

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ABSORCIÓN, TRANSPORTE Y UTILIZACIÓN DE LOS LÍPIDOS  
DIETÉTICOS EN EL INTESTINO E HÍGADO DE DORADA (SPARUS  
AURATUS) Y LUBINA (DICENTRARCHUS LABRAX)**

**M<sup>a</sup> JOSÉ CABALLERO CANSINO**

Las Palmas de Gran Canaria, 2002

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA - DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**  
**INSTITUTO CANARIO DE CIENCIAS MARINAS**

**TESIS DOCTORAL**

**ABSORCIÓN, TRANSPORTE Y UTILIZACIÓN DE LOS  
LÍPIDOS DIETÉTICOS EN EL INTESTINO E HÍGADO DE  
DORADA (*Sparus auratus*) Y LUBINA (*Dicentrarchus labrax*)**

**Memoria que presenta la Licenciada M<sup>a</sup> JOSE CABALLERO CANSINO para  
la colación del Grado de Doctor en Veterinaria en la Universidad de Las Palmas  
de Gran Canaria.**

**Las Palmas de Gran Canaria, Octubre 2002.**



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

**María Soledad Izquierdo López**, Catedrática del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

hace constar que la presente memoria “Absorción, transporte y utilización de los lípidos dietéticos en el intestino e hígado de dorada (*Sparus auratus*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*)”, de la que es autora la licenciada en Veterinaria Dña. **M<sup>a</sup> José Caballero Cansino**, ha sido realizada bajo su dirección, siendo así mismo revisada y aceptada para la colación del grado de Doctor en Veterinaria en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Las Palmas de Gran Canaria, a 19 de Julio de 2002.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**  
TEL.: 45 14 37 – FAX: 45 34 20  
APARTADO DE CORREOS, 550  
35080 LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, ESPAÑA

**Antonio Jesús Fernández Rodríguez**, Catedrático del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria,

hace constar que la presente memoria “Absorción, transporte y utilización de los lípidos dietéticos en el intestino e hígado de dorada (*Sparus auratus*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*)”, de la que es autora la licenciada en Veterinaria Dña. **M<sup>a</sup> José Caballero Cansino**, ha sido realizada bajo su dirección, siendo así mismo revisada y aceptada para la colación del grado de Doctor en Veterinaria en esta Universidad.

Las Palmas de Gran Canaria, a 19 de Julio de 2002.

*Audentis Fortuna iuvat*

Virgilio

***A MIS PADRES***

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	V
<b>RESUMEN</b> .....	VIII
<b>ABREVIATURAS</b> .....	X
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Importancia del cultivo y la nutrición de la dorada y la lubina</b> .....	1
<b>1.2. Importancia de los lípidos en las dietas para peces</b> .....	3
<b>1.3. Digestión de los lípidos en los peces</b> .....	5
<b>1.4. Mecanismo de absorción de los lípidos en peces. Síntesis intestinal de triacilgliceroles y fosfolípidos en el enterocito</b> .....	7
<b>1.5. El transporte de lípidos y el metabolismo de las lipoproteínas en peces</b> .....	16
<b>1.6. Metabolismo hepático de los lípidos en peces</b> .....	20
<b>1.7. Objetivos</b> .....	24
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	25
<b>2.1. Instalaciones y peces experimentales</b> .....	25
<b>2.2. Dietas</b> .....	26
<b>2.3. Parámetros biológicos</b> .....	26
2.3.1. Crecimiento .....	26
2.3.2. Índice hepatosomático .....	26
<b>2.4. Estudios histológicos</b> .....	27
2.4.1. Recogida de muestras .....	27
2.4.2. Inclusión en parafina .....	27
2.4.3. Inclusión en resina. ....	28
2.4.3.1. Cortes semifinos .....	29
2.4.4. Cortes en congelación.....	29

2.4.5. Análisis de imagen.....	30
2.4.5.1. Análisis morfométrico del hígado.....	30
2.4.5.2. Análisis morfométrico del intestino.....	30
<b>2.5. Separación y caracterización de lipoproteínas plasmáticas.....</b>	<b>31</b>
2.5.1. Recogida de muestras.....	31
2.5.2. Separación de lipoproteínas.....	31
2.5.3. Extracción de lípidos totales.....	32
2.5.4. Separación de lípidos polares y neutros.....	33
2.5.5. Separación de clases lipídicas.....	33
2.5.6. Determinación de ácidos grasos.....	34
2.5.7. Determinación de proteína soluble.....	36
<b>2.6. Ensayos enzimáticos.....</b>	<b>36</b>
2.6.1. Materiales.....	36
2.6.2. Recogida de muestras.....	36
2.6.3. Preparación de microsomas intestinales.....	37
2.6.4. Incubaciones.....	39
2.6.4.1. Ensayo vía glicerol-3-fosfato.....	39
2.6.4.2. Ensayo vía monoacilglicerol.....	41
<b>2.7. Tratamiento estadístico.....</b>	<b>42</b>
<b>3. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA HISTOLOGÍA DEL HÍGADO</b>	
<b>3.1. Introducción.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2. Efectos del porcentaje de lípidos y la calidad de la harina de pescado en dietas de engorde para dorada.....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Condiciones experimentales.....	45
3.2.2. Resultados.....	50
3.2.3. Iconografía.....	55
3.2.4. Discusión.....	61

<b>3.3. Efectos a medio plazo de la inclusión de niveles moderados de aceites vegetales en sustitución del aceite de pescado en dietas para dorada y lubina</b> .....	67
3.3.1. Condiciones experimentales .....	67
3.3.2. Resultados.....	71
3.3.3. Iconografía.....	78
3.3.4. Discusión. ....	89
<b>3.4. Efectos a largo plazo de la inclusión de niveles moderados y extremos de aceites vegetales en sustitución del aceite de pescado en dietas para dorada y lubina, y de su alimentación posterior con aceite de pescado exclusivamente</b> .....	97
3.4.1. Condiciones experimentales .....	97
3.4.2. Resultados.....	101
3.4.3. Iconografía.....	109
3.4.4. Discusión. ....	117
<b>4. UTILIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS EN DORADA. EFECTO DE LA CALIDAD DE LOS LÍPIDOS</b>	
4.1. Justificación y objetivos.....	122
4.2. Condiciones experimentales .....	123
4.3. Resultados.....	125
4.4. Discusión .....	142
<b>5. EFECTO DE LOS LÍPIDOS EN LA HISTOLOGÍA DEL INTESTINO</b>	
5.1. Introducción .....	151
5.2. Efectos del porcentaje de lípidos y la calidad de la harina de pescado en dietas de engorde para dorada .....	151
5.2.1. Condiciones experimentales .....	152

---

5.2.2. Resultados.....	157
5.2.3. Iconografía.....	160
5.2.4. Discusión .....	166
<b>5.3. Efectos a medio plazo de la inclusión de niveles moderados de aceites vegetales en dietas sobre la morfología del intestino de dorada y lubina .....</b>	<b>170</b>
5.3.1. Condiciones experimentales .....	170
5.3.2. Resultados.....	174
5.3.3. Iconografía.....	177
5.3.4. Discusión. ....	186
<b>5.4. Efectos de la inclusión de niveles moderados y extremos de aceites vegetales en sustitución del aceite de pescado sobre la morfología y composición bioquímica del intestino de dorada.....</b>	<b>189</b>
5.4.1. Condiciones experimentales .....	189
5.4.2. Resultados.....	193
5.4.3. Iconografía.....	205
5.4.4. Discusión. ....	213
<b>6. ESTUDIO DE LAS RUTAS DE REACILACIÓN DE TRIACILGLICEROLES Y FOSFOLÍPIDOS EN MICROSOMAS INTESTINALES DE DORADA. EFECTO DE LA CALIDAD DE LOS LÍPIDOS</b>	
6.1. Justificación y objetivos.....	220
6.2. Condiciones experimentales .....	223
6.3. Resultados.....	225
6.4. Discusión .....	238
<b>7. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>244</b>
<b>8. REFERENCIAS CITADAS .....</b>	<b>248</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar en primer lugar mi más profundo agradecimiento a la Dr. Marisol Izquierdo López, Catedrática del Departamento de Biología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria y directora de esta tesis. Su valía tanto profesional como personal ha sido esencial para la finalización de este trabajo, además el inagotable entusiasmo que deposita en cada trabajo ha logrado instruir mis deseos de aprender y de investigar. Su criterio sigue siendo para mí de gran valor en el desarrollo de mi trabajo.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Antonio Fernández Rodríguez, Catedrático del Departamento de Morfología de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria y codirector de esta tesis, por haber confiado en mí desde un principio y por su disponibilidad en todo momento para resolver las necesidades que me surgieron.

A D. Hipólito Fernández-Palacios Barber, Técnico Superior y Jefe de Sección de cultivos marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas, por su apoyo y confianza depositados en todo momento en este trabajo.

A la Dra. Lidia E. Robaina Robaina, al Dr. Daniel Montero Vítores y a D. Juan Socorro Cruz, por resolverme muchas dudas y problemas que eventualmente surgieron en el desarrollo de este estudio y, sobre todo porque han sido para mí mucho más que compañeros de trabajo.

A Dña. Regina Morales y Dña. Carmen Quintana, técnicos del laboratorio de Nutrición del Instituto Canario de Ciencias Marinas, por su excelente talento y por la cordial atmósfera de trabajo que tuvimos durante la realización de los análisis bioquímicos de esta tesis y, sobre todo, su sincera amistad.

## *Agradecimientos*

---

---

Un agradecimiento muy especial al resto de mis compañeros del GIA: Dr. Carmen Maria Hernández Cruz, D. Antonio Valencia, Dr. José Manual Vergara Martín, Dña. Eloisa Matus, Dña. Dominique Schuchardt, D. Javier Roo, Dña. Mapi Viera, Dña. Gloria Acebedo, Dña. Lucía Molina Domínguez, en quienes siempre encontré ayuda cuando la necesité.

A los técnicos de la nave de cultivos, Dña. Ada Martín, Dña. Monebia Suárez y D. Manolo San Román, por su excelente labor en el desarrollo de los experimentos y su buen humor durante los muestreos.

A mi compañero de despacho D. Agustín Fernández, por su sincera amistad y su incondicional apoyo.

Mi agradecimiento también a D. Miguel Medina y al personal del Instituto Canario de Ciencias Marinas, por la indispensable ayuda prestada a lo largo de estos años.

Al personal de la empresa de Alevines y Doradas, ADSA que han facilitado los peces para el desarrollo de los experimentos de esta tesis.

A la Dra. Grethe Rosenlund y al Dr. Alex Obach, de Nutreco Aquaculture Research Centre (Stavanger, Noruega) por su excelente colaboración en la elaboración de las dietas y su confianza depositada en todo momento en nuestro grupo de investigación.

A la Dra. Bente Torstensen, del Instituto de Nutrición de la Universidad de Bergen (Noruega) por las facilidades prestadas, sus sugerencias en el desarrollo de los análisis de las lipoproteínas y su disponibilidad en todo momento para colaborar con nuestro grupo de investigación.

A la Dr. Elin Kjørsvik y a todo su equipo del Brattøra Research Center, (Trondheim, Noruega) por su increíble hospitalidad y su paciencia en el aprendizaje de las técnicas de microscopía electrónica de esta tesis.

A la Dr. Fernanda Fanjul, al Dr. Germán Gallardo y a sus colegas del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por su desinteresada colaboración y su gentileza prestada en todo momento durante el tiempo de los experimentos en su laboratorio.

De un modo especial quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Carlos Gómez Villamandos del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada de la Universidad de Córdoba, por su desinteresada colaboración y su valiosa aportación en el estudio ultraestructural de esta tesis.

A los miembros del Departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria: D. Pedro Castro, Dr. Antonio Espinosa, Dr. Marisa, Dr. Pedro Herráez, Dr. Paco Guisado, Dr. Jorge Orós, Dr. José Luis, y Dña. Any, por ofrecerme su ayuda en cualquier momento desde un principio.

Mi más sincero agradecimiento a D. Escolástico Aguilera Tejero, quién realmente me animo para que comenzase este trabajo, a sus acertados consejos, su inagotable paciencia y su insustituible amistad.

## **RESUMEN**

Los lípidos constituyen un componente de gran importancia estructural y funcional en los teleósteos. La elevación de los niveles de lípidos en las dietas comerciales para peces de cultivo tiene un gran interés, ya que permite reducir los niveles de proteína dietética que es el componente más abundante y caro de las dietas para peces. Sin embargo, la limitación en la producción de aceite de pescado, tradicionalmente la principal fuente de lípidos en las dietas para peces, y el paulatino incremento de su coste, favorecen la inclusión de aceites de origen vegetal. En consecuencia, el aumento progresivo de lípidos en las dietas y la inclusión de aceites vegetales alternativos al aceite de pescado son dos tendencias nutricionales que han tomado una especial relevancia en los últimos años.

La mayoría de los trabajos de investigación están orientados a determinar los efectos de los lípidos dietéticos sobre el crecimiento o la eficiencia del alimento. Sin embargo, todavía se desconocen muchos aspectos del metabolismo de los lípidos en peces y de cómo estos organismos utilizan los lípidos dietéticos. Entre los aspectos que se desconocen destacan aquellos relacionados con la absorción y el transporte de los lípidos dietéticos. Así, el metabolismo de los lípidos en la célula intestinal y los posibles efectos de éstos sobre la morfología del intestino han sido poco estudiados en los peces. Además, la efectividad de los lípidos dietéticos requiere de un óptimo transporte de éstos por el organismo, por lo que el estudio de las lipoproteínas plasmáticas es particularmente importante para optimizar las dietas. Por otro lado, la manipulación de los lípidos dietéticos ha provocado la aparición de alteraciones histológicas principalmente en el hígado, tales como la esteatosis hepática. Hasta el momento se desconocen las causas de su presencia y sus repercusiones en la salud de los peces cultivados en condiciones de producción intensiva.

Por todo ello, en el presente trabajo se estudian los efectos del incremento de los lípidos en las dietas y la utilización de aceites vegetales alternativos al aceite de pescado sobre el transporte de los lípidos, el metabolismo lipídico del hígado e intestino y los cambios histológicos de ambos órganos en dorada y lubina.

Como conclusión, los resultados muestran que no solo la cantidad total de lípidos sino también la calidad de la proteína utilizada y la calidad de los lípidos dietéticos afectan a la morfología del hígado. Así, se confirma que la reducción del contenido de ácidos grasos esenciales en la dieta tiende a ocasionar una deposición de lípidos en el hígado. Pero además, los distintos ácidos grasos no esenciales incluidos en la dieta afecta de distinta manera a la morfología del hepatocito, estableciéndose un orden entre estos ácidos grasos y la aparición de esteatosis hepática en los peces marinos,  $18:2n-6 > 18:1n-9 > 18:3n-3 > n-3$  HUFA. Sin embargo, los resultados de este trabajo han mostrado que estas alteraciones morfológicas del hígado son recuperables. En relación al transporte de lípidos, se muestra que la composición de las lipoproteínas plasmáticas esta influenciada por la composición de ácidos grasos de la dieta. Así, la inclusión de aceites vegetales modifica principalmente el porcentaje de triacilgliceroles y colesterol en las diferentes fracciones lipoprotéicas, dependiendo principalmente del contenido dietético de los n-3 HUFAs en las dietas. El estudio histológico del intestino ha mostrado que la inclusión de aceites vegetales incrementan la deposición de grasa en el enterocito, debida a la acumulación preferente de los ácidos grasos de 18 carbonos, abundantes en dichos aceites, en los triglicéridos de la célula. Finalmente, los resultados de los análisis enzimáticos del intestino sugieren que en los enterocitos de dorada la principal vía de síntesis de PL es la del glicerol-3-fosfato, teniendo posiblemente la vía monoacilglicerol menor importancia que en mamíferos. Además, se pone de manifiesto que la composición de los lípidos de la dieta afecta la reaclación de los mismos en el enterocito.

**ABREVIATURAS**

- AAT:** acil-CoA acyltransferasa  
**AGEs:** ácidos grasos esenciales  
**AGL:** ácidos graso libre  
**ANOVA:** análisis normal de varianza  
**ARA:** ácido araquidónico (20:4n-6)  
**ATP:** adenosin trifosfato  
**AT& FB:** azul de toluidina y fuschina básica  
**BAL:** lipasa neutra no específica activada por las sales biliares (bile salt activated lipase)  
**CDP:** citidin difosfato  
**CE:** ésteres de colesterol  
**CG:** complejo de Golgi  
**CHO:** colesterol  
**CMP:** citidin monofosfato  
**CoA:** coenzima A  
**DAG:** diacilglicerol  
**DHA:** ácido docosahexaenoico (22:6n-3)  
**DGAT:** diacilglycerol transferasa  
**DGCPT:** DG:colina fosfotransferasa  
**DGEPT:** DG:etanolamina fosfotransferasa  
**DTT:** dithiothreitol  
**ei:** espacio intercelular  
**EPA:** ácido eicosapentaenoico (20:5n-3)  
**FABP:** proteína fijadora de ácidos grasos (fatty acid binding protein)  
**FACS:** acil-CoA sintetasa  
**GPAT:** 1-acilglycerol-3-fostato aciltransferasa  
**H&E:** hematoxilina-eosina  
**HDL:** lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein)  
**HSI:** índice hepatosomático
-

- IDL:** lipoproteína de densidad intermedia (intermediate density lipoprotein)  
**L:** lumen intestinal  
**Lp:** lámina propia  
**LPC:** lisofosfatidilcolina  
**LCAT:** lecitina colesterol acil-transferasa  
**LDL:** lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein)  
**LPL:** lipoproteína lipasa  
**mb:** membrana basal  
**MGAT:** monoacilglycerol aciltransferasa  
**n:** núcleo celular  
**n-3 HUFA:** ácidos grasos insaturados de más de 20 carbonos de la serie n-3 (highly unsaturated fatty acids)  
**NL:** lípidos neutros  
**PA:** ácido fosfatídico  
**PAS:** ácido periódico-reactivo de Schiff  
**PC:** fosfatidilcolina  
**PE:** fosfatidiletanolamina  
**PI:** fosfatidilinositol  
**PL:** fosfolípidos  
**PLA<sub>2</sub>:** fosfolipasa tipo A<sub>2</sub>  
**PPH-1:** fosfatídico fosfohidrolasa  
**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acid)  
**QM:** quilomicron  
**REL:** retículo endoplásmico liso  
**RER:** retículo endoplásmico rugoso  
**sd:** desviación estándar  
**TAG:** triacilglicerol  
**VL:** vacuola lipídica  
**VHDL:** lipoproteína de muy alta densidad (very high density lipoprotein)  
**VLDL:** lipoproteína de muy baja densidad (very low density lipoprotein)

## ***INTRODUCCIÓN***

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 IMPORTANCIA DEL CULTIVO Y LA NUTRICIÓN DE LA DORADA Y LA LUBINA.

La dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) son las dos especies más importantes de la acuicultura Europea. El cultivo comercial de ambas especies comenzó hacia los años 80, desarrollándose principalmente en los países Mediterráneos, particularmente en Grecia, Italia y España. A partir de los años 90 se produjo un notable incremento en la producción de estas especies en estos países y una clara expansión en otros, como Turquía, Túnez, Malta, Chipre o Israel. Los datos de producción industrial sobre el año 2001 publicados por la Federación Europea de Productores de Acuicultura (Federation of European Aquaculture Producers, FEAP), indican que la producción europea de dorada alcanzó las 70.000 toneladas y la de lubina cerca de las 50.000. En concreto en España la producción de dorada aumentó en 4.750 toneladas entre los años 2000 y 2001 y la de lubina en 450 (Fig. 1).

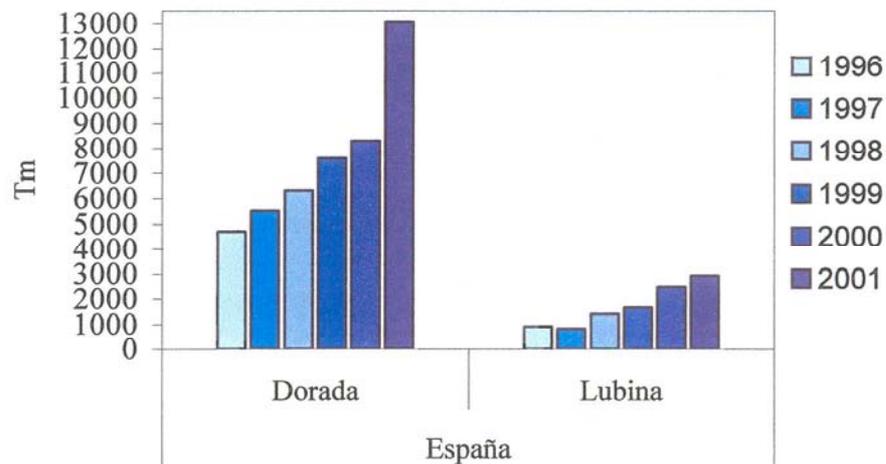


Fig. 1. Producción de dorada y lubina en España durante los últimos años (Datos tomados de la FEAP).

Para beneficiarse de este progresivo aumento en la producción, las empresas acuícolas tienen como principal objetivo maximizar el crecimiento y la supervivencia con el mínimo coste (KNIGHTS, 1985). Un eslabón para alcanzar este objetivo es la mejora de la alimentación, que representa uno de los principales costes en la producción intensiva de peces.

Pero para elaborar alimentos que satisfagan los requerimientos fisiológicos y metabólicos de las especies a cultivar es esencial conocer las funciones e implicaciones fisiológicas de los principales nutrientes dietéticos en los peces. La interacción de estos nutrientes esenciales en la dieta tiene su base en el clásico modelo diseñado para optimizar el crecimiento, donde la proteína dietética debe ser destinada principalmente a la constitución de los tejidos, como reflejo de síntesis y deposición proteica, y los lípidos se deben utilizar esencialmente como fuente de energía y como componentes estructurales de las membranas celulares. Los carbohidratos tienen una menor importancia debido en parte a la limitada capacidad de uso que presentan los peces en comparación con otros vertebrados (HALVER, 1989) (Fig.2). Un desequilibrio en este modelo supondría un derroche desde el punto de vista nutricional, económico y ecológico.

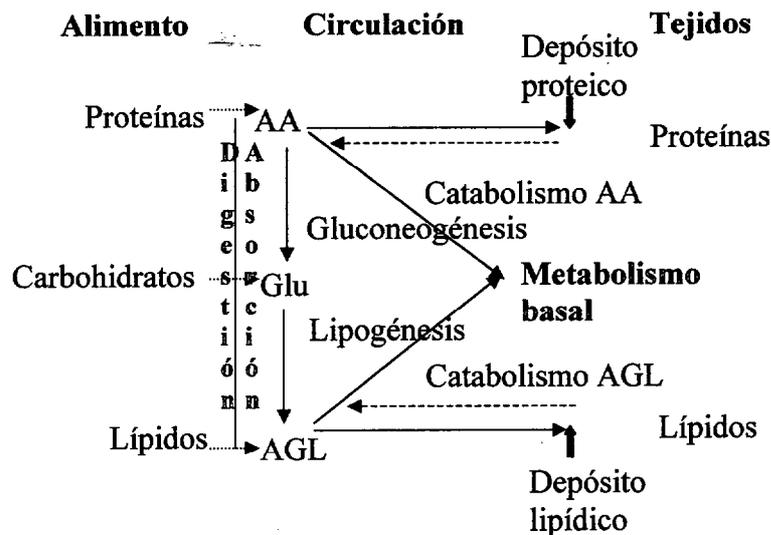


Fig. 2. Interacciones entre los principales nutrientes de la dieta. (AA: amino ácidos; Glu: glucosa; AGL: ácidos grasos libres).

## 1.2 IMPORTANCIA DE LOS LÍPIDOS EN LAS DIETAS PARA PECES

Los lípidos dietéticos tienen una especial importancia como fuente de energía y ácidos grasos esenciales en los peces, y como vehículos de sustancias liposolubles (vitaminas, pigmentos, etc), facilitando su incorporación en el organismo. Además, los lípidos son imprescindibles para el mantenimiento de la estructura de las membranas celulares y su correcto funcionamiento. Así, por ejemplo, la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos que constituyen las membranas gobierna el estado de fluidez de las mismas (BELL *et al.*, 1986). Además, el fosfatidilinositol, presente en dichas membranas y caracterizado en peces no solo por los ácidos grasos 18:0 y 20:4n-6 sino también por su contenido en 20:5n-3, juega un papel importante en la traducción de las señales hormonales y en el aporte de precursores de eicosanoides (SARGENT *et al.*, 1989) tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, todos ellos con efectos fisiológicos importantes. Por otra parte, estudios recientes han demostrado la importancia de los lípidos dietéticos en la resistencia de los peces a las enfermedades y al estrés propio de cultivos (MONTERO e IZQUIERDO, 1998).

Algunos ácidos grasos importantes no pueden o sus precursores no pueden ser sintetizados por los peces, lo que tienen que ser administrados en la dieta y se consideran esenciales. Estos ácidos grasos son principalmente los ácidos docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) y eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) derivados del ácido linolénico (18:3n-3), y el ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) derivado del ácido linoleico (18:2n-6). Los salmónidos, anguilas y peces de agua dulce en general poseen los complejos enzimáticos necesarios para alargar y desaturar los ácidos linoleico y linolénico, esenciales para estas especies, y sintetizar ARA, EPA y DHA. Sin embargo, en los peces marinos la actividad de dichos complejos es insuficiente, por lo que requieren la presencia de ARA, EPA y DHA en su dieta para cubrir sus requerimientos de ácidos grasos esenciales. Los requerimientos de ácidos grasos esenciales para alevines y juveniles de dorada han sido estimados entre 0.9 y 1.9% de

la dieta de n-3 HUFA (ácidos grasos polinsaturados de 20 o más carbonos: Highly Unsaturated Fatty acids) (KALOGEROPOULOS *et al.*, 1992; IBEAS *et al.*, 1994).

Además de su importancia estructural y funcional, los lípidos tienen una especial relevancia en las dietas comerciales para peces de cultivos. Su incremento en la dieta permite reducir los niveles de proteína dietética, componente más abundante y caro de las dietas para peces. De esta forma, el pez puede dedicar una mayor proporción de estas proteínas dietéticas para la reposición de proteínas corporales y por tanto para el crecimiento o la reproducción. Este efecto de los niveles lipídicos dietéticos sobre el metabolismo de las proteínas en los peces se conoce como “efecto ahorrador”. VERGARA *et al.*, (1996) demostraron un efecto “ahorrador” de los lípidos en dietas para dorada, cuando se incrementaban los niveles de éstos de 9 a 15%, con resultados de mayor crecimiento. En muchas otras especies también se ha estudiado este efecto, así, por ejemplo, BEAMISH y MEDLAND (1986) encontraron un crecimiento óptimo en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) administrando dietas con el nivel mínimo de proteínas (30%) si incrementaban el nivel de lípidos del 12 al 24%. VAN DER MEER *et al.*, (1997) describieron también un aumento en la deposición proteica en *Colossoma macropomun* alimentados con dietas con un alto nivel lipídico.

Por todo ello, el contenido de lípidos en las dietas comerciales para peces de cultivo ha ido incrementándose, y con ello la relevancia de los estudios sobre los lípidos en la nutrición de los peces. Por otra parte, la trascendencia de estas investigaciones en el desarrollo industrial de la Acuicultura se va acentuando con la reducción de la disponibilidad de aceite de pescado y el incremento de su precio, por ser aquella la principal fuente de lípidos y de ácidos grasos esenciales en las dietas para peces de cultivo (CABALLERO *et al.*, en prensa; IZQUIERDO *et al.*, datos no publicados).

### 1.3 DIGESTIÓN DE LOS LÍPIDOS EN LOS PECES

El sistema digestivo de la dorada y la lubina, ambas especies carnívoras, se caracteriza por presentar un estómago bien desarrollado y un intestino que se diferencia en 4 ciegos pilóricos, intestino anterior, posterior y ano (CATALDI *et al.*, 1987).

El intestino anterior y ciegos pilóricos son las principales partes del intestino implicadas en la absorción de lípidos en teleósteos (SIRE y VERNIER, 1981; SEGNER *et al.*, 1987; DEPLANO *et al.* 1989, 1990). En general, la digestibilidad de los lípidos dietéticos en peces es alta, alrededor de un 95%. Aunque, la digestibilidad de los distintos ácidos grasos es diferente dependiendo del grado de insaturación y de la longitud de la cadena. Así, los saturados y monoenoos son menos digeribles que los ácidos grasos poliinsaturados (LIED y LAMBERTSEN, 1982; LIE *et al.*, 1987; SIGURGISLADOTTIR *et al.*, 1992; OLSEN y RINGØ, 1997). Por ello se ha sugerido que la absorción de algunos ácidos grasos es más eficiente que la de otros (OLSEN *et al.*, 1998).

Los lípidos dietéticos son hidrolizados en el lumen del tracto digestivo por las enzimas lipolíticas correspondientes, produciendo principalmente ácidos grasos libres, monoacilgliceroles, diacilgliceroles y algo de glicerol. Mientras que en vertebrados superiores la hidrólisis de los lípidos de la dieta es catalizada principalmente por una lipasa pancreática específica, que hidroliza los ácidos grasos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 liberando 2-monoacilgliceroles, en los peces, la principal enzima encargada de la digestión de los lípidos neutros es una lipasa neutra no específica dependiente de sales biliares (bile salt activated lipase, BAL) (IJIMA *et al.*, 1998; IZQUIERDO y HENDERSON, 1998), que hidroliza los enlaces éster de diversos ácidos grasos con la molécula de glicerol. Aunque esta enzima está caracterizada por tener un amplio rango de sustratos, parece presentar una mayor especificidad por los ácidos grasos poliinsaturados (LIED y LAMBERTSEN, 1982; LIE *et al.*, 1987; IJIMA *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 2000).

