían distintas proporciones de carbohidratos (entre 20 y 40%) y diferentes grados de digestibilidad de carbohidratos (Capilla et al., 2003; Novoa et al., 2004). En la presente investigación, aunque se observó una menor digestibilidad de carbohidratos en las dietas con inclusión de proteína vegetal (datos no mostrados), estas diferencias no produjeron cambios en los niveles de glucosa en plasma entre las distintas dietas en ambos momentos del postprandial. También existe la posibilidad que los incrementos de glucosa postprandial se dieran a distintos momentos después la ingesta de cada dieta, como se ha descrito para trucha común (Navarro et al., 1993). Esta posible explicación concuerda con las diferencias encontradas en la velocidad del tránsito intestinal del alimento que podría ocasionar una entrada diferencial de glucosa y otros metabolitos al torrente sanguíneo (PEPPA, 2003). Sin embargo serían necesarios más puntos de muestreo para poder comprobarlo.

En esta investigación, el incremento de proteína vegetal en la dieta, no afectó a la expresión del ARNm del GLUT4 en el músculo rojo de trucha arco iris alimentadas con las distintas dietas. Esto concuerda con el hecho de que no se observaron diferencias en los niveles plasmáticos postprandiales de insulina y glucosa entre los animales alimentados con las dietas experimentales; estudios previos en músculo rojo muestran la existencia de una buena correlación entre los niveles de insulina plasmática y la expresión del GLUT4 (Capilla et al., 2002).

Tal y como se ha comentado inicialmente en el bloque I, el efecto de dietas con proteínas vegetales sobre los niveles de insulina en teleósteos es completamente desconocido. En mamíferos, existen escasos estudios sobre la estimulación de la secreción de la insulina por parte de proteínas vegetales, y además la mayoría de estas

proteínas provienen de plantas medicinales, que son de poco uso en la alimentación (Gallagher et al., 2003; Gray y Flatt, 1998a; Gray y Flatt, 1998b; Gray y Flatt, 1999a; Gray y Flatt, 1999b). En el presente trabajo, truchas arco iris alimentadas con la dieta T100 tuvieron valores basales (24 h) de insulina elevados, incluso fueron similares a los niveles de insulina encontrados a las 6 horas postprandial. Puesto que el perfil de aminoácidos fue más o menos constante en las dietas, es difícil de explicar estos valores elevados por una estimulación diferencial consecuencia de la composición de aminoácidos. Distintos autores (Capilla et al., 2003; Gabillard et al., 2003; Larsen et al., 2001) observaron en trucha niveles altos de insulina asociados a bajas temperaturas, sugiriendo una disminución en el metabolismo y un enlentecimiento de la digestión como causas posibles. Un retraso en la velocidad del tránsito del alimento, podría ser una posible explicación de los niveles basales elevados de insulina en plasma en el grupo T100, que probablemente alcanzaron valores más bajos en un momento posterior a las 24 h.

La sustitución de la proteína animal por proteína vegetal en la dieta de la dorada, no tuvo ningún efecto sobre los niveles postprandiales de la insulina. Por lo tanto, si tenemos en cuenta las diferencias encontradas en los niveles de insulina tras la ingesta del alimento en las doradas del bloque experimental I, el incremento de la proteína vegetal no altera la respuesta secretora de la insulina a los aminoácidos, que se mantienen igual en todas las dietas. En ambas especies, las escasas diferencias en las proporciones de los aminoácidos insulínotropicos como arginina, lisina, leucina y fenilalanina entre las dietas, podrían ser una de las posibles causas de la similitud en los niveles de insulina a lo largo del postprandial entre los distintos grupos.

En mamíferos así como en peces, no existe información del efecto en la alimentación con dietas vegetales sobre los niveles de glucagón. En la presente investigación, el reemplazo de la proteína animal en las dietas de ambas especies, no generó diferencias en la respuesta postprandial del glucagón plasmático respecto al grupo control. En ambas especies, los niveles de glucagón plasmático incrementaron después de la ingesta del alimento. Los estudios sobre la secreción postprandial del glucagón en peces son escasos y contradictorios. En bacalao alimentados con dietas sin carbohidratos, no se han encontrado cambios en los niveles de glucagón plasmático respecto a animales con una dieta con carbohidratos (Hemre et al., 1990). En trucha,

Harmon y colaboradores (1991), señalan un incremento en el glucagón en plasma después de una inyección de glucosa. Mientras que dietas enriquecidas con carbohidratos en trucha arco iris producen una inhibición de la secreción del glucagón, debido al incremento postprandial de la glucosa (Novoa et al., 2004). En ambas especies, en la presente investigación se observó a las 6 horas una tendencia a la disminución del glucagón con el incremento de proteína vegetal en la dieta, pero los efectos no fueron significativos.

En resumen, en el presente bloque experimental, y en nuestras condiciones de cultivo entre las que cabe destacar el tamaño del animal y época del año, los resultados de los parámetros de crecimiento observados en animales alimentados que fueron similares a los obtenidos en animales alimentados con una dieta control, nos indican que existe la posibilidad de un reemplazo del 50% de la proteína animal por proteína vegetal en la dieta de trucha arco iris. Mientras en dorada, la incorporación de proteína vegetal por la proteína animal en la dieta tendría que ser menor al 50%; lo que indica un menor grado de adaptación a componentes vegetales de la dieta en dorada que en trucha. En ambas especies, la sustitución de proteína animal por proteína vegetal en la dieta, no produce alteraciones en la respuesta postprandial de la glucosa, insulina y el glucagón, ni afectan la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en trucha arco iris.

### **4.3.- BLOQUE III: Tratamientos de arginina y glucosa en dorada.**

En el presente bloque experimental, el objetivo fue evaluar los efectos de la administración de glucosa y arginina sobre los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, glucagón e IGF-I, así como los distintos parámetros de caracterización de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco de doradas. Dos grupos de 40 doradas fueron adaptadas a las dietas D0 y D75 del bloque experimental II durante 6 semanas. Una semana antes del tratamiento con glucosa y arginina, las doradas fueron separadas en grupos de 10 peces y siguieron la alimentación con la misma dieta. Al inicio del experimento, los peces fueron anestesiados brevemente con MS-222 (0,1 g /l), e inyectados con 0,5 ml de arginina (1,4 mg/g de pez), 0,5 ml de D-glucosa (0,5 mg/g de pez) y 0,5 ml de solución salina, para posteriormente ser muestreados a las 3 y 6 horas tras las inyecciones.

**4.3.1.- Crecimiento y eficiencia alimenticia de las doradas.**

En este experimento de adaptación a las dietas durante 6 semanas realizado entre agosto y septiembre del 2002, el reemplazo del 75 % de la proteína animal por proteína vegetal en la dieta, no provocó un efecto significativo sobre el crecimiento de los animales, aunque se observó una tendencia a una menor tasa de crecimiento específica. Los pesos corporales finales y las tasas de crecimiento del grupo de la dieta D75 fueron similares al de las doradas alimentadas con la dieta control (D0). Aunque, la diferencia no fue significativa, la proteína vegetal en la dieta generó un consumo del alimento inferior en el grupo D75. La incorporación de proteína vegetal en la dieta tampoco produjo diferencias en las tasas de conversión alimenticia y tasas de eficiencia proteica de los animales (Tabla 4.3.1).

**Tabla 4.3.1.- Tasas de crecimiento y eficiencia alimenticia de las doradas alimentadas con las dietas experimentales durante 6 semanas.**

	D0	D75
Peso corporal inicial (g)	98,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	100,9 ± 0,2 <sup>b</sup>
Peso corporal final (g)	178,9 ± 1,4	175,4 ± 1,9
Alimento ingerido (g DM /pez)	96,3 ± 2,6	82,6 ± 1,8
Tasa de crecimiento específico (%)	1,38 ± 0,01	1,29 ± 0,01
Tasa de conversión alimenticia	0,83 ± 0,03	0,90 ± 0,00
Tasa de eficiencia proteica	1,83 ± 0,07	2,12 ± 0,01

Tabla modificada de Vega-Rubín y colaboradores (2004)

Tasa de crecimiento específico =  $[100 \times [\text{Ln}(\text{peso corporal final}) - \text{Ln}(\text{peso corporal inicial})]]/\text{días}$

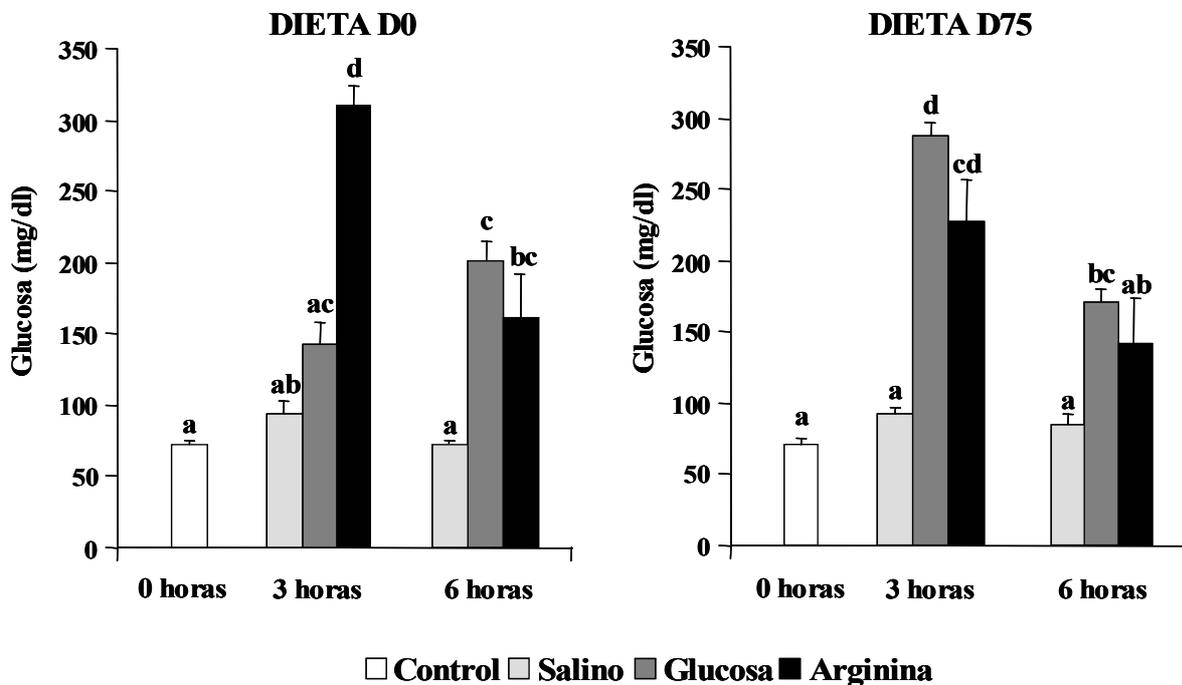
Tasa de conversión alimenticia = peso húmedo ganado / peso de alimento seco ingerido

Tasa de eficiencia proteica = peso húmedo ganado / peso neto de proteínas ingeridas

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba T-Student).

#### 4.3.2.- Niveles plasmáticos de glucosa en dorada: efectos de la administración de glucosa y arginina.

En los animales controles inyectados con la solución salina, la glucosa fue muy similar a los valores control no tratados (0 horas), tanto en los animales alimentados con la dieta D0 como con la dieta D75. En el grupo de la dieta D0, los valores de glucosa en plasma variaron entre tratamientos tras las inyecciones de glucosa y arginina (Figura 4.3.1). En estos animales, el tratamiento de glucosa produjo un aumento de la glucemia sólo a las 6 horas después de la inyección. La inyección de arginina generó un incremento de los niveles plasmáticos de glucosa de los animales, con un valor máximo a las 3 horas ( $309,4 \pm 15,2$  mg/dl) significativamente superior al registrado a las 6 horas ( $160,8 \pm 30,8$  mg/dl). En las doradas alimentadas con la dieta D75, a las 3 horas después de la inyección, los tratamientos de glucosa y arginina incrementaron los niveles de glucosa en plasma (Figura 4.3.1). A las 6 horas del tratamiento de glucosa, los valores de glucosa en plasma se mantuvieron elevados ( $170,6 \pm 8,7$  mg/dl) respecto a los niveles registrados para el grupo salino ( $84,4 \pm 8,1$  mg/dl).

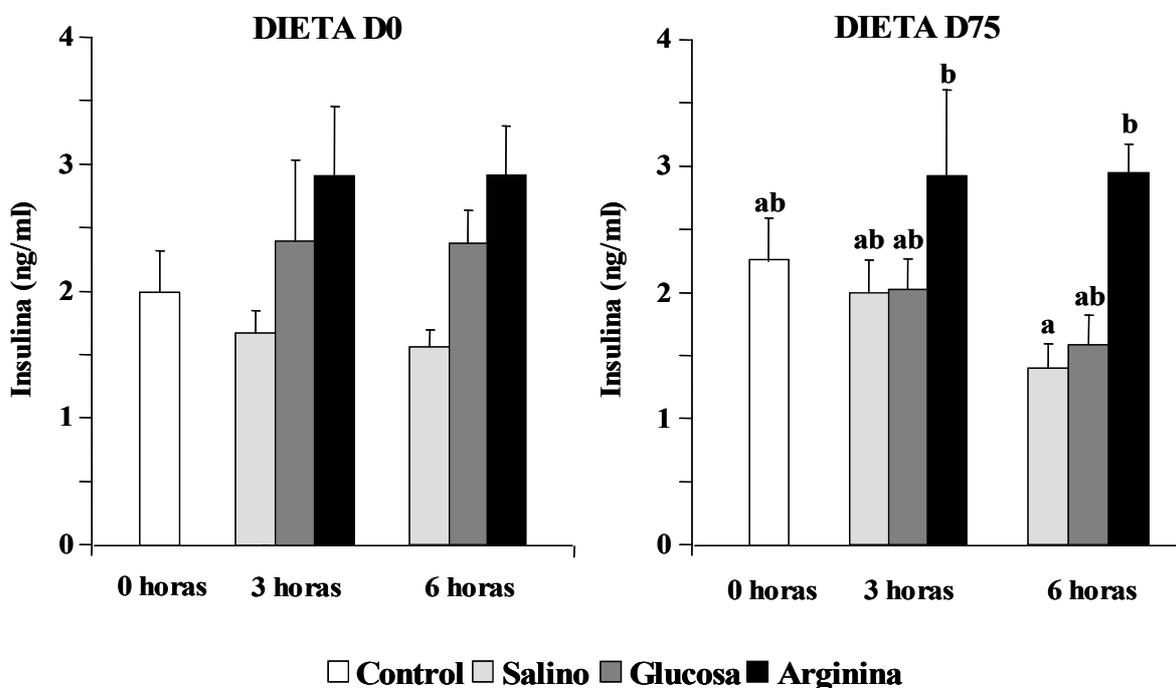


**Figura 4.3.1.-** Niveles plasmáticos de glucosa sanguínea de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina. a,b,c,d Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a  $p < 0,05$  (prueba HSD de Tukey).

