

C. Bienestar animal I,II

EFFECTO DEL ESTRÉS SOBRE EL RELOJ CIRCADIANO INTESTINAL EN TRUCHA ARCOIRIS. POSIBLES BENEFICIOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON L-TRIPTÓFANO.

M. Alborja¹, A. Verde¹, C. Ramirez¹, M. Chivite¹, J. Calo¹, J.M. Míguez¹, M.A. López Patiño¹

¹Centro de Investigación Mariña, Lab. Fisiología Animal, Dept. Bioloxía Funcional e Ciencias da Saúde, Fac. Bioloxía, Universidade de Vigo, Vigo, Spain.

Resumen

La elevada demanda de productos acuícolas conlleva una intensificación de los cultivos. Esto podría conducir al hacinamiento de los animales y a una mayor competencia por los recursos, siendo una posible causa de estrés. Por ello, es importante refinar las prácticas de manejo y mejorar el bienestar animal en las piscifactorías. El sistema circadiano influye en numerosas funciones fisiológicas y comportamentales incluyendo la respuesta al estrés, por lo que profundizar en su conocimiento contribuye a la mejora del bienestar animal. En el presente estudio se evaluó el efecto del estrés sobre la expresión relativa de genes reloj en el tracto gastrointestinal de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con una dieta normal o enriquecida con L-Triptófano para conocer si dicho aminoácido mitiga su efecto. Los resultados del presente trabajo apuntan a que la suplementación con L-Trp mitiga parcialmente los efectos del estrés sobre los ritmos de expresión de los genes reloj intestinales.

Introducción

El bienestar animal es uno de los aspectos prioritarios en acuicultura, habiéndose puesto el foco en particular en las situaciones de estrés. En los peces, el estrés puede afectar al equilibrio fisiológico y provocar la alteración de sus funciones rítmicas diarias, siendo el sistema circadiano el responsable de controlarlas. El tracto gastro-intestinal (TGI) es un elemento clave en la absorción de nutrientes y su regulación implica múltiples procesos neuroendocrinos. Es rico en neurotransmisores monoaminérgicos, en particular la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT), la cual modula el comportamiento alimentario a nivel central y participa en la regulación del estrés. Además, la 5HT modula localmente la motilidad intestinal, los procesos secretores e influye en la regulación circadiana a través de receptores específicos. Su síntesis se inicia a partir del aminoácido L-triptófano (L-Trp). Se ha observado que la suplementación de dietas con el aminoácido suprime el comportamiento agresivo y reduce las concentraciones de cortisol en plasma tras un estrés agudo en algunas especies de teleosteos (Höglund *et al.* 2019), limitando su síntesis y liberación en ensayos a largo plazo (Herrera *et al.* 2019). Además, se ha demostrado que la suplementación con L-Trp estimula la síntesis de melatonina a nivel intestinal, influyendo por tanto en la regulación circadiana y en la propia respuesta a estrés (Acharyya *et al.* 2021). Aun así, existen discrepancias, existiendo estudios que señalan que la suplementación con L-Trp afecta al sistema neuroendocrino de los peces provocando un aumento en los niveles plasmáticos de cortisol (Lepage *et al.* 2002) y comprometiendo la respuesta inmunitaria de los animales (Machado *et al.* 2019).

Por ello el objetivo del presente trabajo fue estudiar cómo afecta el estrés crónico por alta densidad al sistema circadiano gastrointestinal en la trucha arco iris, así como el potencial efecto beneficioso de la suplementación dietaria con L-Trp en dicha condición.

Material y métodos

Se utilizaron ejemplares inmaduros de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) obtenidos de una piscifactoría local y mantenidos en instalaciones de la Universidad de Vigo. Los animales se aclimataron a un fotoperiodo 12L:12D, con alimentación diaria a ZT3 (ZT0 = encendido de las luces). Los peces se dividieron en 4 grupos que fueron expuestos a diferentes condiciones experimentales: 1) Control (sin estrés) alimentado con pienso control (0.2% L-Trp) (CC); 2) Control alimentado con pienso suplementado (1% L-Trp) (TC); 3) Estrés alimentado con pienso control (CE); 4) Estrés alimentado con pienso suplementado (TE). En los grupos que recibieron L-Trp en el alimento, se inició el tratamiento 7 días antes de la exposición al estrés. En los grupos sometidos a estrés por alta densidad se redujo el volumen de agua en los tanques pasando de 10 Kg/100 L (control) a 70 Kg/100 L (estrés), durante las 96 horas de duración del

experimento. Tras finalizar el experimento, se procedió al sacrificio de grupos de peces cada 4 horas a lo largo de un ciclo diario (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20 y 0') y se tomaron muestras de sangre y de intestino. Las muestras de sangre se centrifugaron para obtener el plasma en el cual se midieron los niveles de cortisol mediante EIA. Con las muestras de intestino se cuantificó la abundancia relativa de genes reloj (*clock1a*, *bmal1b*, *per1*, *cry2*) mediante qPCR. La existencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales se realizó mediante un ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples (SNK). Además, la consistencia de los ritmos de cada parámetro analizado y sus características se evaluó utilizando el análisis del COSINOR.