---

Las fosfolipasas son las enzimas encargadas de la hidrólisis de los fosfolípidos de la dieta. La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ha sido aislada del hepatopáncreas de la dorada japonesa (*Pagrus major*) (IIJIMA *et al.*, 1990), y actúa preferentemente sobre ácidos grasos en posición 2, dando lugar a ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Su actividad también ha sido encontrada en el intestino de otras especies como rodaballo (*Psetta maxima*) (IZQUIERDO y HENDERSON, 1998), dorada y pargo (*Pagrus pagrus*) (IZQUIERDO *et al.*, 2000). Estos productos son absorbidos intactos y sirven como aceptores de grupos acilo resultando en la resíntesis de glicerofosfolípidos.

Una vez digeridos los lípidos dietéticos, su absorción depende de su traslado desde el lumen del intestino hacia la pared del digestivo, de su paso hacia el interior del enterocito y de su transporte desde el enterocito hasta los fluidos extracelulares. Así, los productos de la hidrólisis de los lípidos dietéticos, ácidos grasos libres, monoacilgliceroles, diacilgliceroles y lisofosfolípidos, se agrupan con las sales biliares para formar pequeñas micelas de solo 4 a 6 µm de diámetro que los transportarán hacia el enterocito. El contenido de estas micelas, que también incluye otros lípidos como colesterol y vitaminas liposolubles, atraviesa la membrana celular por difusión y es vertido en el interior del enterocito.

#### 1.4 MECANISMO DE ABSORCIÓN DE LÍPIDOS EN PECES. SÍNTESIS INTESTINAL DE TRIACILGLICEROLES Y FOSFOLÍPIDOS EN EL ENTEROCITO

A pesar de que existen pocos trabajos sobre el mecanismo de absorción de lípidos en peces, desde hace tiempo se ha sugerido que éste no difiere fundamentalmente del mecanismo descrito en mamíferos (BAUERMEISTER *et al.*, 1979; SIRE *et al.*, 1981). La actividad de los enterocitos durante la absorción de las grasas es la de empaquetar a los lípidos junto con proteínas, de forma que se constituyan moléculas estables para el transporte de éstos por la sangre hacia los lugares de su metabolismo y almacén (BREAZILE, 1971; GURR y HARWOOD, 1991).

En el interior de las células intestinales, los ácidos grasos de cadena corta (menos de 12 átomos de carbono) al ser lo suficientemente solubles en el plasma son liberados directamente desde el enterocito a la circulación portal y metabolizados en el hígado (GREENE Y SELIVONCHICK, 1987; SHERIDAN, 1988). Los ácidos grasos de cadena larga y monoacilgliceroles absorbidos emigran hacia las vesículas de retículo endoplásmico, donde son resintetizados en triacilgliceroles o en otros lípidos por un complejo multienzimático (BREAZILE, 1971; SEGNER *et al.*, 1987; GURR y HARWOOD, 1991). Estos ácidos grasos difunden hacia el retículo endoplásmico asociados a una proteína fijadora FABP (fatty acid binding protein), que juega un importante papel en el transporte intracelular de los ácidos grasos absorbidos. Así, OCKNER y MANNING, (1976) demostraron que la inhibición de la proteína FABP intestinal resultaba en una disminución de la incorporación de ácidos grasos en triacilgliceroles. En peces, esta proteína tiene preferencia por los ácidos grasos insaturados de igual forma que ocurre en los mamíferos (GANGL *et al.*, 1980). Según SIRE y VERNIER, (1981) esta proteína es más abundante en peces sometidos a un régimen rico en lípidos, por lo que podría afectar indirectamente en la activación y reactivación de los ácidos grasos.

Las dos principales vías para la reaclilación de ácidos grasos en los enterocitos son la vía *monoacilglicerol* y la *glicerol-3-fosfato*, ambas rutas producen finalmente triacilgliceroles (JOHNSTON, 1977) (ver Fig. 3). La mayoría de las enzimas implicadas en estas rutas han sido identificadas y estudiadas en ratas, sin embargo hay muy pocos trabajos en peces que hagan referencia a ellas, limitando la información a los resultados y sugerencias planteadas principalmente por IJIMA *et al.*, (1983) y SIRE *et al.*, (1981). Así, IJIMA *et al.*, (1983) quienes mostraron que preparaciones enzimáticas de intestino de carpa (*Cyprinus carpio*) son capaces de esterificar el ácido palmítico en triacilgliceroles y fosfolípidos. Y SIRE *et al.*, (1981) encontraron que el ácido linoleico es más rápidamente esterificado en triacilgliceroles que el ácido palmítico en enterocitos de trucha arco iris. Además, estos autores proponen que mientras en mamíferos la vía *monoacilglicerol* es la predominante debido principalmente a que los productos de la hidrólisis luminal son los 2-monoacilgliceroles, en peces, la vía *glicerol-3-fosfato* es la principal debido a que ácidos grasos libres y glicerol son los principales productos de la hidrólisis intraluminal, por lo que la síntesis de glicerofosfolípidos en peces es más importante que en mamíferos.

Experimentos citoquímicos en ratas han sugerido que la vía *monoacilglicerol* esta asociada al retículo endoplásmico liso, mientras que la vía *glicerol-3-fosfato* esta principalmente localizada en las membranas del retículo endoplásmico rugoso (CARTWRIGHT *et al.*, 1997). En peces, SIRE *et al.*, (1981) mostraron que la vía *glicerol-3-fosfato* podría localizarse tanto en el retículo endoplásmico rugoso (RER) como en el retículo endoplásmico liso (REL). La localización subcelular en la fracción microsomal de ambos complejos enzimáticos se ha demostrado tanto en el hígado como en el intestino (COLEMAN y BELL, 1983).

*Vía monoacilglicerol*

Las reacciones enzimáticas implicadas en la utilización de monoacilgliceroles (MAG) para la biosíntesis de diacilgliceroles (DAG) y triacilgliceroles (TAG) ha sido investigada en la mucosa intestinal de varias especies (rata, ratón, hámster, cerdo de guinea), demostrándose la existencia de un complejo enzimático denominado “triacilglicerol sintetasa”, que ha sido purificado por LEHNER y KUKSIS, (1995). Este complejo está constituido por cuatro enzimas: *monoacilglicerol aciltransferasa* (MGAT), *diacilglicerol aciltransferasa* (DGAT), *acil-CoA sintetasa* (FACS) y *acil-CoA acyltransferasa* (AAT).

La MGAT ha sido extensamente estudiada en los microsomas de ratas y hámster (JOHNSTON, 1977; KUKNIS y MANGANARO, 1986). Esta enzima cataliza la acilación de un grupo acil a un monoacilglicerol, mostrando una marcada preferencia por la acilación en la posición *sn*-1 (paso 4). Estudios iniciales en ratas mostraron que los 2-monoacilgliceroles son los sustratos preferidos de la MGAT, obteniéndose como productos principales *sn*-1,2-diacilgliceroles y *sn*-2,3-diacilgliceroles (BRECKENRIDGE y KUKSIS, 1972). Más recientemente, LEHNER *et al.*, (1993) confirman mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPTLC) la producción de isómeros *sn*-1,2- y *sn*-2,3-diacilgliceroles tras la incubación de microsomas con 2-oleoilglicerol radiactivo y oleoil-CoA, aunque remarcan el alto porcentaje encontrado del isómero *sn*-1,2 diacilgliceroles (80%). En este sentido, TSUJITA *et al.*, (1996) sugieren que la actividad de una lipasa pancreática pueda contribuir a la cantidad de productos *sn*-1,2 diacilgliceroles, al actuar sobre el “pool” de diacilgliceroles de la mucosa intestinal. Además, la MGAT tiene una cierta especificidad dependiendo de la naturaleza de los ácidos grasos esterificados en posición 2.

La DGAT produce directamente triacilgliceroles por la acilación de un grupo acil-CoA en la posición *sn*-3 de un diacilglicerol (paso 5). Esta enzima ha sido

## *Introducción*

---

purificada de microsomas intestinales de hámster, rata, hígado y de semillas oleaginosas (KUKSIS y LEHNER, 2001). En cuanto a su esteroespecificidad, LEHNER *et al.*, (1993) mostraron que esta enzima reacciona de igual manera con isómeros *sn*-1,2, *sn*-2,3 o *sn*-1,3, sugiriendo que posee un amplio rango de esterificación.

La *acil-CoA ligasa* regula la entrada de los ácidos grasos en rutas de síntesis u oxidación. En vertebrados superiores es activada por ARA, EPA y DHA (COLEMAN *et al.*, 2000). La *acil-CoA aciltransferasa* esterifica los ácidos grasos a la segunda posición del glicerol y parece tener mayor afinidad por los ácidos grasos de cadena larga (MANSBACH *et al.*, 2001).

### *Vía glicerol-3-fosfato*

Esta vía contribuye tanto a la biosíntesis de triacilgliceroles como de glicerofosfolípidos (PL). La transferencia de grupos acil-CoA a un glicerol-3-fosfato da lugar a la formación de ácido fosfatídico (PA). Estas reacciones son catalizadas por dos enzimas con distinta especificidad sobre las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-fosfato: la enzima *1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa* (GPAT) que transfiere un grupo acil a la posición 1 y tiene una marcada especificidad por acil-CoA saturados (paso 1). Y la enzima *2,1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa* que actúa sobre la posición 2 y muestra especificidad hacia acil-CoA mono o diinsaturados catalizando la conversión del 1-acilglicerol-3-fosfato en ácido fosfatídico (paso 2).

El ácido fosfatídico es un importante punto de control en la síntesis de glicerolípidos. Este puede ser convertido en CDP diacilglicerol, precursor de fosfolípidos aniónicos (fosfatidilinositol (PI), cardiolipin), o ser hidrolizado a diacilglicerol mediante la acción de la enzima *fosfatídico fosfohidrolasa* (PPH-1), que es dependiente de  $Mg^{2+}$  (paso 3). Aunque esta enzima no ha sido purificada o clonada todavía, PPH-1 es considerada una importante enzima reguladora de la

biosíntesis de TAG y PL, ya que factores dietéticos u hormonales inducen cambios más drásticos en su actividad que en la de otras enzimas (TIJBURG *et al.*, 1989). Así, un incremento celular de ATP favorece la síntesis de PL y reduce la de triacilgliceroles, por estimulación de la actividad de la PPH-1 (CARMAN, 1997).

El diacilglicérido es el precursor común de fosfolípidos (fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE)) y de triacilgliceroles. Estos últimos son obtenidos por la acción de la enzima DGAT. Aún existe la controversia de si esta enzima es la misma en ambas vías metabólicas, o si bien existen dos formas, una asociada a la conversión del ácido fosfatídico y la otra integrada en el complejo "triacilglicerol sintetasa". Recientemente, CASES *et al.*, (1998), han sugerido que una misma DGAT funciona en ambas vías en el enterocito, puesto que la misma proteína de 488 aminoácidos que codifica el DGAT cDNA ha sido encontrado en el complejo purificado triacilglicerol sintetasa.

La biosíntesis de PC ocurre principalmente por la reacción de los diacilglicéridos con CDP-colina (paso 6), aunque una cierta cantidad puede ser producida por la metilación de la PE (paso 8). La colina es un componente esencial en la dieta de la mayoría de especies. La enzima *colina kinasa*, localizada en el citosol de los tejidos, cataliza la fosforilación de la colina en presencia de ATP, produciendo CDP-colina y ADP (TIJBURG *et al.*, 1989). Esta activación representa el primer paso en la biosíntesis de PC. La enzima envuelta en la formación de PC a partir de CDP-colina y diacilglicerol es la *DG:colina fosfotransferasa* (DGCPT), que tiene una marcada especificidad hacia los isómeros *sn*-1,2 diacilglicerol. Esta enzima juega un importante papel en la regulación de PC en los tejidos (KENT, 1997), que es cuantitativamente el principal fosfolípido en mamíferos y peces. De forma similar a lo que ocurre en la biosíntesis de PC, PE es sintetizada principalmente por la acción sucesiva de la *etanolamina kinasa* y *DG:etanolamina fosfotransferasa* (DGEPT), con la participación de CDP-etanolamina y diacilgliceroles (paso 7). Y un porcentaje bajo de PE puede ser sintetizado a partir de la descarboxilación de la PS (paso 9) (TIJBURG *et al.*, 1989).

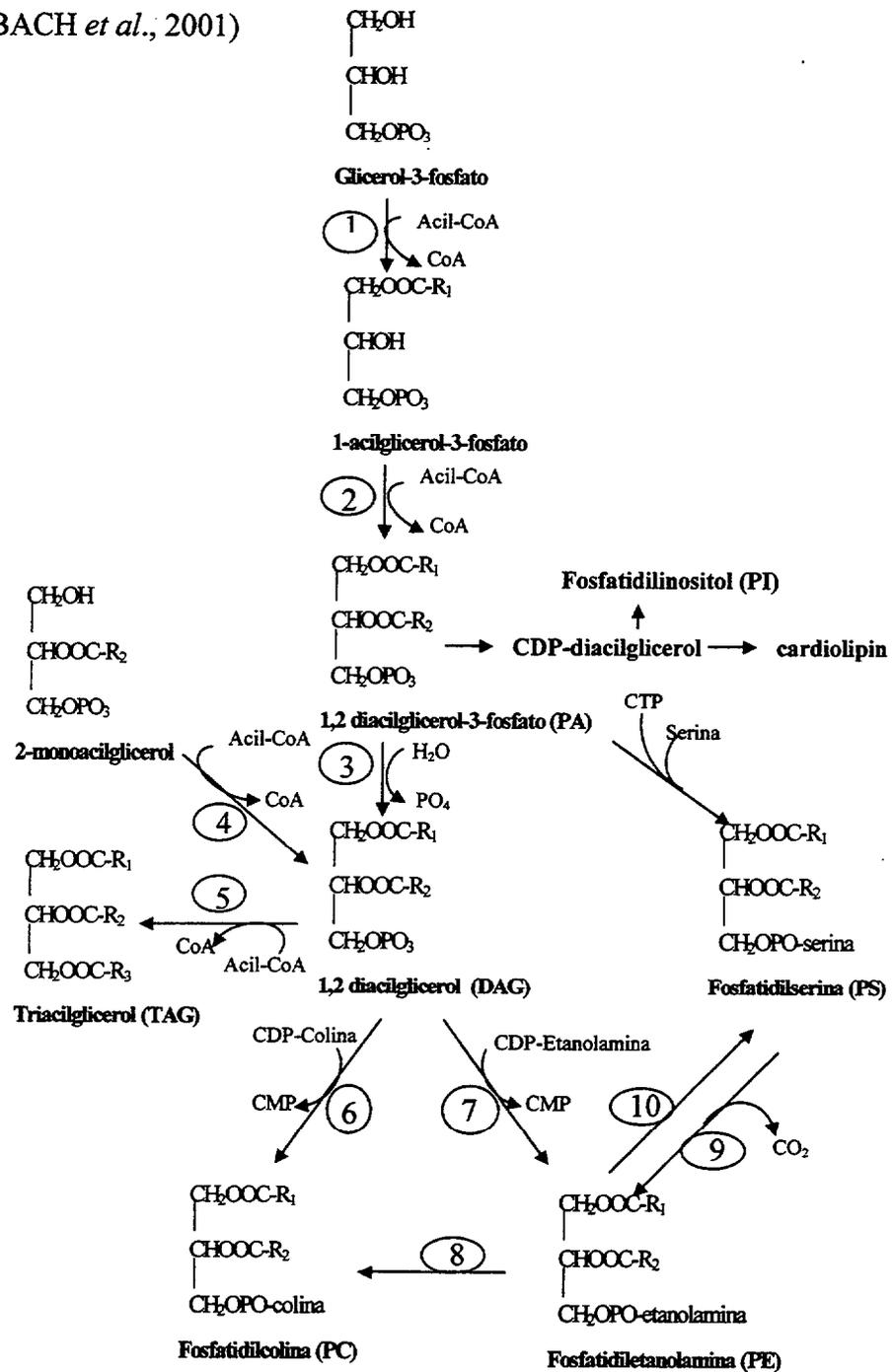
---

La actividad de las enzimas DGCPT y DGEPT está regulada por las concentraciones celulares de CDP bases. De modo que la disponibilidad de CDP-colina o CDP-etanolamina determina la síntesis de PC y PE. Además, la presencia de estos cofactores influye en la actividad de la enzima DGAT y consecuentemente determina el rango de síntesis de TAG. Así, en presencia de suficiente CDP-colina, la afinidad de la DGCPT por los diacilglicéridos es mayor que la de la enzima DGAT, favoreciéndose la síntesis de PC (STALS *et al.*, 1992).

Otros fosfolípidos como la fosfatidilserina, que se encuentra en pequeñas cantidades en los tejidos, pueden ser sintetizados mediante un intercambio de bases entre la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (TIJBURG *et al.*, 1989) (paso 10).

A pesar de estos avances en los conocimientos de las actividades de las enzimas de reación en el enterocito, todavía se desconocen que factores dietéticos pueden modular dichas actividades interfiriendo en el proceso de absorción de lípidos. En concreto en peces, la única información disponible son los resultados de IJIMA *et al.*, (1983), quienes examinan la influencia de los lípidos oxidados en la incorporación del [1-<sup>14</sup>C]-ácido palmítico y [(U)-<sup>14</sup>CL-glicerol-3-fosfato en los TAG y PL del intestino de carpa, encontrando que dichos lípidos inhiben drásticamente la biosíntesis de DAG y TAG en la vía glicerol-3-fosfato. La tendencia en los últimos años al incremento de lípidos en las dietas comerciales para peces y la creciente sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en éstas, junto con la escasa información que existe en peces sobre el mecanismo de absorción de lípidos, han aumentado el interés por investigar los efectos de estos factores en los eventos celulares que tienen lugar en la absorción lipídica, para tratar de ampliar los conocimientos y con ello elaborar dietas que se adecuen a la fisiología digestiva de cada especie.

Fig. 3. Biosíntesis de triacilglicerolos y fosfolípidos en el enterocito (Tomado de MANSBACH *et al.*, 2001)



- |  |  |
|--|--|
| 1: 1-acilglycerol-3-fostato aciltransferasa (GPAT) | 6: DG:colina fosfotransferasa (DGCPT)      |
| 2: 2,1-acilglycerol-3-fostato aciltransferasa      | 7: DG:etanolamina fosfotransferasa (DGEPT) |
| 3: fosfatídico fosfohidrolasa (PPH1)               | 8: fosfatidiletanolamina metil transferasa |
| 4: monoacilglycerol aciltransferasa (MGAT)         | 9: fosfatidilserina descarboxilasa         |
| 5: diacilglycerol transferasa (DGAT)               | 10: intercambio de bases                   |

## *Introducción*

---

Los lípidos resintetizados en el enterocito son estabilizados formando lipoproteínas del tipo quilomicrones (QM) y lipoproteínas de muy baja densidad (very low density lipoprotein, VLDL). En las imágenes electrónicas, estas lipoproteínas son observadas como pequeñas vacuolas de distinta electrodensidad dependiendo de su composición en ácidos grasos en el interior del retículo endoplásmico, cisternas del complejo de Golgi, en los espacios intercelulares y en la lámina propia intestinal (SIRE *et al.*, 1981).

En un principio, se postuló la ausencia de los quilomicrones en peces, lo que hizo suponer un mecanismo de absorción y transporte distinto al de los mamíferos. Estudios ultraestructurales posteriores (SIRE y VERNIER 1981; SIRE *et al.*, 1981) demostraron la presencia de distintos tamaños de lipoproteínas, que dependían del porcentaje de lípidos ingeridos y de la naturaleza de los ácidos grasos. Así, estos autores encontraron que cuando truchas arco iris reciben solamente ácido palmítico las partículas de lipoproteínas tienen un tamaño de 400-700 Å (VLDL). Sin embargo, el tamaño de las partículas incrementa de 800 a 2600 Å después de la ingestión de una dieta que contenga 8% de lípidos de los cuales el 14% sean EPA y DHA y llegan a tamaños por encima de 6500 Å cuando la dieta contiene 10% de lípidos con 27% de EPA y DHA. Los tamaños por encima de 1000 Å entran en la gama de los descritos para quilomicrones (GLICKMAN y SABESIN, 1988). Otro hecho importante que parece influir sobre el tamaño de estas lipoproteínas es la vía metabólica utilizada para la reesterificación de los triacilglicerolos. Al ser la vía *glicerol-3-fosfato* la principal vía de reesterificación en peces, parece evidente que la síntesis de glicerofosfolípidos es más importante que en mamíferos. Este hecho unido a la alta cantidad de proteínas que contienen las dietas para peces explicaría la mayor formación de materiales de superficie, resultando en lipoproteínas más pequeñas (VLDL) comparado con los mamíferos (SIRE *et al.*, 1981). Estudios sobre estos temas han sido realizados principalmente en trucha (SIRE y VERNIER, 1981; SIRE *et al.*, 1981), siendo poco conocidos los mecanismos de formación de lipoproteínas intestinales y los factores dietéticos que las regulan en otras especies de peces. En lubina, DEPLANO *et al.*, (1989) compararon ultraestructuralmente la

formación de lipoproteínas intestinales entre lubinas salvajes y aquellas alimentadas con una dieta comercial.

Por otro lado, la disponibilidad de fosfolípidos parece influir en la formación de las lipoproteínas intestinales. En concreto, la fosfatidilcolina ha sido identificada como un factor dietético que incrementa la absorción de lípidos que son secretados en las lipoproteínas (TSO *et al.*, 1981; MANSBACH *et al.*, 2001). PC puede ser reesterificada a partir de la lisofosfatidilcolina absorbida o bien puede ser sintetizada *de novo* por la vía *glicerol-3-fosfato*. KUMAR y MANSBACH (1997) postularon que PC tiene que estar presente en cantidades adecuadas en el enterocito para la formación de los fosfolípidos de membrana que son requeridos para la síntesis de las lipoproteínas intestinales. En definitiva, la fosfatidilcolina tiene gran importancia como estabilizador de las partículas de triacilgliceroles o de lipoproteínas y como reparador de membranas del enterocito modificadas para la absorción y secreción de los lípidos (FRIEDMAN Y CARDELL, 1976; GURR Y HARWOOD, 1991). Diversos estudios tanto en juveniles como en larvas de diferentes especies de peces han mostrado la importancia de la fosfatidilcolina en los procesos de asimilación de lípidos (GEURDEN *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 2000).

Una segunda forma de lípidos esterificados observada por varios autores (BERGOT y FLECHON, 1970; NOAILLAC-DEPEYRE y GAS, 1979; SIRE y VERNIER, 1981) son las vacuolas lipídicas de localización extrarreticular y supranuclear. Estas gotas lipídicas son detectadas al microscopio electrónico como vacuolas de distinta electrodensidad y tamaño, no rodeadas de membrana. Todavía se desconocen los motivos de la acumulación de estas vacuolas. Algunos autores han sugerido que podría ser debido a la saturación de las rutas de síntesis de lipoproteínas, a la entrada excesiva de los productos de la digestión intraluminal o al déficit temporal en la síntesis de apoproteínas estructurales de quilomicrones y VLDL.

## 1.5 EL TRANSPORTE DE LÍPIDOS Y EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS EN PECES

El transporte de lípidos y otros componentes liposolubles desde el intestino a los tejidos periféricos es mediado predominantemente por lipoproteínas. Estudios sobre lipoproteínas plasmáticas han comenzado a ser cada vez más importantes en peces, para completar la información sobre el metabolismo lipídico de éstos.

Las lipoproteínas son partículas que difieren en su proporción de lípidos (triacilgliceroles, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos) y proteínas. Las lipoproteínas plasmáticas han sido clasificadas por su densidad en 5 principales clases: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (intermediate density lipoprotein, IDL), lipoproteína de baja densidad (low density lipoprotein, LDL), lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein, HDL) y lipoproteína de muy alta densidad (very high density lipoprotein, VHDL = vitellogenin, VTG). Esta última lipoproteína está presente solamente durante la vitelogénesis en las hembras, o puede ser inducida por estrógenos u otras sustancias en machos o en individuos inmaduros (KWON *et al.*, 1993). En varias especies de peces han sido aisladas las diferentes fracciones de lipoproteínas y caracterizada la composición lipídica y proteica de éstas (SKINNER y ROGIE, 1978; CHAPMAN *et al.*, 1978; SHERIDAN *et al.*, 1985; SANTULLI *et al.*, 1997), aunque todavía no existen trabajos en dorada.

Para abordar el estudio del metabolismo de las lipoproteínas es importante resaltar que las clases de lipoproteínas no son independientes sino que están funcionalmente interrelacionadas (Fig. 4).

Como se ha comentado anteriormente, el intestino sintetiza quilomicrones y VLDL, y según estudios de IJIMA *et al.*, (1990a) pequeñas cantidades de HDL. Los quilomicrones están constituidos principalmente por ácidos grasos exógenos de cadena larga. El metabolismo de los quilomicrones es rápido y efectivo. Son

metabolizados en la superficie de los capilares de músculo y tejido adiposo mediante la enzima *lipoproteína lipasa* (LPL) que se encuentra localizada en la membrana plasmática de las células endoteliales (BLACK *et al.*, 1983). La apoproteína C2 componente de los quilomicrones activa a esta enzima, la cual rompe los triacilgliceroles en ácidos grasos libres y monoacilgliceroles que son absorbidos y de nuevo resintetizados en el interior de las células a triacilgliceroles que son el producto final para reserva (SHERIDAN, 1988).

La VLDL transporta principalmente lípidos endógenos y contiene preferentemente triacilgliceroles, semejante a los quilomicrones. Su principal lugar de síntesis es el hígado. El catabolismo de VLDL es básicamente el mismo que el de los quilomicrones, actuando sobre ellas la lipoproteína lipasa que hidroliza a los triacilgliceroles. La interacción VLDL-lipasa es menos eficiente que la interacción quilomicron-lipasa, de este modo las lipoproteínas VLDL plasmáticas persisten más tiempo en circulación (SHERIDAN, 1988). Durante su degradación, los fosfolípidos y la apoproteína C son transferidos a la HDL, mientras que las apoproteínas B y E son retenidas en las partículas.

Estas partículas resultantes, denominadas IDL, están compuestas por una menor cantidad de triacilgliceroles y son ricas en ésteres de colesterol, siendo finalmente degradadas resultando en la formación de las LDL, que retienen únicamente la apoproteína B. La principal función de la LDL es el transporte de colesterol hacia los tejidos periféricos. La apoproteína B tiene un importante papel en el reconocimiento de las partículas de LDL por las células, interactuando con receptores específicos de membrana. La distribución de LDL en los tejidos parece que depende de la actividad de estos receptores de membrana. Así, músculo o tejido adiposo tienen pocos receptores, mientras que la glándula adrenal (órgano importante en la síntesis de hormonas esteroideas derivadas del colesterol) tiene abundantes receptores de LDL. Además, los receptores de LDL están regulados dependiendo de la concentración de LDL en el plasma. Altas concentraciones plasmáticas de LDL deprimen el número de receptores, y éstos aumentan en la situación contraria.

---

## Introducción

---

HDL es el principal almacén de colesterol, esta lipoproteína acepta el colesterol de los tejidos periféricos y lo transporta hacia el hígado para su degradación o reutilización. La apoproteína A asociada a las partículas de HDL es un activador específico de la enzima *lecitina colesterol acil-transferasa* (LCAT). La función de esta enzima es la de transferir un ácido graso de la fosfatidilcolina al colesterol en la superficie de la HDL para formar ésteres de colesterol que son transferidos al interior de la partícula (Fig. 4). Esta redistribución de lípidos convierte a la partícula discoidal de HDL en forma esférica. La lisofosfatidilcolina resultante es transferida al plasma y es rápidamente degradada o reacilada. Los ésteres de colesterol por acción de una colesterol-esterasa, dan lugar a ácidos grasos y colesterol libre, el cual puede eliminarse por la bilis, o ser utilizado para la formación de ácidos biliares u hormonas esteroideas. Este proceso es el denominado “transporte reverso del colesterol”.

En contraste con los mamíferos donde VLDL y LDL son las lipoproteínas dominantes en el plasma, HDL constituye la principal fracción en el plasma de peces (BABIN y VERNIER, 1989; IJIMA *et al.*, 1990a; LIE *et al.*, 1993). No obstante, la distribución de las clases lipídicas varía entre especies y, dentro de una misma especie debido a diversos factores como pueden ser el estado de maduración sexual o las condiciones nutricionales (FRÉMONT y MARION, 1982; LIE *et al.*, 1993). A este respecto, la influencia de la dieta en la composición de las lipoproteínas ha sido demostrada principalmente en salmónidos (LIE *et al.*, 1993; TORSTENSEN *et al.*, 2000), y sin embargo, la información en otras especies como la dorada prácticamente es inexistente.



