

## Efecto de algunas harinas de pescado sobre las disacaridasas y fosfatasa alcalina del intestino delgado de rata

E. Rebolledo-Varela \* y M.<sup>a</sup> P. Fernández-Otero

Departamento de Fisiología Animal  
Facultades de Biología \* y Farmacia  
Universidad de Santiago de Compostela (España)

(Recibido el 15 de marzo de 1981)

E. REBOLLEDO-VARELA and M.<sup>a</sup> P. FERNANDEZ-OTERO. *Effect of Fish Meals on Disaccharidases and Alkaline Phosphatase in Small Intestine of Rat*. Rev. esp. Fisiol., 38, 321-326. 1982.

Female rats of the Wistar strain, weighing 40-60 g were used to study the effect of fish meals (*Coryphaenoides rupestris*, *Chimaera monstrosa* and *Merluccius merluccius*) on the disaccharidases and alkaline phosphatase in the small intestine in relation to the control group which consumed casein.

Fish meal diets diminished lactase and alkaline phosphatase activity, the latter being most remarkable in animals fed *Ch. monstrosa* meal, while no statistical variations in maltase and sucrase activity were observed.

Maltase, sucrase and lactase activity of animals fed *Ch. monstrosa* meal dropped in comparison with those fed *C. rupestris* meal, while the alkaline phosphatase activity showed no significant changes.

Para una proteína dada, el crecimiento máximo (retención nitrogenada y síntesis aparente de lípidos) no depende solamente de su capacidad para cubrir las necesidades cuantitativas y cualitativas de los aminoácidos, sino también de un máximo de energía disponible bajo la forma de ATP obtenida por el equilibrio metabólico entre la glicolisis y gluconeogénesis (16).

El intestino delgado es capaz de metabolizar aminoácidos dietéticos transformando algunos de éstos en glucosa (7), pero la mayor parte de la misma, necesaria para llevar a cabo el metabolismo, pro-

cede de los carbohidratos dietéticos, los cuales se encuentran bajo la forma de disacáridos.

Estos disacáridos son hidrolizados en el intestino delgado, pasando a sus correspondientes monosacáridos, por las disacaridasas que se hallan localizadas en el borde en cepillo de las células mucosales intestinales (18).

Ahora bien, la actividad de los enzimas intestinales puede ser modificada por alteraciones dietéticas y no sólo se producen por altos contenidos en carbohidratos (2, 5, 10), sino también por restricciones proteicas y energéticas (12, 17), así

como por la deficiencia o exceso de determinados aminoácidos (3, 11).

En el presente trabajo se estudia la influencia de las harinas de pescado procedentes de *Coryphaenoides rupestris*, *Chimaera monstrosa* y *Merluccius merluccius* sobre las disacaridasas y fosfatasa alcalina intestinales frente a la caseína que se utiliza como patrón.

### Material y métodos

Se utilizan ratas, raza Wistar, recién destetadas y con un peso comprendido entre 40-60 g. Los animales se introducen en jaulas individuales y se alimentan durante 10 días con dietas (10 g/día) cuya composición en porcentaje de sustancia seca es: 12 de proteína, 4 de grasa, 8 de fibra, 5 de mezcla mineral, 5 de complejo vitamínico y vitamina A y D, 30 y 10 UI/rata/día. El resto hasta 100 se completa con almidón y sacarosa a partes iguales. Se utiliza como grasa aceite de oliva y como fibra celulosa microcristalina.

(Mezcla mineral, en g: ClNa, 338; PO<sub>4</sub>HCa, 334; CO<sub>3</sub>HK, 219,6; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub>, 72,2; CO<sub>3</sub>Mg, 38; SO<sub>4</sub>Fe, 9,3; SO<sub>4</sub>Mn, 1,18; SO<sub>4</sub>Cu, 0,16; (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>AlK, 0,08; Cl<sub>2</sub>Ca, 0,08; FNa, 0,08; IK, 0,04 y de CO<sub>3</sub>Zn, 0,04. Complejo vitamínico, en mg: Tiamina, 1.500; Riboflavina, 200; Nicotinamida, 2.200; Piridoxal, 200; Pantotenato cálcico, 300; completando hasta 1 kg con almidón.)

La fuente proteica para los grupos controles es caseína suplementada con 0,6% de metionina y para los tratados harinas de pescado procedentes de *Coryphaenoides rupestris*, *Chimaera monstrosa* y *Merluccius merluccius*.