#### 4.3.3.- Niveles de insulina en el plasma de las doradas: efectos de la administración de glucosa y arginina.

Los niveles de insulina en plasma de los animales controles no tratados (0 horas) fueron similares a los valores de insulina plasmática encontrados en los animales inyectados con la solución salina para ambas dietas. En el grupo de la dieta D0, las inyecciones de glucosa y arginina no produjeron cambios significativos en los niveles plasmáticos de insulina de las doradas. Sin embargo, se observaron las tendencias a que ambos tratamientos generaran aumentos de los niveles de insulina plasmática en los animales; la inyección de arginina produjo un incremento mayor de la secreción de insulina tras las 3 horas y 6 horas después de la inyección (Figura 4.3.2).

En las doradas alimentadas con la dieta D75, el tratamiento con arginina provocó un incremento ligero en los niveles plasmáticos de insulina a las 6 horas respecto al grupo control (salino). Mientras que los animales tratados con glucosa, no presentaron cambios significativos respecto al grupo control (Figura 4.3.2). En las doradas tratadas con arginina, la insulina en plasma alcanzó valores de  $2,92 \pm 0,68$  ng/ml a  $2,94 \pm 0,23$  ng/ml a las 3 y 6 horas respectivamente tras la inyección.

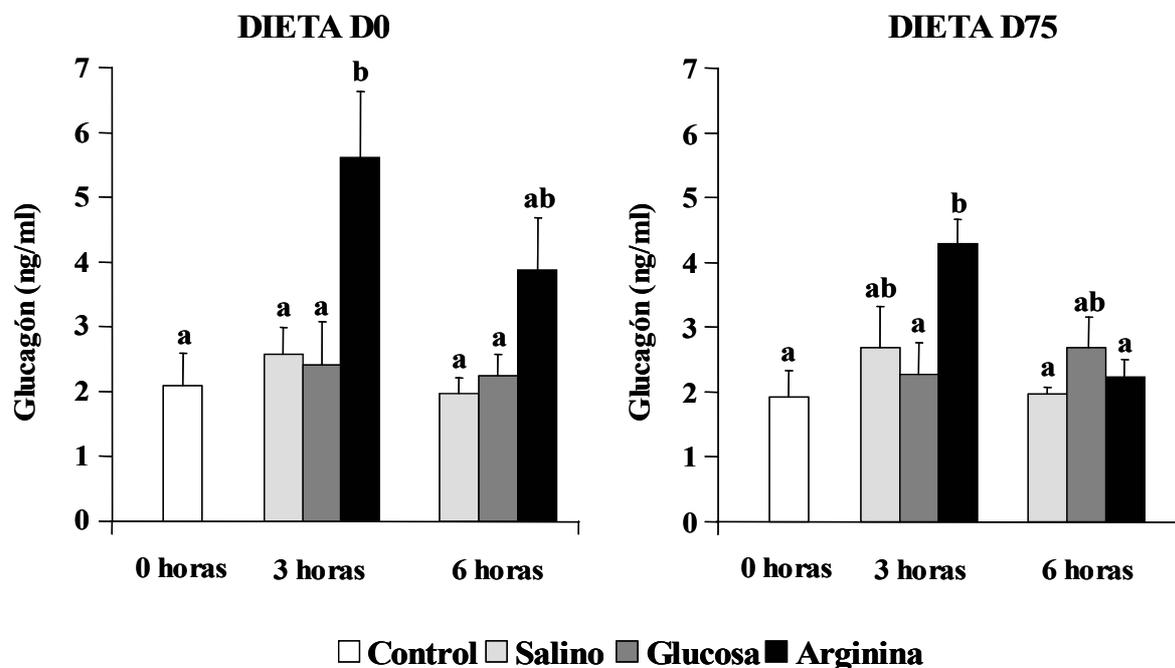


**Figura 4.3.2.-** Niveles de insulina en plasma de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina. a,b Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a  $p < 0,05$  (prueba HSD de Tukey).

#### 4.3.3.- Niveles plasmáticos de glucagón en la dorada: efectos de la administración de glucosa y arginina.

Los niveles de glucagón plasmático de los animales inyectados con la solución salina y alimentados con ambas dietas fueron similares a los valores de glucagón en plasma encontrados en los animales no tratados (0 horas). En los animales alimentados con la dieta D0, a las 3 horas de la inyección, el tratamiento de arginina generó un incremento significativo de los niveles de glucagón en plasma (Figura 4.3.3). Este aumento del glucagón plasmático con la administración de arginina representa un incremento del 110% con respecto a los controles inyectados con salino. Las doradas tratadas con arginina tuvieron niveles de glucagón en plasma menores a las 6 horas que a las 3 horas después de la inyección aunque no de forma significativa. Mientras que la administración de glucosa no alteró los niveles plasmáticos de glucagón

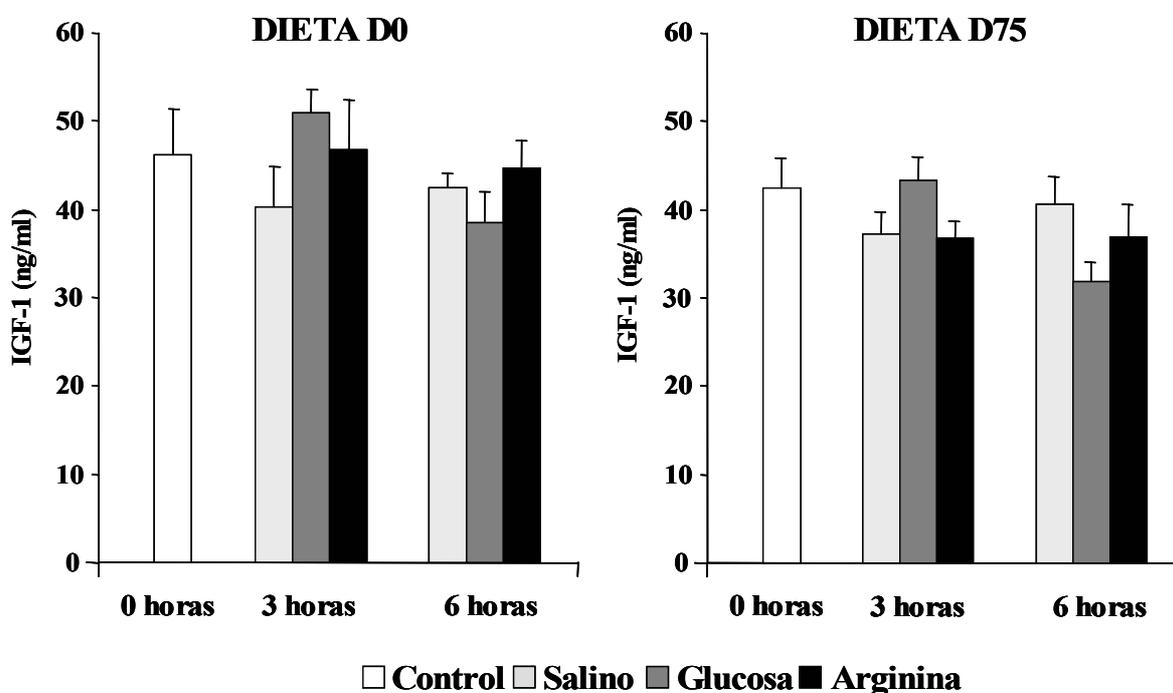
En el grupo de la dieta D75, la inyección de glucosa no produjo cambios en los niveles de glucagón en plasma respecto al grupo salino al igual que en las doradas alimentadas con la dieta D0 (Figura 4.3.2). En las doradas tratadas con arginina, a las 3 horas después de la inyección, se observaron niveles plasmáticos de glucagón ( $4,29 \pm 0,41$  ng/ml) superiores a los valores registrados para los animales inyectados con la solución salina y de forma significativa respecto a los controles de 0 horas.



**Figura 4.3.3.-** Niveles plasmáticos de glucagón en las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina. a,b Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a  $p < 0,05$  (prueba HSD de Tukey).

#### 4.3.3.- Niveles del IGF-I en el plasma de dorada: efectos de la administración de glucosa y arginina.

En las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75, los tratamientos de arginina y glucosa no produjeron cambios en los niveles plasmáticos de IGF-I ni a las 3 y ni a las 6 horas del inicio del experimento (Figura 4.3.4). En la dieta D0, los niveles de IGF-I en plasma estuvieron comprendidos entre  $40,3 \pm 4,5$  y  $50,9 \pm 3,7$  ng/ml a las 3 horas y valores plasmáticos de IGF-I de  $38,3 \pm 3,5$  a  $44,6 \pm 3,1$  ng/ml a las 6 horas después de las inyecciones. En el grupo D75, el IGF-I en plasma estuvo en el rango comprendido entre  $36,9 \pm 1,9$  y  $43,5 \pm 2,7$  ng/ml a las 3 horas y de  $31,9 \pm 2,3$  a  $40,8 \pm 3,1$  ng/ml a las 6 horas del inicio de los tratamientos.



**Figura 4.3.4.-** Niveles de IGF-I en plasma de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina. No se han encontrado diferencias significativas entre tratamientos a  $p < 0,05$  (prueba HSD de Tukey).

#### 4.3.4.- Caracterización de los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco de las doradas: efectos de la administración de glucosa y arginina.

Los distintos parámetros analizados de los receptores de insulina en el músculo blanco de dorada, no mostraron cambios significativos entre tratamientos de arginina y glucosa respecto al control (salino) a las 3 horas de la inyección y en todos los grupos se observó una elevada variabilidad en estos parámetros. En la dieta D0, la constante de disociación de los receptores de insulina varió entre  $0,40 \pm 0,09$  y  $0,56 \pm 0,23$  nM, y el número de receptores fue de  $122,8 \pm 22,8$  a  $207,4 \pm 67,4$  fmol/mg de proteína. En la dieta D75, la constante de disociación del receptor de insulina fue de  $0,38 \pm 0,05$  a  $0,75 \pm 0,36$  nM y el número de receptores de insulina varió entre  $179,7 \pm 6,7$  y  $214,5 \pm 104,6$  fmol/mg de glucoproteína (Tabla 4.3.2).

En los receptores de IGF-I, la Kd de IGF-I fue menor al de los receptores de insulina. Para ambas dietas, las Kd y los números de receptores de IGF-I fueron similares entre tratamientos. En la dieta D0, la Kd del IGF-I estuvo en el rango de  $0,11 \pm 0,04$  a  $0,12 \pm 0,03$  nM, el número de receptores de IGF-I fue de  $52,3 \pm 22,2$  a  $80,4 \pm 36,6$  fmol/mg de glucoproteína. En la dieta D75, la Kd de IGF-I osciló en el rango de  $0,05 \pm 0,02$  a  $0,08 \pm 0,02$  nM, los números de receptores de IGF-I variaron entre  $128,5 \pm 11,2$  y  $171,8 \pm 49,8$  fmol/mg de glucoproteína (Tabla 4.3.2). En el grupo D75, los números de receptores de IGF-I fueron superiores a los valores registrados para el grupo de la dieta D0. Además, se observó una constante de disociación menor en el grupo de la dieta D75.

**Tabla 4.3.2.- Características de los receptores de insulina e IGF-I en los músculo blancos de doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino, glucosa y arginina después de 3 horas del tratamiento.**

	DIETA D0			DIETA D75		
	Salino	Glucosa	Arginina	Salino	Glucosa	Arginina
Kd INS	$0,51 \pm 0,31$	$0,40 \pm 0,09$	$0,56 \pm 0,23$	$0,38 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,11$	$0,75 \pm 0,36$
Kd IGF-1	$0,12 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,08$	$0,11 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,02$
Ro INS	$143,3 \pm 64,0$	$122,8 \pm 22,8$	$207,4 \pm 67,4$	$179,7 \pm 30,4$	$208,8 \pm 51,0$	$214,5 \pm 104,6$
Ro IGF-1	$56,8 \pm 19,1$	$52,3 \pm 22,2$	$80,4 \pm 36,6$	$128,5 \pm 11,2$	$136,0 \pm 29,1$	$171,8 \pm 49,8$

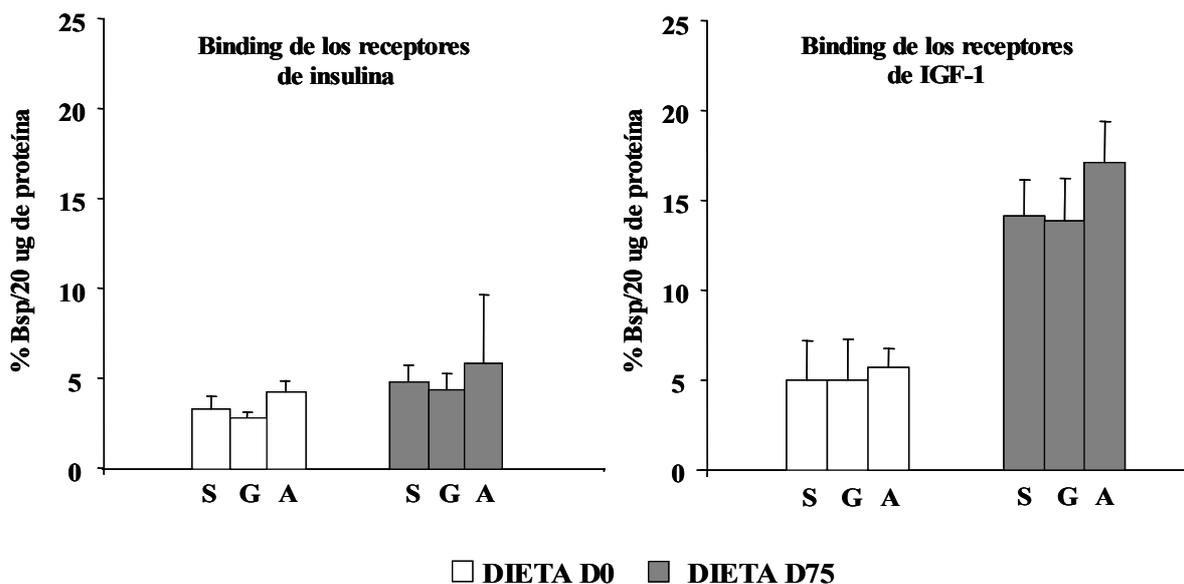
Kd, Constante de disociación (nM); Ro, Número de receptores (fmol/mg de glucoproteína)

No existen diferencias significativas entre tratamientos a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

En ambas dietas, las uniones de las hormonas a sus receptores (*binding*) específicos de insulina no mostraron diferencias entre tratamientos (Figura 4.3.5). En la dieta D0, los valores del *binding* estuvieron entre  $2,9 \pm 0,3$  y  $4,3 \pm 0,6$  % para 20  $\mu$ g de glucoproteína. En el grupo D75, el *binding* de insulina fue de  $4,4 \pm 0,9$  a  $5,9 \pm 3,8$  % para 20  $\mu$ g de glucoproteína.