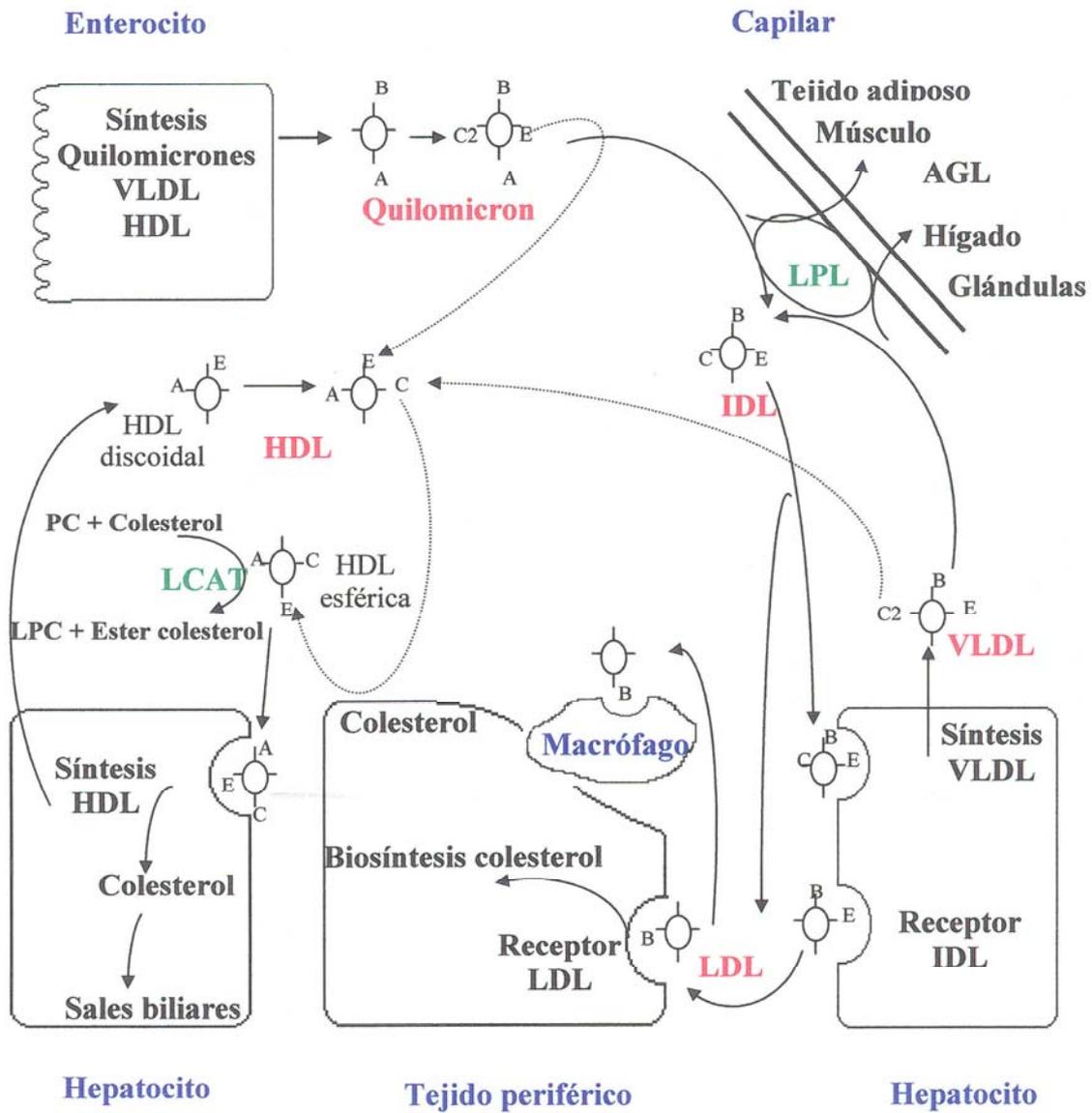


Fig. 4. Metabolismo de las lipoproteínas. LPL: lipoproteína lipasa; LCAT: lecitina coolesterol aciltransferasa (Esquema tomado de GURR y HARWOOD, 1991).

## **1.6 METABOLISMO HEPÁTICO DE LOS LÍPIDOS EN LOS PECES**

El hígado es un órgano esencial implicado en el metabolismo de las sustancias absorbidas por el intestino, en su transformación y utilización por el resto de los tejidos del organismo. Y es el principal lugar de regulación lipídica implicado tanto en la síntesis como en la degradación de los ácidos grasos (CROSS, 1993).

Los ácidos grasos de la sangre son captados por los hepatocitos, pudiendo formar parte de tres vías distintas:

### *1.- Como fuente de energía:*

El catabolismo lipídico proporciona energía al organismo. A pesar de que no existen muchos trabajos sobre este tema en peces, algunos aspectos metabólicos relacionados con la oxidación de los ácidos grasos han sido estudiados en los últimos años (FRØYLAND *et al.*, 1998; 2000).

Los ácidos grasos libres son activados por el acetil coenzima A en la membrana exterior de las mitocondrias por un complejo enzimático constituido por diferentes enzimas *tioquinasas* dependientes del tipo de ácido graso. Estos acil-CoA grasos no pueden entrar directamente a la matriz de la mitocondria para la  $\beta$ -oxidación por lo que se requiere un mecanismo de transporte donde entra a formar parte la enzima *carnitina acil-CoA transferasa*, que convierte al acil-CoA en acil-carnitina (BREMER, 1997).

Posteriormente, en la matrix de la mitocondria el grupo acil-carnitina es nuevamente convertido en acil-CoA, que se emplea como sustrato por el ciclo de la  $\beta$ -oxidación del ácido graso (FRØYLAND *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* de  $\beta$ -oxidación mitocondrial en peces han sugerido que existe una preferencia sobre los ácidos grasos saturados y monoinsaturados como sustratos para la oxidación. Así, 16:0, 16:1, 18:1n-9 y 18:2n-6 parecen ser preferentemente oxidados durante periodos

de inanición, mientras que el rango de oxidación del 22:6n-3 es bastante bajo en dichas circunstancias (KIESSLING y KIESSLING, 1993; HENDERSON, 1996).

Aparte de las mitocondrias existen otros lugares subcelulares donde existen también enzimas para la  $\beta$ -oxidación, como son los peroxisomas, los cuales contienen una primitiva cadena respiratoria. En peces, los peroxisomas fueron puestos de manifiesto en estudios de truchas por HENDERSON y SARGENT en 1984, los cuales demostraron que se inducía una ruta peroxisómica alternativa a las mitocondrias que dependía principalmente de los ácidos grasos. Parece ser que los peroxisomas actúan sobre los ácidos grasos de cadena larga reduciendo su tamaño a acil-CoA de bajo peso molecular que son mejores sustratos para la  $\beta$ -oxidación y también intervienen en la oxidación de ácidos grasos de cadena corta. Cuantitativamente los peroxisomas son mucho menos eficaces que las mitocondrias (HENDERSON y SARGENT, 1984; GURR y HARWOOD, 1991).

La  $\beta$ -oxidación también es llevada a cabo en otros lugares del organismo, como músculo o tejido adiposo (GREENE y SELIVONCHICK, 1987; SHERIDAN, 1988). Esta oxidación está regulada hormonalmente dependiendo principalmente de la concentración de ácidos grasos en el plasma y de la demanda de energía de los tejidos.

## 2.- Como reserva de energía:

Los triacilgliceroles son la principal fuente de reserva de energía. Así, los ácidos grasos son conjugados con glicerol en una serie de acilaciones catabolizadas por complejos triacilglicerol sintetasa, constituyéndose triacilgliceroles que se almacenan libres en el citoplasma de los hepatocitos como lípidos neutros. Las enzimas implicadas en la biosíntesis de triacilgliceroles son la *glicerol-3-fosfato aciltransferasa* y la *fosfatidil fosfohidrolasa* que se localizan en el REL. El mecanismo de biosíntesis es similar al descrito anteriormente en los enterocitos, de

---

igual manera también forma parte la proteína FABP la cual puede regular la activación y reesterificación de los ácidos grasos.

El lugar de almacén de lípidos varía según la especie de pez pudiendo ser, hígado, tejido adiposo perivisceral o músculo. La trucha tiende a acumular grasa en el tejido adiposo perivisceral, las especies pelágicas como el arenque (*Clupea harengus*) y la caballa (*Scomber japonicus*) tienen depósitos de lípidos subcutáneos en el interior del músculo y el bacalao (*Gadus morhua*) tiende a almacenar los lípidos en el hígado (LIE *et al.*, 1986). Otras especies marinas como dorada y lubina tienden a acumular los lípidos en hígado y grasa perivisceral (KAUSHIK, 1997).

Ultraestructuralmente, estos depósitos de triacilgliceroles son observados como vacuolas de distinta electrodensidad que no poseen membrana exterior y se encuentran libres dentro del citoplasma de varios tipos de células (GHADIALLY, 1988). Al microscopio óptico, grandes espacios vacíos representan lugares anteriormente ocupados por los lípidos debido a que son extraídos por los solventes utilizados en las técnicas histológicas (CROSS, 1993), por lo que el uso de técnicas especiales es requerido para la identificación de los lípidos en las preparaciones histológicas de los tejidos.

Cuando los ácidos grasos son demandados de sus lugares de almacén, los triacilgliceroles reesterificados en el REL son conjugados con proteínas procedentes del RER y son transportadas al complejo de Golgi (CG), en donde se les incorporan los fosfolípidos y colesterol constituyendo las lipoproteínas. En las imágenes electrónicas estas lipoproteínas son observadas como pequeñas vacuolas de distinta electrodensidad dependiendo de su composición en ácidos grasos en el interior del retículo endoplásmico, complejo de Golgi, en las vesículas de exocitosis en la superficie celular y en el espacio de Disse (GHADIALLY, 1988; FAWCET, 1992).

Sin embargo, cuando el aporte de lípidos excede la necesidad o la capacidad de que las células hepáticas oxiden a los ácidos grasos, el resultado es la síntesis y

deposición de triacilglicerolos, ó bien cuando la síntesis de proteínas no es paralela a la entrada y síntesis de lípidos, estos se acumulan en forma de vacuolas resultando en hígado graso o esteatosis (GURR y HARWOOD, 1991). Esta alteración ha sido observada frecuentemente en los peces cultivados en condiciones de producción. Su aparición esta relacionada principalmente con factores nutricionales, como pueden ser deficiencias en ácidos grasos esenciales, enranciamiento de los lípidos (TACON, 1996) ó un incremento del porcentaje de lípidos en las dietas (CABALLERO *et al.*, 1999). No obstante, todavía se desconocen cuales son los mecanismos por los que estos factores nutricionales producen acumulación creciente de grasas en el hígado.

3.- *Participando en la biosíntesis de fosfolípidos, esfingolípidos de membranas y otras estructuras (prostaglandinas, etc)*

Los ácidos grasos son componentes de los fosfolípidos, componente lipídico mayoritario en las biomembranas. La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos depende de la especie y, dentro de una misma especie, del tejido concreto (SARGENT *et al.*, 1989). Los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 son los precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y lipoxinas), que son derivados oxigenados de estos ácidos grasos y que no se acumulan, sino que deben ser sintetizados de *novo* inmediatamente después de la activación celular.

## **1.7 OBJETIVOS**

Dada la creciente importancia de los lípidos en las dietas para peces cultivables, la tendencia actual al incremento de los lípidos en éstas ó a la utilización de aceites vegetales alternativos al aceite de pescado, el presente estudio tiene la finalidad de estudiar los efectos de la manipulación de los lípidos dietéticos sobre los procesos de absorción, transporte y metabolismo hepático, para tratar de ampliar los conocimientos que actualmente se tienen sobre el metabolismo lipídico en las dos especies con importancia en la Acuicultura Mediterránea: la dorada y la lubina.

Por estas razones y dentro de la línea de investigación sobre Nutrición de estas especies se han establecido los siguientes objetivos:

1. Establecer las relaciones porcentaje de lípidos y calidad de harina de pescado y evaluar las repercusiones de estas dietas en la histología del hígado de dorada.
2. Evaluar los efectos a medio plazo de la inclusión de aceites vegetales en el crecimiento y sus repercusiones en el metabolismo lipídico del hígado de dorada y lubina.
3. Evaluar los efectos a largo plazo de la inclusión de aceites vegetales y de mayores niveles de sustitución del aceite del pescado en el crecimiento y en la histología del hígado de dorada y lubina, a la vez que estudiar la reversibilidad de estos cambios estructurales en este órgano.
4. Estudiar el transporte de lípidos y los posibles efectos de la composición de ácidos grasos de la dieta sobre el metabolismo de las lipoproteínas en la dorada.
5. Estudiar los efectos del porcentaje de lípidos y calidad de harina de pescado sobre la histología del intestino en dorada.
6. Evaluar los efectos de la inclusión de aceites vegetales en el proceso de absorción intestinal de lípidos en la dorada y la lubina.
7. Estudiar la influencia de la dieta en las rutas de reaclilación de triacilgliceroles y fosfolípidos en el intestino de dorada.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se presenta la metodología común a todos los experimentos llevados a cabo en el presente estudio, incluyendo la relativa a los parámetros biológicos, análisis histológicos, bioquímicos y enzimáticos. Las condiciones experimentales específicas de cada experiencia se incluyen en los capítulos correspondientes.

### 2.1 INSTALACIONES Y PECES EXPERIMENTALES

Los experimentos llevados a cabo en el presente estudio se realizaron en la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas, perteneciente a la Dirección General de Universidades e Investigación de la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias.

Todos los peces, tanto doradas (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) como lubinas (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) de los distintos experimentos fueron suministrados por la empresa local de producción de peces *Alevines y Doradas, S.A* (ADSA). Los peces se preseleccionaron en la planta de procedencia según el peso deseado en cada experimento. Durante tres semanas previas a la realización de la experiencia los peces se aclimataron en tanques de 2 m<sup>3</sup>, donde se alimentaron con dietas comerciales. Para distribuirlos en los tanques experimentales, los peces se anestesiaron con clorobutanol (1,1,1 tricloro-2-metil-2-propanol) a una concentración de 200 mg/l de agua. Seguidamente, se pesaron y se repartieron en los distintos tanques experimentales, de manera que no hubiese diferencias significativas entre los pesos de los distintos lotes. Se utilizaron tanques de fibra de vidrio de 0.1, 0.4 y 1 m<sup>3</sup>, según el peso de los ejemplares utilizados. Los tanques, diseñados por el equipo de investigación y contruidos por una empresa local, estaban provistos de aireación y suministro continuado de agua de mar obtenida de un pozo y procedente de un tanque de sedimentación de 27 m<sup>3</sup>. Diariamente se anotaron las mortalidades y se midió la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en el agua.

---

## **2.2 DIETAS**

Todas las dietas experimentales utilizadas en el presente estudio se diseñaron conjuntamente con las empresas noruegas, *Norwegian Herring Oil and Meal Industry Research Institute (SSF)* (Bergen) y *Nutreco Aquaculture Research Centre* (Stavanger), que fueron responsables de su elaboración. En los capítulos dedicados a cada uno de los experimentos realizados se detalla la composición de las diferentes dietas experimentales.

## **2.3 PARÁMETROS BIOLÓGICOS**

### **2.3.1 Crecimiento**

Para estudiar el crecimiento de los peces se procedió a la determinación del peso corporal de cada uno de los individuos a lo largo de toda la experiencia. Antes de cada control de peso los peces permanecieron en ayuno durante 24 horas. El peso se registró en términos absolutos o bien como porcentaje respecto al peso inicial:

$$\text{Crecimiento} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

### **2.3.2 Índice hepatosomático**

Para completar el estudio de crecimiento se determinó el índice hepatosomático (HSI), que representa la relación existente entre el peso del hígado y el peso corporal total, y está definido por la expresión:

$$\text{HSI} = \frac{\text{Peso hígado}}{\text{Peso total}} \times 100$$

## **2.4 ESTUDIOS HISTOLÓGICOS**

### **2.4.1 Recogida de muestras**

Los peces destinados a la toma de muestras de tejidos para los estudios histológicos se sacrificaron previamente con una sobredosis de clorobutanol (>200mg/l de agua).

### **2.4.2 Inclusión en parafina**

Las muestras de intestino e hígado se fijaron con formalina tamponada 10% (pH 7) hasta su posterior procesado.

<b>Formalina tamponada 10%</b>	
100ml	Formol concentrado 40%
900ml	Agua destilada
4g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
6g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Para su procesamiento, las muestras se cortaron en pequeñas piezas, se deshidrataron en un gradiente de alcoholes (70-96%) y xilol, y se embebieron en moldes con parafina. Sobre los bloques de parafina se hicieron cortes de 3-4µm de grosor con un microtomo de rotación (Leica Jung 2050, Alemania). Los cortes se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina (H&E) y de ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS) (MARTOJA y MARTOJA-PIERSON, 1970). Los cortes se estudiaron y fotografiaron con un fotomicroscopio (Leica Leitz DMRBE®, Alemania).

### **2.4.3 Inclusión en resina**

Las muestras de intestino e hígado destinadas a los estudios para microscopia electrónica se trocearon en pequeñas piezas ( $1\text{mm}^3$ ) y se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato al 0.2M, (pH 7.2) según MILLONIG (BANCROFT y STEVENS, 1996) hasta su procesamiento.

<b>Glutaraldehído tamponado 2.5%</b>	
25%	Glutaraldehído
2.26%	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2.52%	NaOH
0.5M	$\text{Cl}_2\text{Ca}$

Las muestras correspondientes a los apartados 3.2 y 5.2 se procesaron en el *Servicio de Microscopia Electrónica y Análisis de Imagen de la Universidad de Córdoba*, según el método descrito por KARNOVSKY (1971). Para ello, las piezas de tejidos se refijaron en tetróxido de osmio al 2% diluido en tampón ferrocianuro al 1.5% durante 2 horas, se deshidrataron con acetona y se incluyeron en bloques con Epon 812 (Fluka, Buchs, Suiza). A partir de los bloques se realizaron cortes de 50nm en un ultramicrotomo (Leica LKB modelo Ultratome Nova, Alemania), y se colocaron sobre rejillas de cobre. Las rejillas con los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes se estudiaron y fotografiaron empleando un microscopio electrónico Philips® CM-10.

Las muestras correspondientes a los apartados 3.3, 5.3 y 5.4 se procesaron en el *Brattøra Research Center de la Universidad de Trondheim (Noruega)*. Estas muestras se procesaron por el método descrito por ANGERMULLER y DARIUSH FAHIMI (1982) con algunas modificaciones. Este método describe el uso del tampón

Imidazol como buffer para el tetróxido de osmio permitiendo una excelente tinción de los lípidos en microscopia electrónica de transmisión. Las piezas de tejidos se refijaron en 4% tetróxido de osmio en tampón Imidazol 0.2M (pH 7.2) durante 2 horas y posteriormente se contrastaron con 1.5% acetato de uranilo durante 1 ½ hora. A continuación se deshidrataron en un gradiente de alcoholes (70-100%) y óxido de propileno y se incluyeron en bloques con Epon 812. Sobre estos bloques se realizaron cortes de 50nm de grosor con un ultramicrotomo (Leica LKB Ultratome Nova, Alemania), que se colocaron sobre rejillas de cobre. Las rejillas con los cortes se tiñeron con 2% citrato de plomo durante 30 segundos para aumentar el contraste. Finalmente, los cortes se estudiaron y fotografiaron empleando un microscopio electrónico JEOL 1200EX.

#### **2.4.3.1 Cortes semifinos**

Los tejidos embebidos en resina se cortaron a 1µm de grosor con un ultramicrotomo y se tiñeron con Azul de Toluidina y Fuschina Básica (AT&FB) (HOFFMAN *et al.*, 1983). Los cortes se estudiaron y fotografiaron empleando un fotomicroscopio (Leica Leitz DMRBE®, Alemania). Con esta técnica, los lípidos se observan de color verde y el resto de estructuras celulares de azul.

#### **2.4.4 Cortes en congelación**

Los hígados pertenecientes al apartado 3.2 se sumergieron en isopropanol, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se conservaron en -80°C hasta su procesamiento. Sobre este material se realizaron cortes de 5µm en un criostato Reichert-Jung 2800 Frigocut N. Estos cortes se tiñeron con Oil-Red O al 70% en etanol (BANCROFT Y STEVENS, 1996). Los cortes se estudiaron y fotografiaron con un fotomicroscopio (Leica Leitz DMRBE®, Alemania). Siguiendo este método, los lípidos se observan de color rojo y el resto de estructuras celulares de azul.

## **2.4.5 Análisis de imagen**

### *2.4.5.1 Análisis morfométrico del hígado*

En el apartado 3.2 se realizó un estudio morfométrico del hígado. Este estudio se realizó en el *Servicio de Microscopía Electrónica y Análisis de Imagen de la Universidad de Córdoba*. Sobre placas negativas de fotos realizadas en el microscopio electrónico se determinó el área de las gotas lipídicas. Para ello se utilizó el programa de tratamiento y análisis de imagen Imago® desarrollado por el grupo de investigación SIVA (*Sistemas Inteligentes de Visión Artificial*) de la Universidad de Córdoba. Para cada dieta, se midieron 10 placas con el mismo aumento (1950x) escogidas al azar. El área se midió en micras cuadradas ( $\mu\text{m}^2$ ).

Sobre las muestras de hígado del apartado 3.3, se realizó un estudio estereométrico cuantificando el volumen de tejido hepático ocupado por lípidos, según los principios del método del conteo de puntos de WEIBEL (1979). La densidad de volumen de vacuolas lipídicas se estimó colocando una plantilla cuadrículada con un número concreto de puntos ( $P_T$ ) sobre las fotos de hígado y determinando el número de estos puntos que coincidían sobre vacuolas lipídicas ( $P_{Vi}$ ). El volumen de los lípidos se calculó como  $V_{vi}=P_{vi}/P_T$ . Aquellos puntos que coincidían sobre otro tipo de estructuras, como tejido pancreático o sinusoides, se descontaron del total de puntos. Para este estudio se utilizó una plantilla cuadrículada con 322 puntos y con una distancia entre puntos de 5mm (equivalente a  $15\mu\text{m}$ ). El estudio se realizó sobre fotos de cortes semifinos de hígado teñidos con AT&FB y las fotografías en un microscopio óptico a 40 aumentos.

### *2.4.5.2 Análisis morfométrico del intestino*

Sobre las muestras de intestino del apartado 5.4, se realizó un estudio morfométrico donde se determinó el porcentaje de epitelio intestinal ocupado por vacuolas lipídicas y por espacios intercelulares. El área del epitelio intestinal

---

escogida para cada fotografía comprendía desde la membrana basal de las microvillosidades hasta la lámina propia. Se midieron 20 negativos (35mm) escogidos al azar para cada dieta con el mismo aumento (460x). Para el análisis se utilizó un sistema de análisis de imagen (Imagen Pro Plus®)

## **2.5 SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS**

### **2.5.1 Recogida de muestras**

Las muestras de sangre se tomaron por punción del seno caudal, a la altura del pedúnculo, en peces anestesiados previamente con clorobutanol (200mg/l de agua). Los peces permanecieron en ayuno 24 horas previas a la extracción de sangre. El “pool” de muestras de sangre procedente de 24 peces por tanque se transfirió a tubos con EDTA (concentración final 0.01%). El plasma se obtuvo por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos.

Las muestras de plasma se conservaron a 4°C, se embalaron en hielo para mantener la refrigeración y se enviaron inmediatamente al *Institute of Nutrition, Department of Fisheries and Marine Biology de la Universidad de Bergen (Noruega)*, donde fueron recibidas al día siguiente, comenzando la separación de lipoproteínas inmediatamente. La separación de las lipoproteínas debe realizarse inmediatamente después de la extracción y obtención del plasma, conservándose estas intactas como máximo 2 semanas a 4°C. La congelación a -80°C durante meses puede producir la degradación de las lipoproteínas (TORSTENSEN, 2000) .

### **2.5.2 Separación de lipoproteínas**

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) se separaron mediante el método de ultracentrifugación-flotación (HAVEL *et al.*, 1955; AVIRAM, 1983). Este método se fundamenta en que

---

## *Material y Métodos*

---

la densidad de las lipoproteínas es inferior a la unidad y, por tanto, al aumentar la densidad del medio en que se encuentran, ascienden a la superficie por flotación. La densidad del medio se aumenta agregando cloruro sódico/bromuro potásico y la velocidad de flotación se acelera mediante centrifugación.

Nueve ml del “pool” de plasma (n=24) procedente de cada tanque se centrifugaron a 107500 g y 4°C, usando una ultracentrífuga Pegasus 65 con un rotor 70-Ti. Los intervalos de densidad se obtuvieron por la adición de cloruro sódico y bromuro potásico, siguiendo la metodología descrita por LIE *et al.*, (1994). Los tiempos de centrifugación e intervalos de densidad para la obtención de cada fracción de lipoproteína fueron los siguientes (WARNICK *et al.*, 1979):

VLDL	$d < 1.015 \text{ g/ml}$	durante 20h
LDL	$1.015 \text{ g/ml} < d < 1.085 \text{ g/ml}$	durante 20h
HDL	$1.085 \text{ g/ml} < d < 1.21 \text{ g/ml}$	durante 44h

Las fracciones de lipoproteínas se guardaron en viales de tipo Eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### **2.5.3 Extracción de lípidos totales**

El contenido de lípidos totales de cada fracción de lipoproteína, así como de las dietas y tejidos analizados se extrajo mediante el método descrito por FOLCH *et al.*, (1957), usando una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v:v) conteniendo 0.01% de BHT (2,[6]-Di-tert-Butyl-p-cresol). Una vez extraído el solvente, los lípidos se pesaron en seco en atmósfera de  $\text{N}_2$ .

#### 2.5.4 Separación de lípidos polares y neutros

Los lípidos totales de la fracción VLDL obtenidos por el método de FOLCH *et al.*, (1957) se separaron en polares y neutros por cromatografía de adsorción en cartuchos de sílice (Sep-pak, waters S.A., Mildford, Massachussets) según el método de JUANEDA y ROCQUELIN (1985). Para ello, se inyectaron los lípidos en el cartucho y se recuperaron los lípidos neutros arrastrándolos con cloroformo a una velocidad de flujo de 25 ml/min. A continuación, se recuperaron los polares con metanol, siguiendo el mismo procedimiento.

#### 2.5.5 Separación de clases lipídicas

Las clases lipídicas de los lípidos neutros de las fracciones lipoprotéicas LDL y HDL se separaron a partir de los lípidos totales obtenidos con el método descrito por FOLCH *et al.*, (1957). Las clases lipídicas de la fracción VLDL se obtuvieron a partir de los lípidos neutros separados previamente. Muestras de 2  $\mu$ l de lípidos neutros disueltos en cloroformo (15mg/ml) se depositaron por triplicado mediante capilares en varillas de cromatografía recubiertas con sílice (Chromarods, Iatronlab). Los ésteres de colesterol (CE), los triacilgliceroles (TAG) y el colesterol (CHO) se separaron utilizando como fase móvil una solución de hexano:dietileter:ácido fórmico (85:15:0.040) (v/v), durante un tiempo de desarrollo de 38 minutos a 4°C y se cuantificaron mediante FID en un Iatroscan MK-5 TLC (Iatron Lab. Inc., Tokio, Japón). Los picos obtenidos fueron integrados con un Chromatopac C-R5A Shimadzu, utilizándose estándares comerciales (Sigma Chemical, St. Louis, U.S.) para su identificación.

Las clases lipídicas de los lípidos polares de las fracciones lipoprotéicas LDL y HDL se separaron a partir de los lípidos totales obtenidos con el método descrito por FOLCH *et al.*, (1957), mientras que las clases lipídicas de la fracción VLDL se obtuvieron a partir de los lípidos polares separados previamente. Muestras de 2  $\mu$ l de

---

lípidos polares disueltos en cloroformo (15mg/ml) se depositaron por triplicado mediante capilares en varillas de cromatografía recubiertas con sílice (Chromarods, Iatronlab). La fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilcolina (PC) y la lysofosfatidilcolina (LPC) se separaron utilizando como fase móvil cloroformo:metanol:agua destilada:ácido fórmico (50:18:1.4:1) (v/v), durante un tiempo de desarrollo de 52 minutos a 4°C y se cuantificaron mediante FID en un Iatroscan MK-5 TLC (Iatron Lab. Inc., Tokio, Japón). Los picos obtenidos fueron integrados con un Chromatopac C-R5A Shimadzu, utilizándose estándares comerciales (Sigma Chemical, St. Louis, U.S.) para su identificación.

Las condiciones del Iatroscan se ajustaron a las descritas por IZQUIERDO (1988), y fueron las siguientes:

Aparato: Iatroscan MK-5 TLC

Flujo de hidrógeno: 0.8 kg/cm<sup>2</sup>

Flujo de aire: 2300 ml/min

Velocidad de barrido: 0.35 cm/seg

### **2.5.6 Determinación de ácidos grasos**

Los ácidos grasos se obtuvieron por transesterificación en medio ácido (CHRISTIE, 1982) a partir de los lípidos totales obtenidos por el método de FOLCH *et al.*, (1957). Se añadió ácido heneicosaeónico (21:0) (Sigma Chemical, St. Louis, U.S.) como estándar interno en una proporción del 10% de los lípidos de la muestra.

Como medio ácido se utilizó una dilución al 1% de ácido sulfúrico en metanol. La reacción se realizó a 50°C durante 16 horas. A continuación, se separaron las fases por centrifugación a 1000 rpm usando una solución de

hexano:eter (1:1). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos así obtenidos se purificaron y se determinaron mediante cromatografía en fase líquida y gaseosa (GLC) usando las condiciones descritas por IZQUIERDO *et al.*, (1990).