Para la elaboración de las harinas de pescado se sigue el siguiente procedimiento: una vez retiradas las cabezas y vísceras, los pescados se cuecen durante 3 minutos y se desecan en estufa a 80°C. La desecación se da por terminada cuando la

humedad de los pescados es aproximadamente de un 10%. A continuación se pulverizan en un molinillo eléctrico y se homogenizan, procediendo posteriormente a su análisis.

El contenido en aminoácidos de la caseína y harinas de pescado, objeto de estudio, se determina según la técnica de MOORE y STEIN (15) mediante un analizador automático PERKIN-ELMER, KLA-5.

Después del período de alimentación, los animales se sacrifican y siguiendo la técnica de MILLER y CRANE (14), así como el procedimiento descrito por BERG y CHAPMAN (1) se separa la mucosa del intestino delgado y se homogeniza, en una solución de ClNa-150 mM, tampón fosfato 10 mM (pH = 7,2) y EDTA-1 mM, utilizando un homogenizador automático con la punta de teflón, a unas 200-300 rpm.

Posteriormente el homogenado intestinal se somete a centrifugaciones sucesivas teniendo en cuenta los trabajos de HOGEBOON (9) y MILLER y CRANE (14) y según el esquema de centrifugación que se indica a continuación: el homogenado se centrifugó a 432,6 g<sub>av</sub>, 10 min, en una centrifuga de mesa (Selecta-P). Los sobrenadantes siguientes (fracciones I, II y III) se centrifugaron en una Ultracentrifuga Sorval OTD-2, a 2°C, a 8.428 g<sub>av</sub>, 10 min; 27.052 g<sub>av</sub>, 10 min y 107.640 g<sub>av</sub>, 60 min, respectivamente. El último sobrenadante corresponde a la fracción IV.

Las distintas fracciones obtenidas se recogen en una solución de ClNa-150 mM y tampón fosfato-10 mM (pH = 7,2), determinando las actividades enzimáticas en cada una de ellas para sumar sus valores y obtener el total.

La medida de la actividad de disacaridasas y fosfatasa alcalina se lleva a cabo mediante la técnica de DAHLQVIST (4), comparando la glucosa hidrolizada en el tubo problema con un tubo patrón de glucosa. Se utiliza glucosa 1-P como sustrato y Amino-Metil-Propanol 0,1 M

(pH = 10) como tampón para la determinación de las fosfatasa.

Los resultados se expresan en  $\mu$ moles de glucosa liberada/mg de proteína/min. La evaluación estadística se realiza mediante la «t» de Student.

### Resultados y Discusión

La composición cualitativa y cuantitativa de aminoácidos presentes en la ca-

Tabla I. Composición cuantitativa y cualitativa (%) en aminoácidos de caseína y harinas de *Coryphaenoides rupestris*, *Chimaera monstrosa* y *Merluccius merluccius*.

Aminoácidos	Harinas de			
	Caseína	«C. rupestris»	«Ch. monstrosa»	«M. merluccius»
Ac. aspártico	6,26	6,90	7,02	9,29
Treonina	3,74	4,11	4,08	5,20
Serina	5,80	9,40	9,00	5,20
Ac. glutámico	20,35	18,63	18,53	16,21
Prolina	9,20	3,25	3,20	2,27
Glicina	1,96	5,43	5,37	6,90
Alanina	3,56	5,50	6,67	6,56
Valina	5,67	4,21	4,50	5,49
Cistina	0,72	1,83	1,53	1,40
Metionina	2,93	2,22	2,37	2,75
Isoleucina	4,81	4,49	5,17	5,53
Leucina	8,90	7,43	7,57	8,01
Tirosina	4,64	4,54	2,41	4,10
Fenilalanina	4,27	2,38	2,33	4,21
Lisina	9,70	9,44	10,27	8,33
Histidina	3,38	3,78	4,06	2,69
Arginina	4,11	6,46	5,92	5,86

seína y en las distintas harinas de pescado procedentes de *Coryphaenoides rupestris*, *Chimaera monstrosa* y *Merluccius merluccius*, se da en la tabla I.