Resultados y discusión

Con respecto a los ritmos diarios de cortisol, los grupos experimentales mantenidos en ausencia de estrés desarrollaron un ritmo diario consistente de la hormona, cuya acrofase se situó al final de la noche. En los peces que recibieron alimento normal y que se expusieron a alta densidad (grupo CE), dicha acrofase se adelantó (ZT10.53), mientras que en el grupo estresado que fue alimentado con triptófano (TE) el ritmo desapareció. Por otro lado, los niveles medios de cortisol fueron más bajos en los peces no estresados, si bien el grupo que recibió L-Trp (TC) mostró valores ligeramente superiores a los del control (CC), en consistencia con lo descrito por otros autores (Lepage *et al.* 2002). El estrés causó el aumento de los niveles medios del glucocorticoide, si bien dicho aumento fue inferior en los peces que recibieron L-Trp (TE), lo que sugiere que el aminoácido podría tener un efecto beneficioso durante una situación de estrés, mitigando, al menos parcialmente, la respuesta fisiológica.

Respecto a la expresión de genes reloj en el intestino, se observaron ritmos consistentes para cada gen analizado (*clock1a*, *bmal1b*, *per1*, *cry2*), en consonancia con la existencia de un oscilador circadiano funcional en dicho tejido. Además, el estrés provocó, en general, un descenso de la amplitud de los ritmos de expresión de cada gen, los cuales fueron acompañados en algunos casos de cambios de fase. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente en el hígado de la trucha (Hernández-Pérez *et al.* 2019). El tratamiento con L-Trp fue efectivo contrarrestando, al menos parcialmente, el efecto del estrés sobre los ritmos de expresión de los genes circadianos analizados, si bien también tuvo efecto en sí mismo, similar al del estrés, disminuyendo la expresión de dichos genes. Nuestros resultados apuntan a que el triptófano puede ayudar a reducir los efectos adversos del estrés en las explotaciones acuícolas, si bien en ausencia de estrés parece producir algunos efectos adicionales que deben ser investigados más en profundidad.

Palabras Clave: Estrés crónico, sistema circadiano, serotonina, L-triptófano.

Bibliografía

- *Acharyya, A., J. Das & K. Hasan. 2021. Melatonin as a Multipotent Component of Fish Feed: Basic Information for Its Potential Application in Aquaculture. *Frontiers in Marine Science*. 8.
- *Lepage, O., O. Tottmar & S. Winberg. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2002. *Journal of Experimental Biology*. Dec;205(Pt 23):3679-87.
- *Hernández-Pérez, J., F. Naderi, M. Chivite, J.L. Soengas, J.M. Míguez, M.A. López-Patiño. 2019. Influence of Stress on Liver Circadian Physiology. A Study in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, as Fish Model. *Frontiers in Physiology*. 10 (455120).
- *Herrera, M., J.M. Miró, I. Giráldez, N. Salamanca, J.A. Martos-Sitcha, J.M. Mancera, J.R. López. 2019. Metabolic and Stress Responses in Senegalese Soles (*Solea senegalensis* Kaup) Fed Tryptophan Supplements: Effects of Concentration and Feeding Period. *Animals*. 9 (320).
- *Höglund, E., Ø. Øverli & S. Winberg. 2019. Tryptophan Metabolic Pathways and Brain Serotonergic Activity: A Comparative Review. *Frontiers in Endocrinology* (Lausanne). 10 (158).
- *Machado, M., R. Azeredo, A. Domingues, S. Fernandez-Boo, J. Dias, L.E.C. Conceição & B. Costas. 2019. Dietary tryptophan deficiency and its supplementation compromises inflammatory mechanisms and disease resistance in a teleost fish. *Scientific Reports*. 9 (7689).

Agradecimientos

Agencia Estatal de Investigación y Fondos Europeos de Desarrollo Regional (PID2022-136288OB-C31) y Xunta de Galicia (Axudas para a consolidación e estruturación de unidades de investigación competitivas e outras accións de fomento nas universidades do SUG, ED431B 2022/01).

maria.alborja@uvigo.es