

VALORACIÓN HISTOQUÍMICA DE GLUCÓGENO HEPÁTICO EN EL TORO DE LIDIA

Histochemical valuation of hepatic glycogen in bullfight

J. Seva¹, F.J. Pallarés¹, F.A. Rodríguez², M.A. Gómez¹ y A. Bernabé¹

¹U.D. Histología y Anatomía Patológica. Facultad de Veterinaria.

²Área de Salud de Murcia. Consejería de Sanidad y Política Social. C.A.R.M.

RESUMEN

Se estudia la cantidad y distribución del glucógeno hepático en 30 animales de raza bovina, de 4 años de edad, lidiados en plazas de toros permanentes de la Región de Murcia. Los niveles de glucógeno en los hígados de los animales lidiados son menores que en los controles y la distribución en el lobulillo hepático es centrolobulillar a diferencia de los animales control, que es panlobulillar, lo que indica que en las zonas perilobulillares es donde primero comienza la formación de glucosa a partir del glucógeno y su liberación a la circulación sanguínea. Además se observa una menor cantidad de glucógeno hepático en los animales con mayor debilidad durante la lidia.

Palabras clave: toro de lidia, glucógeno, hígado, histoquímica.

SUMMARY

The quantity and distribution of hepatic glycogen have been studied in 30 bullfight 4 years old fought in permanent bullrings of the Region of Murcia. Glycogen levels in the liver of fought animals are minor than control animals and the distribution in the hepatic lobule is perivenous unlike control animals that is in all the lobule. This indicates that the production of glucose via glycogenolysis and its liberation to bloodstream start in the periportal zone. Furthermore, the minor quantity of hepatic glycogen is observed in the more weak animals during the fight.

Key words: bullfight, glycogen, liver, histochemistry.

INTRODUCCIÓN

El hígado, debido a su localización en la circulación y las características de los hepatocitos, es un órgano vital para el procesamiento de sustancias nutritivas absorbidas en el intestino y para su transformación en sustancias de reserva que posteriormente serán utilizadas en otras partes del organismo (BOLLEN *et al.*, 1998). En los rumiantes, la mayor parte de la digestión de los carbohidratos tiene lugar en el estómago no glandular por medio de la digestión fermentativa. El precursor más importante de la glucosa es el propionato, que se absorbe en rumen y se extrae de sangre portal por el hígado, no entrando nunca en la circulación sistémica. Una vez formada la glucosa los procesos metabólicos donde están implicados los carbohidratos son similares a las demás especies (CUNNINGHAM, 1999). El glucagón provoca una movilización energética del hígado mientras que la insulina favorece su almacenamiento. La actividad movilización/almacenamiento de energía depende de la hormona que sea dominante, siendo más importante la proporción de ambas hormonas que sus concentraciones absolutas (BEITZ, 1999).

La cantidad de glucógeno en el hígado de animales bien alimentados es alta en los primeros momentos tras la ingesta, aunque conforme van pasando las horas y durante el ejercicio disminuye (KJAER, 1998; BEITZ, 1999; GEOR *et al.*, 2000). CUNNINGHAM (1999) observó que el glucógeno hepático puede mantener los requerimientos de glucosa sanguínea en humana y animales entre 6 y 12 horas con un ejercicio mínimo y unos 20 minutos en situaciones de ejercicio intenso. Cuando los depósitos de glucógeno son reducidos, el hígado produce glucosa de substratos

gluconeogénicos (BORBA-MURAD *et al.*, 1998).

El glucógeno se deposita inicialmente en los hepatocitos localizados centralmente en el lobulillo clásico, en las regiones por donde llega la circulación venosa, de forma que conforme aumenta la cantidad de glucógeno alcanza los hepatocitos perilobulillares (BABCOCK y CARDELL, 1974). Los hepatocitos periportales difieren de los situados alrededor de la vena centrolobulillar. Estos dos tipos de hepatocitos reciben diferentes señales debido a que los substratos, incluido el oxígeno y hormonas, son degradados y los productos y mediadores se forman conforme la sangre atraviesa el hígado (JUNGERMANN y KIETZMANN, 1997).