Los valores del *binding* específico de IGF-I fueron similares entre los diferentes grupos de animales tratados con glucosa y arginina respecto al control en ambas dietas. Sin embargo en el grupo D75, los niveles de *binding* de IGF-I fueron superiores a los observados (del orden de 3 veces más) para los receptores de IGF-I del grupo D0.

En el grupo de la dieta D75, los niveles del *binding* específico de los receptores de IGF-I fueron superiores del orden de 3 veces más que los valores de los receptores de insulina (Figura 4.3.5).



**Figura 4.3.5.-** Niveles de *binding* de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco de las doradas alimentadas con las dietas D0 y D75 e inyectadas con salino (S), glucosa (G) y arginina (A) después de 3 horas del tratamiento. No se han encontrado diferencias significativas entre tratamientos a  $p < 0,05$  (prueba HSD de Tukey).

#### **4.3.5.- Discusión.**

En este bloque experimental, se dan a conocer los resultados de los efectos de tratamientos de glucosa y arginina sobre la secreción de las hormonas pancreáticas insulina y glucagón en doradas alimentadas con las dietas D0 y D75. A pesar de que se han realizado estudios de los efectos de dichos metabolitos sobre la insulina en otras especies como salmónidos, se desconocen los posibles efectos en la dorada.

Las doradas alimentadas con la dieta D75 no mostraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento respecto al grupo control después de 6 semanas, aunque en la dieta D75 se observó una tendencia a un menor crecimiento. Contrariamente en el bloque experimental II, doradas alimentadas con dietas idénticas durante 12 semanas, el crecimiento fue claramente menor con la dieta D75. En el bloque experimental II, los pesos corporales iniciales de las doradas fueron inferiores a las del presente estudio; este hecho indicaría que en individuos más grandes, cabe la posibilidad de que el incremento de proteína vegetal en la dieta no afecte al crecimiento de los animales. También hay que tener en cuenta que el período experimental es más corto y durante una época del año algo distinta (agosto-septiembre). Al igual que en el bloque experimental II, las doradas alimentadas con la dieta D75 consumieron cantidades de alimento inferiores que los animales del grupo D0 aunque no significativamente.

En el presente experimento, los tratamientos con glucosa generaron incrementos en las glucemias de los animales como cabía esperar. Sin embargo, las respuestas en los niveles de glucosa plasmática fueron diferentes entre dietas. En peces existen diversos estudios en los que se han señalado hiperglucemias similares a las observadas en la presente investigación después de tratamientos con glucosa (Blasco et al., 1996; Blasco et al., 2001; Harmon et al., 1991). También se han observado niveles postprandiales de glucosa elevados en peces alimentados con dietas enriquecidas de carbohidratos (Furuichi y Yone, 1981; Ince y Thorpe, 1974; Mazur et al., 1992). Por todo ello se ha considerado a estas especies poco tolerantes a la glucosa, debido a la hiperglucemia prolongada tras su administración producto de la menor utilización de dicho metabolito (Moon T., 2001).

En peces, los efectos del tratamiento de glucosa sobre los niveles de insulina son diversos. En dorada, el tratamiento de glucosa en el presente experimento no produjo un aumento significativo en los niveles de insulina a lo largo del período observado, al igual que estudios en anguilas, pez gato y tilapia (Ince y Thorpe, 1974; Ottolenghi et al., 1995; Wilson y Poe, 1987). Sin embargo, en especies como carpa, salmón chinook y trucha común, el tratamiento de glucosa estimuló el incremento de la insulina plasmática (Blasco et al., 1996; Blasco et al., 2001; Furuichi y Yone, 1981). En trucha común, inyecciones intraperitoneales de glucosa generaron la disminución de los niveles de insulina plasmática en los animales (Harmon et al., 1991). Blasco y colaboradores (2001) en trucha común tras una carga de glucosa intravenosa, han determinado que el incremento de la insulina en plasma se da durante las 2 primeras horas después del tratamiento y que a las 3 horas, los niveles de insulina plasmática son similares a los basales. Por tanto, cabe la posibilidad de que el estímulo de la glucosa sobre la secreción de insulina pudo haber sucedido en el presente trabajo antes de las 3 horas. Sin embargo, el efecto de la administración intraperitoneal es siempre más lento. Además en algunos estudios en peces, se ha descrito que la administración de glucosa genera un incremento de la secreción de somatostatina, que inhibe la secreción de insulina (Ronner y Scarpa, 1987), que podría ser otra posible causa de no observar cambios en los niveles de insulina plasmática en esta investigación.

Los estudios del efecto de la glucosa sobre los niveles de glucagón son escasos en peces. Las respuestas de esta hormona son variadas en función de la especie. En dorada, en el presente trabajo, el tratamiento de glucosa no generó cambios en los niveles de glucagón en ambas dietas. En estudios *in vivo* e *in vitro*, el tratamiento de glucosa incluso aumenta la secreción de glucagón en trucha arco iris, anguila y pez gato (Harmon et al., 1991; Ince y So, 1984; Ronner y Scarpa, 1987). Por otro lado, Carneiro y col. (1993) han descrito que inyecciones intraperitoneales de glucosa, así como tratamientos con dietas enriquecidas con carbohidratos (Novoa et al., 2004), provocan la disminución de los niveles de glucagón en trucha común. Al igual que en mamíferos este efecto inhibitorio también se intuye en los resultados de esta tesis, al menos si se compara con los efectos producidos por la arginina.

Tanto en mamíferos como en peces, la arginina es un potente estimulador de la secreción de la insulina (Mommsen y Plisetkaya, 1991). En salmónidos, la arginina

puede llegar a incrementar en unas 3-9 veces los niveles de insulina en plasma (Párrizas et al., 1994a; Baños et al., 1999); se han utilizado inyecciones con este aminoácido en diversos estudios como modelo de hiperinsulinemia (Carneiro et al., 1993; Párrizas et al., 1994a; Baños et al., 1999; Mommsen et al., 2001). Sin embargo, en este primer estudio de los efectos de inyecciones de arginina en dorada, los resultados obtenidos indican que independientemente de la dieta, dosis altas de arginina sólo incrementan dos veces los niveles insulina circulante. Esta menor respuesta de la insulina es similar a la encontrada en carpa (Baños et al., 1997; Párrizas et al., 1994b), lo que sugiere una baja sensibilidad de las células pancreáticas betas a este aminoácido en estas especies, si se compara con la respuesta en los salmónidos y otras especies carnívoras.

En salmónidos, cuando se estudian los efectos de los tratamientos de arginina sobre la insulina y el glucagón, la acción insulínica predomina sobre la estimulación del glucagón (Carneiro et al., 1993), con disminución o sin cambios en la glucemia (Plisetkaya et al., 1991). Sin embargo, los resultados de la presente investigación en dorada muestran una estimulación mayor del glucagón que la insulina. Además, el incremento de la relación glucagón/insulina podría haber mediado el estado de hiperglucemia en los peces tratados con arginina, ya que los perfiles plasmáticos de glucosa y glucagón son paralelos a lo largo del tiempo. Estas observaciones son apoyadas al hacer las comparaciones entre animales alimentados con las dietas D0 y D75. La respuesta menor del glucagón en el grupo D75 coincide con el incremento menor de los niveles de glucosa en plasma. Este factor junto con el aumento similar de la insulina plasmática en ambas dietas (D0 y D75), sugiere que la respuesta conjunta de la insulina y glucagón a la arginina es diferente en ambas dietas. Además, al igual que en mamíferos donde niveles de glucagón elevados estimulan la secreción de la insulina, el efecto insulínico del glucagón también ha sido observado en peces (Pérez et al., 1988). Por lo que es posible que los importantes incrementos del glucagón plasmático observados a las 3 horas de la administración de arginina pudieran aumentar los niveles de insulina en ambos grupos de dietas a las 6 horas de los tratamientos con arginina.

En mamíferos, los efectos estimuladores de la insulina sobre los niveles de IGF-I se han demostrado en experimentos *in vivo* e *in vitro* (Griffen et al., 1987; Hurson et al., 1995). Las acciones estimuladoras de la insulina y arginina sobre el IGF-I también se han demostrado en salmónidos (Baños et al., 1999), así como, la

estimulación de la insulina sinérgicamente con la hormona de crecimiento (GH) sobre la expresión del ARNm del IGF-I en hepatocitos de coho salmón (Duan y Hirano, 1992; Duan y Plisetskaya, 1993). Se ha sugerido que la GH y la insulina actúan conjuntamente sobre la síntesis y liberación del IGF-I en el hígado. En el presente trabajo, el efecto insulino-trópico del tratamiento de arginina fue moderado, e independientemente de la dieta, la arginina no tuvo un efecto sobre los niveles de GH (de Celis et al., 2004), estas circunstancias podrían explicar la ausencia de cambios en los niveles plasmáticos de IGF-I. Todo ello estaría también relacionado con la disminución de la actividad del eje somatotrópico, que podría contribuir a la pérdida de la respuesta del IGF-I durante esta época del año (Mingarro et al., 2002; Pérez-Sánchez et al., 1994).

En relación a los receptores de insulina e IGF-I del músculo blanco, los tratamientos de glucosa y arginina no produjeron diferencias en los porcentajes del *binding* de los receptores de insulina y IGF-I a las 3 horas del tratamiento. A diferencia de estos resultados, Planas y col. (2000b) en carpa y trucha han señalado incrementos del *binding* de los receptores de insulina, asociados a aumentos de la insulina plasmática tras los tratamientos de arginina. Probablemente en dorada, la estimulación moderada de la insulina por la administración de arginina puede que no fuese suficiente para generar cambios a nivel del *binding* de los receptores de insulina.

Independientemente del tratamiento y la dieta, los tratamientos con glucosa y arginina no produjeron cambios en los distintos parámetros de caracterización de los receptores de IGF-I del músculo blanco de dorada. Al igual que en los resultados del bloque experimental I, en el grupo de la dieta D75, los niveles del *binding* de los receptores de IGF-I fueron superiores al *binding* de los receptores de insulina en el músculo blanco de dorada. Sin embargo, en el grupo de la dieta D0, no se pudo observar esta diferencia entre los porcentajes del *binding* del IGF-I respecto a los valores de *binding* del receptor de insulina. Estas diferencias en el *binding* del receptor de IGF-I respecto al *binding* del receptor de insulina encontradas entre dietas, no están asociadas a cambios en los niveles del IGF-I en plasma, ya que en el presente experimento no se han observado diferencias en los niveles plasmáticos de IGF-I entre dietas. Es posible que este incremento en el *binding* del receptor del IGF-I fuera un factor compensatorio que favorecería un mayor crecimiento de las doradas alimentadas con la dieta D75, y

explicaría el que no se encontrasen diferencias en los parámetros de crecimiento respecto al de animales alimentados con la dieta D0.

En resumen en el presente bloque experimental, el tratamiento intraperitoneal con arginina posee en dorada un efecto secretor de glucagón superior al de la insulina, independientemente de la dieta, y no produce cambios en los niveles del IGF-I; mientras que con el tratamiento con glucosa no se ha podido observar cambios en los niveles plasmáticos de insulina, glucagón e IGF-I. La administración de glucosa y arginina no produjo cambios a nivel de los receptores de insulina e IGF-I en el músculo blanco de dorada.

#### **4.4.- BLOQUE IV: Caracterización y clonaje del transportador de glucosa (saGLUT) del músculo esquelético de dorada.**

El presente bloque experimental se realizó con el objetivo de identificar y caracterizar el transportador de glucosa de difusión facilitada GLUT4 en el músculo de dorada similar al descrito en otros peces. Para lo cual, a partir del ARNm del músculo esquelético de dorada se realizó una RT-PCR y una PCR anidada (apartado 3.10.4), utilizando los cebadores degenerados diseñados para amplificar el transportador de glucosa de dorada (tabla 3.10.2), y cuyos productos de PCR fueron secuenciados e introducidos en las bases públicas (BLAST). Posteriormente mediante una RT-PCR se analizó la distribución tisular del transportador de glucosa. Así como, la regulación a nivel de proteína del transportador de glucosa en diferentes condiciones fisiológicas, como el ayuno o situaciones de hiperinsulinemia mediante inyecciones intraperitoneales de insulina o arginina.