Los valores obtenidos en la actividad de disacaridasas y fosfatasa alcalina de ratas que ingieren dietas proteicas procedentes de harinas de pescado frente a los grupos controles, alimentados con caseína, se recogen en las tablas II y III. Se observa un descenso significativo en la lactasa en los lotes de animales a los que se les administra harinas de pescado como proteína, hecho que puede explicarse por una adaptación de las enzimas al tipo de alimento ingerido, lo que está de acuerdo con los trabajos de BLAIR *et al.* (2) y de DEREN *et al.* (5), los cuales observan un aumento en las actividades de maltasa y

Tabla III. Actividad de las disacaridasas y fosfatasa alcalina del intestino delgado de ratas alimentadas con harina de *Merluccius merluccius* frente a la obtenida en ratas controles.

Los resultados se expresan en  $\mu$ moles de glucosa liberada/mg de proteína/min. Cada valor representa la media  $\pm$  el error de la media de 8 ratas. \*\* P < 0,005.

	Caseína	Harina de «M. merluccius»
Maltasa	0,75 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,02
Sacarasa	0,20 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01
Lactasa	0,19 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,003**
Fosfatasa alcalina	1,54 $\pm$ 0,03	1,50 $\pm$ 0,05

Tabla II. Actividad de las disacaridasas y fosfatasa alcalina del intestino delgado de ratas alimentadas con harinas de *Coryphaenoides rupestris* y *Chimaera monstrosa* frente a la obtenida en ratas controles.

Los resultados se expresan en  $\mu$ moles de glucosa liberada/mg de proteína/min. Cada valor representa la media  $\pm$  el error de la media de 8 ratas. \* P < 0,01; \*\* P < 0,005.

	Caseína	Harinas de	
		«C. rupestris»	«Ch. monstrosa»
Maltasa	0,78 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,02
Sacarasa	0,26 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02
Lactasa	0,19 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01**	0,13 $\pm$ 0,01**
Fosfatasa alcalina	1,68 $\pm$ 0,11	1,61 $\pm$ 0,10	1,46 $\pm$ 0,07*

sacarasa del intestino de rata, cuando los animales son alimentados con dietas con alto contenido en carbohidratos al compararlas con dietas isocalóricas libres de ellos.

Si se compara la actividad de la fosfatasa alcalina, obtenida en ratas alimentadas con las dietas cuyas fuentes proteicas proceden de las harinas de pescado frente a la del control, se observa un descenso en todos los lotes, el cual no es significativo para los animales a los que se les administra harina de *C. rupestris* y *M. merluccius*, pero sí lo es para los alimentados con harina de *Ch. monstrosa*, observándose que la mínima inhibición se produce en el grupo de animales que ingieren harina de *M. merluccius*.

La máxima actividad de las disacaridasas como la de la fosfatasa alcalina se encuentra localizada en el borde en cepillo de las células intestinales (18), aunque también se encuentra la fosfatasa alcalina en las células y matriz de la lámina propia.

Mediante estudios realizados *in vitro* se pone de manifiesto que la actividad de la fosfatasa alcalina intestinal localizada en el borde en cepillo es inhibida por la fenilalanina, aminoácido que, sin embargo, sólo produce pequeños efectos o ninguno sobre la actividad del enzima ubicado en las células y matriz de la lámina propia. Por el contrario, otro aminoácido, la arginina, no origina alteraciones en el enzima localizado en el borde en cepillo, pero sí inhibe la actividad del que se encuentra en la lámina propia (3, 6).

Al comparar el porcentaje de estos dos aminoácidos en las harinas de pescado frente a la caseína (tabla I), se observa que el contenido en arginina es superior en las harinas de *C. rupestris*, *Ch. monstrosa* y *M. merluccius*; por el contrario, la cantidad de fenilalanina desciende en las dos primeras y no se modifica prácticamente en la tercera.

Esto hace pensar que la posible inhibición ocasionada por las harinas de pes-

Tabla IV. Actividad de las disacaridasas y fosfatasa alcalina de ratas alimentadas con harina de *Chimaera monstrosa* frente a la obtenida en ratas que ingieren harina de *Coryphaenoides rupestris*.

Los resultados se expresan en  $\mu$ moles de glucosa liberada/mg de proteína/min. Cada valor representa la media  $\pm$  el error de la media de 8 ratas. \*\*  $P < 0,005$ .

	Harinas de	
	<i>C. rupestris</i>	<i>Ch. monstrosa</i>
Maltasa	0,79 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,02**
Sacarasa	0,27 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02**
Lactasa	0,15 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01**
Fosfatasa alcalina	1,61 $\pm$ 0,10	1,46 $\pm$ 0,07

cado sobre la fosfatasa alcalina intestinal es debida a la arginina, la cual modifica la actividad de la enzima localizada en la lámina propia.