Las situaciones de estrés provocan requerimientos extra de energía de los almacenes de glucógeno tanto hepático como muscular (FERNÁNDEZ *et al.*, 1995; DE BOECK *et al.*, 2000). Así, el glucógeno muscular actúa como fuente de energía para el metabolismo del propio músculo, disminuyendo su concentración durante el ejercicio por el metabolismo oxidativo que se produce. La glucosa es utilizada por el propio músculo y no aumenta las concentraciones de glucosa sanguínea (BEITZ, 1999; FEBBRAIO y KOUKOULAS, 2000). Dependiendo del tipo de fibra que componga el músculo esquelético, habrá un predominio del metabolismo glucolítico u oxidativo que en el caso del toro de lidia es fundamentalmente glucolítico (MARTÍNEZ GOMARIZ *et al.*, 1997-98).

En el presente trabajo nos proponemos identificar el glucógeno hepático y establecer su cantidad y distribución en el hígado de animales lidiados para poder determinar, en la medida de lo posible, su relación con el comportamiento en la plaza.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado 30 toros de lidia de 4 años, lidiados en plazas de toros permanentes de la Región de Murcia durante el año 2000. Como controles se utilizaron 2 toros sacrificados en matadero que no fueron lidiados.

De cada uno de los animales se tomaron dos muestras de hígado. Una de ellas fue fijada en formol al 10% y previa inclusión en parafina se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (H-E). La otra muestra fue fijada en líquido de Carnoy (fijador específico para detección de glucógeno), incluida en parafina y teñida mediante la técnica ácido periodico-reactivo de Schiff (PAS).

En las muestras teñidas con H-E se realizó el estudio histopatológico, valorándose posibles lesiones en las mismas. De las muestras teñidas con PAS, se determinó en qué zonas del lobulillo hepático (centro, peri o panlobulillar) aparecían los hepatocitos con mayor o menor cantidad de glucógeno en su interior. Para poder determinar de forma objetiva la cantidad de glucógeno presente en el hígado se contabilizaron en cada animal, mediante un analizador digital de imagen, 50 campos de $1.500 \mu\text{m}^2$ cada uno escogidos al azar y se les asignó un valor de 1 a 3 según la cantidad de glucógeno, siendo 1 (nivel de glucógeno bajo, donde la mayoría de los hepatocitos no presentan glucógeno), 2 (nivel de glucógeno medio, donde la mayoría de hepatocitos presentan glucógeno) y 3 (nivel de glucógeno alto, donde la mayoría de los hepatocitos están repletos de glucógeno).

En cada uno de los 30 toros lidiados se valoró su comportamiento en la plaza, asignándole un valor de 1 si era normal la lidia, 2 si perdía las manos en alguna ocasión, 3 si había flojedad manifiesta, 4 si era inválido y 5 si era devuelto. Posteriormente se agruparon los valores de los toros con igual compor-

tamiento y se calcularon los valores medios para cada grupo, aplicándose la prueba T de Student ($p < 0.05$), con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre los grupos.

RESULTADOS

En los hígados de los toros lidiados se observó la presencia de cantidades variables de glucógeno en el interior de los hepatocitos, y dentro de un mismo animal aparecían numerosos campos con valor 1, 2 y 3 (*figura 1*), a diferencia de los controles, donde aparecían fundamentalmente campos con valor 3 (*figura 1B*).

Las cantidades de glucógeno obtenidas se presentan en la *tabla 1*, reflejándose el número de campos con valor 1, 2 y 3, y los valores medios de las 50 mediciones de cada uno de los animales estudiados.

La distribución de los hepatocitos con glucógeno en el hígado de los animales lidiados era zonal y en la mayoría de los casos similar, apareciendo los hepatocitos con menor cantidad de glucógeno en las porciones periféricas del lobulillo clásico, junto a los espacios porta, aunque conforme se avanzaba hacia la vena centrolobulillar había mayor cantidad de glucógeno, por lo que era una distribución típicamente centrolobulillar, a diferencia de los toros control que presentaban una distribución panlobulillar (*figura 2*).