#### 4.4.1.- Clonaje del transportador de glucosa (saGLUT) del músculo esquelético de dorada.

En la presente investigación, se obtuvo un fragmento de ADN de 636 pb por PCR utilizando los cebadores degenerados. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica fue un fragmento de proteína de 211 aminoácidos (Figura 4.4.1). Esta secuencia de aminoácidos al ser introducida en las bases públicas (BLAST), mostró un grado de homología elevado con la familia de transportadores de glucosa.

```

1   tttcagcaactcggaggggagacgggtgactggaacccttgctctctcagtggttcaccgct
    F Q Q L G G E T V T G T L A L S V F T A
61  gtattggggttcctttcagtttgggtacaacataggtgtcatcaacgctcctcagaagatc
    V L G S F Q F G Y N I G V I N A P Q K I
121 attgaagcggactacaacgctacatgggtgcatcggtatggagagcccatccccagcagt
    I E A D Y N A T W V H R Y G E P I P S S
181 accctcacaaccctctgggtccctgtccgtagccatcttctctataggcggatgatctcc
    T L T T L W S L S V A I F S I G G M I S
241 tccttctgtgtgggcgatctcagagtggtggtggggaggaggaaagccatgctcattaac
    S F C V G V I S E W L G R R K A M L I N
301 aacttgtttgcccttcacgagggaggtttgatgggcatggccaagatcagcaggtccttc
    N L F A F I G G G L M G M A K I S R S F
361 gagatgatgattctgggacgattcgtcatcgggtgcatactgtggattggcatcggggctg
    E M M I L G R F V I G A Y C G L A S G L
421 gtgccccatgtatgtgggtgagatagcccctaccagtctgcgagggggcattgggcacgctc
    V P M Y V G E I A P T S L R G A L G T L
461 caccagctggctatcgtcacagggattctcatggcacaggtcctgggtctggagcttttg
    H Q L A I V T G I L M A Q V L G L E S L
521 ctgggcagtgaggagttgtggccagtgctggtggtggtgaccggttctgcccactgtcctg
    L G S E E L W P V L V G V T V L P T V L
581 cagatggtgctgctgccccttctgccccgaaagcca
    Q M V L L P F C P E S

```

**Figura 4.4.1.-** Secuencias de nucleótidos y aminoácidos del transportador de glucosa de dorada. La secuencia de aminoácidos deducida es representada por letras en mayúscula.

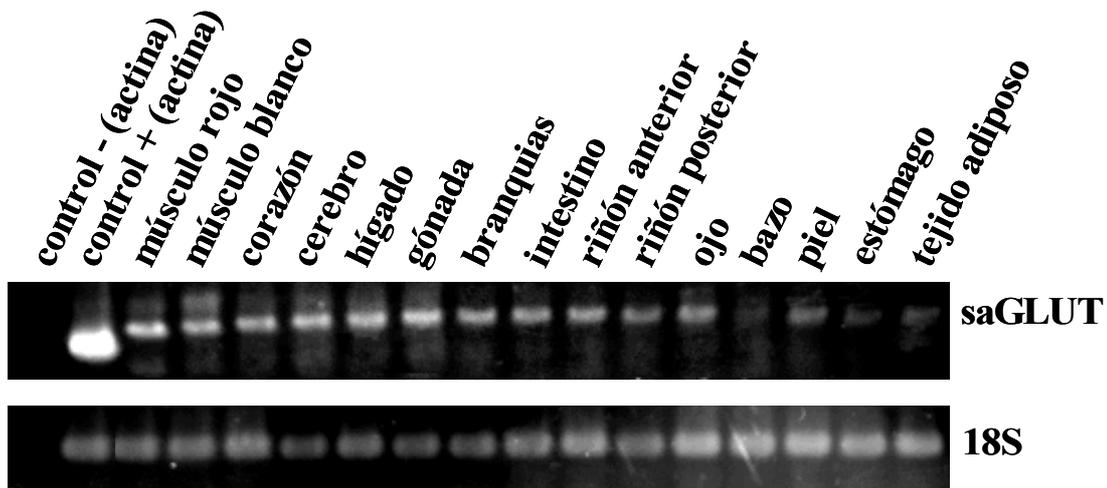
En concreto, la secuencia de aminoácidos deducida en el presente estudio, presentó un alto grado de homología (100%) con un fragmento del transportador de glucosa (okGLUT4), clonada en *Oncorhynchus kisutch*. El transportador de glucosa obtenido en dorada mostró una homología del 96 % respecto al transportador btGLUT4, clonado de *Salmo trutta*; y una homología del 89 % con un fragmento del transportador de glucosa tipo 4 (gmGLUT4), clonado de *Gadus morhua*. Esta secuencia obtenida se denominó saGLUT. A partir de la secuencia de aminoácidos deducida se determinó la existencia de 6 dominios transmembrana señalados en números romanos (Figura 4.4.2).

	1			<b>I</b>		50
<b>saGLUT4</b>	----FQQL-G	GETVTGTLAL	SVFTAVLGSF	QFGYNIGVIN	APQKIIEADY	
<b>okGLUT4</b>	MPSGFQQL-G	GETVTGTLAL	SVFTAVLGSF	QFGYNIGVIN	APQKIIEADY	
<b>btGLUT4</b>	MPPGFQHL-G	GETVTGTLAL	SVFTAVLGSF	QFGYNIGVIN	APQKIIEADY	
<b>gmGLUT4</b>	MPAGFQQLNG	GETVTRTLAL	SVFTAVLGSF	QFGYNIGVIN	APQKIIEQDY	
	51			<b>II</b>		100
<b>saGLUT4</b>	<b>NATWVHRYGE</b>	PIPSSTLTTL	WSLSVAIFSI	GGMISSFCVG	VISEWLGRRK	
<b>okGLUT4</b>	<b>NATWVHRYGE</b>	PIPSSTLTTL	WSLSVAIFSI	GGMISSFCVG	VISEWLGRRK	
<b>btGLUT4</b>	<b>NATWVHRYGE</b>	LIPTATLTTP	WSLSVAIFSI	GGMISSFCVG	VISEWLGRRK	
<b>gmGLUT4</b>	<b>NATWQHRYGE</b>	PISPGLTSL	WSLSVAIFSI	GGMASSFCVG	FVSEWLGRRK	
	101	<b>III</b>		<b>IV</b>		150
<b>saGLUT4</b>	AMLINNLFAF	IGGGLMGMAK	ISRSFEMMIL	GRFVIGAYCG	LASGLVPMYV	
<b>okGLUT4</b>	AMLINNLFAF	IGGGLMGMAK	ISRSFEMMIL	GRFVIGAYCG	LASGLVPMYV	
<b>btGLUT4</b>	AMLINNLFAF	IGGSLMGMAK	ISRSFEMMIL	GRFVIGAYCG	LASGLVPMYV	
<b>gmGLUT4</b>	AMLINNLFAF	IGGGLMGMSK	ICRSIEMMVL	GRFVIGAYCG	LASGLTPMYV	
	151		<b>V</b>			200
<b>saGLUT4</b>	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILMAQVL	GLSLLGSEE	LW <b>P</b> VLVGVTV	
<b>okGLUT4</b>	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILMAQVL	GLSLLGSEE	LW <b>P</b> VLVGVTV	
<b>btGLUT4</b>	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILIAQVL	GLSLLGSEE	LW <b>P</b> VLVGVTV	
<b>gmGLUT4</b>	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILIAQVL	GLEALLGSEA	LW <b>P</b> VLLGVTV	
	201	<b>VI</b>				
<b>saGLUT4</b>	L <b>P</b> TVLQMVLL	<b>P</b> FCPES				
<b>okGLUT4</b>	L <b>P</b> TVLQMVLL	<b>P</b> FCPES				
<b>btGLUT4</b>	L <b>P</b> TVLQMALL	<b>P</b> FCPES				
<b>gmGLUT4</b>	L <b>P</b> TVLQMALL	<b>P</b> FCPES				

**Figura 4.4.2.-** Alineamiento de aminoácidos del transportador de glucosa de dorada (saGLUT) con las secuencias de transportadores de glucosa de diferentes especies, okGLUT4 (*Oncorhynchus kisutch*, GenBank: AF502957), btGLUT4 (*Salmo trutta*, GenBank: AF247395), y gmGLUT (*Gadus morhua*, GenBank: DQ109810). Las cajas con números romanos corresponden a seis dominios transmembrana. Aminoácidos de motivos importantes se señalan en negritas.

#### 4.4.2.- Expresión tisular del transportador de glucosa de dorada (*saGLUT*).

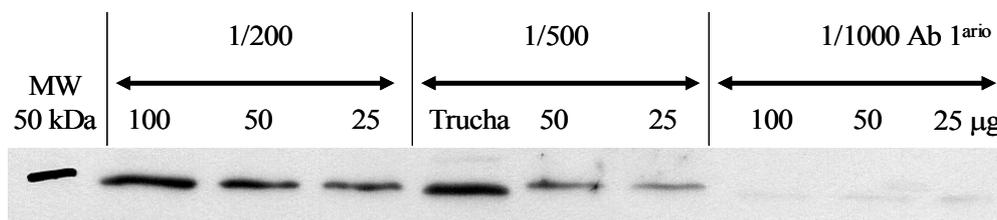
En la figura 4.4.3, se muestra la distribución tisular del *saGLUT* de dorada analizada del ARNm mediante RT-PCR con 30 ciclos en la reacción de PCR, en el que se utilizaron cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos clonada del *saGLUT*. Las intensidades de las bandas de la RT-PCR del *saGLUT*, nos indican que la expresión del ARNm del *saGLUT* es superior en el músculo rojo, músculo blanco, corazón, cerebro, hígado, gónada y ojo. En las branquias, intestino, riñón anterior, riñón posterior y piel, el *saGLUT* presenta una expresión intermedia y una expresión del *saGLUT* inferior en el tejido adiposo, estómago y especialmente en el bazo donde la expresión es muy baja.



**Figura 4.4.3.-** Distribución tisular del *saGLUT* de dorada a partir de RT-PCR utilizando cebadores específicos de *saGLUT* (parte superior) y 18S (parte inferior).

#### 4.4.3.- Validación del anticuerpo para la determinación del transportador de glucosa de dorada (saGLUT).

Los niveles de proteína del saGLUT fueron analizados por inmunodetección. Para lo cual, mediante western blot se procedió a la validación del anticuerpo policlonal de conejo diseñado contra el extremo carboxilo terminal del transportador de glucosa de salmón btGLUT4 (Capilla et al., 2004). Se utilizaron diferentes diluciones de anticuerpo (1:1000, 1:500, 1:200) en varias cantidades de extractos totales de proteínas del músculo rojo de dorada (25, 50 y 100  $\mu$ g). En la figura 4.4.4, se detectó una sola banda de aproximadamente 50 kDa del mismo tamaño a la detectada en trucha. Además se observó una buena correlación entre la cantidad de proteína y la concentración del anticuerpo para la inmunodetección. La concentración de 50  $\mu$ g de proteína y la dilución del anticuerpo de 1:500 fueron las condiciones seleccionadas para los estudios posteriores de western blot.



**Figura 4.4.4.-** Inmunodetección del saGLUT mediante western blot en el músculo rojo de dorada, utilizando diferentes concentraciones de proteínas y diluciones del anticuerpo btGLUT4.

#### 4.4.4.- Efecto del ayuno sobre el transportador de glucosa de dorada (saGLUT).

En el experimento de ayuno de 2 semanas en dorada (apartado 3.1.4), los pesos corporales finales fueron similares entre los grupos de animales alimentados y ayunados. Sin embargo, las doradas ayunadas mostraron pesos de los hígados y valores de los índices hepatosomáticos inferiores a los de las alimentadas. No se observaron cambios en la glucemia de los animales ayunados respecto a los alimentados. En dorada, el ayuno provocó una disminución de los valores de insulina en plasma (Tabla 4.4.1).

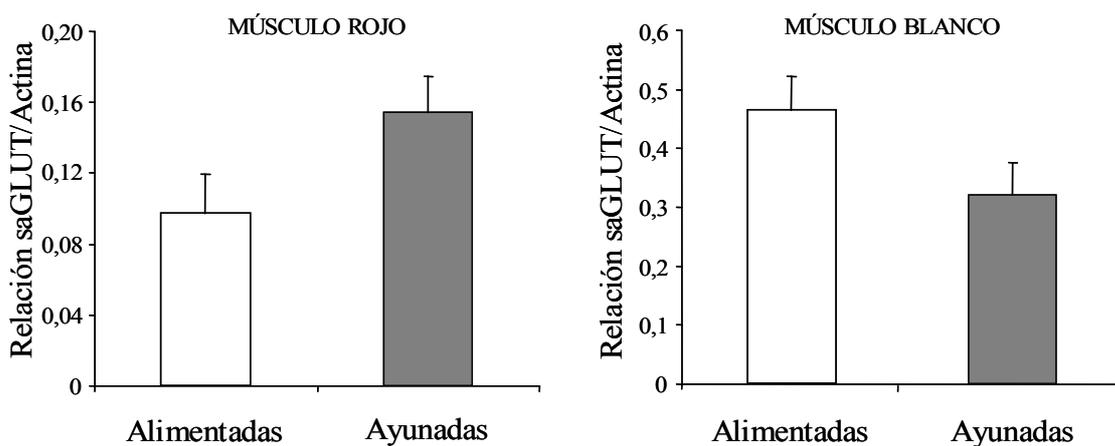
**Tabla 4.4.1.- Características corporales y parámetros en plasma de las doradas en el experimento de ayuno después de 2 semanas.**

	Alimentados	Ayunados
<i>Características corporales</i>		
Peso corporal final (g)	122,8 ± 6,6	116,3 ± 7,5
Hígado (g)	1,48 ± 0,11	0,84 ± 0,12*
Índice Hepatosomático	1,22 ± 0,09	0,72 ± 0,09*
<i>Parámetros en plasma</i>		
Glucosa (mg/dL)	128,1 ± 9,3	113,2 ± 3,1
Insulina (ng/mL)	5,02 ± 1,61	1,23 ± 0,57*

Índice Hepatosomático = 100 x (peso del hígado) / (peso corporal)

<sup>a,b</sup> Medias con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ; prueba T-Student).

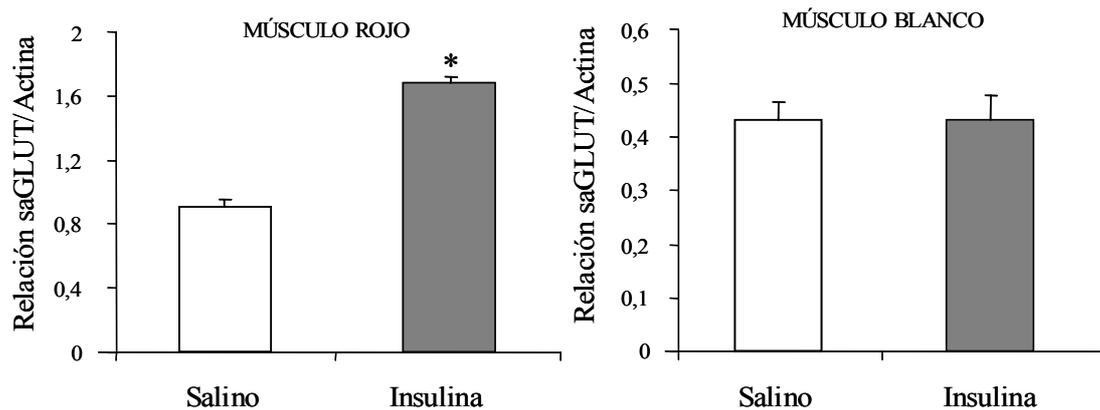
En el músculo esquelético de dorada, el ayuno mostró un efecto diferente sobre el transportador de glucosa (saGLUT) según el tipo de músculo; aunque, la diferencia no fue significativa. En las doradas ayunadas, se observaron incrementos de los niveles de proteína del saGLUT en los músculos rojos. Mientras que en músculo blanco, la cantidad del saGLUT mostró una tendencia a disminuir con el ayuno.