Las condiciones operativas empleadas fueron:

Aparato: Shimadzu (Analytical instrument división,

Kyoto, Japón, GC-14-A)

Integrador: Shimadzu C-R5A

Columna: Capilar en sílice fundida con Sulpeco-10  
(30mx0.32 mm ID)

Gas portador: Helio

Presión del gas: He: 1 kg/cm<sup>2</sup>      N<sub>2</sub>: 0.5 kg/cm<sup>2</sup>

H<sub>2</sub>: 0.5 kg/cm<sup>2</sup>      aire: 0.5 Kg/cm<sup>2</sup>

Temperatura: Detector: 250°C

Inyector: 250°C

Rampa de temperatura: 10 min a 180°C;

subida a 215°C a 2.5°C/min y 10 min a 215°C

Los ácidos grasos se identificaron por su tiempo de retención usando como referencia una mezcla comercial de ácidos grasos bien caracterizada (EPA 28, Nippai, Ltd.Tokyo, Japón).

### **2.5.7 Determinación de proteína soluble**

El contenido de proteína soluble de cada fracción de lipoproteína se determinó por el método de LOWRY *et al.* (1951), basado en el cambio de color del reactivo de Folin-Ciocaltean en respuesta a la cantidad de proteína presente en la muestra. La absorbancia se midió a 660 nm en un espectrofotómetro UV-160A Shimadzu. Se usó albúmina de suero bovino como estándar.

## **2.6 ENSAYOS ENZIMÁTICOS**

### **2.6.1 Materiales**

Los reactivos Palmitoil-CoA, Glicerol-3-fosfato, 1-monoacilglicerol, Trizma base, suero de albúmina bovina, MgCl<sub>2</sub>, DTT (ditiotreitól), EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), CDP-colina (citidin difosfato colina), CDP-etanolamina (citidin difosfato etanolamina), CTP (citidin trifosfato) se adquirieron en Sigma Chemical Company (St. Louis, U.S.). El <sup>14</sup>C-PalmitoilCoA (55mCi/mmol) y el L-(<sup>14</sup>C)Glicerol-3-fosfato (100mCi/mM) fueron suministrados por ARC (American radiolabeled Chemicals Inc, St. Louis, U.S.). Las placas de nano-silica gel fueron obtenidas de Fluka (Buchs, Switzerland). Los estándares de triacilgliceroles, diacilgliceroles, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.). Los solventes orgánicos del grado HPLC fueron suministrados por Panreac Química (Barcelona, España).

### **2.6.2 Recogida de muestras**

Los peces destinados a estos estudios permanecieron en ayuno 24 horas. Para la extracción del intestino anterior, los peces se sacrificaron con una sobredosis de anestésico (clorobutanol, >200mg/l de agua). Se extrajo el intestino en frío,

---

---

eliminándose el contenido intestinal y la grasa mesentérica, y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **2.6.3 Preparación de microsomas intestinales**

Los microsomas intestinales se prepararon según el método descrito por LEHNER y KUKSIS (1995) con algunas modificaciones.

Las muestras de intestino se bañaron con buffer frío de Tris-HCl 50mM (pH 7.4), se trocearon en pequeñas piezas y se homogenizaron a 2000 rpm durante 2 minutos en 4 volúmenes (p/v) de buffer frío, de las siguientes características:

<b>Buffer para homogenización</b>	
Tris-HCl 50mM (pH 7.4)	
0.225M	Sacarosa
1mM	EDTA
2mM	DTT

El homogenizado se centrifugó a 1200g durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a 5900g durante 10 minutos. A continuación, 2ml del sobrenadante resultante se centrifugaron (centrífuga TL 100, Beckman) a 106000g durante 1 hora. Los microsomas obtenidos se resuspendieron por homogenización con el buffer, en un volumen igual al sobrenadante extraído, y se centrifugaron nuevamente a 106000g durante 1 hora. Todo el proceso se realizó a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por último, los microsomas lavados se suspendieron en el buffer Tris-HCl 50mM (pH 7.4), 0.225M de sacarosa, 1mM de EDTA y 2mM de DTT y se conservaron en un tubo

---

Eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Dichos análisis se efectuaron en el plazo de una semana como máximo sin detectar cambios en la actividad enzimática. La Fig. 5 muestra la sucesión de pasos para la obtención de microsomas intestinales.

El contenido de proteína microsomal se determinó por el método de LOWRY *et al.*, (1951), descrito en el apartado 2.5.7.

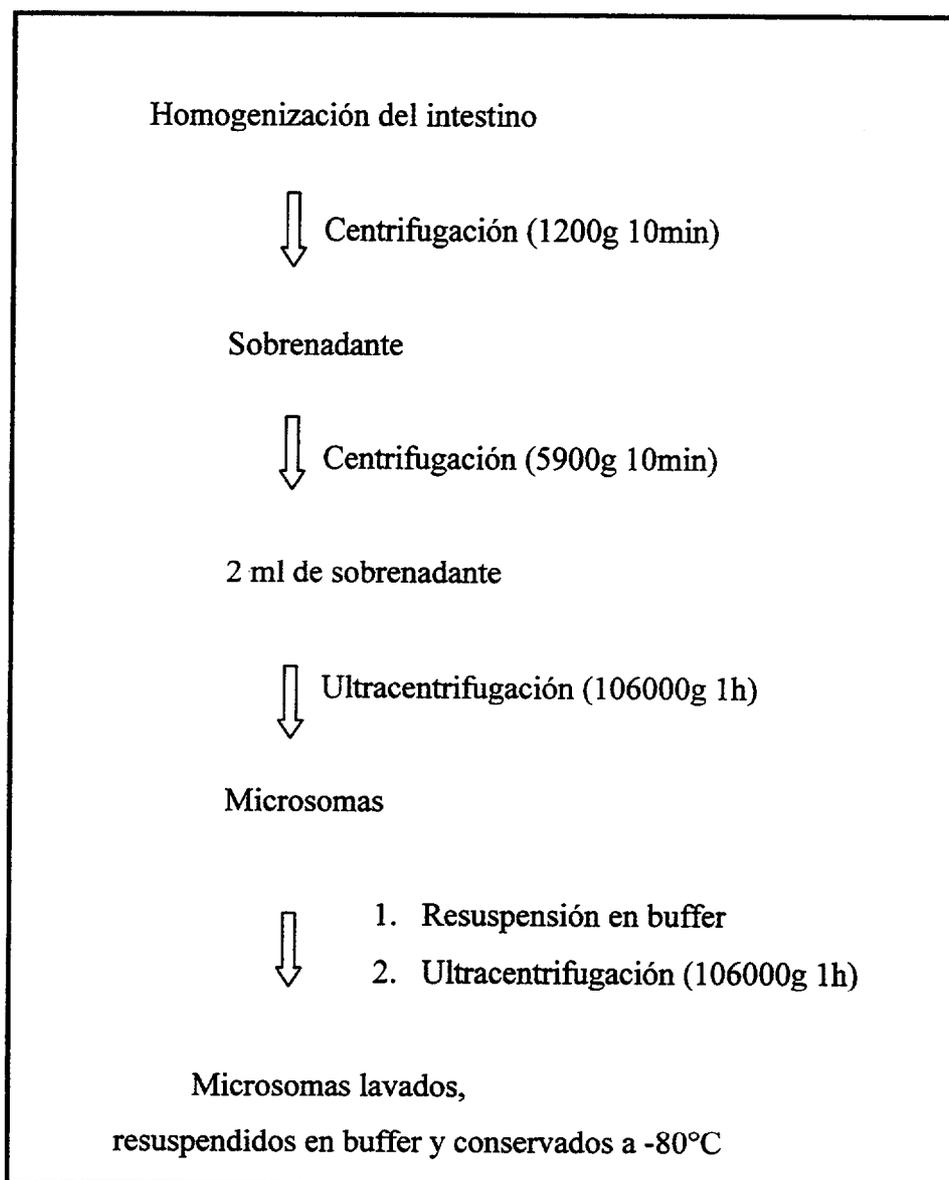


Fig. 5. Metodología para la obtención de microsomas intestinales

## 2.6.4 Incubaciones

### 2.6.4.1 Ensayo vía glicerol-3-fosfato

La actividad de la enzima *glicerol-3-fosfato aciltransferasa* se determinó usando [<sup>14</sup>C] glicerol-3-fosfato y palmitoil-CoA según el método descrito por LEHNER y KUKSIS (1995) con ligeras modificaciones. Los sustratos y cofactores de la reacción enzimática fueron los siguientes:

Solución basal 1:

0.002μmol L-[ <sup>14</sup> C(U)]glicerol-3-fosfato (A.e. 100 mCi/mM)
0.200μmol L-α-glicerol-3-fosfato
0.020μmol Palmitoil-CoA
70mM Tris-HCL (pH 7.4)
1mM DTT
3.0 mM MgCl <sub>2</sub>
2mg/ml suero de albúmina bovina

La reacción se inició con la adición de 200μl de microsomas (aproximadamente 0.8 mg proteína microsomal), que se incubaron a 37°C durante 10 minutos en un incubador con agitación Dubnoff (Melrose Park, Illinois, EEUU). El volumen final de la reacción fue de 0.5 ml. Se utilizaron viales de 5 ml (Pierce, Rockford, Illinois, EEUU). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

La reacción se terminó rápidamente por la adición de 4ml de cloroformo:metanol (2:1) conteniendo 0.01% BHT. Los lípidos se extrajeron según el método descrito por FOLCH *et al.*, (1957).

A continuación, estos lípidos se disolvieron en 3ml de cloroformo. Se tomaron alícuotas de 1ml que se evaporaron bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> durante 2 horas y se aplicaron en placas de HPTLC para su separación en lípidos neutros y polares. Dichas placas de sílica gel se limpiaron previamente con acetato de etilo y se activaron a 100°C durante 2 horas.

Los lípidos neutros se desarrollaron con el solvente hexano:dietileter:ácido acético (80:20:2, v/v). Los triacilgliceroles (TAG) y diacilgliceroles (DAG) se detectaron por la exposición con vapores de Yodo. Se emplearon estándares de TAG y DAG suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.) para su identificación.

Los lípidos polares se desarrollaron con el solvente cloroformo:metanol: 25% amoníaco:agua destilada (65:35:1:3, v/v) y se revelaron con vapores de Yodo. Se usaron estándares de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), lisofosfatidilcolina (LPC) y difosfoacilgliceroles (DPG) para su identificación.

Para la identificación del ácido fosfatídico (PA) las placas de HPTLC se prepararon en 0.25M de ácido oxálico y se activaron posteriormente a 100°C durante 2 horas. El solvente utilizado para su separación fue éter de petróleo:acetona:ácido fórmico (74:26:0.25, v/v) y se revelaron con vapores de Yodo. Para su identificación se empleó un estándar de PA.

Las áreas correspondientes a TAG, DAG, PC, PE y PA se rasparon y se transfirieron a viales de centelleo conteniendo 3ml de Optiphase "2" (Wallac, Finland). La radiactividad se determinó en un contador LKB Wallac, 1211 Rackbeta.

#### 2.6.4.2 Ensayo vía monoacilglicerol

La actividad del complejo *triacilglicerol sintetasa* se ensayó usando monoacilglicerol y [<sup>14</sup>C]Palmitoil-CoA como sustratos, según el método descrito por LEHNER y KUKSIS (1995) con algunas modificaciones. La mezcla del ensayo contenía:

Solución basal 2:

0.040μmol	1-monopalmitoil-rac-glicerol
0.001μmol	[1- <sup>14</sup> C]Palmitoil-CoA (A. e. 55 mCi/mmol)
0.020μmol	Palmitoil-CoA
70mM	Tris-HCl (pH 7.4)
1mM	DTT
3.0 mM	MgCl <sub>2</sub>
2mg/ml	suero de albúmina bovina

La reacción se inició con la adición de 200μl de microsomas (aproximadamente 0.8 mg proteína microsomal). El volumen final de la reacción fue de aproximadamente de 0.5 ml. Después de 10 minutos de incubación a 37°C, la reacción se terminó rápidamente con la adición de 4ml de cloroformo:metanol (2:1) conteniendo 0.01% BHT. Los lípidos se extrajeron mediante el método de FOLCH *et al.*, (1957). La separación en lípidos neutros y polares en placas de silica gel se realizó como anteriormente ha sido descrita para la vía glicerol-3-fosfato (apartado 2.6.4.1). De igual manera, las respectivas áreas de TAG, DAG, PC, PE y PA se rasparon de las placas de silica gel y su radioactividad se cuantificó en el contador de centelleo.

## **2.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis de varianza de una entrada (ANOVA) para los datos de todos los experimentos. Aquellos datos expresados en porcentajes se transformaron previamente en raíz cuadrada del arcoseno para conseguir varianzas homogéneas entre los grupos. Las diferencias entre medias se compararon con el test de Tukey o test de Duncan con un intervalo de confianza del 95% ( $P < 0.05$ ).

En los casos en que se obtuvo un valor de  $P \leq 0.05$  en el test de Barlett de homogeneidad de varianzas, los datos se sometieron al test no paramétrico de Kruskal-Wallis (SOKAL y ROLF, 1995). Y para determinar las diferencias entre las medianas de cada grupo se aplicó el gráfico de caja y bigotes con muescas (Box-and-Whisker-notched).

***EFEECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA  
EN LA HISTOLOGÍA DEL HÍGADO***

### **3. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA HISTOLOGÍA DEL HÍGADO**

#### **3.1 INTRODUCCIÓN**

Muchas especies de peces en determinadas épocas de su vida utilizan el tejido hepático para el almacenamiento de lípidos, sin que ello implique repercusiones patológicas. Sin embargo, una de las alteraciones histológicas frecuentemente observadas en las especies cultivadas en condiciones de producción intensiva es la acumulación creciente de grasas en el hígado o esteatosis hepática (MOSCONIBAC, 1990; SPISNI *et al.*, 1998). En la mayoría de los casos descritos, esta alteración aparece como resultado de desajustes en la dieta, desequilibrios en la relación de los niveles dietéticos de los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 (BAUTISTA y DE LA CRUZ, 1988; CABALLERO *et al.*, en prensa), deficiencias en ácidos grasos esenciales (MONTERO *et al.*, 2001), elevación del contenido dietético de lípidos (CABALLERO *et al.*, 1999) o enranciamiento de los mismos (ROBERTS y BULLOCK, 1989).

Debido a la tendencia actual al incremento de lípidos en las dietas para peces o a la utilización de aceites vegetales como consecuencia del creciente descenso en la producción de aceite y harina de pescado, el presente capítulo tiene como finalidad estudiar las implicaciones que dichas tendencias nutricionales tienen sobre la histología del hígado. Por esto, el primer objetivo fue evaluar las repercusiones histológicas del hígado de doradas alimentadas con diferentes porcentajes de lípidos combinados con dos calidades de harina de pescado (apartado 3.2). Un segundo objetivo fue determinar la influencia de la inclusión de aceites vegetales en el hígado de dorada y lubina tras ser alimentadas durante 3 meses con dietas conteniendo un 60% de aceites vegetales (apartado 3.3).

Además, debido a las discrepancias en sí el acumulo de grasas en el hígado de los peces pueda ser considerado como una respuesta fisiológica a un exceso de

---

## *Hígado*

---

---

lípidos o como una situación patológica (MOSCONI-BAC, 1987; SEGNER Y WITT, 1990), el tercero de los objetivos propuestos fue comprobar si la alimentación a largo plazo con estas dietas puede llegar a producir patologías hepáticas. Para ello, se diseñó una segunda experiencia donde doradas y lubinas fueron alimentadas a largo plazo con dietas conteniendo 60% y 80% de aceites vegetales (apartado 3.4). Por último, para comprobar la posible reversibilidad de los cambios estructurales del hígado, tras el periodo largo de alimentación con las dietas conteniendo aceites vegetales, las doradas fueron re-alimentadas con una dieta conteniendo 100% aceite de pescado durante los siguientes 3 meses (apartado 3.4).

## **3.2 EFECTOS DEL PORCENTAJE DE LÍPIDOS Y LA CALIDAD DE HARINA DE PESCADO EN DIETAS DE ENGORDE PARA DORADA\***

### **3.2.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Mil ciento cuarenta doradas de aproximadamente 70g de peso medio inicial procedentes de la granja comercial ADSA se aclimataron en tanques de 2 m<sup>3</sup> durante 3 semanas, siendo alimentadas con una dieta comercial (Mistral 3mm, Proaqua S.A., Palencia, España). Después del periodo de aclimatación, los peces se anestesiaron con clorobutanol (200mg/l agua), se pesaron y distribuyeron al azar en 12 tanques cilíndricos de 400 l en grupos de 60 peces por tanque. Cuando el peso de los peces se aproximó a los 150g se transfirieron a tanques de 1 m<sup>3</sup>. Estos tanques estaban provistos de aireación, ciclo natural de luz natural y un flujo continuo de agua de mar que fue incrementándose de 4 a 10 l/min en el transcurso del experimento. El rango de temperatura a lo largo del experimento osciló entre 20.8 y 24.4 °C. Los peces se alimentaron hasta saciedad aparente con las distintas dietas experimentales dos veces al día, 6 días a la semana durante los 6 meses de duración del experimento hasta que los peces alcanzaron un peso final aproximado de 400-450g (peso comercial en el mercado Mediterráneo). Los tratamientos se ensayaron por duplicado.

Las dietas experimentales fueron diseñadas y elaboradas en colaboración con la empresa noruega *Norwegian Herring Oil and Meal Industry Research Institute* (SSF). Esta empresa realizó los análisis de calidad de las harinas y la elaboración de las dietas. Como principal fuente proteica se utilizó harina de pescado de dos diferentes calidades, una harina de pescado de calidad "estándar" (denominada en este estudio como BC: baja calidad) y otra harina obtenida a baja temperatura (Norse-LT 94®) (denominada en este estudio AC: alta calidad).

\*Publicado como: Caballero, M.J., López-Calero, G., Socorro, J., Izquierdo, M.S., Fernández, A.J. 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179: 277-290

Ambas harinas fueron suministradas por Norsildmel (Noruega). La calidad se evaluó dependiendo de su contenido en aminos biogénicos (especialmente cadaverina) y su digestibilidad proteica para el visón (SKEDE, 1979). Para completar el nivel proteico en las dietas se utilizó harina de soja, pan rallado y harina de trigo. La composición bioquímica de las harinas se muestra en la Tabla 1.

La fuente lipídica utilizada en las todas las dietas fue aceite de pescado (NorSea Oil®). Las mezclas de vitaminas y minerales usadas en la elaboración de las dietas se obtuvieron de Hoffman La Roche, Suiza.

Con estos ingredientes, se formularon 6 dietas experimentales con tres niveles de lípidos (15, 22 y 27 %) y cada nivel de lípidos se combinó con cada una de las calidades de harina ensayadas en este experimento. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 2. Las dietas se procesaron por extrusión y se formularon para ser aproximadamente isocalóricas en energía bruta y similares en el contenido proteico (Tabla 2). Las dietas experimentales tuvieron una composición similar en ácidos grasos. Las principales familias de ácidos grasos de las distintas dietas experimentales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 1. Composición bioquímica de las harinas utilizadas para la elaboración de las dietas experimentales

	Harina de pescado alta calidad (AC)	Harina de pescado baja calidad (BC)	Harina de soja	Pan rallado	Harina de trigo
<i>(g/100g peso seco)</i>					
Proteínas (N x 6.25)	71.6	71.9	46.3	14.2	13
Lípidos	8.0	10.0	1.0	3.6	1.5
Cenizas	13.6	11.1	5.7	1.2	4.5
Humedad	8.3	7.2	11.6	5.2	12.9
Cadaverina	0.50	1.50	-	-	-
Histamina	0.20	0.24	-	-	-
Digestibilidad proteica <sup>a</sup>	91.6 ± 0.5	85.0 ± 1.2	-	-	-

<sup>a</sup> Digestibilidad para el visón (4 animales por muestra).

*Efectos del Porcentaje de Lípidos – Hígado*

Tabla 2. Ingredientes y análisis proximal de las dietas ensayadas en el presente experimento

	DIETA					
	AC 15	BC 15	AC 22	BC 22	AC 27	BC 27
<i>Ingredientes (g/ 100g)</i>						
Harina de pescado alta calidad (AC)	44.6	0	48.6	0	52.6	0
Harina de pescado baja calidad (BC)	0	45.6	0	49.7	0	53.7
Aceite de pescado	7.4	6.4	13.4	12.3	19.4	18.3
Harina de soja	22	22	17	17	12	12
Pan rallado	22	22	17	17	12	12
Harina de trigo	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Lecitina de soja <sup>a</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitaminas <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Minerales <sup>c</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Análisis Proximal (g/ 100g peso seco)</i>						
Proteínas (N x 6.25)	47.7	51.7	47.5	49.8	48.3	49.7
Lípidos	15.1	16.0	22.8	24.1	27.0	29.2
Cenizas	9	7.4	8.5	11.3	9.2	7.7
Carbohidratos <sup>d</sup>	28.2	24.9	21.2	14.8	12.1	13.4
Energía bruta(MJ/ kg)	22	22	24	24	25	25

<sup>a</sup> Lecitina de soja obtenida de Denofa (Fredikstad, Norway).

<sup>b</sup> Por Kg de pienso: vitamina A 3000 IU (Rovimix A 500P); vitamina D<sub>3</sub> 1600 IU (Rovimix D<sub>3</sub> 500); vitamina E 160mg (Rovimix E50SD); tiamina 12mg (thiamin mononitrate); riboflavina 24mg (Rovimix B280SD); piridoxina 12mg (pyrodoxin HCl); vitamina C 60mg (Rovimix Stay-C25); ácido pantoténico 48mg (Rovimix Calpan); biotina 0.6mg (Rovimix H2); ácido fólico 6.0mg (Rovimix Folic 80SD); niacina 120mg (Rovimix Niacin); vitamina B<sub>12</sub> 0.024mg (B12 1% FG); menadiona Nabisulfito 12mg.

<sup>c</sup> Por Kg de pienso: MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 10mg; MgHPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 500mg; FeSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 50mg; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 80mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 5mg; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 400mg; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400mg; CaCO<sub>3</sub>, 18.89 mg.

<sup>d</sup> Carbohidratos = NFE + fibra = 1000-proteína-lípidos-cenizas.

Tabla 3. Principales ácidos grasos de los lípidos totales de las distintas dietas experimentales (n=3)

	DIETA					
	AC 15	BC 15	AC 22	BC 22	AC 27	BC 27
Σ Saturados	24,40	26,41	25,46	25,60	25,07	24,17
Σ n-3	20,20	19,81	18,44	19,57	18,13	17,61
Σ n-6	5,63	7,78	5,40	5,57	3,81	3,52
Σ n-9	12,94	13,14	14,48	13,10	14,36	11,84
Σ n-3 HUFA	15,48	14,99	14,52	14,94	14,17	15,53

Al final del experimento, se tomaron los hígados de 8 peces por cada tanque para el estudio estructural. Estas muestras se fijaron y prepararon para su inclusión en parafina como ha sido descrito en el apartado 2.4.2 de Material y Métodos. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Para el estudio ultraestructural, se tomaron los hígados de 2 peces por cada tanque. Estos se trocearon en pequeñas piezas y se incluyeron en sus correspondientes bloques con resina (apartado 2.4.3 de Material y Métodos). Dos bloques se tomaron al azar para cada muestra. De cada uno se realizó al azar un corte del tejido hepático que se colocó en rejilla de cobre para su estudio empleando el microscopio electrónico.

El diámetro de las vacuolas lipídicas se midió sobre placas negativas de fotos realizadas en el microscopio electrónico, como ha sido descrito en el apartado 2.4.5.1 de Material y Métodos. Para cada dieta, se midieron 10 placas con el mismo aumento (1950x) escogidas al azar. El área se expresó en micras cuadradas ( $\mu\text{m}^2$ ).

### 3.2.2 RESULTADOS

En este apartado se han incluido los resultados de crecimiento importantes para el analizar las repercusiones histológicas.

#### *Crecimiento*

Los valores obtenidos para el crecimiento expresado en peso final de los peces alimentados con las diferentes dietas experimentales se muestran en la Fig. 6.

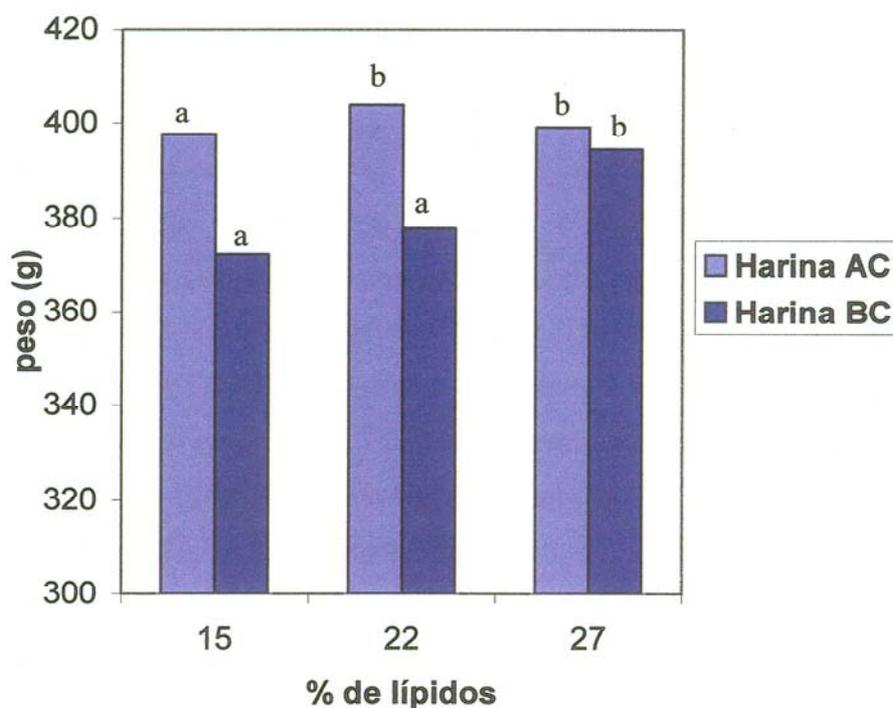


Fig. 6. Crecimiento expresado en peso medio final de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales \* ( $P < 0.05$ ) ( $n=60 \times 3$ ).

Comparando los resultados de crecimiento entre los niveles dietéticos de lípidos para cada calidad de harina de pescado ensayada, se observó que entre los peces alimentados con dietas conteniendo harina de pescado AC, aquellos alimentados con sólo 15% de lípidos mostraron significativamente ( $P < 0.05$ ) los

---

peores crecimientos. En cambio, en los peces alimentados con dietas conteniendo harina de pescado BC, solamente el 27% de lípidos en la dieta mejoró significativamente ( $P<0.05$ ) el crecimiento.

Por otro lado, comparando los resultados de crecimiento entre las dos calidades de harina ensayadas para cada nivel dietético de lípidos, sólo se encontraron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) para aquellos peces alimentados con dietas conteniendo 22% de lípidos, obteniéndose los mayores crecimientos en los peces alimentados con harina de alta calidad. Por el contrario, no existieron diferencias en el crecimiento entre calidades de harina para el resto de niveles lipídicos ensayados (15% y 27%).

### ***Histología del hígado***

La presentación de los resultados histológicos se realizará describiendo las imágenes de microscopía óptica y electrónica del hígado para cada nivel de lípidos (15, 22 y 27%) y comparando calidades de harina para cada uno de ellos.

#### *15% de lípidos*

En los hígados de estos peces se observaron hepatocitos con núcleos grandes y esféricos localizados en posición central y un citoplasma moderadamente eosinofílico. Se visualizaron prominentes nucleolos (Fig.1a). Al microscopio electrónico se observaron pequeñas vacuolas lipídicas distribuidas por el citoplasma del hepatocito. Los núcleos fueron grandes y los orgánulos citoplasmáticos se encontraron desplazados hacia la periferia de la célula (Fig.1b).

#### *22% de lípidos*

Los hígados mostraron una morfología similar a la de los peces alimentados con 15% de lípidos. Los núcleos celulares eran grandes y esféricos, pero que en este

caso se encontraron desplazados hacia la periferia de los hepatocitos (Fig.2a). Ultraestructuralmente, los hepatocitos presentaron núcleos y orgánulos citoplasmáticos desplazados a la periferia celular debido al incremento de tamaño de las vacuolas lipídicas observadas en el citoplasma (Fig. 2b).

*27% de lípidos*

Los hígados pertenecientes a los peces alimentados con *27% de lípidos y harina de BC* mostraron características morfológicas similares a los descritos para dietas conteniendo 22% de lípidos y la misma calidad de harina, observándose hepatocitos con moderada eosinofilia citoplasmática, núcleos grandes y esféricos desplazados del centro celular (Fig.3a). Ultraestructuralmente, los hepatocitos mostraron gran número de vacuolas lipídicas distribuidas en el citoplasma y núcleos celulares grandes y esféricos en la periferia celular (Fig.3b).

En los hígados de peces alimentados con *27% y harina de AC* se observaron focos de hepatocitos voluminosos con núcleos alargados en forma de media luna situados en el borde celular. El citoplasma poco eosinofílico indicaba la presencia de abundantes vacuolas de naturaleza lipídica en su interior (Fig. 4a). Ultraestructuralmente, se confirmó en los hepatocitos de dietas AC la presencia de grandes vacuolas lipídicas de gran tamaño y en pequeño número uniéndose entre sí que causaban el desplazamiento del núcleo y de los orgánulos citoplasmáticos hacia la periferia de la célula. El núcleo celular era alargado e irregular (Fig. 4b).