Ahora bien, al comparar la actividad de estas enzimas entre los animales que ingieren harina de *C. rupestris* y *Ch. monstrosa* (tabla IV), se observa que con un porcentaje de aminoácidos similar, en el segundo grupo se produce un descenso en las actividades de maltasa, sacarasa y lactasa significativo para  $P < 0,005$ , mientras que la actividad de la fosfatasa alcalina no presenta variación significativa con respecto al primero.

Estas variaciones enzimáticas cuando las ratas son alimentadas con dietas similares (harina de *C. rupestris* y harina de *Ch. monstrosa*), pueden deberse a la posible adaptación de los enzimas a los distintos componentes alimenticios, adaptación que tiene lugar a largo plazo (8).

Quizá por esta razón la fosfatasa alcalina intestinal de las ratas alimentadas con harina de *C. rupestris* experimenta un descenso de tal sólo 4,16 % (no significativo estadísticamente para las probabilidades estudiadas pero sí para otras) frente a los controles, mientras que las que ingieren harina de *Ch. monstrosa* el descenso llega a ser de un 13,1 % (significativo para  $P < 0,01$ ) cuando el conte-

nido de arginina es un poco mayor en *C. rupestris* que en *Ch. monstruosa*.

### Resumen

Se estudia en ratas hembras de raza Wistar, con un peso comprendido entre 40-60 g, el efecto de algunas harinas de pescado (*Coryphaenoides rupestris*, *Chimaera monstruosa* y *Merluccius merluccius*) sobre las disacaridasas y fosfatasa alcalina del intestino delgado, frente al grupo control alimentado con caseína.

Las dietas a base de harina de pescado producen un descenso en la actividad de la lactasa y fosfatasa alcalina frente a las ratas controles — descenso que es más pronunciado, con respecto a la fosfatasa, en los animales que ingieren harina de *Ch. monstruosa* —, mientras que no hay variaciones significativas en la maltasa y sacarasa.

Las actividades de maltasa, sacarasa y lactasa en ratas alimentadas con harina de *Ch. monstruosa* descienden con respecto a los animales que ingieren harina de *C. rupestris*, mientras que la actividad de la fosfatasa alcalina no presenta variación significativa.

### Bibliografía

1. BERG, G. G. y CHAPMAN, B.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, 65, 361-372, 1965.
2. BLAIR, D. G. R., YAKIMETS, W. y TUBA, J.: *J. Biochem. Physiol.*, 41, 917-929, 1963.
3. BLUESTEIN, R. M., MALAGELADA, J. R., LINSCHER, W. G. y FISHMAN, W. H.: *Histochemie*, 33, 313-322, 1973.
4. DAHLQVIST, A.: *Anal. Biochem.*, 22, 99-107, 1968.
5. DEREN, J. J., BROITMAN, S. A. y ZAMCHECK, N.: *J. Clin. Invest.*, 46, 186-195, 1967.
6. FERNLEY, H. N. y WALKER, P. G.: *Biochem. J.*, 116, 543-544, 1970.
7. HERMAN, R. H.: En «Sugars in Nutrition» (H. L. Sipple and K. W. McNutt, eds.). Academic Press, Nueva York, 1974, p. 145.
8. HIETANEN, E.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 50, 41-46, 1975.
9. HOGEBOON, G. H.: En «Methods in Enzymology», Vol. 1 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.). Academic Press, Nueva York, 1955, p. 16.
10. IRWIN, M. I. y STATON, A. L.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 22, 701, 1969.
11. KIMURA, T., SUZUKI, S. y YOSHIDA, A.: *J. Nutr.*, 105, 257-265, 1975.
12. KOGA, A. y KIMURA, S.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 24, 323-329, 1978.
13. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
14. MILLER, D. y CRANE, R. K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 293-298, 1961.
15. MOORE, S. y STEIN, W. H.: En «Methods in Enzymology», Vol. 6 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.). Academic Press, Nueva York, 1963, pp. 819-831.
16. PERET, J., COTA, J., CHANEZ, M. y BOISYOYEUX, B.: *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18, 663-679, 1978.
17. SOLIMANO, G., BURGESS, E. A. y LEVIN, B.: *J. Nutr.*, 21, 55-68, 1967.
18. UGOLEV, A. M. y LAEY, P. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 105-128, 1973.