**Figura 4.4.5.-** Efecto del ayuno de 2 semanas sobre los niveles de proteínas del saGLUT en los músculos rojos y blancos de dorada. No se encontraron diferencias significativas entre las doradas alimentadas y ayunadas a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

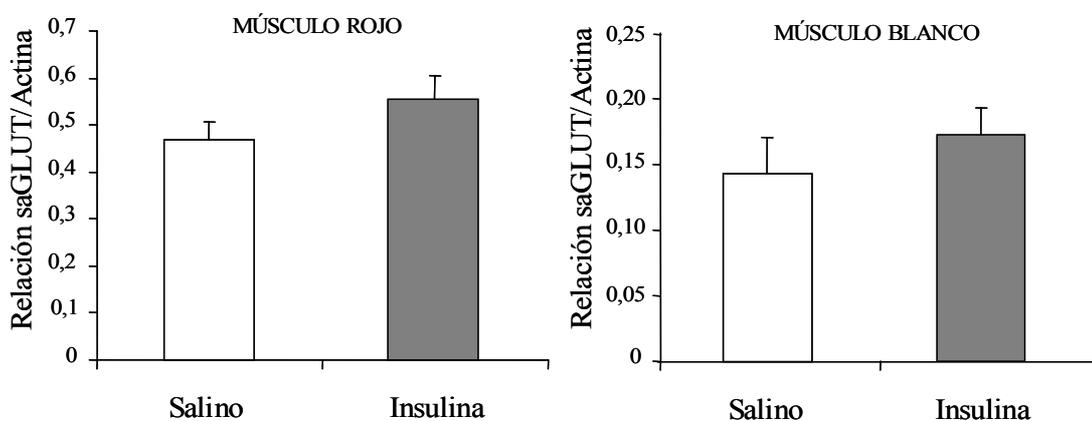
#### 4.4.5.- Efectos de la administración intraperitoneal de insulina sobre el transportador de glucosa (saGLUT) en el músculo esquelético de dorada .

En el músculo rojo de dorada, se observó un incremento del nivel de proteína del saGLUT a las 3 horas de la inyección de insulina. En cambio, en el músculo blanco, el tratamiento de insulina no provocó cambios a nivel de proteína en el transportador de glucosa (saGLUT) a las 3 horas de la inyección (Figura 4.4.6).



**Figura 4.4.6.-** Efectos de la insulina sobre los niveles de proteína del saGLUT en los músculos rojos y blancos de dorada a las 3 horas de la inyección. Asterisco representa diferencia significativa entre grupo salino e insulina a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

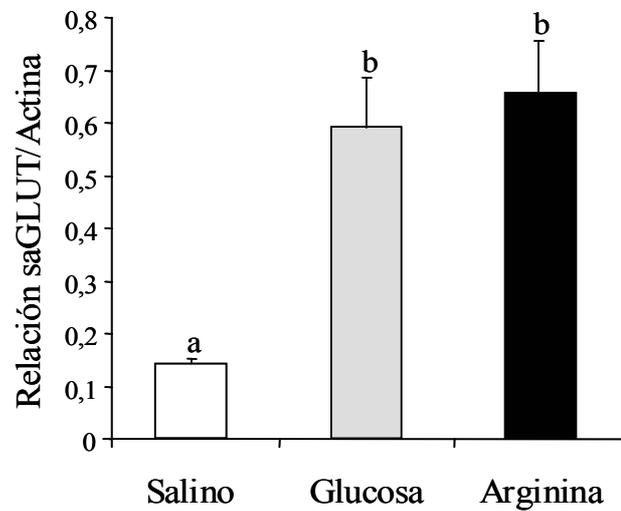
A las 24 horas de una inyección de insulina, los niveles de proteína del saGLUT no presentaron diferencias respecto a los animales tratados con la solución salina ni en músculo rojo ni en músculo blanco de dorada (Figura 4.4.7).



**Figura 4.4.7.-** Efectos de la insulina sobre los niveles de proteína del saGLUT en los músculos rojos y blancos de doradas a las 24 horas de la inyección. No se encontraron diferencias significativas entre las doradas alimentadas y ayunadas a  $p < 0,05$  (prueba T-Student).

#### 4.4.5.- Efectos de la administración de glucosa y arginina sobre el transportador de glucosa en el músculo blanco de dorada (saGLUT).

Los análisis de proteína de saGLUT a partir de muestras de los músculos blancos de las doradas alimentadas con la dieta D0 del experimento de inyección de glucosa y arginina (bloque experimental III), mostraron que la glucosa y la arginina incrementaron significativamente los niveles de proteínas de saGLUT a las 3 horas de las inyecciones (Figura 4.4.8). Tanto en los animales tratados con glucosa como arginina, los niveles de saGLUT fueron 4 veces superiores a los observados en los animales controles (salino).



**Figura 4.4.8.-** Efectos de la glucosa y arginina sobre los niveles de proteínas del saGLUT en los músculos blancos de doradas alimentadas con la dieta D0 a las 3 horas del inyecciones. <sup>a,b</sup> Valores promedios con letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos experimentales  $p < 0,05$  (prueba HSD Tukey, ANOVA).

#### 4.4.6.- Discusión.

En el presente trabajo, se ha clonado en dorada un fragmento de nucleótidos que al ser introducido y traducido en aminoácidos dentro de las bases públicas (BLAST), presentó una homología elevada con los fragmentos de proteínas de la familia de transportadores de glucosa de difusión facilitada (GLUTs). El alineamiento y los análisis de las secuencias de GLUTs clonados en peces, nos evidencian el alto grado de conservación estructural de los diferentes GLUTs caracterizados en peces. La secuencia de aminoácidos obtenida del saGLUT fue idéntica a la del fragmento correspondiente de la proteína del transportador de glucosa del tejido adiposo (okGLUT4), clonada en *Oncorhynchus kisutch* (GenBank: AF502957). El saGLUT tuvo una homología del 96 % respecto al transportador (btGLUT4), clonada del músculo esquelético de *Salmo trutta* (GenBank: AF247395); y una homología del 89 % con el fragmento del transportador de glucosa tipo 4 (gmGLUT), clonado de *Gadus morhua* (GenBank: DQ109810). La fracción clonada del transportador de glucosa saGLUT presentó 6 dominios transmembrana de forma similar a los dominios transmembrana encontrados en el btGLUT4 por Planas y colaboradores (2000). Asimismo, en el saGLUT entre los dominios transmembrana I y II se encontró un residuo asparagina (lugar de glicosilación) en la misma posición que en los descritos en el btGLUT4 y algunos GLUTs de mamíferos y aves (Planas et al., 2000a). Además, en el dominio de VI del saGLUT se encontraron los residuos prolinas que aparentemente tendrían un papel importante en la actividad del transporte de glucosa, y que sería una región muy conservada en los diferentes GLUTs a excepción del GLUT2 (Planas et al., 2000a; Wellner et al., 1995).

El análisis de la expresión tisular del ARNm de saGLUT mediante RT-PCR, nos indica que esta proteína se expresa en todos los tejidos analizados, pero con una expresión del saGLUT superior en el músculo rojo, músculo blanco y otros tejidos como cerebro, gonada y ojo. En *Salmo trutta*, la expresión tisular del btGLUT4 predomina en el músculo esquelético, branquias y riñones (Planas et al., 2000a). Mientras en dorada la expresión del saGLUT fue similar en más tejidos, excepto en el tejido adiposo, estómago y bazo donde la expresión fue baja. Teniendo en cuenta que el músculo esquelético representa una zona de elevada captación de glucosa en *Salmo*

*trutta* (Blasco et al., 1996), y la predominancia de la expresión del btGLUT4 en el músculo rojo y blanco, los patrones de expresión tisular del saGLUT podrían estar asociados a las zonas de captación de glucosa tal y como se ha sugerido en *Salmo trutta* (Planas et al., 2000a). Los resultados de expresión tisular del saGLUT en dorada, nos indicarían una mayor capacidad de captación glucosa por parte del conjunto de tejidos en esta especie con respecto a *Salmo trutta*.

En la comparación de la secuencia del saGLUT respecto a otros GLUTs en las bases públicas (BLAST), los resultados indican una gran homología del saGLUT con los transportadores de glucosa GLUT4 de diferentes mamíferos. En peces, los estudios filogenéticos de GLUTs, señalan la homología elevada del btGLUT4 y el okGLUT4 con diferentes isoformas de GLUT4s de mamíferos (Planas et al., 2000a; Capilla et al., 2004). En mamíferos, el GLUT4 es una proteína que se expresa principalmente en músculo y tejido adiposo, regulado por insulina y señales metabólicas (Ikemoto et al., 1995; Kahn, 1996). En peces, los resultados obtenidos con el btGLUT4 y okGLUT4 también evidencian la regulación sobre estos transportadores por parte de la insulina y el estado fisiológico de los animales (Capilla et al., 2004a; Capilla et al., 2002).

Para evaluar los efectos sobre los niveles de proteína del saGLUT en diferentes estados metabólicos, se validó el western blot del saGLUT. Se detectó una proteína de 50 kDa aproximadamente utilizando el anticuerpo dirigido contra el btGLUT4. Este peso molecular es similar al de los detectados para los otros GLUT4s de peces (Capilla et al., 2004a). Estos resultados, junto con la buena correlación observada entre la cantidad de proteína y la concentración de anticuerpo, demuestran la validez del anticuerpo anti-btGLUT4 para la detección de los niveles de proteína de saGLUT.

En la presente investigación, el ayuno no provocó cambios significativos en los niveles de proteínas del saGLUT, ni en el músculo rojo ni en el músculo blanco, a pesar de la disminución en los niveles de insulina plasmática de las doradas ayunadas. En mamíferos existen diversos estudios que señalan que la expresión del GLUT4 en el músculo esquelético es regulada de forma distinta en función de la fibra muscular, ya que en músculos con predominio de fibras rojas ó oxidativas expresan el GLUT4 en mayor medida que en músculos con fibras blancas o anaeróbicas (Camps et al., 1992; Stephens y Pilch, 1995). En ratas, el ayuno provoca la disminución de los niveles de

proteína del GLUT4 en el músculo oxidativo, originada por la disminución de la síntesis de la proteína o el incremento de la tasa de degradación del GLUT4, ya que no se han observado efectos del ayuno sobre la expresión del ARNm de GLUT4; mientras que en el músculo anaeróbico, el ayuno no producen cambios en el nivel de proteína del GLUT4, a pesar de provocar un aumento en la expresión del ARNm de GLUT4 (Camps et al., 1992). A diferencia de lo observado en mamíferos, el ayuno provocó una disminución significativa del ARNm de btGLUT4 en el músculo rojo de la trucha común; mientras en el músculo blanco no se produjeron cambios en los niveles de expresión del btGLUT (Capilla et al., 2004a). Estas diferencias entre mamíferos y peces en la regulación del GLUT4 especialmente en el músculo rojo podrían ser causadas por las diferencias en la distribución de las fibras musculares de ambos grupos de vertebrados. En peces, las fibras del músculo rojo y blanco están mucho más segregadas que en mamíferos. Estos 2 tipos de fibras musculares difieren funcionalmente en peces, así el músculo rojo es aeróbico y permite el mantenimiento de la locomoción, y en cambio, el músculo blanco es anaeróbico y permite los movimientos rápidos y bruscos (Bone, 1978). Además, la notable disminución de la tasa metabólica que se observa en peces durante el ayuno (Navarro et al., 1992) podría influir en la regulación del saGLUT en músculo esquelético.

En *Salmo trutta*, los resultados sobre la regulación del btGLUT4 sugieren que la insulina podría estimular la expresión del btGLUT4 en el músculo esquelético rojo. Mientras en músculo blanco, la expresión del btGLUT4 no parece estar regulada por la insulina (Capilla et al., 2002). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en esta tesis, donde los resultados de la administración de insulina también parecen indicar que a nivel de proteína, el saGLUT podría estar estimulado por la insulina en el músculo rojo, mientras en músculo blanco, la insulina no tendría ningún efecto sobre el saGLUT. Sin embargo, en este estudio se ha observado que los niveles de proteína de saGLUT en el músculo blanco aumentan significativamente con tratamientos de glucosa y de arginina que provocan una respuesta endógena de insulina y otros factores, que en su conjunto son incluso más efectivos que un tratamiento directo con insulina sobre la regulación del transportador de glucosa, aunque no se ha comprobado en este trabajo. Posiblemente dichos tratamientos también generan un incremento de la expresión del ARNm del saGLUT similar al descrito para el btGLUT en el músculo rojo por Capilla y colaboradores (2002).

En resumen, en el presente bloque experimental, se ha comprobado la existencia de un transportador de glucosa GLUT4 en dorada similar al descrito en otros peces, al que se ha denominado saGLUT. Los experimentos *in vivo* han demostrado que en el músculo rojo de dorada, la insulina aumenta los niveles de proteína del saGLUT. Mientras que en el músculo blanco, no se ha podido observar ningún efecto directo de la insulina exógena sobre el saGLUT. No obstante, la respuesta del saGLUT en el músculo blanco al tratamiento con glucosa y arginina sugiere la existencia de mecanismos de regulación de dicho transportador probablemente a través de la insulina endógena y otros factores que necesitan de mayor estudio.