La presencia de vacuolas lipídicas en los hígados de las distintas dietas experimentales se puso también de manifiesto con la técnica histoquímica de Oil-Red O realizada en cortes por congelación (Fig.5).

*Análisis morfométrico del hígado*

Se realizó un análisis de imagen donde se midió el área de las gotas lipídicas de los hepatocitos en las imágenes tomadas con el microscopio electrónico. Los valores obtenidos para las diferentes dietas experimentales se muestran en la Fig. 7.

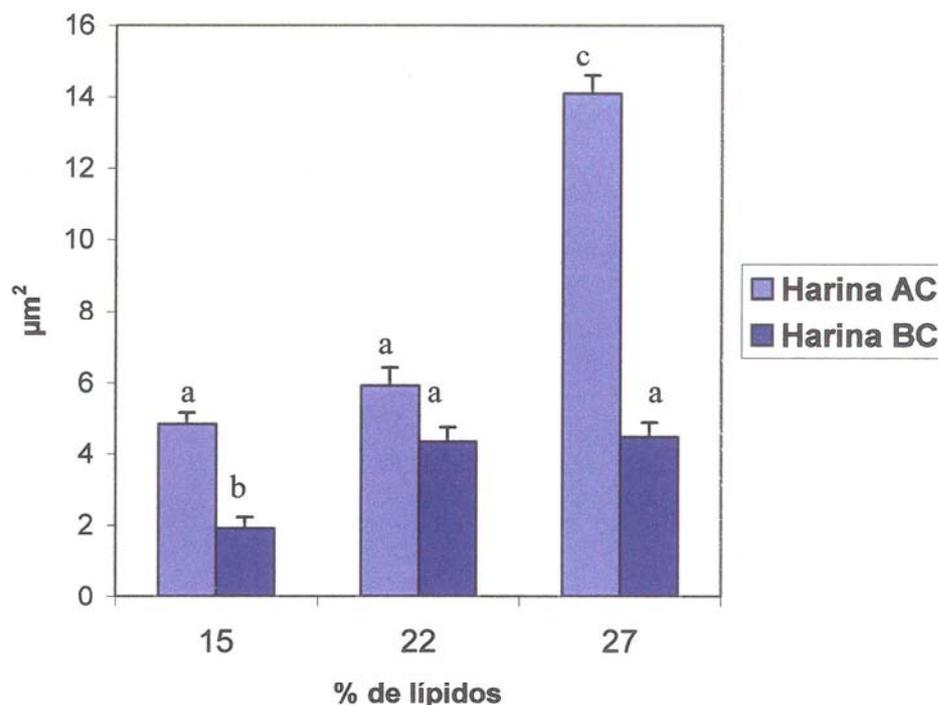


Fig. 7. Área de las gotas lipídicas observadas en los hígados de los peces alimentados con las dietas experimentales, comparando los distintos niveles de lípidos en la dieta para cada calidad de harina ensayada \* ( $P < 0.05$ ) (media  $\pm$  error standar).

En general, se encontraron las mayores áreas de vacuolas lipídicas en los hígados de los peces alimentados con harina de AC.

En los hígados pertenecientes a los peces alimentados con harina AC se observaron áreas significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) para el nivel 27% de lípidos. Para los peces alimentados con harina de BC las áreas significativamente menores ( $P < 0.05$ ) se observaron para el nivel más bajo 15% de lípidos.

### *Efectos del Porcentaje de Lípidos – Hígado*

---

---

Comparando entre calidades de harina, para el 15% de lípidos, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en aquellos hepatocitos de peces alimentados con dietas conteniendo harina BC. Para 22% de lípidos no se observaron diferencias significativas entre calidades de harina en el área lipídica. En el nivel más alto de lípidos (27%), los hepatocitos de dietas conteniendo harina AC presentaron las mayores áreas ( $P < 0.05$ ) con respecto a la dieta conteniendo harina BC.

**3.2.3 ICONOGRAFÍA**

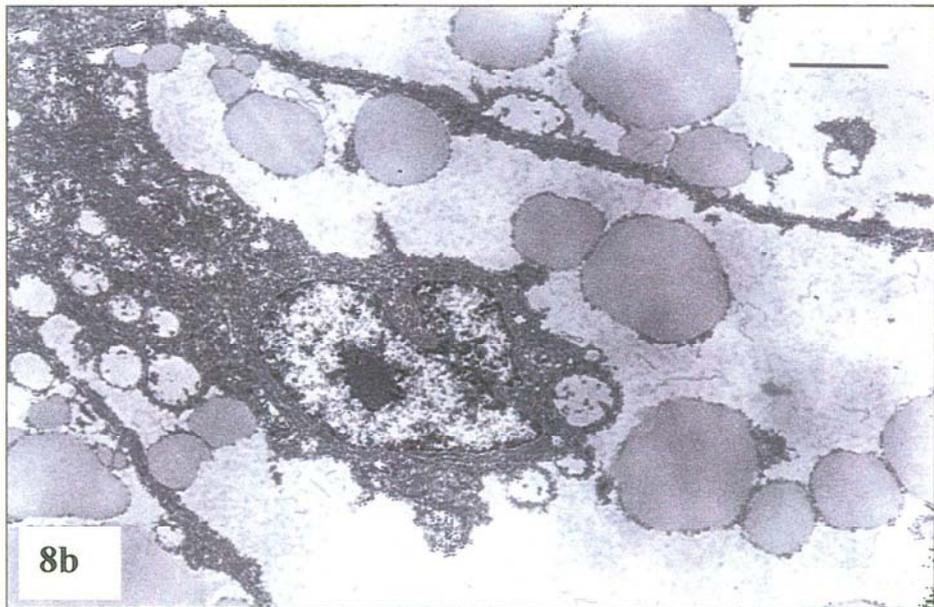
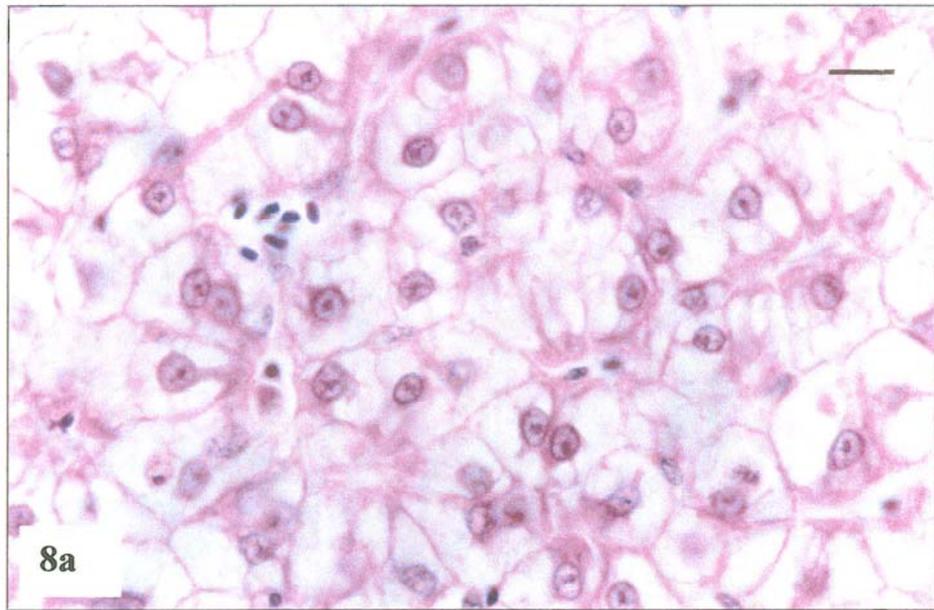
*15% de lípidos*

Figura 8a. Hepatocitos con núcleos grandes y esféricos en posición central. H&E.

Barra= 10 $\mu$ m

Figura 8b. Pequeñas vacuolas lipídicas distribuidas por el citoplasma del hepatocito.

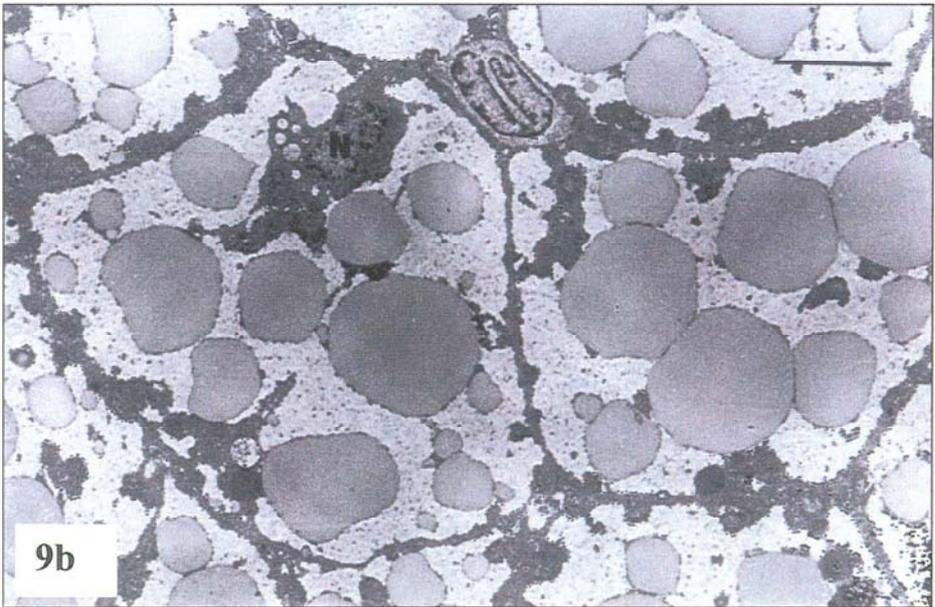
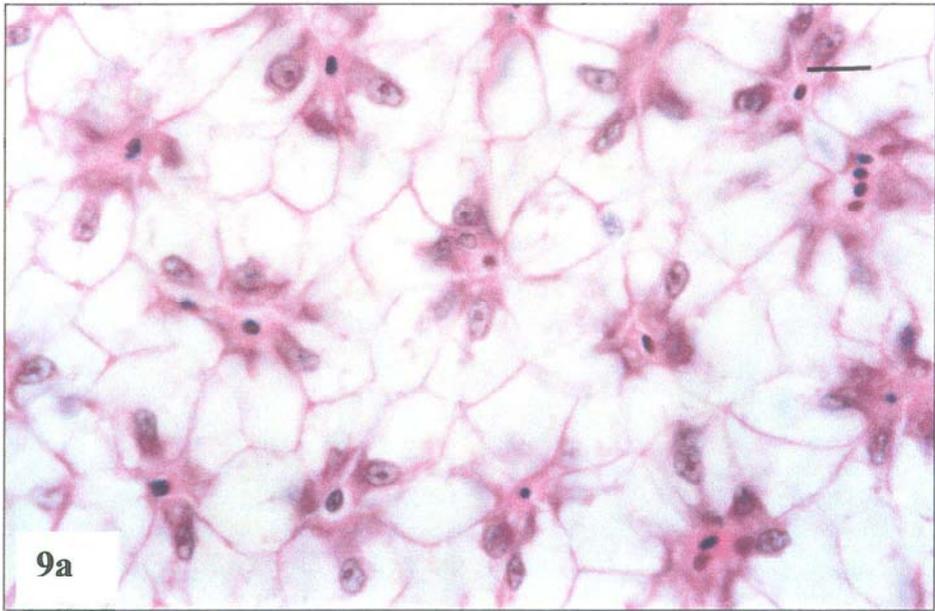
Barra= 2.5 $\mu$ m



*22% de lípidos*

Figura 9a. Núcleos grandes y esféricos pero desplazados hacia la periferia de los hepatocitos (flecha). H&E. Barra= 10 $\mu$ m

Figura 9b. Barra= 5 $\mu$ m

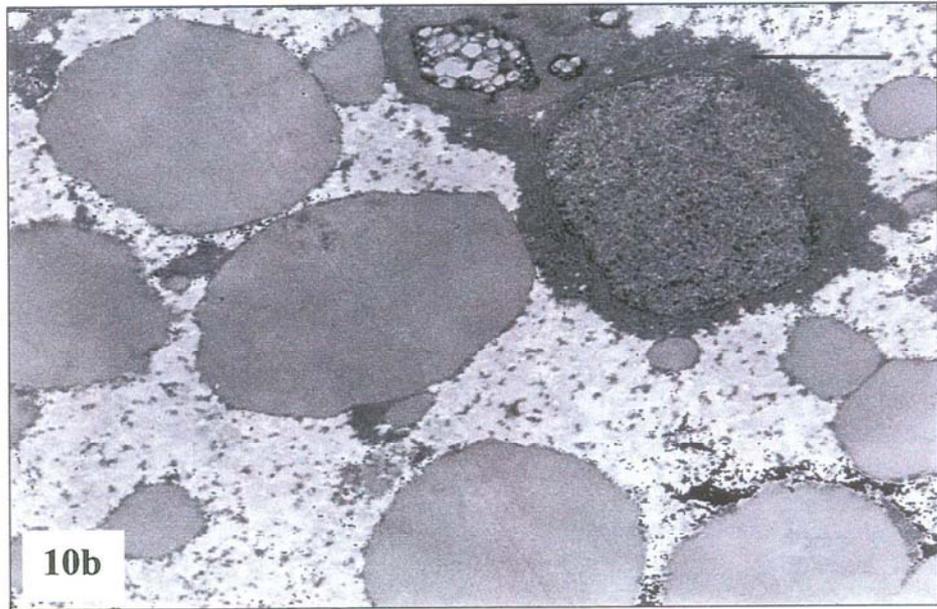
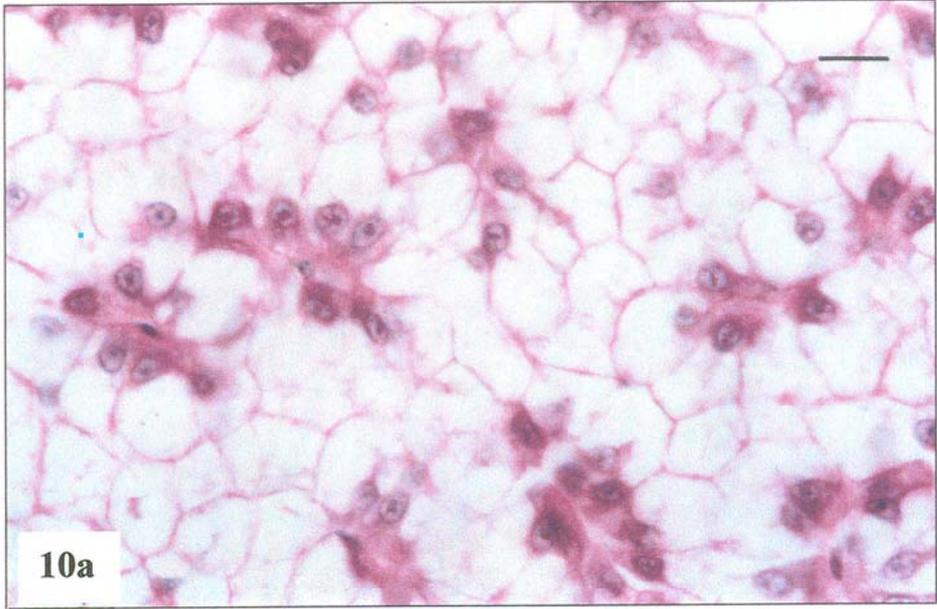


*27% lípidos. Harina de pescado de baja calidad (BC)*

Figura 10a. Hepatocitos con núcleos grandes y esféricos desplazados hacia la periferia similares a los observados para 22% de lípidos (véase figura 9a).

H&E. Barra= 10 $\mu$ m

Figura 10b. Núcleo celular grande y esférico. Barra= 2.5 $\mu$ m



*27% de lípidos. Harina de pescado de alta calidad (AC)*

Figura 11a. Foco de hepatocitos voluminosos con núcleos alargados en forma de media luna situados en el borde celular. H&E. Barra= 10µm

Figura 11b. Grandes vacuolas lipídicas en pequeño número uniéndose entre sí que causan el desplazamiento del núcleo y organelas citoplasmáticas. Barra= 5µm

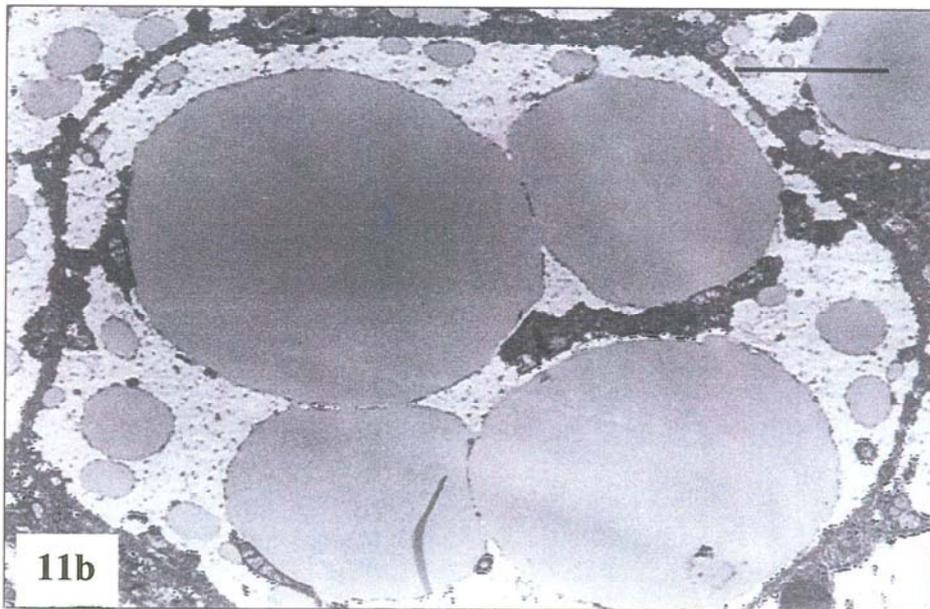
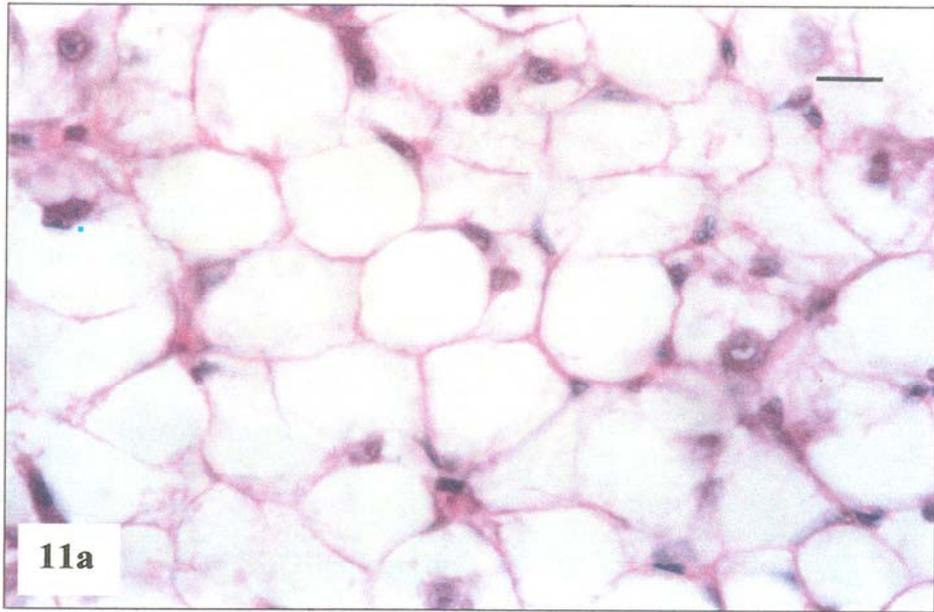
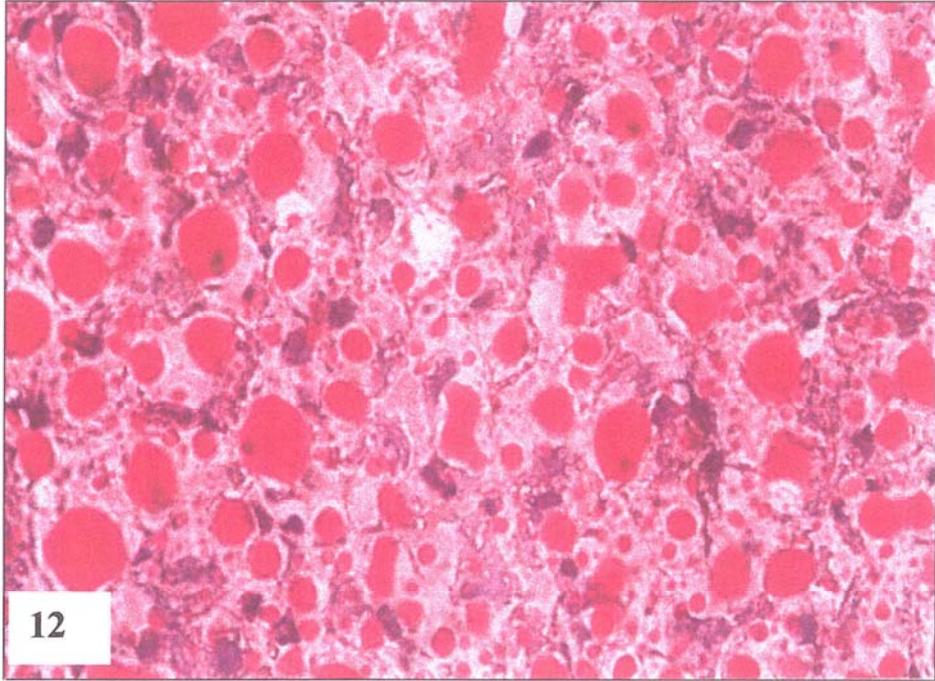


Figura 12. Vacuolas lipídicas teñidas con Oil-Red-O. *27% de lípidos y harina de pescado de alta calidad* ( $\times 1000$ ).



### 3.2.4 DISCUSION

La calidad de la harina de pescado fue evaluada dependiendo de la temperatura de su procesamiento y el contenido en aminos biogénicos. En general, las condiciones de procesamiento parecen afectar al valor biológico de las harinas (PIKE *et al.*, 1990). Varios estudios, principalmente en salmón, han demostrado que la temperatura de procesamiento de la harina puede influir en el crecimiento de los peces alimentados con ella, fundamentalmente por afectar la digestibilidad de la proteína (PIKE *et al.*, 1990; MOKSNESS *et al.*, 1995; AKNES y MUNDHEIM, 1997; AKSNES *et al.*, 1997). En este sentido, MOKSNESS *et al.*, (1995) concluyen que el tratamiento de calor puede alterar significativamente los amino ácidos libres en las harinas, con efectos negativos sobre la palatabilidad y digestibilidad de las dietas, afectando al crecimiento. PIKE *et al.*, (1990) han mostrado que la digestibilidad proteica ensayada en visón y trucha disminuye significativamente con el incremento de la temperatura de procesamiento de la harina de pescado. Asimismo, AKSNES y MUNDHEIM (1997) describen una reducción del 4% en la digestibilidad de la proteína para dietas procesadas a altas temperaturas y, consecuentemente, una reducción en el crecimiento en halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) alimentados con esas dietas. En el presente estudio, el crecimiento de los peces mostró una tendencia a decrecer cuando los peces fueron alimentados con dietas preparadas con baja calidad de harina de pescado, procesadas a 100°C comparado con las dietas preparadas con harinas de alta calidad procesadas a 60°C. Así pues, concordando con los resultados de los anteriores autores, la diferencia en la temperatura de procesamiento de las harinas podrían ser la causa del diferente crecimiento observado entre los grupos experimentados. Similares resultados han sido observados para rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (DANIELSEN *et al.*, 1989), trucha, salmón atlántico (*Salmo salar*) (MUNDHEIM y OPSTVEDT, 1989), y salmón chinook (*Salmo tshawytscha*) (McCALLUM y HIGGS, 1989).

En relación al nivel dietético de lípidos, se observó una reducción del crecimiento en los peces alimentados con el 15% de lípidos para ambas calidades de

---

harina de pescado. Este hecho podría indicar que este nivel de lípidos es insuficiente para cubrir las necesidades energéticas del organismo, llegando a una subsecuente utilización de la proteína de la dieta para este fin, disminuyendo su utilización como promotora del crecimiento. Esta idea está en concordancia con las imágenes histológicas observadas en los hígados de los peces alimentados con estas dietas. Así, los hepatocitos de estos peces mostraron núcleos grandes y esféricos localizados centralmente y escasas vacuolas lipídicas de pequeño tamaño. Esta imagen histológica reflejaría la utilización de los lípidos en los peces alimentados con los niveles bajos de lípidos con el fin de obtener energía, impidiendo su acumulación en el hígado. A este respecto, JOBLING *et al.*, (1991) observan en bacalao que los peces alimentados con dietas de baja energía conteniendo además niveles bajos de lípidos presentan una disminución en el peso de sus hígados y concluyen que la acumulación de lípidos en el hígado depende no sólo de la relación proteína-energía de las dietas sino del porcentaje de lípidos de éstas. Por otro lado, el bajo contenido de lípidos en estas dietas puede ser el responsable de enmascarar un posible efecto de la calidad de la harina de pescado utilizada.

El crecimiento de los peces alimentados con 22% de lípidos incrementó en comparación con los peces alimentados con 15% de lípidos y según el tipo de harina empleada, denotando un efecto “ahorrador” de proteínas por parte de los lípidos dietéticos. El incremento en el crecimiento se debería a una mejor utilización proteica en estos peces, siendo posible esto al incrementarse el porcentaje de lípidos en las dietas con la consiguiente utilización de los mismos con fines energéticos. Así, la retención de proteína es aumentada por el efecto “ahorrador” de los lípidos (KAUSHIK y MÉDALE, 1994). Este efecto ahorrador motivado por el incremento de lípidos en la dieta ha sido estudiado en varias especies de peces. ARZEL *et al.*, (1994) encontraron un incremento en la utilización de la proteína en truchas (*Salmo trutta*) alimentadas con dietas conteniendo alto contenido lipídico. VAN DER MEER *et al.*, (1997) describieron un incremento en la deposición de proteína en *Colossoma macropomun* alimentados con altos niveles de lípidos en dieta. En trucha arco iris, BEAMISH y MEDLAND (1986) encontraron un efecto “ahorrador” cuando el

contenido lipídico de las dietas incrementó del 12 a 24%. Un efecto similar fue encontrado en dorada (VERGARA *et al.*, 1996) cuando se incrementó el porcentaje de lípidos de 9 a 15%, resultando en un aumento en el crecimiento. En el presente estudio, el efecto “ahorrador” observado en los peces alimentados con 22% de lípidos fue mas evidente para aquellos peces alimentados con dietas conteniendo alta calidad de harina de pescado, que mostraron los mayores crecimientos. En cuanto a las imágenes histológicas, el desplazamiento nuclear en los hepatocitos de los peces alimentados con 22% de lípidos y las grandes vacuolas lipídicas observadas en el estudio ultraestructural parecen ser solamente una adaptación del hígado a un incremento en el contenido dietético de lípidos. Esta idea estaría en concordancia con los resultados obtenidos por MOSCONI-BAC (1987) quién sugiere que la presencia de numerosas y voluminosas vacuolas lipídicas en los hepatocitos puede ser una respuesta fisiológica a un exceso de lípidos, representando un almacén de energía y no una situación patológica. SEGNER y WITT (1990) también encuentran que un incremento de lípidos en rodaballo después del destete puede ser debido solamente a cambios en la alimentación y ser considerado como una expresión de un buen estado nutricional, lejos de ser un síndrome patológico. En la mayoría de peces marinos, el depósito lipídico en el hígado sin modificaciones estructurales en los hepatocitos puede ser considerado como un mecanismo de adaptación a diferentes condiciones nutricionales (KAUSHIK, 1997).

La elevación de los niveles lipídicos de 22 a 27% condujo a un incremento del crecimiento en aquellos peces alimentados con dietas conteniendo harina de baja calidad. Estos resultados pueden ser explicados nuevamente como reflejo de un efecto “ahorrador” de los lípidos al incrementarse éstos en la dieta para aquellos peces alimentados con harina de baja calidad. Sin embargo, el buen crecimiento obtenido en los peces alimentados con 22% de lípidos y harina de alta calidad no incrementó cuando el nivel de lípidos fue elevado a 27%, lo que significaría que el incremento de lípidos en estas dietas supone un exceso de energía para el organismo sin obtener un beneficio en el crecimiento de los peces, tendiéndose por ello al depósito grasa en los distintos tejidos. Diversos autores han concluido que un exceso

de energía en las dietas se manifiesta en deposición grasa en carcasas y vísceras. Así, para tilapia (*Oreochromis niloticus*) HANLEY (1991) encuentra que un aumento de lípidos en las dietas pueden resultar en la producción de peces “grasos”. Similares resultados han sido obtenidos en pez gato (*Clarias batrachus*) (ERFANULLAH, 1998), bacalao (JOBLING *et al.*, 1991) y el híbrido de tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) (CHOU y SHIAU, 1996).

De igual manera, efectos de la calidad de la harina fueron observados en la morfología del hígado en los peces alimentados con el mayor porcentaje de lípidos. Por un lado, peces alimentados con harina de baja calidad mostraron similar morfología hepática a la observada con 22% de lípidos y la misma calidad de harina, encontrándose hepatocitos con grandes núcleos desplazados hacia la periferia celular y vacuolas lipídicas de tamaño medio.