Al analizar los valores medios del nivel de glucógeno en los toros con igual comportamiento en la plaza, se observó que los valores medios de glucógeno eran menores conforme los animales manifestaban mayor debilidad en la plaza, existiendo diferencias significativas entre los animales de mayor debilidad (grupo 4) y el resto, así como entre los 4 grupos y el control (*tabla 2*).

Tabla 1. Valores de glucógeno y comportamiento en la plaza de los toros.

<i>TORO</i>	<i>COMPORTAMIENTO</i>	<i>Nº CAMPOS 1</i> <i>Nivel bajo</i>	<i>Nº CAMPOS 2</i> <i>Nivel medio</i>	<i>Nº CAMPOS 3</i> <i>Nivel alto</i>	<i>NIVEL DE</i> <i>GLUCÓGENO</i>
<i>1</i>	<i>3</i>	<i>8</i>	<i>20</i>	<i>22</i>	<i>2.28</i>
<i>2</i>	<i>1</i>	<i>7</i>	<i>21</i>	<i>22</i>	<i>2.3</i>
<i>3</i>	<i>2</i>	<i>8</i>	<i>20</i>	<i>22</i>	<i>2.28</i>
<i>4</i>	<i>3</i>	<i>10</i>	<i>26</i>	<i>14</i>	<i>2.08</i>
<i>5</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>20</i>	<i>26</i>	<i>2</i>
<i>6</i>	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>25</i>	<i>16</i>	<i>2.14</i>
<i>7</i>	<i>3</i>	<i>7</i>	<i>21</i>	<i>22</i>	<i>2.30</i>
<i>8</i>	<i>2</i>	<i>8</i>	<i>18</i>	<i>24</i>	<i>2.32</i>
<i>9</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>22</i>	<i>23</i>	<i>2.36</i>
<i>10</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>19</i>	<i>27</i>	<i>2.46</i>
<i>11</i>	<i>3</i>	<i>11</i>	<i>25</i>	<i>14</i>	<i>2.06</i>
<i>12</i>	<i>4</i>	<i>10</i>	<i>26</i>	<i>12</i>	<i>1.96</i>
<i>13</i>	<i>1</i>	<i>8</i>	<i>21</i>	<i>21</i>	<i>2.26</i>
<i>14</i>	<i>1</i>	<i>8</i>	<i>18</i>	<i>24</i>	<i>2.32</i>
<i>15</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>21</i>	<i>24</i>	<i>2.38</i>
<i>16</i>	<i>2</i>	<i>7</i>	<i>22</i>	<i>21</i>	<i>2.28</i>
<i>17</i>	<i>3</i>	<i>10</i>	<i>30</i>	<i>10</i>	<i>2</i>
<i>18</i>	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>31</i>	<i>10</i>	<i>2.02</i>
<i>19</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>23</i>	<i>22</i>	<i>2.34</i>
<i>20</i>	<i>2</i>	<i>7</i>	<i>22</i>	<i>21</i>	<i>2.28</i>
<i>21</i>	<i>4</i>	<i>10</i>	<i>26</i>	<i>14</i>	<i>2.08</i>
<i>22</i>	<i>3</i>	<i>8</i>	<i>18</i>	<i>24</i>	<i>2.32</i>
<i>23</i>	<i>2</i>	<i>9</i>	<i>19</i>	<i>22</i>	<i>2.26</i>
<i>24</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>18</i>	<i>27</i>	<i>2.42</i>
<i>25</i>	<i>3</i>	<i>7</i>	<i>20</i>	<i>23</i>	<i>2.32</i>
<i>26</i>	<i>4</i>	<i>12</i>	<i>20</i>	<i>18</i>	<i>2.02</i>
<i>27</i>	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>25</i>	<i>16</i>	<i>2.14</i>
<i>28</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>25</i>	<i>21</i>	<i>2.34</i>

Tabla 2. Valores medios de glucógeno por grupos de comportamiento en la plaza.

<i>COMPORTAMIENTO</i>	<i>Nº DE TOROS</i>	<i>VALORES MEDIOS</i>
1	4	2.31±0.04
2	8	2.30±0.36
3	15	2.22±0.16
4	3	2.02±0.06¹
Control	2	2.68±0.13²

¹ Existen diferencias estadísticamente significativas con los 3 primeros grupos y el control ($p<0.05$).² Existen diferencias estadísticamente significativas con los 4 grupos ($p<0.05$).