---

## **5.- CONCLUSIONES**

---



- 1) Tanto en trucha arco iris como en dorada, la alimentación con dietas basadas en los perfiles de aminoácidos esenciales del músculo determinaron parámetros de crecimiento de los animales muy próximos a peces que fueron alimentados con dietas diseñadas a partir del perfil de aminoácidos esenciales de la composición corporal.
- 2) Independientemente de los perfiles de aminoácidos esenciales de las dietas (corporal o músculo), la variación del balance entre aminoácidos esenciales y no esenciales en la dieta (por el incremento del ácido glutámico), no afectó al crecimiento ni en trucha arco iris ni en dorada.
- 3) En ambas especies, los niveles plasmáticos postprandiales de glucosa e insulina no presentaron variaciones en función del perfil de aminoácidos esenciales de la dieta. Sin embargo, las dietas suplementadas con el ácido glutámico tuvieron en ambas especies un efecto estimulador menor en la secreción postprandial de la insulina, y que no alteraron los distintos parámetros de caracterización de los receptores de insulina en el músculo blanco.
- 4) Los niveles de glucagón son más elevados en dorada que en trucha arco iris. La respuesta postprandial del glucagón a las dietas con diferentes perfiles y contenido de aminoácidos es distinta entre ambas especies. En trucha arco iris, la dieta con el perfil de aminoácidos esencial corporal posee un efecto secretor mayor sobre el glucagón postprandial que las dietas del perfil del músculo. Mientras en dorada, el perfil de aminoácidos esenciales de la dieta produce cambios menores en la secreción del glucagón a las 6 horas del postprandial y con un perfil inverso al de la trucha.
- 5) En trucha arco iris, la similitud en los parámetros de crecimiento obtenidos con la dieta control y las de sustitución nos indican que en nuestras condiciones de cultivo, se puede realizar un nivel de sustitución entre 50 y el 75 %. En la dorada, en nuestras condiciones de cultivo (experimentales), los parámetros de crecimiento sugieren una adaptación menor que la trucha a la sustitución de proteína animal por proteína vegetal.

- 6) En ambas especies, la sustitución de proteína animal por proteína vegetal en la dieta, no produce alteraciones en la respuesta postprandial del glucagón, insulina y glucosa, ni afectan en trucha arco iris a la expresión del ARNm del transportador de glucosa GLUT4.
- 7) En dorada, independientemente de la dieta suministrada, el tratamiento intraperitoneal con arginina estimuló la secreción de glucagón en mayor medida que la insulina, con un efecto final hiperglucémico, sin afectar los niveles circulantes de IGF-I. La dosis administrada de glucosa no alteró los niveles plasmáticos de dichas hormonas.
- 8) En dorada, se ha obtenido un fragmento de ADN de 636 pb, que ha demostrado la existencia de un transportador de glucosa GLUT4 similar al descrito en otros peces, al que se ha denominado como saGLUT, y que se expresa en diversos tejidos principalmente en el músculo esquelético.
- 9) En el músculo rojo de dorada se ha demostrado que la insulina aumenta los niveles de proteína del saGLUT. Mientras que en el músculo blanco, no se ha podido observar directamente ningún efecto de la insulina sobre el saGLUT. No obstante, la respuesta del saGLUT en el músculo blanco al tratamiento con glucosa y arginina sugiere la existencia de mecanismos de regulación de dicho transportador que necesitan de mayor estudio.

---

## **6.- BIBLIOGRAFIA**

---



**Ablett, R. F., Taylor, M. J., Selivonchick, D. P.** (1983). The Effect of High-Protein and High-Carbohydrate Diets on Iodoinsulin-I-125 Binding in Skeletal-Muscle Plasma-Membranes and Isolated Hepatocytes of Rainbow-Trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition* 50, 129-139.

**Albalat, A., Gómez-Requeni, P., Rojas, P., Medale, F., Kaushik, S., Vianen, G. J., Van den Thillart, G., Gutiérrez, J., Pérez-Sánchez, J., Navarro, I.** (2005). Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 289, R259-R265.

**Arias, A.M.** (1980). Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata*) y del robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Inv. Pesq.*, 44 (1), 59-83.

**Bach, L., and Rechler, M.** (1995). Insulin-like growth factor binding proteins. *Diabetes Rev* 3, 38-61.

**Balm, P. H. M., and Pottinger, T. G.** (1995). Corticotrope and Melanotrope Pomc-Derived Peptides in Relation to Interrenal Function during Stress in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 98, 279-288.

**Baños, N., Baro, J., Castejon, C., Navarro, I., Gutiérrez, J.** (1998). Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regul Pept* 77, 55-62.

**Baños, N., Moon, T. W., Castejon, C., Gutiérrez, J., Navarro, I.** (1997). Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding in fish red muscle: regulation by high insulin levels. *Regul Pept* 68, 181-187.

**Baños, N., Planas, J. V., Gutiérrez, J., Navarro, I.** (1999). Regulation of plasma insulin-like growth factor-I levels in brown trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 124, 33-40.

**Barton, B. A., Ribas, L., Acerete, L., Tort, L.** (2005). Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research* 36, 172-179.

**Baumann, C., and Saltiel, A.** (2001). Spatial compartmentalization of signal transduction in insulin action. *BioEssays* 23, 215-222.

**Baxter, R.** (1993). Circulating binding proteins for the insulin-like growth factors. *Trends Endocrinol Metab* 4, 91-96.

**Baxter, R., and Martin, J.** (1989). Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function. *Prog Growth Factor Res* 1, 49-68.

**Blasco, J., FernandezBorras, J., Marimon, I., y Requena, A.** (1996). Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: Effect of an intravascular glucose load. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 165, 534-541.

**Blasco, J., Marimon, I., Viaplana, I., y Fernandez-Borras, J.** (2001). Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 247-258.

**Blundell, T. L., and Humbel, R. E.** (1980). Hormone Families - Pancreatic Hormones and Homologous Growth-Factors. *Nature* 287, 781-787.

**Bone, Q.** (1978). Locomotor muscle, In *Fish Physiology*, W. Hoar, y D. Randall, eds. (New York: Academic), pp. 361-424.

**Bornfeldt, K., Gidlof, R., Wasteson, A., Lake, M., Skottner, A., Arnqvist, H.** (1991). Binding and biological effects of insulin, insulin analogues and insulin-like growth factors in rat aortic smooth muscle cells. Comparison of maximal growth promoting activities. *Diabetologia* 34, 307.

**Buentello, J. A., and Gatlin, D. M.** (2001). Effects of elevated dietary arginine on resistance of channel catfish to exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 194-201.

**Butler, A., Yakar, S., Gewolb, I., Karas, M., Okubo, Y., LeRoith, D.** (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol A* 121B, 19-26.

**Camps, M., Castelló, A., Muñoz, P., Monfar, M., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A.** (1992). Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem J* 282, 765-772.

**Capilla, E., Diaz, M., Albalat, A., Navarro, I., Pessin, J. E., Keller, K., Planas, J. V.** (2004a). Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

**Capilla, E., Diaz, M., Gutiérrez, J., Planas, J. V.** (2002). Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E44-49.

**Capilla, E., Medale, F., Navarro, I., Panserat, S., Vachot, C., Kaushik, S., Gutiérrez, J.** (2003). Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul Pept* 110, 123-132.

**Capilla, E., Medale, F., Panserat, S., Vachot, C., Rema, P., Gomes, E., Kaushik, S., Navarro, I., Gutiérrez, J.** (2004b). Response of hexokinase enzymes and the insulin system to dietary carbohydrates in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Reproduction Nutrition Development* 44, 233-242.

**Carneiro, N. M., Navarro, I., Gutiérrez, J., Plisetskaya, E. M.** (1993). Hepatic Extraction of Circulating Insulin and Glucagon in Brown Trout (*Salmo trutta fario*) after Glucose and Arginine Injection. *Journal of Experimental Zoology* 267, 416-422.

**Castillo, J., Codina, M., Martínez, M. L., Navarro, I., Gutiérrez, J.** (2004). Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R935-941.

**Castillo, J., Le Bail, P. Y., Paboeuf, G., Navarro, I., Weil, C., Fauconneau, B., Gutiérrez, J.** (2002). IGF-I binding in primary culture of muscle cells of rainbow trout: changes during in vitro development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R647-652.

**Clarke, E., and Wiseman, J.** (2000). Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans I. Protein and amino acid content. *J Agric Sci* 134, 111-124.

**Cohick, W. S., and Clemmons, D. R.** (1993). The Insulin-Like Growth-Factors. *Annual Review of Physiology* 55, 131-153.

**Colloca, F. and Cerasi, S.** (2005). Cultured Aquatic Species Information Programme - *Sparus aurata*. FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). FAO - FIGIS.

**Company, R., Calduch-Giner, J., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J.** (1999). Growth performance and adiposity in gilthead seabream (*Sparus aurata*): risks and benefits of the high energy diets. *Aquaculture* 171, 279-292.

**Conlon, J. M.** (2001). Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides* 22, 1183-1193.

**Conlon, J. M., and Thim, L.** (1986). Primary Structure of Insulin and a Truncated C-Peptide from an Elasmobranchian Fish, *Torpedo-Marmorata*. *General and Comparative Endocrinology* 64, 199-205.

**Cowey, C., Knox, D., Walton, M., Adron, J.** (1977). The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr* 38, 463.

**Cowx, I. G.,** (2005). Cultured Aquatic Species Information Programme - *Oncorhynchus mykiss*. FAO Inland Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). FAO - FIGIS.

**Czech, M. P.** (1989). Signal Transmission by the Insulin-Like Growth-Factors. *Cell* 59, 235-238.

**Cheng, Z. J., Hardy, R. W., Blair, M.** (2003a). Effects of supplementing methionine hydroxy analogue in soybean meal and distiller's dried grain-based diets on the performance and nutrient retention of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. *Aquaculture Research* 34, 1303-1310.

**Cheng, Z. J., Hardy, R. W., Usry, J. L.** (2003b). Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture* 215, 255-265.

**Daughaday, W. H., Kapadia, M., Yanow, C. E., Fabrick, K., Mariz, I. K.** (1985). Insulin-like growth factors I and II of nonmammalian sera. *Gen Comp Endocrinol* 59, 316-325.

**de Celis, S. V. R., Rojas, P., Gomez-Requeni, P., Albalat, A., Gutiérrez, J., Medale, F., Kaushik, S. J., Navarro, I., Pérez-Sánchez, J.** (2004). Nutritional assessment of somatolactin function in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): concurrent changes in somatotrophic axis and pancreatic hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 138, 533-542.

**Drakenberg, K., Sara, V. R., Falkmer, S., Gammeltoft, S., Maake, C., y Reinecke, M.** (1993). Identification of IGF-I receptors in primitive vertebrates. *Regul Pept* 43, 73-81.

**Duan, C., y Hirano, T.** (1992). Effects of Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin on the In vitro Uptake of Sulfate by Eel Branchial Cartilage - Evidence for the Presence of Independent Hepatic and Pancreatic Sulfation Factors. *Journal of Endocrinology* 133, 211-219.

**Duan, C., and Plisetskaya, E. M.** (1993). Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissues. *J Endocrinol* 139, 243-252.

**Duan, C. M., and Xu, Q. J.** (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *General and Comparative Endocrinology* 142, 44-52.

**Duclos, M. J., Wilkie, R. S., Goddard, C.** (1991). Stimulation of DNA-Synthesis in Chicken Muscle Satellite Cells by Insulin and Insulin-Like Growth-Factors - Evidence for Exclusive Mediation by a Type-I Insulin-Like Growth-Factor Receptor. *Journal of Endocrinology* 128, 35-&.

**Duncan, N. J., Auchinachie, N., Robertson, D., Murray, R., Bromage, N.** (1998). Growth, maturation and survival of out-of-season 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 168, 325-339.

**Ehrman, M. A., Melroe, G. T., Kittilson, J. D., Sheridan, M. A.** (2005). Regulation of pancreatic somatostatin gene expression by insulin and glucagon. *Molecular and Cellular Endocrinology* 235, 31-37.

**Epple, A., and Brinn, J.** (1987). *The comparative Physiology of the Pancreatic Islets.* (Berlin: Springer-Verlag).

**FAO** (2002). *Estado de la Pesca Mundial y la Acuicultura 2002* (ROMA: FAO).

**FAO** (2004). *Estado de la Pesca Mundial y la Acuicultura 2004* (ROMA: FAO).

**Ferry, R. J., Cerri, R. W., Cohen, P.** (1999). Insulin-like growth factor binding proteins: New proteins, new functions. *Hormone Research* 51, 53-67.

**Figueiredo-Garutti, M. L., Navarro, I., Capilla, E., Souza, R. H., Moraes, G., Gutiérrez, J., Vicentini-Paulino, M. L.** (2002). Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132, 467-476.

**Foster, G., and Moon, T.** (1989). Insulin and the regulation of glycogen metabolism and gluconeogenesis in American eel hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 73, 374.

**Foster, G., and Moon, T.** (1990). The role of glycogen phosphorylase in the regulation of glycogenolysis by insulin and glucagon in isolated eel (*Anguilla rostrata*) hepatocytes. *Fish Physiol Biochem* 8, 299.

**Francis, G., Makkar, H., Becker, K.** (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.

**Furuichi, M., and Yone, Y.** (1981). The Utilization of Carbohydrate by Fishes .3. Change of Blood-Sugar and Plasma-Insulin Levels of Fishes in Glucose-Tolerance Test. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47, 761-764.

**Gabillard, J. C., Weil, C., Rescan, P. Y., Navarro, I., Gutiérrez, J., Le Bail, P. Y.** (2003). Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 133, 233-242.

**Gallagher, A. M., Flatt, P. R., Duffy, G., Abdel-Wahab, Y. H. A.** (2003). The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion. *Nutrition Research* 23, 413-424.

**Geary, N., Lesauter, J., Noh, U.** (1993). Glucagon Acts in the Liver to Control Spontaneous Meal Size in Rats. *American Journal of Physiology* 264, R116-R122.

**Gomes, E., Rema, P., Kaushik, S.** (1995). Replacement of fish meal by plant protein in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); digestibility and growth performance. *Aquaculture* 130, 177-186.

**Gomez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J. A., Medale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., Kaushik, S. J., Pérez-Sánchez, J.** (2003). Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749-767.

**Gray, A. M., and Flatt, P. R.** (1998a). Actions of the traditional anti-diabetic plant, Agrimony eupatoria (agrimony): effects on hyperglycaemia, cellular glucose metabolism and insulin secretion. *British Journal of Nutrition* 80, 109-114.

**Gray, A. M., and Flatt, P. R.** (1998b). Antihyperglycemic actions of *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) are associated with pancreatic and extra-pancreatic effects in mice. *Journal of Nutrition* 128, 2319-2323.

**Gray, A. M., and Flatt, P. R.** (1999a). Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). *British Journal of Nutrition* 81, 203-209.