Por el contrario, los peces alimentados con el 27% de lípidos y harina de alta calidad mostraron focos de hepatocitos voluminosos con núcleos irregulares localizados en la periferia de la célula. Esta observación esta en concordancia con el hecho que el incremento de lípidos al 27% no promovió un efecto “ahorrador” en los peces alimentados con harina de alta calidad, llegando a un incremento en la deposición de lípidos en los hepatocitos, que no se observó cuando se usó harina de pescado de baja calidad. Las modificaciones estructurales del núcleo celular observadas en los hepatocitos de este grupo experimental podrían reflejar una patología nutricional. Algunos autores han descrito que el tamaño del núcleo del hepatocito puede ser usado como un indicador del estado nutricional del pez (ESCAFFRE y BERGOT, 1986; SEGNER y BRAUNBECK, 1988; STRÜSSMAN y TAKASHIMA, 1990). MOSCONI-BAC (1987) relacionaron las modificaciones de la forma del núcleo celular, de la densidad de la cromatina y la atípica deposición de vacuolas lipídicas en lubina alimentadas con dietas artificiales con una alteración del metabolismo lipídico en el hígado, siendo signo de una patología nutricional. GHITTINO (1978) también consideró este tipo de deposición lipídica como un proceso patológico, refiriéndolo como una degeneración grasa o esteatosis, reflejo de

disturbios hepáticos como consecuencia del metabolismo de las grasas. SPISNI *et al.*, (1998) describieron la esteatosis como una alteración del hígado debido a un exceso de lípidos dietéticos, que saturan la capacidad fisiológica del hígado, llegando a su acumulación. Similar deposición lipídica en el hígado debida a una entrada masiva de lípidos ha sido descrita para otros vertebrados tales como pollos, denotando una situación patológica (STAKE *et al.*, 1980). Aunque estas observaciones no tienen porque ser de carácter irreversible, sería conveniente determinar cuanto tiempo puede ser mantenido un régimen rico en lípidos antes que los cambios estructurales de los hepatocitos lleguen a ser irreversibles, esta idea es defendida por varios autores STORCH *et al.*, (1984) y MOSCONI-BAC (1990).

Por último hay que señalar que AKSNES y MUNDHEIM (1997) encontraron alteraciones histológicas en el hígado de halibut alimentados con dietas conteniendo harina de pescado de baja calidad, procedente de materias primas alteradas. Estos autores sugieren un efecto negativo como consecuencia del alto contenido de aminas biogénicas encontrado en estas harinas. En el presente estudio, el contenido de aminas biogénicas fue más bajo que el descrito por estos autores, por lo que el nivel de lípidos en la dieta parece afectar significativamente más a la morfología del hígado que el contenido de aminas biogénicas en las dietas.

En conclusión el incremento de los niveles dietéticos de lípidos ocasiona un aumento en la deposición de grasa en el hígado y así, la morfología hepática observada en doradas alimentadas con un 22% de lípidos y alta y baja calidad de harina de pescado refleja un almacén de reservas lipídicas sin consecuencias patológicas. Sin embargo, no sólo el contenido de lípidos de la dieta, sino también la calidad de la proteína utilizada, y por lo tanto la disponibilidad de energía digerible o metabolizable, afectan la morfología hepática, por lo que la esteatosis observada en los peces alimentados con 27% de lípidos y harina de alta calidad parece ser un reflejo de la no utilización de los lípidos dietéticos. Estos resultados muestran que los efectos beneficiosos del porcentaje de lípidos siguen una curva y que la determinación del punto óptimo depende de la calidad de la harina de pescado. En la

### *Efectos del Porcentaje de Lípidos – Hígado*

---

práctica, la determinación de los niveles óptimos de lípidos dietéticos para obtener el mejor crecimiento dependerá no sólo de la cantidad sino también de la calidad de la proteína, por lo que el productor debería exigir en el etiquetado de los piensos información no sólo de la cantidad de nutrientes sino de la calidad de las materias primas utilizadas en la elaboración de los mismos. Por último, este estudio confirma que los estudios de las alteraciones histológicas del hígado bajo distintas condiciones ofrecen una idea del estado de los tejidos y células, completando la información obtenida con otros parámetros, que en su conjunto determinan el estado nutricional del pez.

### **3.3 EFECTOS A MEDIO PLAZO DE NIVELES MODERADOS DE ACEITES VEGETALES EN SUSTITUCIÓN DEL ACEITE DE PESCADO EN DIETAS PARA DORADA Y LUBINA**

#### **3.3.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Las doradas y lubinas utilizadas en esta experiencia fueron suministradas por la empresa local ADSA. Trescientas doradas de aproximadamente 10 g de peso medio se distribuyeron en tanques circulares de polietileno de 100 L de capacidad (20 peces/ tanque). Cada tanque estaba provisto de un flujo continuo de agua de mar (36 ‰) y aireación. El rango de temperatura del agua a lo largo del experimento fue de 20.0 - 24.2°C y el oxígeno disuelto entre 5.0 - 8.3 ppm. Los peces se sometieron a un fotoperiodo natural de aproximadamente 12h luz/ 12h oscuridad. Tras la finalización del experimento con dorada, 450 lubinas de aproximadamente 8 g de peso medio se distribuyeron en los tanques (30 peces/tanque). La temperatura del agua a lo largo de este experimento osciló entre 21.5 y 22.8°C y el oxígeno disuelto entre 5.2 y 7.4 ppm.

En ambos experimentos los peces se aclimataron a los tanques durante 2 semanas con la dieta control previamente a la administración de las distintas dietas experimentales. Las dietas se suministraron hasta saciedad aparente tres veces al día, durante 3 meses. Las dietas experimentales se ensayaron por triplicado.

Cinco dietas experimentales se formularon en colaboración con la empresa noruega *Nutreco Aquaculture Research Centre A/S* y el *Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA)*. Las dietas fueron iso-energéticas e iso-protéicas (45%) y con un contenido de lípidos alrededor de un 25% en peso seco. La única fuente de lípidos añadida a la dieta control (100P) fue aceite de pescado, mientras que en el resto de las dietas el 60% del aceite de pescado se reemplazó por aceites vegetales. Así, aceites de soja, colza o lino y una combinación de los tres se usaron en las dietas 60S, 60C, 60L y 60Mix, respectivamente.

Las dietas elaboradas con aceites vegetales mantuvieron un nivel de n-3 HUFAs por encima del 3% para poder satisfacer los requerimientos en ácidos grasos esenciales de estas especies (MONTERO, 1996; LANARI *et al.*, 1999). Así, mientras la dieta 100P contenía 6.71% en peso seco de n-3 HUFAs, las otras dietas contenían entre un 3.5 - 4 % de n-3 HUFAs (Tabla 4). El contenido en EPA y DHA de la dieta 100P fue mayor que en el resto de las dietas (13.9 y 8.9%, respectivamente), que tuvieron semejante porcentaje en cada uno de estos ácidos grasos (7.5 y 5.4%, respectivamente). Por otra parte, la proporción de ácidos grasos de la serie n-3 con respecto a los de la serie n-6 (n-3/n-6) varió en gran manera entre las dietas experimentales, debido principalmente al contenido en ácido linoleico de los aceites vegetales usados, así la relación n-3/n-6 fue de 0.8 para la dieta 60S y de 3.3 para la dieta 100P. El ácido mayoritario de la dieta 60C fue el ácido oleico con un porcentaje del 27.8% y las dietas 60L y 60Mix destacaron por su alto contenido en 18:3n-3 (23.0 y 18.2%, respectivamente). El contenido de ARA fue mayoritario en las dietas 100P y 60S comparado con el resto de dietas que tuvieron el mismo porcentaje. La composición en ácidos grasos de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de lípidos y principales ácidos grasos de las distintas dietas experimentales

	DIETA				
	100P	60S	60C	60L	60Mix
<i>Lípidos (%)</i>	26.7	23.2	25.8	26.6	28.5
<i>Ácidos grasos (% área)</i>					
14:0	5.9	3.4	3.1	3.1	3.0
16:0	15.5	13.4	11.3	11.0	11.2
16:1n-7	6.6	3.8	3.6	3.4	3.4
16:2n-6	0.9	0.5	0.4	0.4	0.4
16:4n-1	1.8	1.0	0.9	0.9	0.9
18:0	2.8	3.3	2.4	2.9	2.8
18:1n-9	11.4	14.4	27.8	15.1	17.8
18:1n-7	2.4	1.9	2.7	1.7	1.9
18:2n-6	7.3	26.2	16.0	13.0	14.6
18:3n-3	3.8	4.7	5.2	23.0	18.2
18:4n-3	2.2	1.4	1.3	1.2	1.2
20:0	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
20:1n-9	2.1	1.8	2.3	1.8	1.9
20:4n-6	0.6	0.4	0.3	0.3	0.3
20:4n-3	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3
20:5n-3	13.9	8.1	7.5	7.3	7.3
22:0	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2
22:1n-11	1.9	1.8	1.9	1.8	1.9
22:5n-6	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
22:5n-3	1.3	0.8	0.7	0.7	0.7
22:6n-3	8.9	5.6	5.4	5.3	5.4
$\Sigma$ Saturados	25.0	20.9	17.8	17.6	17.8
$\Sigma$ Monoinsaturados	25.9	24.8	39.5	25.1	28.2
$\Sigma$ n-3	31.2	21.3	20.7	38.2	33.4
$\Sigma$ n-6	9.4	27.5	17.2	14.1	15.7
$\Sigma$ n-9	14.2	16.7	30.9	17.7	20.5
n-3/n-6	3.3	0.8	1.2	2.7	2.1
n-3 HUFA	25.2	15.2	14.2	13.9	14.0
n-3 HUFA (% p.s.)	6.7	3.5	3.7	3.7	4.0

Al final del experimento, se tomaron los hígados de 4 peces por cada tanque al azar para el estudio histológico, en total 12 hígados para cada dieta experimental. Las muestras se tomaron tras 24 horas de inanición. Los hígados se procesaron para su posterior inclusión en parafina o en resina según lo descrito en los apartados 2.4.2 y 2.4.3, respectivamente. Los cortes de parafina (4 $\mu$ m) se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) y los semifinos (1 $\mu$ m) con azul de toluidina-fuschina básica (AT&FB) para la visualización de los lípidos, como se ha descrito en los anteriores apartados de Material y Métodos. Sobre los semifinos se realizó el análisis estereométrico, calculando el porcentaje de tejido hepático ocupado por vacuolas lipídicas (ver apartado 2.4.5.1 de Material y Métodos).

### 3.3.2 RESULTADOS

#### *Crecimiento*

La Tabla 5 muestra los pesos iniciales y finales de doradas y lubinas alimentadas con las distintas dietas experimentales. Para ninguna de las dos especies hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el peso final entre los distintos grupos experimentales. Comparando las dos especies, las lubinas mostraron un crecimiento más lento que las doradas, creciendo aproximadamente la mitad que éstas.

Tabla 5. Peso inicial y final de doradas y lubinas alimentadas con las dietas experimentales durante 3 meses\*

DIETA	<i>Dorada</i>		<i>Lubina</i>	
	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
100P	9.98 ± 1.55	65.38 ± 9.28	7.97 ± 0.08	32.12 ± 0.6
60S	10.11 ± 1.56	63.10 ± 9.42	7.93 ± 0.09	31.38 ± 0.4
60C	10.09 ± 1.32	68.58 ± 11.50	7.96 ± 0.08	29.23 ± 0.1
60L	10.07 ± 1.59	67.62 ± 10.24	8.04 ± 0.27	31.05 ± 0.9
60Mix	10.07 ± 1.45	66.31 ± 10.10	8.02 ± 0.21	32.03 ± 4.6

\* (media ± SD);(doradas n=20x3; lubinas n=30x3).

### ***Histología del hígado***

Tanto en dorada como en lubina, no se observaron daños en el parénquima hepático tales como necrosis, o infiltrado celular para ningún grupo experimental. De modo que solamente se encontraron diferencias morfológicas en los hepatocitos de los distintos grupos experimentales debido principalmente al acúmulo de lípidos.

#### ***Dorada***

Los hígados de las doradas alimentadas con la dieta 100P mostraron hepatocitos de morfología cuadrangular, con núcleos grandes y redondeados localizados principalmente en posición central (Fig. 13a). Los cortes semifinos teñidos con AT&FB revelaron la existencia de vacuolas lipídicas en el citoplasma celular, que en algunos hepatocitos ocupaban por completo el citoplasma (Fig. 13b).

Los hígados de los peces alimentados con la dieta 60S mostraron hepatocitos voluminosos con núcleos de morfología irregular y localizados en la periferia de la célula (Fig. 14a). La tinción con AT&FB reveló la existencia de focos de hepatocitos esteatósicos caracterizados por presentar una gran vacuola lipídica que, ocupando todo el citoplasma, desplazaba al núcleo hacia la periferia celular (Fig. 14b).

La tinción de H&E mostró que los hígados de los peces alimentados con la dieta 60C presentaban una morfología similar a la del grupo 60S, con hepatocitos voluminosos y núcleos desplazados hacia la periferia (Fig. 15a). Sin embargo, la tinción AT&FB reveló diferencias en el tamaño y número de vacuolas lipídicas entre ambos grupos, observándose escasas vacuolas lipídicas en el grupo 60C (Fig. 15b).

Los hígados de los peces alimentados con las dietas 60L y 60Mix presentaron una morfología similar a la del grupo 100P, con hepatocitos poliédricos y núcleos redondeados (Figs.16a y 17a). En los cortes semifinos teñidos con AT&FB

se observó la existencia de grandes vacuolas lipídicas en los hepatocitos de ambos grupos, similares a las encontradas en el grupo control (Figs. 16b y 17b).

### *Lubina*

Los hígados de las lubinas alimentadas con la dieta 100P mostraron hepatocitos poliédricos con núcleos esféricos localizados en el borde de la célula (Fig. 18a). Los hepatocitos se disponían en columnas alrededor de los sinusoides hepáticos. La tinción de AT&FB evidenció una gran cantidad de vacuolas lipídicas en los hepatocitos (Fig. 18b).

Los hígados de las lubinas alimentadas con la dieta 60S presentaron focos de hepatocitos esteatósicos caracterizados por su gran volumen y por presentar el núcleo celular de forma irregular (Fig.19a). El citoplasma de estos hepatocitos estaba ocupado por una inmensa vacuola lipídica, llegando incluso a ocultar la visualización del núcleo celular (Fig. 19b).

Los grupos 60C y 60L mostraron hepatocitos con núcleos desplazados hacia la periferia celular (Figs. 20a y 21a). Se observó, además, una gran cantidad de vacuolas lipídicas en los cortes teñidos con AT&FB (Figs. 20b y 21b), de manera similar a lo observado en el grupo 100P.

Los hígados de las lubinas alimentadas con 60Mix presentaron hepatocitos voluminosos (Fig. 22a) que contenían grandes vacuolas lipídicas en su citoplasma de forma homogénea en todo el parénquima hepático (Fig. 22b).

***Análisis estereométrico***

El cálculo estereométrico del porcentaje de tejido hepático ocupado por lípidos confirmó las observaciones histológicas observadas entre los distintos grupos experimentales. La Tabla 6 muestra los porcentajes obtenidos en dorada y lubina alimentadas con las distintas dietas experimentales.

La diferencia más relevante entre ambas especies fue el alto porcentaje de lípidos en todos los grupos experimentales en el caso de la lubina, obteniéndose valores que duplicaban a los encontrados en dorada.

También se observó un efecto de la calidad de los lípidos dietéticos en los porcentajes de tejido hepático ocupado por grasa. Así, doradas alimentadas con la dieta 60S mostraron significativamente ( $P < 0.05$ ) el mayor porcentaje de lípidos. Los grupos 60L y 60Mix tuvieron un porcentaje similar al del grupo control, mientras que las doradas alimentadas con la dieta 60C mostraron el menor porcentaje de lípidos lo que concuerda con las imágenes histológicas encontradas para este grupo donde se observó una menor presencia de vacuolas lipídicas (Fig. 15b).

En el caso de la lubina, los peces alimentados con la dieta 60S mostraron el mayor porcentaje de lípidos aunque fue significativamente similar al de los grupos 60C y 60Mix. Las lubinas alimentadas con la dieta 100P presentaron el menor porcentaje de lípidos, aunque no hubo diferencias significativas con respecto a los grupos 60C, 60L y 60Mix.

Tabla 6. Porcentaje de volumen de lípidos ocupado en cada hepatocito de doradas y lubinas alimentadas con las diferentes dietas experimentales\*

DIETA	<i>Dorada</i>	<i>Lubina</i>
	Volumen lípidos/hepatocito (%)	Volumen lípidos/hepatocito (%)
100P	17 ± 0.01 <sup>ab</sup>	38 ± 0.03 <sup>a</sup>
60S	33 ± 0.02 <sup>c</sup>	50 ± 0.06 <sup>b</sup>
60C	11 ± 0.01 <sup>d</sup>	43 ± 0.04 <sup>ab</sup>
60L	16 ± 0.01 <sup>a</sup>	40 ± 0.04 <sup>a</sup>
60Mix	19 ± 0.02 <sup>b</sup>	43 ± 0.04 <sup>ab</sup>

\* Valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05); (media ± sd); n=12.

### *Composición de ácidos grasos del hígado*

La Tabla 7 muestra la composición de ácidos grasos de los hígados de las doradas y las lubinas alimentadas con las distintas dietas experimentales.

#### *Dorada*

La composición de ácidos grasos de los hígados de las doradas reflejó claramente el perfil de ácidos grasos de las dietas. Así, los hígados de la dieta 100P se caracterizaron por un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados y de n-3 HUFA, y los hígados de las dietas 60S, 60C y 60L por un mayor contenido del ácido graso linolénico, linoleico y oleico, respectivamente. Hay que destacar la disminución del contenido de 18:3n-3 en los hígados con respecto a su porcentaje en

las dietas observada en todos los grupos experimentales. Los hígados de las dietas con aceites vegetales (60S, 60C, 60L y 60Mix) presentaron una disminución del porcentaje de n-3 HUFA, principalmente por una disminución del contenido de EPA con respecto a su porcentaje en la dieta. En todos los grupos experimentales, el contenido de DHA en los hígados fue ligeramente superior con respecto a su porcentaje en la dieta.

#### *Lubina*

La composición de ácidos grasos de los hígados de las lubinas se caracterizaron por un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados y monoeno (principalmente 18:1n-9) en todos los grupos experimentales. El aumento de oleico en los hígados produjo que la relación 18:1n-9/DHA fuera mucho mayor en los hígados de las lubinas.

El contenido de 18:2n-6 y 18:3n-3 en los hígados disminuyó con respecto a su porcentaje en la dieta en todos los grupos experimentales. Además, una considerable disminución en el porcentaje de n-3 HUFA se observó en los hígados, principalmente por una reducción tanto en el contenido de EPA como de DHA.

DIETA	<i>Dorada</i>					<i>Lubina</i>				
	100P	60S	60C	60L	60Mix	100P	60S	60C	60L	60Mix
<i>Lípidos (% p.s.)</i>	29.82	30.20	33.13	30.17	29.6	47.55	46.1	52.18	58.28	56.72
<i>Ácidos grasos (%area)</i>										
Saturados	24.90	22.50	22.21	20.28	21.83	30.46	31.32	29.24	29.83	28.62
18: 1n-9	19.67	22.63	34.80	25.40	26.44	34.72	34.23	40.81	36.27	36.73
18: 2n-6	5.89	22.14	12.28	10.80	12.17	3.36	11.74	8.28	6.30	7.15
18: 3n-3	2.00	2.71	2.81	14.48	11.66	0.64	1.41	1.80	8.11	7.18
20: 4n-6	0.76	0.45	0.40	0.45	0.42	0.38	0.29	0.26	0.25	0.25
20: 5n-3	7.59	4.31	3.62	3.98	3.87	5.41	3.40	3.12	3.02	3.27
22: 6n-3	11.25	6.58	5.44	5.88	5.75	5.14	3.19	2.66	2.73	3.41
n-3 HUFA	18.84	10.89	9.06	9.86	9.62	12.00	7.66	6.77	6.77	7.72
18:1n-9/DHA	1.75	3.44	6.40	4.32	4.60	6.75	10.73	15.34	13.29	10.77

Tabla 7. Principales ácidos grasos del hígado de las doradas y las lubinas alimentadas con las distintas dietas experimentales

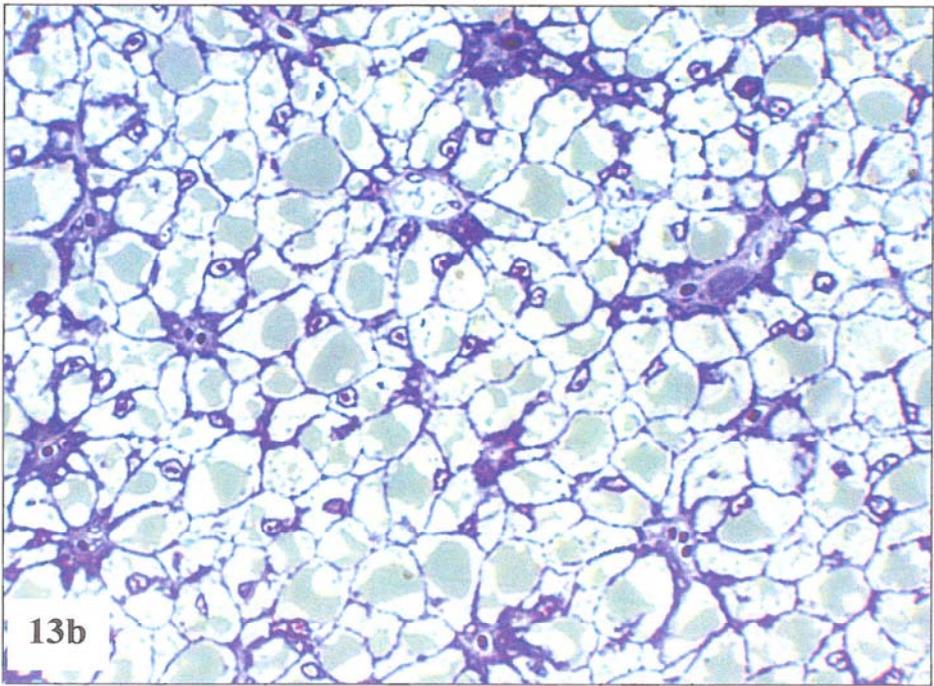
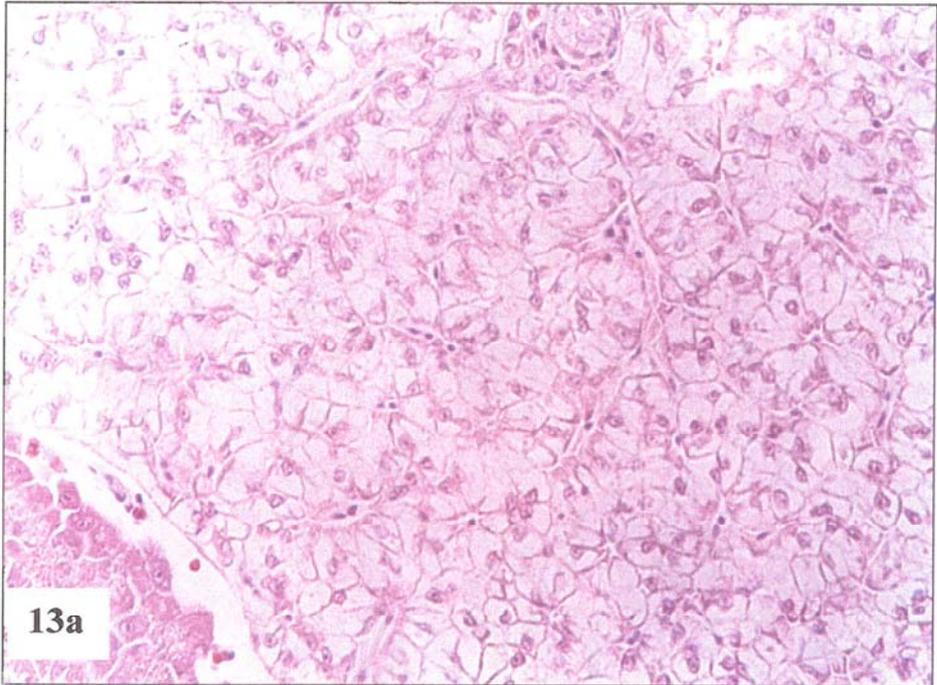


### **3.3.3 ICONOGRAFÍA**

#### Hígados de doradas alimentadas con la dieta 100P

Figura 13a. Hepatocitos de morfología cuadrangular con núcleos grandes y esféricos (H&E) (× 400).

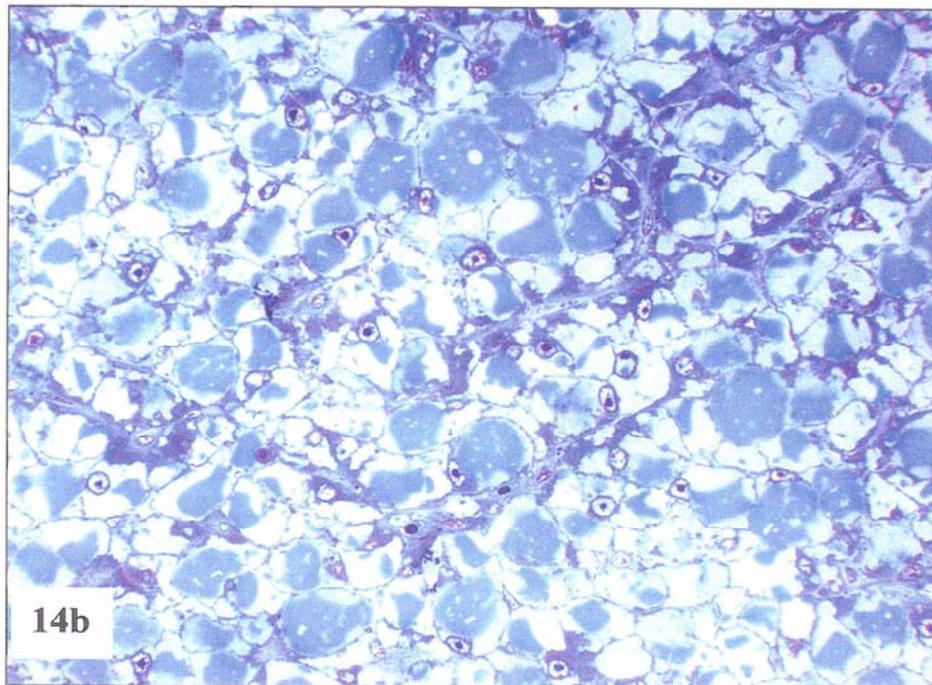
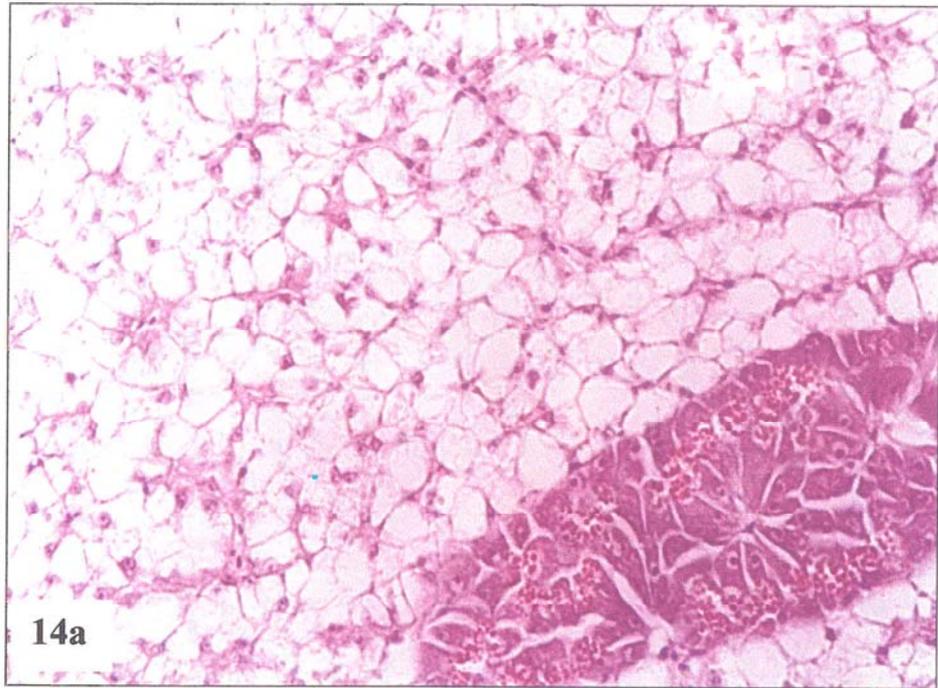
Figura 13b. Corte semifino teñido con AT&FB. Evidencia de vacuolas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos (× 400).



*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60S*

Figura 14a. Hepatocitos voluminosos con núcleos de morfología irregular y localizados en la periferia de la célula. H&E (× 400).