Figura 1. El nivel de glucógeno en hígado es bajo, en campos de valor 1 (A), donde la mayoría de los hepatocitos no presentan glucógeno en su interior, mientras que el nivel de glucógeno es alto, en campos de valor 3 (B), donde la mayoría de los hepatocitos están repletos de glucógeno. Hígado de toros de lidia. PAS. Barra = 30 mm.

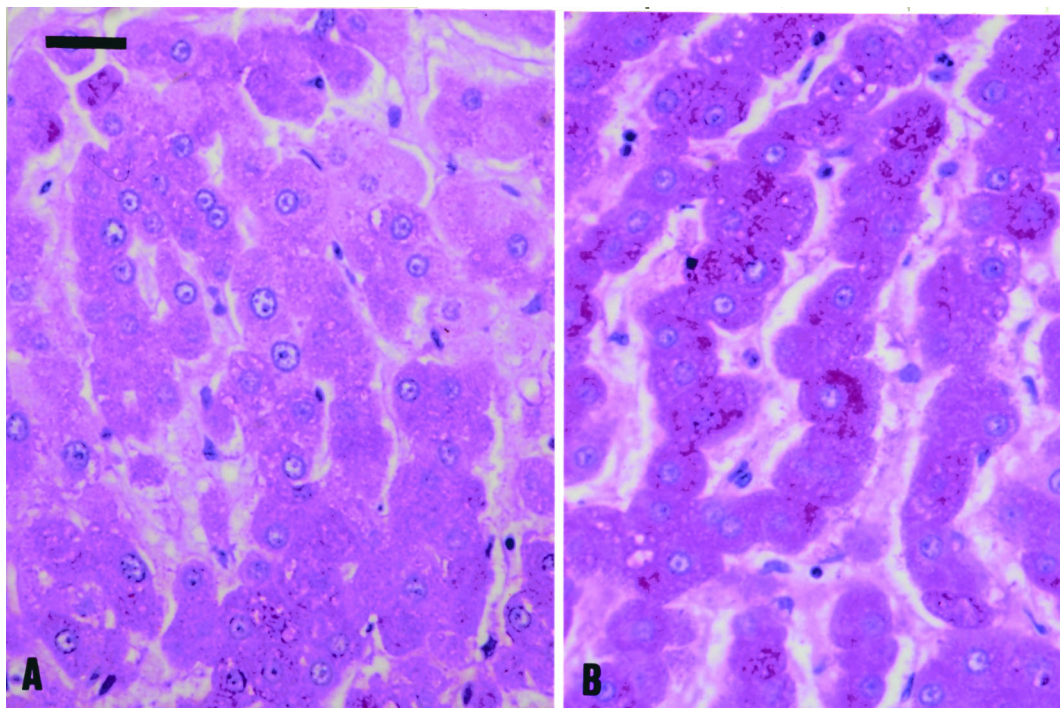
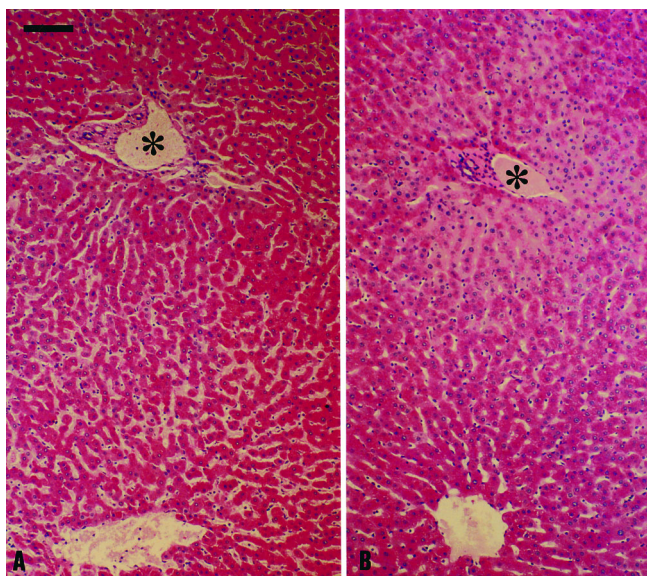