**Gray, A. M., and Flatt, P. R.** (1999b). Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). *Journal of Endocrinology* 160, 409-414.

**Griffen, S. C., Russell, S. M., Katz, L. S., Nicoll, C. S.** (1987). Insulin Exerts Metabolic and Growth-Promoting Effects by a Direct Action on the Liver In vivo - Clarification of the Functional-Significance of the Portal Vascular Link between the Beta-Cells of the Pancreatic-Islets and the Liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 7300-7304.

**Gutiérrez, J., Asgard, T., Fabbri, E., Plisetskaya, E. M.** (1989). Insulin-Receptors in Skeletal-Muscles of Trout Fed Carbohydrate-Enriched Diet. *American Zoologist* *29*, A19-A19.

**Gutiérrez, J., Asgard, T., Fabbri, E., Plisetskaya, E. M.** (1991). Insulin-Receptor Binding in Skeletal-Muscle of Trout. *Fish Physiology and Biochemistry* *9*, 351-360.

**Gutiérrez, J., Fernandez, J., Blasco, J., Gesse, J. M., Planas, J.** (1986). Plasma-Glucagon Levels in Different Species of Fish. *General and Comparative Endocrinology* *63*, 328-333.

**Gutiérrez, J., Párrizas, M., Carneiro, N., Maestro, J. L., Maestro, M. A., Planas, J.** (1993). Insulin and Igf-I Receptors and Tyrosine Kinase-Activity in Carp Ovaries - Changes with Reproductive-Cycle. *Fish Physiology and Biochemistry* *11*, 247-254.

**Gutiérrez, J., Navarro, I., Planas J.V., Montserrat, N., Rojas, P., Castillo, J., Chystiakova, O., Gabillard, J.C., Smith, A., Chan, S.J., Leibush, N.B.** (2005). Insulin and IGF receptors in fish, In *Fish Endocrinology*. Eds Zaccone, G., Reinecke, M. and B.G. Kapoor (Kapoor: Science publisher, Inc. Enfield).

**Gutiérrez, J., Párrizas, M., Maestro, M. A., Navarro, I., Plisetskaya, E. M.** (1995). Insulin and Igf-I Binding and Tyrosine Kinase-Activity in Fish Heart. *Journal of Endocrinology* *146*, 35-44.

**Gutiérrez, J., and Plisetskaya, E. M.** (1991). Insulin Binding to Liver Plasma-Membranes in Salmonids with Modified Plasma-Insulin Levels. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* *69*, 2745-2750.

**Harmon, J. S., Eilertson, C. D., Sheridan, M. A., Plisetskaya, E. M.** (1991). Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose-injected rainbow trout. *Am J Physiol* *261*, R609-613.

**Hazelwood, R.** (1993). Pancreatic hormones and metabolism, In *The Endocrinology of Growth, development, and metabolism in vertebrates*, S. C. a. P. P. J. Scheibman MP, ed. (San Diego: Academic Press), pp. 289-325.

**Hediger, M., and Rhoads, D.** (1994). Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev* *74*, 993-1026.

**Hemre, G. I., Lie, O., Lambertsen, G., Sundby, A.** (1990). Dietary Carbohydrate Utilization in Cod (*Gadus-Morhua*) - Hormonal Response of Insulin, Glucagon and Glucagon-Like-Peptide to Diet and Starvation. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* *97*, 41-44.

**Hemre, G. I., Mommsen, T. P., Krogdahl, A.** (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* 8, 175-194.

**Holloway, A. C., Keene, J. L., Noakes, D. G., Moccia, R. D.** (2004). Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquaculture Research* 35, 1025-1030.

**Humbel, R. E.** (1990). Insulin-Like Growth Factor-I and Factor-II. *European Journal of Biochemistry* 190, 445-462.

**Hurson, M., Regan, M. C., Kirk, S. J., Wasserkrug, H. L., Barbul, A.** (1995). Metabolic Effects of Arginine in a Healthy Elderly Population. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 19, 227-230.

**Ikemoto, S., Thompson, K. S., Itakura, H., Lane, M. D., Ezaki, O.** (1995). Expression of an Insulin-Responsive Glucose-Transporter (Glut4) Minigene in Transgenic Mice - Effect of Exercise and Role in Glucose-Homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 865-869.

**Ince, B. W.** (1979). Insulin-Secretion from the Insitu Perfused Pancreas of the European Silver Eel, *Anguilla anguilla* L. *General and Comparative Endocrinology* 37, 533-540.

**Ince, B. W., and So, S. T. C.** (1984). Differential Secretion of Glucagon-Like and Somatostatin-Like Immunoreactivity from the Perfused Eel Pancreas in Response to D-Glucose. *General and Comparative Endocrinology* 53, 389-397.

**Ince, B. W., and Thorpe, A.** (1974). Effects of Insulin and of Metabolite Loading on Blood Metabolites in European Silver Eel, (*Anguilla anguilla* L). *General and Comparative Endocrinology* 23, 460-471.

**Ince, B. W., and Thorpe, A.** (1977). Glucose and Amino Acid-Stimulated Insulin Release In vivo in European Silver Eel (*Anguilla anguilla* L). *General and Comparative Endocrinology* 31, 249-256.

**Inui, Y., and Ishioka, H.** (1983). Effects of insulin and glucagon on the incorporation of <sup>14</sup>C -Glycine into the protein of the liver and opercular muscle of the eel in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 51, 208-212.

**Inui, Y., and Yokote, M.** (1977). Effects of Glucagon on Amino-Acid Metabolism in Japanese Eels, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology* 33, 167-173.

**James, D. E.** (1995). The Mammalian Facilitative Glucose-Transporter Family. *News in Physiological Sciences* 10, 67-71.

**Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D. P.** (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154, 1-15.

- Jones, J. I., and Clemmons, D. R.** (1995). Insulin-Like Growth-Factors and Their Binding-Proteins - Biological Actions. *Endocrine Reviews* 16, 3-34.
- Jurss, K., and Bastrop, R.** (1995). The Function of Mitochondria-Rich Cells (Chloride Cells) in Teleost Gills. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5, 235-255.
- Kagawa, H., Kobayashi, M., Hasegawa, Y., Aida, K.** (1994). Insulin and Insulin-Like Growth-Factor-I and Growth-Factor-Ii Induce Final Maturation of Oocytes of Red Seabream, *Pagrus-Major*, in-Vitro. *General and Comparative Endocrinology* 95, 293-300.
- Kahn, B. B.** (1996). Glucose transport: Pivotal step in insulin action. *Diabetes* 45, 1644-1654.
- Kaushik, S., Cravedi, J., Lalles, J., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M.** (1995). Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257-274.
- Kelley, K., Siharath, K., Bern, H.** (1992). Identification of insulin-like growth factor-binding proteins in the circulation of four teleost fish species. *J Exp Zool* 263, 220-224.
- Kelley, K. M., Schmidt, K. E., Berg, L., Sak, K., Galima, M. M., Gillespie, C., Balogh, L., Hawayek, A., Reyes, J. A., Jamison, M.** (2002). Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *J Endocrinol* 175, 3-18.
- Khan, A. H., and Pessin, J. E.** (2002). Insulin regulation of glucose uptake: A complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45, 1475-1483.
- Kim, K. H.** (1997). Re-evaluation of protein and amino acid requirements of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 151, 3-7.
- Kissil, G. W., Lupatsch, I., Higgs, D. A., Hardy, R. W.** (2000). Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture Research* 31, 595-601.
- Krasnov, A., Teerijoki, H., Molsa, H.** (2001). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1520, 174-178.
- Krogdahl, A., Hemre, G. I., Mommsen, T. P.** (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition* 11, 103-122.
- Lappova, Y. L., and Leibush, B. N.** (1995). Receptor-mediated endocytosis of insulin in lower vertebrates: internalization and intracellular processing of 125I-insulin in isolated hepatocytes of lamprey and frog. *Gen Comp Endocrinol* 100, 1-9.
- Larsen, D. A., Beckman, B. R., Dickhoff, W. W.** (2001). The effect of low temperature and fasting during the winter on metabolic stores and endocrine physiology (Insulin, insulin-like growth factor-I and thyroxine) of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 123, 308-323.

**Le Roith, D., Párrizas, M., Blakesley, V. A.** (1997). The insulin-like growth factor-I receptor and apoptosis. Implications for the aging progress. *Endocrine* 7, 103-105.

**Legate, N. J., Bonen, A., Moon, T. W.** (2001). Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *Gen Comp Endocrinol* 122, 48-59.

**Leong, S., Baxter, R., Camerato, T., Dai, J., Wood, W.** (1992). Structure and functional expression of the acid-labile subunit of hte insulin-like growth factor-binding protein complex. *Mol Endocrinol* 6, 870-876.

**Lloyd, C. E., Kalinyak, J. E., Hutson, S. M., Jefferson, L. S.** (1987). Stimulation of Albumin Gene-Transcription by Insulin in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *American Journal of Physiology* 252, C205-C214.

**Madsen, S., and Bern, H.** (1993). In-vitro effects of insulin-like growth factor-I on gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *J Endocrinol* 138, 23-30.

**Maestro, M. A., Méndez, E., Párrizas, M., Gutiérrez, J.** (1997). Characterization of insulin and insulin-like growth factor-I ovarian receptors during the reproductive cycle of carp (*Cyprinus carpio*). *Biol Reprod* 56, 1126-1132.

**Mambrini, M., Medale, F., Sanchez, M. P., Recalde, B., Chevassus, B., Labbe, L., Quillet, E., Boujard, T.** (2004). Selection for growth in brown trout increases feed intake capacity without affecting maintenance and growth requirements. *Journal of Animal Science* 82, 2865-2875.

**Marcouli, P. A., Alexis, M. N., Andriopoulou, A., Iliopoulou-Georgudaki, J.** (2004). Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture Nutrition* 10, 335-343.

**MartiPalanca, H., MartinezBarbera, J. P., Pendon, C., Valdivia, M. M., PerezSanchez, J., Kaushik, S.** (1996). Growth hormone as a function of age and dietary protein: Energy ratio in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Growth Regulation* 6, 253-259.

**Matty, A., and Lone, K. P.** (1985). The hormonal control metabolism and feeding, In *Fish Energetics (New Perspectives)*, pp. 185-209.

**Mazur, C. N., Higgs, D. A., Plisetskaya, E., March, B. E.** (1992). Utilization of Dietary Starch and Glucose-Tolerance in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of Different Strains in Seawater. *Fish Physiology and Biochemistry* 10, 303-313.

**McCormick, S.** (1996). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Interaction with cortisol. *Gen Comp Endocrinol* 86, 398-406.

**Medale, F., Boujard, T., Vallee, F., Blanc, D., Mambrini, M., Roem, A., Kaushik, S. J.** (1998). Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquatic Living Resources* 11, 239-246.

**Méndez, E., Smith, A., Figueiredo-Garutti, M. L., Planas, J. V., Navarro, I., Gutiérrez, J.** (2001). Receptors for insulin-like growth factor-I (IGF-I) predominate over insulin receptors in skeletal muscle throughout the life cycle of brown trout, *Salmo trutta*. *Gen Comp Endocrinol* 122, 148-157.

**Miller, D. S.** (1989). Stimulation of Protein-Synthesis in Stage-Iv *Xenopus* Oocytes by Microinjected Insulin. *Journal of Biological Chemistry* 264, 10438-10446.

**Mingarro, M., de Celis, S. V. R., Astola, A., Pendon, C., Valdivia, M. M., Pérez-Sánchez, J.** (2002). Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *General and Comparative Endocrinology* 128, 102-111.

**Mommsen, T. P.** (2001). Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 129, 207-219.

**Mommsen, T. P., Danulat, E., Walsh, P. J.** (1992). Metabolic Actions of Glucagon and Dexamethasone in Liver of the Ureogenic Teleost *Opsanus beta*. *General and Comparative Endocrinology* 85, 316-326.

**Mommsen, T. P., and Moon, T. W.** (1989). Metabolic Actions of Glucagon-Family Hormones in Liver. *Fish Physiology and Biochemistry* 7, 279-288.

**Mommsen, T. P., Moon, T. W., Plisetskaya, E. M.** (2001a). Effects of arginine on pancreatic hormones and hepatic metabolism in rainbow trout. *Physiol Biochem Zool* 74, 668-678.

**Mommsen, T. P., and Plisetskaya, E. M.** (1991). Insulin in Fishes and Agnathans - History, Structure, and Metabolic-Regulation. *Reviews in Aquatic Sciences* 4, 225-259.

**Mommsen, T. P., Silverstein, J. T., Plisetskaya, E. M., Whittaker, L. J., Whittaker, J., Conlon, J. M.** (2001b). Two insulins from channel catfish: purification, structures, receptor-binding and cDNA sequences. *Fish Physiology and Biochemistry* 25, 61-70.

**Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., Moon, T. W.** (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.

**Monget, P., Besnard, N., Huet, C., Pisselet, C., Monniaux, D.** (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Hormone Research* 45, 211-217.

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

**Moon, T. W.** (2004). Hormones and fish hepatocyte metabolism: "the good, the bad and the ugly!" *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 139, 335-345.

**Moon, T. W., Castejon, C., Baños, N., Maestro, M. A., Plisetskaya, E. M., Gutiérrez, J., Navarro, I.** (1996). Insulin and IGF-I binding in isolated trout cardiomyocytes. *Gen Comp Endocrinol* 103, 264-272.

**Morley, J. E.** (2001). Decreased food intake with aging. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* 56, 81-88.

**Muggeo, M., Ginsberg, B. H., Roth, J., Neville, D. M., Jr., De Meyts, P., Kahn, C. R.** (1979a). The insulin receptor in vertebrates is functionally more conserved during evolution than insulin itself. *Endocrinology* 104, 1393-1402.

**Muggeo, M., Van Obberghen, E., Kahn, C. R., Roth, J., Ginsberg, B. H., De Meyts, B. H., Emdin, S. O., Falkmer, S.** (1979b). The insulin receptor and insulin of the Atlantic hagfish. Extraordinary conservation of binding specificity and negative cooperativity in the most primitive vertebrate. *Diabetes* 28, 175-181.

**Navarro, I., Carneiro, M. N., Párrizas, M., Maestro, J. L., Planas, J., Gutiérrez, J.** (1993). Post-Feeding Levels of Insulin and Glucagon in Trout (*Salmo trutta fario*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 104, 389-393.