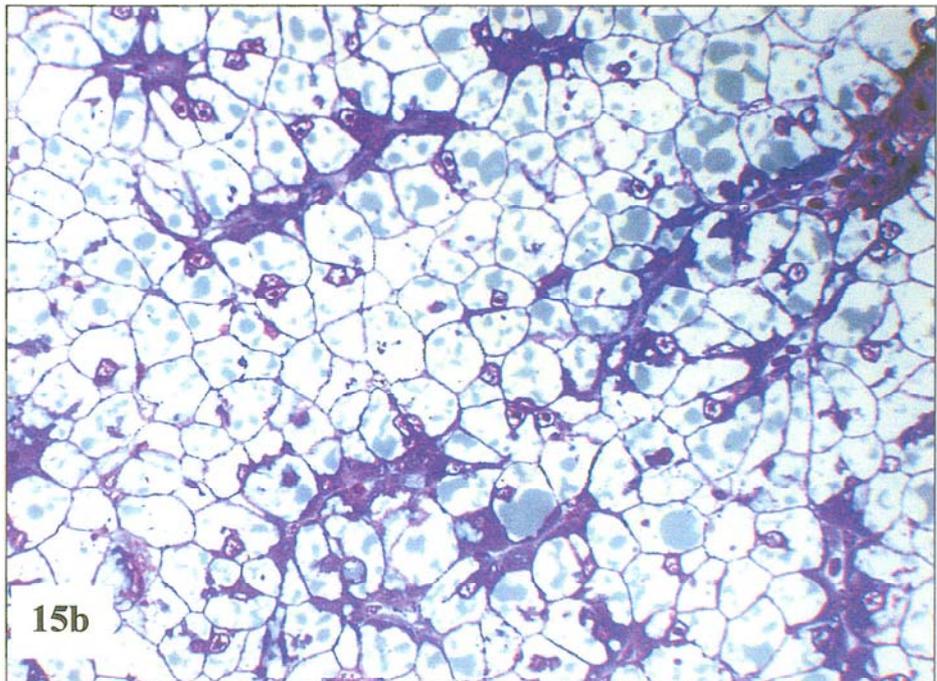
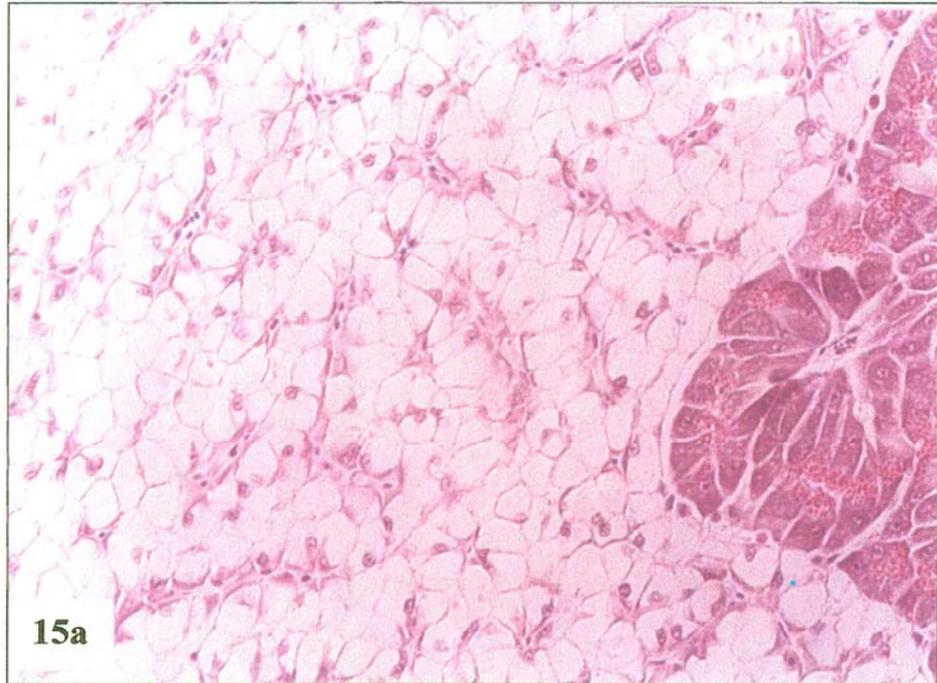
Figura 14b. Corte semifino teñido con AT&FB. Grandes vacuolas lipídicas ocupando el citoplasma de los hepatocitos (× 400).



*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60C*

Figura 15a. Hepatocitos voluminosos con núcleos desplazados hacia la periferia de la célula. H&E (× 400).

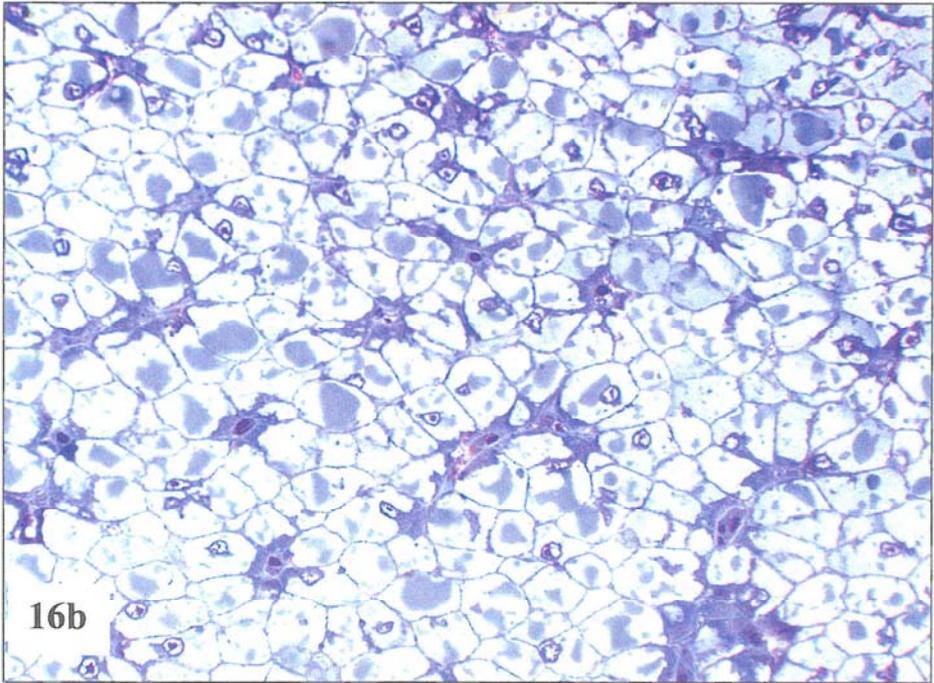
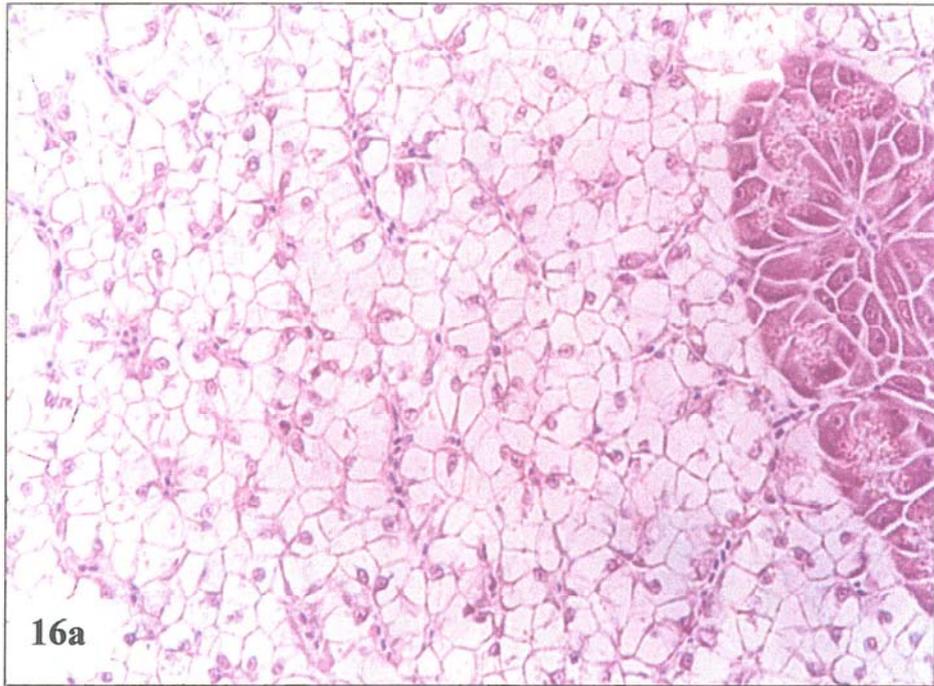
Figura 15b. Corte semifino teñido con AT&FB. Escasas vacuolas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos (× 400).



*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60L*

Figura 16a. Hepatocitos poliédricos y núcleos redondeados. H&E (× 400).

Figura 16b. Vacuolas lipídicas en los hepatocitos. AT&FB (× 400).



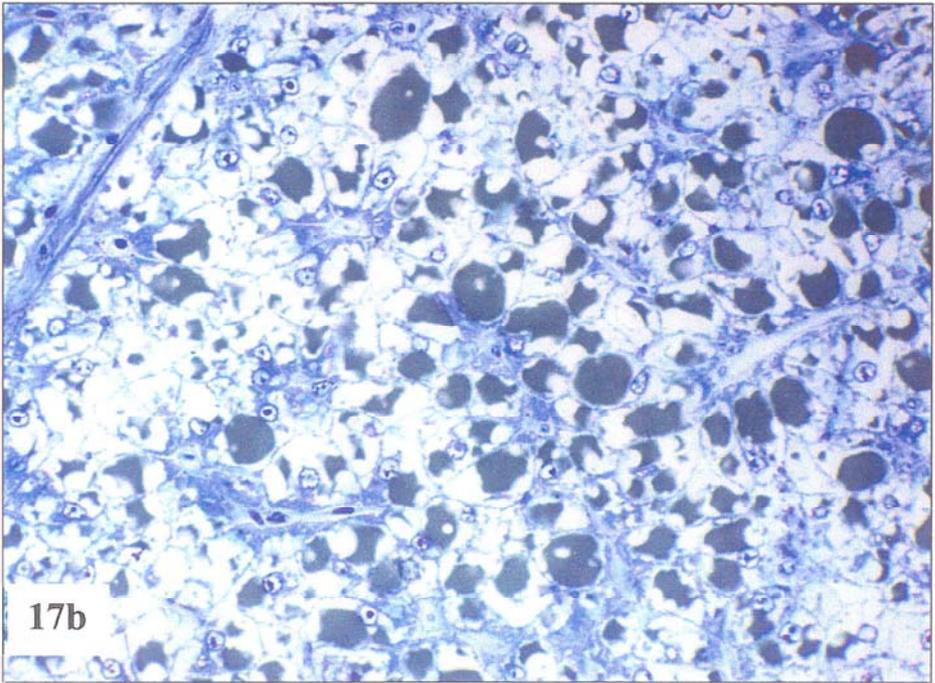
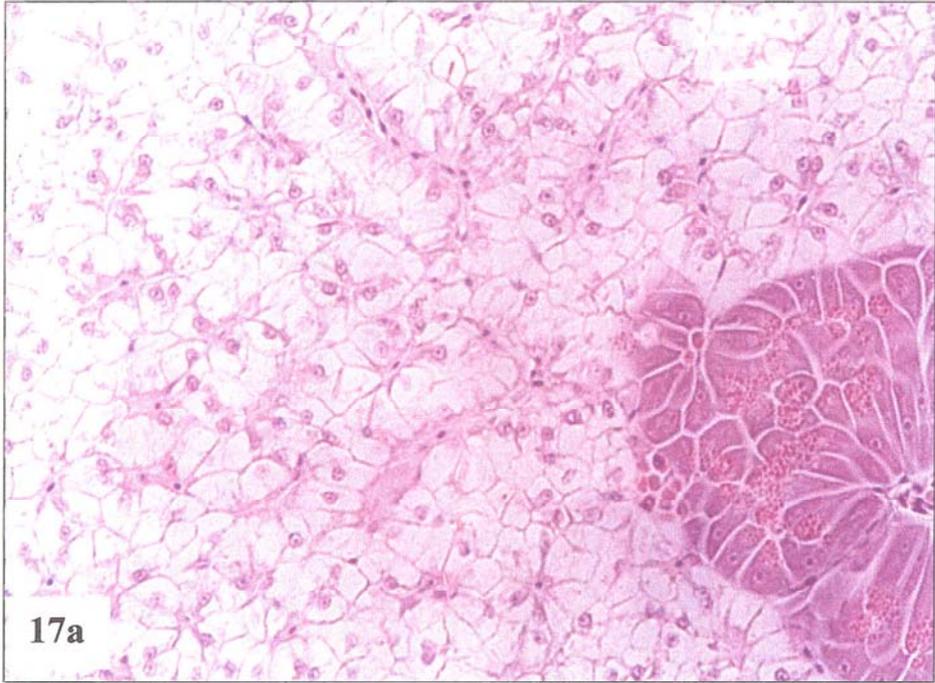
*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60Mix*

Figura 17a. Hepatocitos con forma regular, similar a la observada en el grupo 100P.

H&E (× 400).

Figura 17b. Corte semifino teñido con AT&FB. Vacuolas lipídicas en los hepatocitos

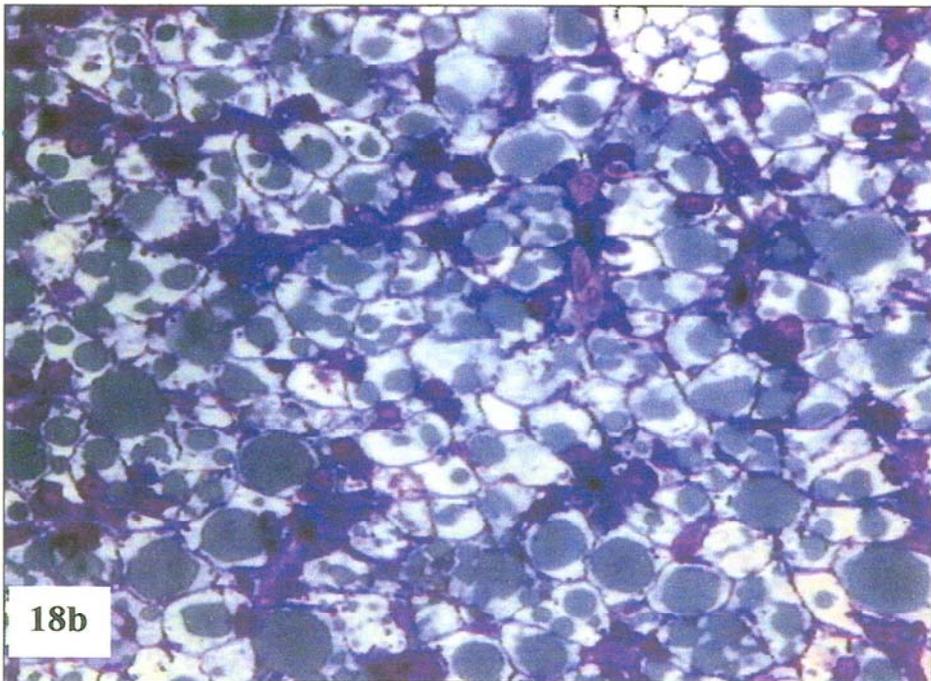
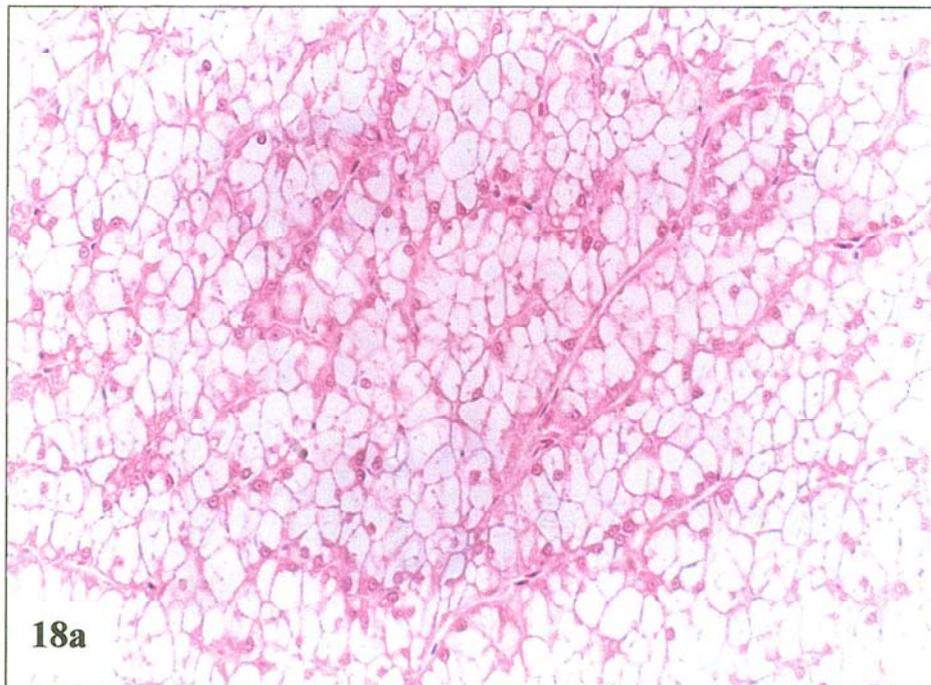
(× 400).



*Hígados de lubinas alimentadas con la dieta 100P*

Figura 18a. Hepatocitos poliédricos con núcleos esféricos localizados en el borde de la célula. H&E (× 400).

Figura 18b. Corte semifino teñido con AT&FB. Gran cantidad de vacuolas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos (× 400).

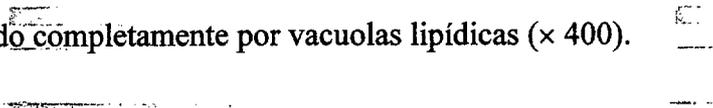


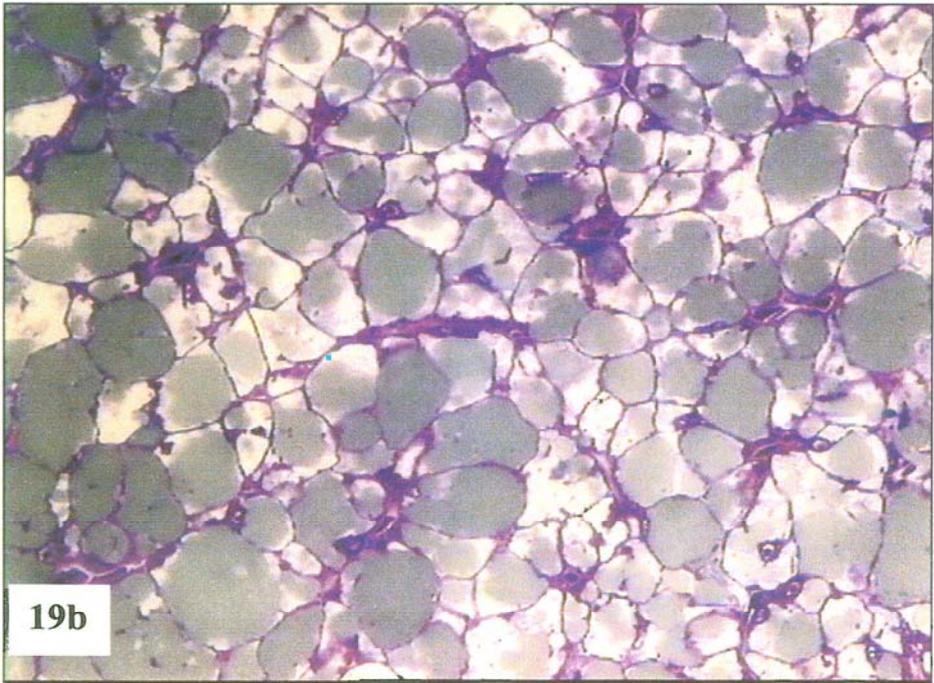
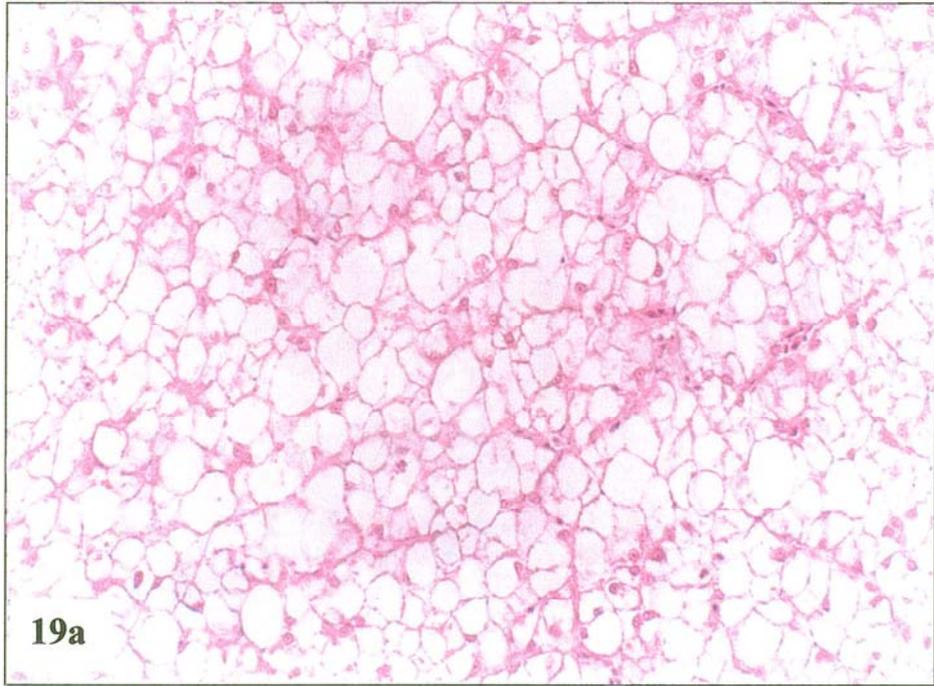
*Hígados de lubinas alimentadas con la dieta 60S*

Figura 19a. Focos de hepatocitos esteatósicos. H&E ( $\times 400$ ).



Figura 19b. Corte semifino teñido con AT&FB. El citoplasma de los hepatocitos es ocupado completamente por vacuolas lipídicas ( $\times 400$ ).

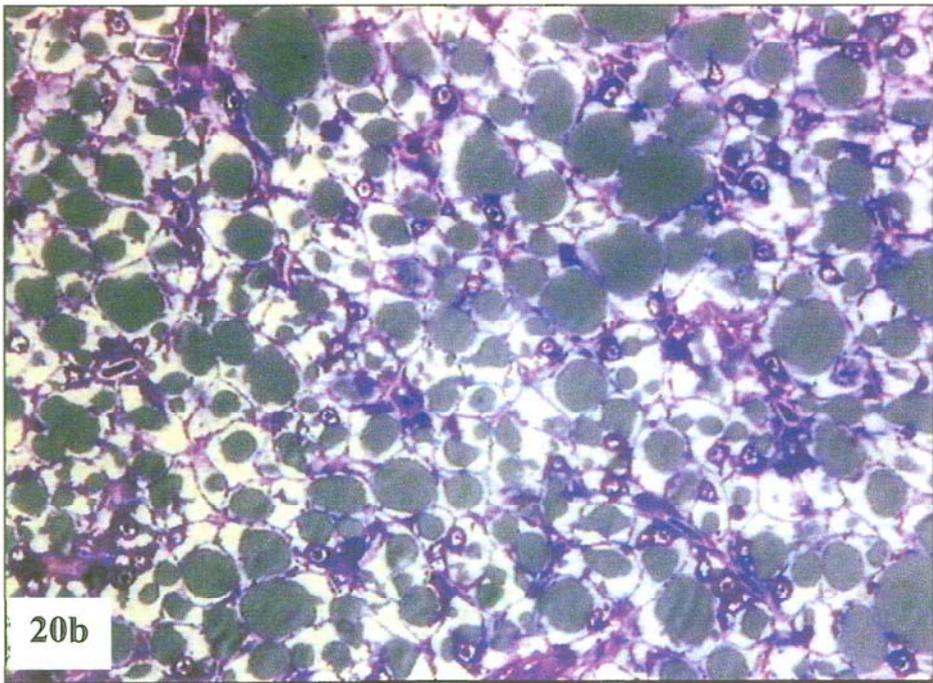
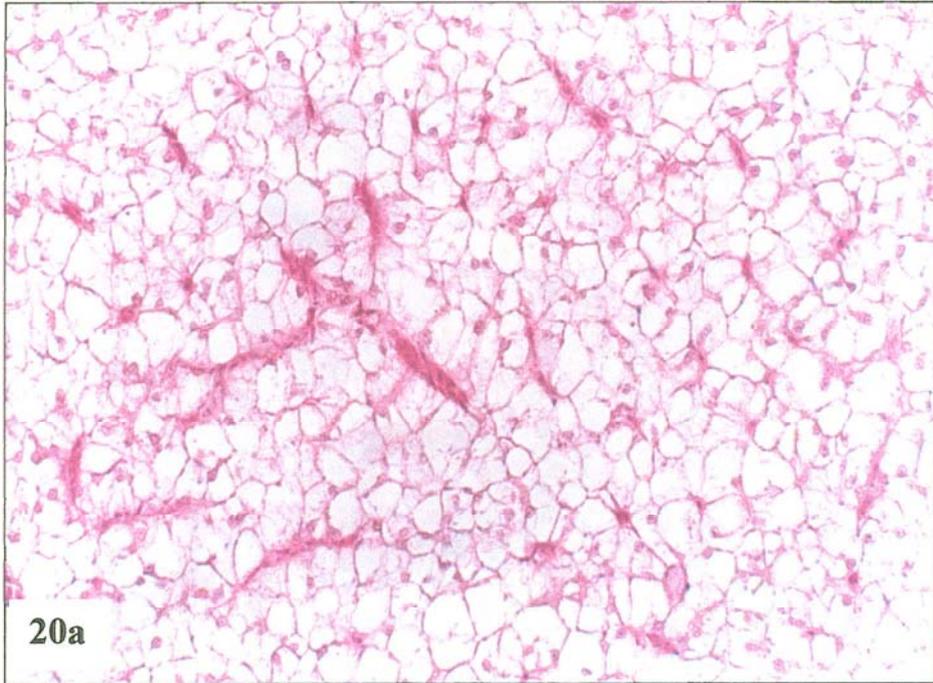




*Hígados de lubinas alimentadas con la dieta 60C*

Figura 20a. Hepatocitos similar a lo observado en el grupo 100P. H&E (× 400).

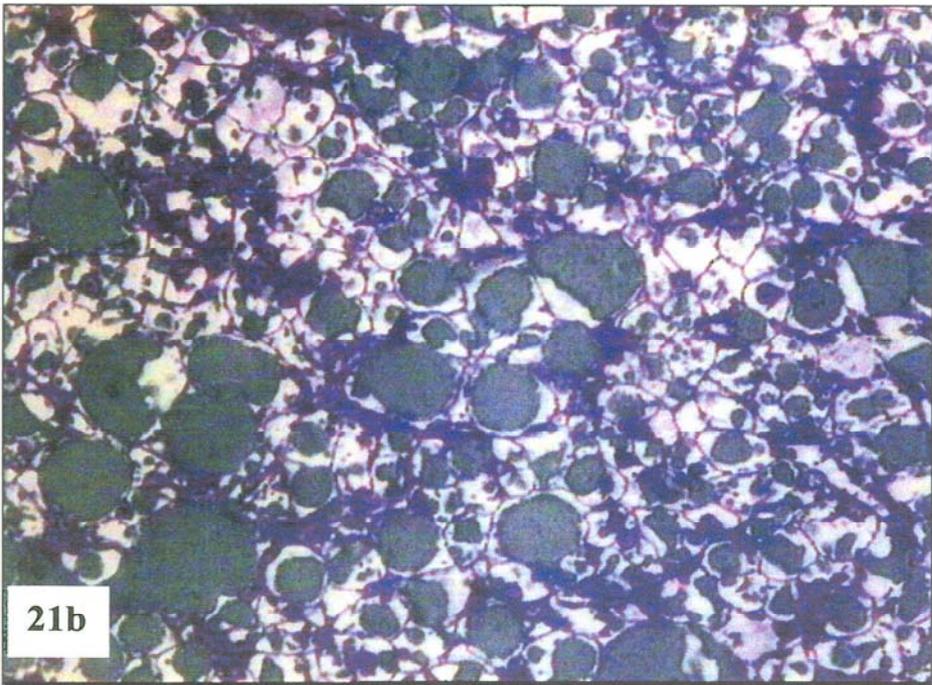
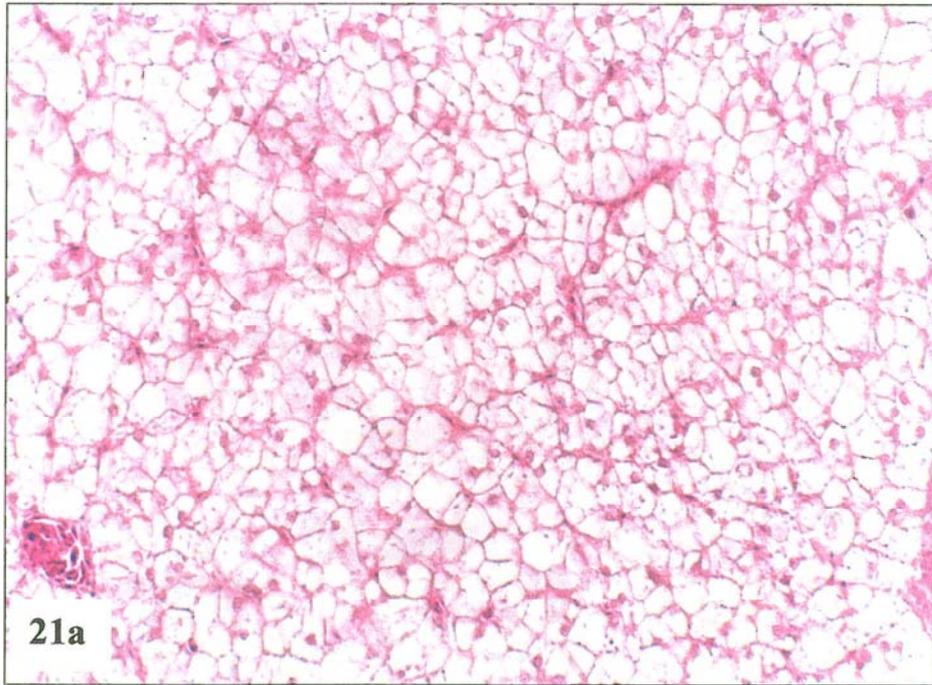
Figura 20b. Corte semifino teñido con AT&FB. Vacuolas lipídicas en los hepatocitos (× 400).