Figura 2. Se observa como en los toros no lidiados (A) la presencia de glucógeno es panlobulillar, abarcando desde la vena centrolobulillar hasta los espacios porta (*), a diferencia de los toros lidiados (B) donde la presencia de glucógeno en los hepatocitos próximos al espacio porta (*) es escasa, presentando el glucógeno distribución centrolobulillar. Hígado de toros de lidia. PAS. Barra=110 μ m



Las lesiones hepáticas observadas en los toros lidiados correspondían a procesos parasitarios crónicos, con pequeños infiltrados inflamatorios y fibrosis (6 animales), y degeneración grasa (4 animales).

DISCUSIÓN

Este estudio se basa en la aplicación de técnicas histoquímicas para la valoración objetiva de la cantidad de glucógeno hepático en el toro de lidia como parámetro indicativo de las alteraciones funcionales que manifiestan los animales en la plaza. Los procesos lesionales observados en el hígado de los animales estudiados no tienen suficiente entidad como para comprometer en modo alguno la normal actividad funcional del mismo.

Los toros, antes de su lidia, son trasladados con una antelación mínima de 48 horas a la plaza, quedando encerrados en corrales donde hay pesebres con alimento y agua. Allí están el tiempo suficiente para que se repongan los niveles de glucógeno que han disminuido como consecuencia de los requerimientos extra de energía de los almacenes de glucógeno, tanto hepático como muscular, por el ayuno y estrés sufrido en el viaje (FERNÁNDEZ *et al.*, 1995). La mañana de la corrida los toros son sometidos a la inspección veterinaria y las manipulaciones del apartado o enchiqueramiento que les genera estrés; posteriormente se mantienen durante 6 horas aproximadamente en ayuno, situación similar a la que ocurre con los animales control que también están unas horas en ayuno en el matadero, donde sufren además el estrés del trans-

porte y manipulación en las cuerdas. Por tanto, los animales antes de ser lidiados y los control antes de ser sacrificados presentarían valores de glucógeno similares (FERNÁNDEZ *et al.*, 1995; DE BOECK *et al.*, 2000), por lo que la diferencia entre ambos grupos en el nivel de glucógeno se produciría durante la lidia.

La distribución de glucógeno en el interior del hígado de los toros lidiados es centrolobulillar, a diferencia de los control, que es panlobulillar. Esta localización indicaría que las zonas portales son aquellas donde primero han comenzado los fenómenos de formación de glucosa a partir de glucógeno, en respuesta directa a los cambios de glucosa circulante que son mediados por estímulos hormonales, debido a la situación de esfuerzo (MOORE *et al.*, 1998). La información llegaría al hígado por la circulación arterial, por lo que el gradiente de liberación de este glucógeno sería desde los espacios porta hacia la vena centrolobulillar, al contrario del gradiente de almacenamiento que indican BABCOCK y CARDELL (1974). Los animales control, que presentaron una distribución panlobulillar, no tenían necesidades energéticas altas, por no estar sometidos al ejercicio, por lo que el glucógeno se almacena en todos los hepatocitos.

Los toros que habían sido lidiados presentaban menor cantidad de glucógeno que los animales no lidiados y que se utilizaron como control, como consecuencia del intenso ejercicio al que son sometidos durante la lidia, al igual que se observa en otros animales tras el ejercicio (LATOURET *et al.*, 1999; BEITZ, 1999). Esta disminución de glucógeno se debe a la producción de glucosa, como consecuencia de la glucogenólisis, estimulada al existir un descenso de glucosa sanguínea junto a un aumento de insulina y/o descenso de glucagón,

propio de los estados de ejercicio (KJAER, 1998; LATOURET *et al.*, 1998). Además los músculos del toro de lidia tienen mayoritariamente fibras musculares con metabolismo glucolítico a diferencia de otras especies (MARTÍNEZ GOMARIZ *et al.*, 1997-98), por lo que necesitan glucosa sanguínea para su normal funcionamiento, que contribuirá a la rápida movilización de glucógeno hepático.