**Navarro, I., and Gutiérrez, J.** (1995). Fasting and starvation, In *Metabolic biochemistry*, H. PW, and M. TP, eds. (Amsterdam: Elsevier Science B.V.), pp. 393-434.

**Navarro, I., Gutiérrez, J., Caixach, J., Rivera, J., Planas, J.** (1991). Isolation and primary structure of glucagon from the endocrine pancreas of *Thunnus obesus*. *Gen Comp Endocrinol* 83, 227-232.

**Navarro, I., Gutiérrez, J., Planas, J.** (1992). Changes in Plasma-Glucagon, Insulin and Tissue Metabolites Associated with Prolonged Fasting in Brown Trout (*Salmo trutta fario*) During 2 Different Seasons of the Year. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 102, 401-407.

**Navarro, I., Leibush, B., Moon, T. W., Plisetskaya, E. M., Baños, N., Méndez, E., Planas, J. V., Gutiérrez, J.** (1999). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 122, 137-153.

**Navarro, I., and Moon, T. W.** (1994). Glucagon binding to hepatocytes isolated from two teleost fishes, the American eel and the brown bullhead. *J Endocrinol* 140, 217-227.

**Navarro, I., Rojas, P., Capilla, E., Albalat, A., Castillo, J., Montserrat, N., Codina, M., Gutiérrez, J.** (2002). Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 205-216.

**Negatu, Z., and Meier, A. H.** (1995). In-Vitro Incorporation of [C-14] Glycine into Muscle Protein of Gulf Killifish (*Fundulus grandis*) in Response to Insulin-Like Growth-Factor-I. *General and Comparative Endocrinology* 98, 193-201.

**Neufer, P. D., Carey, J. O., Dohm, G. L.** (1993). Transcriptional Regulation of the Gene for Glucose-Transporter Glut4 in Skeletal-Muscle - Effects of Diabetes and Fasting. *Journal of Biological Chemistry* 268, 13824-13829.

**Niu, P., and LeBail, P.** (1993). Presence of insulin -like growth factor binding protein (IGF-BP) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum. *J Exp Zool* 265, 627.

**Novoa, M. D., Capilla, E., Rojas, P., Baro, J., Gutiérrez, J., Navarro, I.** (2004). Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 139, 48-54.

**NRC** (1993). Nutrient requirements of fish (Washington, D.C.: National Academy Press.).

**Olson, A. L., Knight, J. B., Pessin, J. E.** (1997). Syntaxin 4, VAMP2, and/or VAMP3/cellubrevin are functional target membrane and vesicle SNAP receptors for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Molecular and Cellular Biology* 17, 2425-2435.

**Ottolenghi, C., Puviani, A. C., Ricci, D., Brighenti, L., Morsiani, E.** (1995). The Effect of High-Temperature on Blood-Glucose Level in 2 Teleost Fish (*Ictalurus Melas* and *Ictalurus-Punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 111, 229-235.

**Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S.** (2002). Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression* 1579, 35-42.

**Papatryphon, E., Capilla, E., Navarro, I., Soares, J. H.** (2001). Early insulin and glucagon response associated with food intake in a teleost, the striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 31-39.

**Párrizas, M., Baños, N., Baro, J., Planas, J., Gutiérrez, J.** (1994a). Up-Regulation of Insulin Binding in Fish Skeletal-Muscle by High Insulin Levels. *Regulatory Peptides* 53, 211-222.

**Párrizas, M., Baños, N., Baro, J., Planas, J., Gutiérrez, J.** (1994b). Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regul Pept* 53, 211-222.

**Párrizas, M., Maestro, M. A., Baños, N., Navarro, I., Planas, J., Gutiérrez, J.** (1995a). Insulin/IGF-I binding ratio in skeletal and cardiac muscles of vertebrates: a phylogenetic approach. *Am J Physiol* 269, R1370-1377.

**Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E. M., Gutiérrez, J.** (1994c). Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am J Physiol* 266, R1944-1950.

**Párrizas, M., Plisetskaya, E. M., Planas, J., Gutiérrez, J.** (1995b). Abundant Insulin-Like Growth-Factor-I (IGF-I) Receptor-Binding in Fish Skeletal-Muscle. *General and Comparative Endocrinology* 98, 16-25.

**Párrizas, M., Plisetskaya, E. M., Planas, J., Gutiérrez, J.** (1995c). Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-I) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen Comp Endocrinol* 98, 16-25.

**PEPPA** (2003). Perspectives of plant protein use in aquaculture second annual progress report.

**Pereira, T. G., and Oliva-Teles, A.** (2003). Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquaculture Research* 34, 1111-1117.

**Peres, H., Goncalves, P., Oliva-Teles, A.** (1999). Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179, 415-423.

**Pérez-Sánchez, J., and Le Bail, P. Y.** (1999). Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117-128.

**Pérez, J., Zanuy, S., Carrillo, M.** (1988). Effects of Diet and Feeding Time on Daily Variations in Plasma-Insulin, Hepatic Camp and Other Metabolites in a Teleost Fish, *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Physiology and Biochemistry* 5, 191-197.

**Pérez-Sánchez, J., Martipalanca, H., Le Bail, P. Y.** (1994). Seasonal-Changes in Circulating Growth-Hormone (Gh), Hepatic Gh-Binding and Plasma Insulin-Like Growth-Factor-I Immunoreactivity in a Marine Fish, Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 13, 199-208.

**Pessin, J. E., and Bell, G. I.** (1992). Mammalian Facilitative Glucose Transporter Family - Structure and Molecular Regulation. *Annual Review of Physiology* 54, 911-930.

**Peter, R. E., and Marchant, T. A.** (1995). The Endocrinology of Growth in Carp and Related Species. *Aquaculture* 129, 299-321.

**Pirola, L., Johnston, A. M., Van Obberghen, E.** (2004). Modulation of insulin action. *Diabetologia* 47, 170-184.

**Planas, J. V., Capilla, E., Gutiérrez, J.** (2000a). Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS Lett* 481, 266-270.

**Planas, J. V., Méndez, E., Baños, N., Capilla, E., Castillo, J., Navarro, I., Gutiérrez, J.** (2000b). Fish insulin, IGF-I and IGF-II receptors: A phylogenetic approach. *American Zoologist* 40, 223-233.

**Planas, J. V., Méndez, E., Baños, N., Capilla, E., Navarro, I., Gutiérrez, J.** (2000c). Insulin and IGF-I receptors in trout adipose tissue are physiologically regulated by circulating hormone levels. *J Exp Biol* 203 Pt 7, 1153-1159.

**Plisetskaya, E., Duguay, S., Duan, C.** (1994). Insulin and insulin-like growth factor I in salmonids, comparison of structure, function, and expression, In *Perspectives in Comparative Endocrinology*, D. KG, ed. (Ottawa: National Research Council of Canada), pp. 226-233.

**Plisetskaya, E. M.** (1995). Peptides of Insulin and Glucagon Superfamilies in Fish. *Netherlands Journal of Zoology* 45, 181-188.

- Plisetskaya, E. M., Buchellinarvaez, L. I., Hardy, R. W., Dickhoff, W. W.** (1991). Effects of Injected and Dietary Arginine on Plasma-Insulin Levels and Growth of Pacific Salmon and Rainbow-Trout. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 98, 165-170.
- Plisetskaya, E. M., and Mommsen, T. P.** (1996a). Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. *Int Rev Cytol* 168, 187-257.
- Plisetskaya, E. M., and Mommsen, T. P.** (1996b). Glucagon and glucagon-like peptides in fishes, In *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology*, Vol 168, pp. 187-257.
- Rechler, M. M., Zapf, J., Nissley, S. P., Froesch, E. R., Moses, A. C., Podskalny, J. M., Schilling, E. E., Humbel, R. E.** (1980). Interactions of Insulin-Like Growth Factor-I and Factor-II and Multiplication-Stimulating Activity with Receptors and Serum Carrier Proteins. *Endocrinology* 107, 1451-1459.
- Robaina, L., Izquierdo, M. S., Moyano, F. J., Socorro, J., Vergara, J. M., Montero, D., Fernandezpalacios, H.** (1995). Soybean and Lupin Seed Meals as Protein-Sources in Diets for Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) - Nutritional and Histological Implications. *Aquaculture* 130, 219-233.
- Ronner, P., and Scarpa, A.** (1987). Secretagogues for Pancreatic Hormone-Release in the Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *General and Comparative Endocrinology* 65, 354-362.
- Sheridan, M. A.** (1994). Regulation of Lipid-Metabolism in Poikilothermic Vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 107, 495-508.
- Siharath, K., and Bern, H.** (1994). The physiology of insulin-like growth factor (IGF) and its binding proteins in teleosts fishes. *Proc Zool Soc of Calcuta Haldane Comm* 113, 124.
- Siharath, K., Kelley, K., Bern, H.** (1996). A low-molecular-weight (25-kDa) IGF-binding protein is increased with growth inhibition in the fasting striped bass, *Morone saxatilis*. *Gen Comp Endocrinol* 102, 307.
- Siharath, K., Nishioka, R., Madsen, S., Bern, H.** (1995). Regulation of IGF-binding proteins by growth hormone in striped bass, *Morone saxatilis*. *Mol Mar Biol Biotech* 4, 171.
- Simon, J.** (1989). Chicken is a useful species for the comprehension of insulin action. *Crit Rev Poult Biol* 2, 121.
- Smit, A. B., Vreugdenhil, E., Ebberink, R. H. M., Geraerts, W. P. M., Klootwijk, J., Joosse, J.** (1988). Growth-Controlling Molluscan Neurons Produce the Precursor of an Insulin-Related Peptide. *Nature* 331, 535-538.
- Standaert, M. L., and Pollet, R. J.** (1988). Insulin-Glycerolipid Mediators and Gene-Expression. *Faseb Journal* 2, 2453-2461.

**Stephens, J. M., and Pilch, P. F.** (1995). The Metabolic-Regulation y Vesicular Transport of Glut4, the Major Insulin-Responsive Glucose-Transporter. *Endocrine Reviews* 16, 529-546.

**Stewart, E., and Rotwein, P.** (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76, 1005-1026.

**Sundby, A., Eliassen, K. A., Blom, A. K., Asgard, T.** (1991). Plasma-Insulin, Glucagon, Glucagonlike Peptide and Glucose-Levels in Response to Feeding, Starvation and Life Long Restricted Feed Ration in Salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry* 9, 253-259.

**Teerijoki, H., Krasnov, A., Gorodilov, Y., Krishna, S., Molsa, H.** (2001a). Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): Functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos. *Journal of Experimental Biology* 204, 2667-2673.

**Teerijoki, H., Krasnov, A., Pitkanen, T. I., Molsa, H.** (2001b). Monosaccharide uptake in common carp (*Cyprinus carpio*) EPC cells is mediated by a facilitative glucose carrier. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 128, 483-491.

**Tort, L., Montero, D., Robaina, L., Fernandez-Palacios, H., Izquierdo, M. S.** (2001). Consistency of stress response to repeated handling in the gilthead sea bream *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research* 32, 593-598.

**Trenzado, C. E., Carrick, T. R., Pottinger, T. G.** (2003). Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *General and Comparative Endocrinology* 133, 332-340.

**Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yangfeng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Lebon, T., Kathuria, S., Chen, E.** (1986). Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Primary Structure - Comparison with Insulin-Receptor Suggests Structural Determinants That Define Functional Specificity. *Embo Journal* 5, 2503-2512.

**Van Loon, L., Saris, W., Verhagen, H., A., W.** (2000). Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr* 72, 96-105.

**Vannucci, S. J., and Simpson, I. A.** (2003). Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 285, E1127-E1134.

**Vielma, J., Ruohonen, K., Peisker, M.** (2002). Dephytinization of two soy protein increases phosphorus and protein utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 204, 145-156.

**Wagner, G. N., Singer, T. D., McKinley, R. S.** (2003). The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research* 34, 1139-1146.

**Walton, M. J., and Cowey, C. B.** (1982). Aspects of Intermediary Metabolism in Salmonid Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 73, 59-79.

**Watson, R. T., Kanzaki, M., Pessin, J. E.** (2004). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocrine Reviews* 25, 177-204.

**Wellner, M., Monden, I., Keller, K.** (1995). From Triple Cysteine Mutants to the Cysteine-Less Glucose-Transporter Glut1 - a Functional-Analysis. *Febs Letters* 370, 19-22.

**Wilson, R. P., and Poe, W. E.** (1987). Apparent Inability of Channel Catfish to Utilize Dietary Monosaccharides and Disaccharides as Energy-Sources. *Journal of Nutrition* 117, 280-285.

**Zorzano, A., James, D. E., Ruderman, N. B., Pilch, P. F.** (1988). Insulin-Like Growth Factor-I Binding and Receptor Kinase in Red y White Muscle. *Febs Letters* 234, 257-262.

**Zorzano, A., Palacin, M., Guma, A.** (2005). Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 183, 43-58.

---

## **7.- PUBLICACIONES**

---



1. Albalat, A., Gómez-Requeni, P., **Rojas, P.**, Medale, F., Kaushik, S., Vianen, G. J., Van den Thillart, G., Gutiérrez, J., Pérez-Sánchez, J., Navarro, I. (2005). Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 289, R259-R265.
2. de Celis, S. V. R., **Rojas, P.**, Gomez-Requeni, P., Albalat, A., Gutiérrez, J., Medale, F., Kaushik, S. J., Navarro, I., Pérez-Sanchez, J. (2004). Nutritional assessment of somatolactin function in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): concurrent changes in somatotrophic axis and pancreatic hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 138, 533-542.
3. Novoa, M. D., Capilla, E., **Rojas, P.**, Baro, J., Gutiérrez, J., Navarro, I. (2004). Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 139, 48-54.
4. Navarro, I., **Rojas, P.**, Capilla, E., Albalat, A., Castillo, J., Montserrat, N., Codina, M., y Gutiérrez, J. (2002). Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 205-216. Special Issue: "Fish Growth and Metabolism. Environmental, Nutritional and Hormonal regulation". E. M. Plisetkaya, Ed., (published 2004).
5. **Rojas, P.**, Gutiérrez, J., Medale, F., Kaushik, S. J., Pérez-Sanchez, J., Navarro, I. Influence of different dietary amino acid patterns on post-feeding levels of insulin and glucagon in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). En elaboración.
6. **Rojas, P.**, Navarro, I., Gutiérrez, J., Planas J.V. Molecular identification and functional characterization of insulin-responsive glucose transporter (saGLUT) in gilthead seabream (*Sparus aurata*). En elaboración.