Al comparar la cantidad de glucógeno hepático con el comportamiento de los animales en la plaza, se observó que los animales de los 3 primeros grupos presentaron valores muy similares, aunque significativamente mayores a los del grupo 4. Estos resultados indican que los niveles de glucógeno hepático son significativamente más bajos para los animales que presentaron mayor debilidad y aunque ésta tenga causas multifactoriales, puede estar influenciada, en cierto modo, por las necesidades de glucosa en músculo en respuesta directa a las demandas energéticas requeridas para la lidia. De tal manera que si los animales que presentan más debilidad, son aquellos que tienen un mayor porcentaje de fibras con metabolismo glucolítico, por tener menos resistencia a la fatiga como afirman MARTÍNEZ GOMARIZ *et al.* (1997-98), estos tendrían mayores necesidades de glucosa en músculo, lo que induciría a un descenso de los niveles de glucógeno hepático como se demuestra en nuestro estudio.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a D. Juan Sánchez Gil y D. Carlos De Jodar Hernández por su labor técnica laboratorial en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- BABCOCK, M.B., CARDELL, R.R.. 1974. Hepatic glycogen patterns in fasted and fed rats. *Am. J. Anat.* 140:229.
- BEITZ, D.C. 1999. Metabolismo de carbohidratos. En: *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. M.J. Swenson y W.O. Reece. Uthea Noriega Editores. 5ª Edición. Mexico.
- BOLLEN, M., KEPPENS, S., STALMANS, W. 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336: 19-31.
- BORBA-MURAD, G.R, DE SOUZA, H.M., LOPES, G., FERREIRA, E.B., DAMBROSO, D., BAZOTTE, R.B. 1998. Changes in glycemia induced by exercise in rats: contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 102: 113-123.
- CUNNINGHAM, J.G. 1999. Utilización de nutrientes después de su absorción. En: *Fisiología Veterinaria*. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. 2ª Edición. México.
- DE BOECK, G., VLAEMINCK, A., VAN DER LINDEN, A., BLUST, R. 2000. The energy metabolism of common carp (*Cyprinus carpio*) when exposed to salt stress: an increase in energy expenditure or effects of starvation?. *Physiol. Biochem. Zool.* 73: 102-111.
- FEBBRAIO, M.A., KOUKOULAS, I. 2000. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* 89: 1055-1060.
- FERNÁNDEZ, X., MEUNIER-SALAUN, M.C., ECOLAN, P., MORMEDE, P. 1995. Interactive effect of food deprivation and agonist behavior on blood parameters and muscle glycogen in pigs. *Physiol. Behav.* 58: 337-345.
- GEOR, R.J., HINCHCLIFF, K.W., SAMS, R.A. 2000. Glucose infusion attenuates endogenous glucose production and enhances glucose use of horses during exercise. *J. Appl. Physiol.* 88: 1765-1776.
- JUNGERMANN, K., KIETZMANN, T. 1997. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int.* 51: 402-412.
- KJAER, M. 1998. Hepatic glucose production during exercise. *Adv. Exp. Med. Biol.* 441: 117-127.
- LATOUR, M.G., DESY, F., WARREN, C., LAVOIE, J.M. 1998. Effects of hepatic portal infusion of deionized water on metabolic and hormonal responses to exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* 84: 1653-1660.
- LATOUR, M.G., BRAULT, A., HUET, P.M., LAVOIE, J.M. 1999. Effects of acute physical exercise on hepatocyte volume and function in rat. *Am. J. Physiol.* 276: 1258-1264.
- MARTÍNEZ GOMARIZ, F., VÁZQUEZ, J.M., MORENO, F., GIL, F., RAMIREZ ZARZOSA, G., LATORRE, R., ALBORS, O. 1997-98. Tipos de fibras en el músculo esquelético del toro de lidia (*Bos taurus Ibericus*). Estudio histoquímico y morfométrico. *An. Vet.* 13-14: 35-44.
- MOORE, M.C., CONNOLLY, C.C., CHERRINGTON, A.D. 1998. Autoregulation of hepatic glucose production. *Eur. J. Endocrinol.* 138: 240-248.