*Hígados de lubinas alimentadas con la dieta 60L*

Figura 21a. Hepatocitos similar a lo observado en el grupo 100P. H&E (× 400).

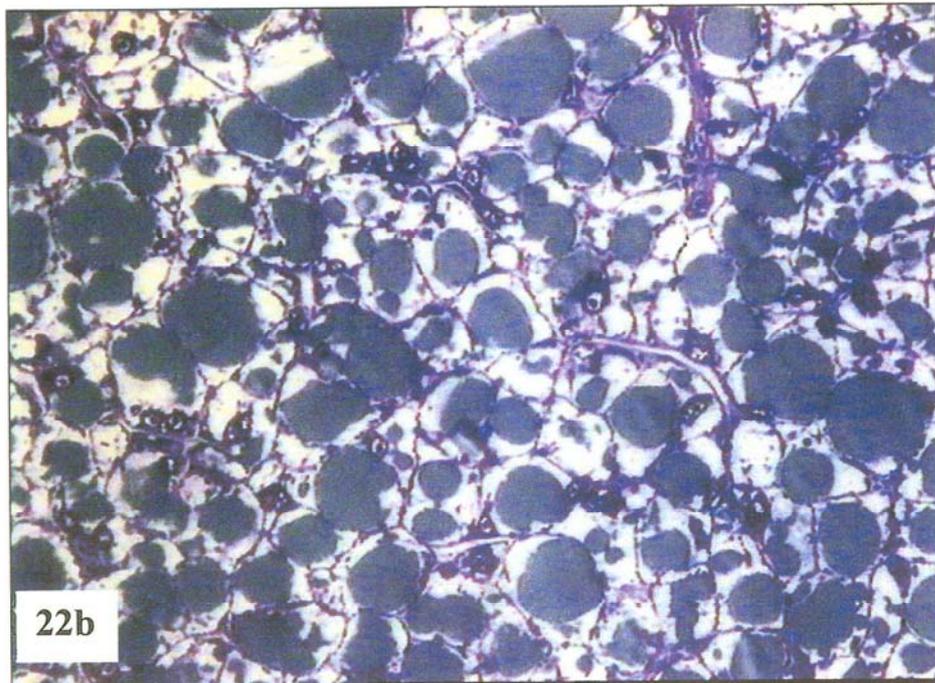
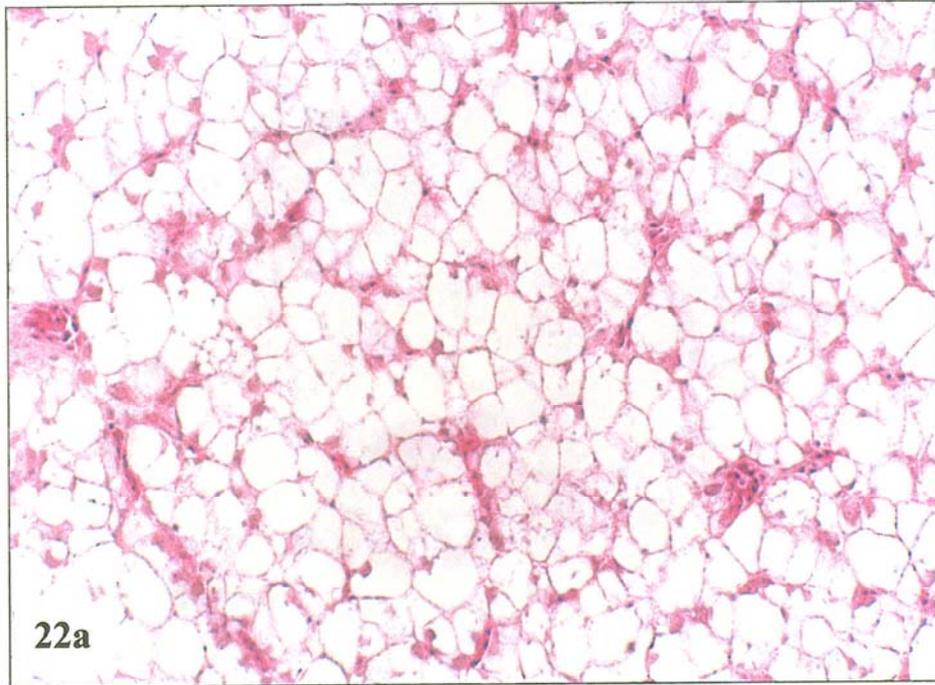
Figura 21b. Corte semifino teñido con AT&FB. Vacuolas lipídicas en los hepatocitos (× 400).



*Hígados de lubinas alimentadas con la dieta 60Mix*

Figura 22a. Hepatocitos voluminosos en todo el parénquima hepático. H&E (× 400).

Figura 22b. Corte semifino teñido con AT&FB. Vacuolas lipídicas en los hepatocitos. (× 400)



### 3.3.4 DISCUSION

Pocos estudios han sido publicados sobre el uso de aceites vegetales en dietas para especies marinas, debido principalmente a la limitada cantidad de n-3 HUFAs de estos aceites (ALEXIS, 1997; ROBIN, 1998). Algunos de los aceites vegetales estudiados en dietas para dorada y lubina han sido aceite de soja, girasol, oliva, colza y lino (ALEXIS, 1997; YLDIZ y SENER, 1997; EL-KERDAWY y SALAMA, 1997). En términos generales, estos autores encuentran que la sustitución por encima de un 50% del aceite de pescado por aceites vegetales causa una disminución en el crecimiento. Esto contrasta con los resultados del presente estudio donde la sustitución de un 60% del aceite de pescado por aceites vegetales no afectó al crecimiento de juveniles de dorada y lubina. Estas diferencias podrían ser debidas a que las dietas del presente estudio han sido formuladas con un mayor porcentaje de lípidos (e.j. 25% frente a un 12% en el trabajo por ALEXIS, 1997), permitiendo un mayor margen de sustitución del aceite de pescado sin reducir considerablemente los niveles de n-3 HUFAs, que son indispensables para el crecimiento. Es interesante destacar así mismo que si bien el crecimiento y los índices de conversión (IZQUIERDO *et al.*, datos no publicados) obtenidos en la experiencia con dorada fueron muy satisfactorios y superiores a los obtenidos en nuestras instalaciones con dietas comerciales, los crecimientos obtenidos para la lubina del presente estudio, independientemente del tipo de dieta suministrado, fueron menores que los obtenidos en condiciones similares con otro tipo de dietas. De hecho, PERES y OLIVATELES (1999) no encontraron ningún efecto beneficioso de la elevación de los niveles dietéticos de lípidos de 12 a 24 % en dietas para lubina.

La adaptación estructural de los hepatocitos a los cambios en la composición de la dieta ha sido sugerida por varios autores (STORCH Y JUARIO, 1983; SEGNER *et al.*, 1984; AVILA 1986a, b). Estos cambios dietéticos se reflejan en modificaciones del tamaño de la célula o núcleo, del contenido de lípidos y glucógeno e incluso de las actividades de enzimas glucogénicas o glucolíticas (SEGNER Y BRAUNBECK, 1988). En el presente estudio se observaron cambios

---

en la morfología de los hepatocitos / núcleos y en los depósitos de lípidos entre los distintos grupos experimentales.

En ambas especies, los hepatocitos de los peces alimentados con la dieta 100P presentaron una forma regular-poliédrica y núcleos grandes que se evidenciaron fácilmente. Aunque esta morfología podría ser comparable a la observada en doradas o lubinas salvajes (ver GODINO *et al.*, 1990; LEMAIRE *et al.*, 1991, respectivamente), en general el porcentaje de vacuolas lipídicas ocupando el parénquima hepático fue elevado, confirmando que el acúmulo de lípidos en el hígado es un fenómeno frecuente en los peces de cultivo. En este sentido, es interesante resaltar que aunque las dos especies son de origen Mediterráneo y tienen similares “estilos de vida”, al ser peces de hábitos bentónicos que almacenan los lípidos de reserva principalmente en los tejidos extramusculares (McCLELLAND *et al.*, 1995), la lubina en condiciones de cultivo tiene una mayor tendencia a la acumulación de lípidos en el hígado que la dorada. Así, en este estudio, el porcentaje de vacuolas lipídicas en el hepatocito duplicó al de la dorada. Este elevado porcentaje de vacuolas lipídicas en hepatocitos de lubinas de cultivo concuerda con los estudios de composición bioquímica y enzimáticos realizados en esta especie por otros autores (KRAJNOVIC-OZRETIC *et al.*, 1994; McCLELLAND *et al.*, 1995; DIAS *et al.*, 1998; PERES Y OLIVA-TELES, 1999). Desde un punto de vista histológico, este acúmulo masivo de grasas en el hígado podría ser reflejo de una menor capacidad de utilización de los lípidos dietéticos en la lubina, asociada con el retraso en el crecimiento observado en el presente estudio, como consecuencia de una menor utilización energética de los lípidos dietéticos a costa de otros nutrientes presentes en la dieta. Este fenómeno ha sido descrito por varios autores en otras especies (SHEARER, 1994; VERGARA *et al.*, 1996; WEATHERUP *et al.*, 1997).

Sin embargo, no se puede descartar el posible efecto de la ingesta en el crecimiento, que en la lubina fue en general menor de lo esperado (1.53-1.61 g alimento/día/% peso pez, sin diferencias significativas entre las distintas dietas experimentales, MONTERO, comunicación personal), bien por el elevado contenido

energético de las dietas o por una posible mal adaptación de los peces a los tanques de cultivo. Así, estos peces tuvieron un nivel basal de cortisol plasmático superior al nivel encontrado en nuestro laboratorio para esta especie, denotando una situación de estrés en dichos peces. En cualquier caso, este menor crecimiento en la lubina y la mayor acumulación de grasas sugieren la peor capacidad de esta especie para adaptarse a dietas con elevado contenido de lípidos y por ello, la necesidad de formular dietas específicas para lubina diferenciadas de las de dorada. De hecho, en su medio natural los hábitos alimenticios de estas dos especies son diferentes, siendo la primera más piscívora que la segunda. Además, si bien el contenido de ácidos grasos esenciales de las dietas ensayadas en este estudio fue igual o superior al estimado por LANARI *et al.*, (1999) para obtener el mejor crecimiento (DHA: 1.51 %, EPA: 1.81 % y ARA: 0.1 % en peso seco de dieta), no se han ensayado aún niveles dietéticos superiores de estos ácidos grasos, con lo que no se puede descartar que los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la lubina no sean superiores a los de la dorada.

La inclusión de aceites vegetales y por tanto la disminución de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta incrementó el contenido de lípidos en el hígado. En estos hígados fue característica la presencia de focos de esteatosis conformados por hepatocitos con su citoplasma ocupado por completo por una inmensa vacuola lipídica. Semejantes resultados han sido encontrados por ALEXIS, (1997), donde doradas alimentadas con aceites vegetales mostraron una clara degeneración grasa de las células hepáticas. Histológicamente, una causa del aumento del volumen celular es la acumulación de lípidos (GHADIALLY, 1988). Así, el término de esteatosis es considerado como una alteración de las células hepáticas debido a una excesiva disponibilidad de lípidos que satura la capacidad del hígado para utilizarlos, resultando en la síntesis y deposición de triglicéridos (CHEVILLE, 1994). Niveles bajos de ácidos grasos esenciales han sido relacionados con la aparición de esteatosis en numerosas especies (WATANABE, 1982; TAKEUCHI *et al.*, 1990; LEMAIRE *et al.*, 1991). Los mecanismos por los cuales estos ácidos grasos poliinsaturados previenen la acumulación de triglicéridos pueden

ser atribuidos principalmente a los siguientes factores: a una disminución de la lipogénesis hepática, un aumento en la oxidación de los ácidos grasos y/o a un aumento en la síntesis de lipoproteínas. Por un lado, la reducción de la actividad lipogénica parece estar asociada al efecto que los PUFAs tienen sobre la inhibición de la expresión de los genes de las enzimas lipogénicas (CLARKE, 2001).

Por otro lado, el EPA es considerado un potente ácido graso hipotriglicéridémico debido principalmente a un incremento de la  $\beta$ -oxidación (FRØYLAND *et al.*, 1997; MADSEN *et al.*, 1999). En salmón atlántico, un 40% del total de la  $\beta$ -oxidación tiene lugar en los peroxisomas (FRØYLAND *et al.*, 2000). Los peroxisomas contribuyen a la oxidación de ácidos grasos, actuando sobre los ácidos grasos de cadena larga reduciendo su tamaño a acil-CoA de bajo peso molecular, que son mejores sustratos para la  $\beta$ -oxidación, y también intervienen directamente en la oxidación de ácidos grasos de cadena corta (GUZMÁN Y GEELLEN, 1993). Además de activar la  $\beta$ -oxidación (por lo tanto la utilización de grasa para obtener energía, o sea la reducción de grasa acumulada en el tejido), el EPA reduce la síntesis hepática de triglicéridos por inhibir la actividad de la enzima *diacilglicerol aciltransferasa* (BERGE *et al.*, 1999). Estudios morfológicos han mostrado que el EPA incrementa el tamaño medio de las mitocondrias y el área de la célula ocupada por peroxisomas y reduce el porcentaje de área ocupado por gotas de grasa en la célula (FRØYLAND *et al.*, 1996; TOTLAND, *et al.*, 2000). Así, la presencia de cantidades adecuadas de ácidos grasos poliinsaturados impediría la acumulación de lípidos en el hígado y consecuentemente la aparición de esteatosis, originando las imágenes histológicas observadas en el presente estudio en aquellos hígados de peces alimentados con la dieta 100P.

El hecho de que la morfología de los hígados de los grupos 60L y 60Mix (dietas ricas en 18:3n-3) para ambas especies fuera mas parecida a la del grupo 100P que al resto de dietas con aceites vegetales, y que no hubiera diferencias significativas en cuanto al porcentaje de vacuolas lipídicas entre dichos grupos, denota un efecto hipolipidémico del ácido linoléico semejante al encontrado con el

aceite de pescado. La activación de la oxidación en los peroxisomas es uno de los efectos con consecuencias hipolipodémicas del aceite de pescado. En ratas alimentadas con aceite de pescado y aceite de lino la oxidación peroxisomal se incrementa por igual (RUSTAN *et al.*, (1992). Este resultado, comparando ambas dietas, ha sido confirmado recientemente por IDE, (2000) en ratas, lo que demuestra que este efecto se debe a un incremento en los niveles de mRNA de las enzimas de oxidación hepática, incluyendo la *carnitina palmitoiltransferasa I y II*, la *acilCoA oxidasa*, y las *3-ketoacil-CoA tiolasa* mitocondrial y peroxisomal. Además, en ratas (POUMES-BALLIHAUT *et al.*, 2001) ha sido observado que la tasa de  $\beta$ -oxidación aparente de 18:3n-3 es semejante a la del 22:6n-3 (59 y 62 % respectivamente). Estas afirmaciones parecen estar en concordancia con el análisis bioquímico del hígado del presente estudio, puesto que el contenido de 18:3n-3 en el hígado disminuyó con respecto a su contenido en la dieta, especialmente en el caso de la lubina (ver Tabla 7).

Sin embargo, en ambas especies la esteatosis fue muy manifiesta en los hígados de peces alimentados con la dieta 60S. Un 33% de los hepatocitos de las doradas estaba ocupado por vacuolas lipídicas y un 50% en el caso de las lubinas. La composición de ácidos grasos del hígado confirmó el acúmulo del ácido graso 18:2n-6 en doradas y lubinas alimentadas con esta dieta (Tabla 7). Estos resultados están en concordancia con los encontrados por KALOGEROPOULOS *et al.*, (1992), quienes describen una alta acumulación de ácido linoleico en los hígados de dorada, incluso en aquellos peces alimentados con los niveles más bajos de este ácido graso. La tendencia a la acumulación de lípidos que posee el ácido linoleico parece estar relacionada con varios fenómenos metabólicos.

Estudios en ratas han demostrado que niveles dietéticos altos de 18:2n-6 aumentan la actividad de las enzimas lipogénicas, *ácido-graso sintetasa* y *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*, revelando el efecto hiperlipidémico de este ácido graso (IDE, 2000). Además, IKEDA *et al.*, (1998) en ratas encuentran que dietas ricas en ácido linoleico no reducen la concentración de triglicéridos en sangre comparadas

---

con aquellas dietas ricas en n-3 PUFA o ácido linolénico, e incluso aumentan el contenido de triglicéridos en el hígado. Este hecho parece estar atribuido a la menor capacidad oxidativa que posee este ácido graso. Así, la oxidación hepática de ácidos grasos fue reducida en los hígados de ratas alimentadas con aceite de girasol (rico en 18:2n-6) (KABIR e IDE, 1996). También KUMAMOTO e IDE, (1998) muestran que la oxidación peroxisomal de palmitoil-CoA es significativamente menor en ratas alimentadas con una dieta rica en 18:2n-6 (2.15 nmol/min/mgproteína) comparada con una dieta conteniendo 18:3n-3 (3.03 nmol/min/mgproteína). Estudios enzimáticos que actualmente están siendo conducidos en dorada muestran que el porcentaje de oxidación inducida en los hígados de peces alimentados con aceite de soja es un 21% menor que con el del aceite de pescado, y un 11% menor que con el aceite de lino (BAUTISTA *et al.*, datos no publicados). Cabría mencionar aquí, que en estudios con larvas de dorada (IZQUIERDO *et al.*, 2000) se ha mostrado que la esteatosis intestinal causada por la alimentación de dietas sin lecitina desaparecía cuando se añadía un 0.1% de PC de pescado o de soja. Aunque la PC de pescado fue más eficiente reduciendo la esteatosis hepática que la PC de soja. Este hecho podría estar relacionado con la menor  $\beta$ -oxidación del 18:2n-6 que consecuentemente induce el acúmulo de lípidos en el hígado, como anteriormente se ha sugerido.

Los hígados de las doradas alimentadas con la dieta 60C presentaron un bajo porcentaje de vacuolas lipídicas, aunque los hepatocitos fueron muy voluminosos, lo que parece indicar la existencia de un depósito de glucógeno en estos hígados. Este hecho parece estar en concordancia con los análisis enzimáticos, donde una baja actividad de la enzima *ácido graso sintetasa* y un considerable incremento de la actividad de la enzima *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* se encontró en los hígados de las doradas alimentadas con la dieta 60C con respecto al resto de dietas (BAUTISTA *et al.*, datos no publicados).

Sin embargo, en el caso de la lubina, los hígados de los peces alimentados con la dieta 60C, contenían numerosas vacuolas lipídicas de gran tamaño, que ocupaban un 43% de la superficie del hepatocito. El análisis bioquímico reveló altos

contenidos de 18:1n-9 en los hígados de todos los grupos experimentales, y donde el contenido hepático de ácido oleico fue el doble o mayor que el nivel dietético de este ácido graso (ver Tabla 7). SPISNI *et al.*, (1998), mostraron que un alto contenido de ácido oleico en la dieta, junto a una disminución en el nivel de DHA parece relacionarse con la aparición de esteatosis en peces marinos, como consecuencia de una disminución en la cantidad de peroxisomas en los hígados esteatósicos. En los tejidos el porcentaje del ácido oleico aumenta paralelamente a una disminución de los niveles dietéticos de n-3 HUFAs. Así, el índice 18:1n-9/DHA es considerado un indicador de deficiencia de AGEs en peces marinos. Una consecuencia de la deficiencia de AGEs es la aparición de esteatosis (WATANABE, 1982). En este sentido, la relación ácido oleico/DHA fue claramente superior en los hígados de las lubinas (ver Tabla 7), lo que parece confirmar que los requerimientos de ácidos grasos esenciales podrían ser mayores que los de las doradas, como ha sido sugerido anteriormente.

Si en el primer capítulo se demuestra que el nivel de lípidos dietéticos y la calidad de la proteína pueden ocasionar la aparición de esteatosis hepática, en el presente capítulo se demuestra que no sólo la cantidad total de lípidos sino también su calidad afectan la morfología del hepatocito. Así, se confirma en dorada que la reducción del contenido de ácidos grasos esenciales en la dieta tiende a ocasionar una deposición de lípidos en el hígado, como había sido observado en otras especies. Pero además, en este estudio se pone de manifiesto por primera vez en peces que la calidad de los distintos ácidos grasos no esenciales incluidos en la dieta afecta de distinta manera a la morfología hepática. En resumen, los resultados del presente estudio establecen un orden entre los principales ácidos grasos de los aceites y la aparición de esteatosis en los hígados de peces marinos,  $18:2n-6 > 18:1n-9 > 18:3n-3 > n-3$  HUFA. Este orden podría estar ligado a la distinta capacidad de inducir oxidación en el hepatocito, que poseen estos ácidos grasos ( $EPA > DHA > 18:3n-3 > 18:1n-9 > 18:2n-6$ ), puesto que una acción fisiológica que se atribuye a la  $\beta$ -oxidación es la prevención de la acumulación de ácidos grasos en los tejidos (OSMUNDTSEN *et al.*, 1991), y a una modificación de la lipogénesis hepática.

---

Además la casi inexistente actividad de las enzimas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  *desaturasas* en peces marinos (MOURENTE y TOCHER, 1993), que limitan la elongación de los ácidos grasos de 18 carbonos, podría estar contribuyendo al acúmulo de estos ácidos grasos en el hígado.

En términos prácticos se demuestra cómo, mientras los niveles de ácidos grasos esenciales sean suficientes para cubrir los requerimientos de las especies estudiadas, es posible sustituir el aceite de pescado por aceites vegetales en las dietas comerciales sin afectar al crecimiento. Sin embargo, el tipo de aceite vegetal empleado afecta de distinta manera a la morfología del hígado y por tanto al metabolismo lipídico del pez y, en consecuencia, podría tener efectos no deseados en la salud del mismo.

### **3.4 EFECTOS A LARGO PLAZO DE LA INCLUSIÓN DE NIVELES MODERADOS Y EXTREMOS DE ACEITES VEGETALES EN SUSTITUCIÓN DEL ACEITE DE PESCADO EN DIETAS PARA DORADA Y LUBINA Y DE SU ALIMENTACIÓN POSTERIOR CON ACEITE DE PESCADO EXCLUSIVAMENTE**

#### **3.4.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Las doradas y las lubinas fueron suministradas por la empresa local ADSA. Mil quinientas sesenta doradas de aproximadamente 79g de peso medio se distribuyeron en tanques circulares de polietileno de 500 L de capacidad (65 peces/tanque). Cada tanque estaba provisto de un flujo continuo de agua de mar (36 ‰) y aireación. El rango de temperatura del agua a lo largo del experimento fue de 20.0 - 24.2°C y el oxígeno disuelto entre 5.0 - 8.3 ppm. Los peces se sometieron a un fotoperiodo natural de 12h luz/ 12h oscuridad. Cuando los peces alcanzaron un peso medio de 200g se transfirieron a tanques de 1000 L de capacidad. Tras la finalización del experimento con doradas, mil cincuenta lubinas de aproximadamente 80g de peso medio se distribuyeron en los tanques de 500 L (50 peces/tanque) y posteriormente se transfirieron a tanques de 1000 L. La temperatura del agua a lo largo de este experimento osciló entre 21.5 – 22.8°C y el oxígeno disuelto entre 5.2 – 7.4 ppm.

En ambos experimentos los peces se aclimataron en los tanques durante 2 semanas con la dieta control previamente a la suministración de las distintas dietas experimentales. Las dietas se suministraron hasta saciedad aparente tres veces al día, durante 6 meses en el caso de las doradas y 9 para las lubinas. Cada dieta experimental se ensayó por triplicado. A lo largo del experimento, se utilizaron dos tamaños de grano (3 y 5mm) para cada dieta.

En el caso de las doradas, después de 6 meses de alimentación con las dietas experimentales, 15 peces de cada grupo se alimentaron con una dieta que contenía 100% aceite de pescado durante los siguientes 3 meses, con el objetivo de estudiar la

---

---

reversibilidad de los cambios estructurales en los hepatocitos. Este periodo se denominó “periodo de recuperación”. En el caso de las lubinas esta parte de la experiencia esta siendo realizada en estos momentos.

Siete dietas experimentales se formularon en colaboración con la empresa noruega *Nutreco Aquaculture Research Centre A/S* y el *Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA)*. Las dietas fueron iso-energéticas e iso-protéicas (45% proteínas) y con un contenido de lípidos alrededor de un 22%. La única fuente de lípidos añadida a la dieta 100P fue aceite de pescado. En las dietas 60S, 60C, 60L y 60Mix, el 60% de aceite de pescado se reemplazó por aceites vegetales, aceite de soja, colza, lino y una combinación de los tres aceites, respectivamente. Finalmente, las dietas 80S y 80L se elaboraron reemplazando un 80% del aceite de pescado por aceite de soja y lino, respectivamente.

Las dietas elaboradas con aceites vegetales mantuvieron un nivel de n-3 HUFA por encima del 3% en orden a cubrir los requerimientos en ácidos grasos esenciales para estas especies (MONTERO, 1996; LANARI *et al.*, 1999). La dieta 100P se caracterizó por un contenido superior en ácidos grasos saturados y en n-3HUFAs que el resto de las dietas. Hubo una marcada diferencia en el ratio n-3/n-6 entre las distintas dietas experimentales debido principalmente al contenido en ácido linoleico de los aceites vegetales usados, rondando el 0.46;0.59 y 0.30;0.31 para las dietas 60S y 80S, en dorada y lubina, respectivamente. Inversamente, las dietas con aceite de lino mantuvieron la relación n-3/n-6 por encima de 2, en parte debido a su alto contenido en ácido linolénico. La dieta 60C se caracterizó por su alto contenido en monoenos, especialmente en 18:1n-9. La dieta 60Mix mantuvo un porcentaje de ácidos grasos similares a la dieta 100P. Y las dietas 80S y 80L tuvieron un menor contenido en HUFA que el resto de las dietas, especialmente en ARA, EPA y DHA. La composición en ácidos grasos de las dietas experimentales para dorada y lubina se muestran en las Tablas 8a y 8b, respectivamente.

Tabla 8 a. Algunos ácidos grasos de los lípidos totales de las dietas experimentales suministradas a las doradas (g/100g a.g.)

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
<b>Lípidos (%)</b>	21.14	20.70	21.83	21.83	22.38	20.93	22.58
14:0	6.21	3.18	3.11	3.09	3.27	1.10	1.94
16:0	18.51	15.45	12.43	12.21	13.37	14.24	10.89
16:1n-7	6.46	3.41	3.39	3.31	3.45	2.20	2.10
16:2n-6	1.15	0.60	0.57	0.58	0.59	0.37	0.36
17:1	1.28	0.63	0.63	0.62	0.59	0.37	0.35
16:4n-3	1.85	0.88	0.85	0.88	0.71	0.44	0.44
18:0	3.18	3.21	2.35	3.37	3.30	3.30	3.45
18:1n-9	16.26	18.48	36.84	17.03	23.40	21.07	18.71
18:1n-7	2.47	1.84	n.d.	1.54	1.81	n.d.	n.d.
18:2n-6	13.07	31.28	17.04	12.29	15.29	38.54	17.66
18:3n-6	0.21	0.12	0.10	0.11	0.10	0.07	0.07
18:3n-3	1.41	3.24	4.64	26.72	18.27	4.03	30.63
18:4n-3	1.43	0.79	0.76	0.78	0.69	0.48	0.54
20:1n-9	1.89	1.63	2.08	1.58	1.81	1.49	1.61
20:4n-6	0.54	0.34	0.33	0.36	0.31	0.25	0.23
20:4n-3	0.43	0.25	0.26	0.25	0.24	0.22	0.19
20:5n-3	11.19	5.88	5.84	6.19	5.10	3.73	3.79
22:1n-11	1.95	1.49	2.13	2.13	1.77	2.01	1.78
22:1n-9	0.14	0.22	0.03	0.03	0.09	0.03	0.08
22:3n-6	0.53	0.33	0.29	0.29	0.26	0.22	0.22
22:4n-6	0.25	0.21	0.17	0.18	0.16	0.16	0.15
22:4n-3	0.19	0.15	0.12	0.14	0.11	0.10	0.08
22:5n-3	1.16	0.75	0.63	0.79	0.56	0.50	0.45
22:6n-3	4.99	3.20	3.26	3.58	2.83	2.36	2.92
Σ Saturados	27.9	21.84	17.89	18.67	19.94	18.64	16.28
Σ Monoenos	30.45	27.70	45.10	26.24	32.92	27.17	24.63
Σ n-3	22.65	15.14	16.36	39.33	28.51	11.86	39.04
Σ n-6	15.75	32.88	18.50	13.81	16.71	39.61	18.69
Σ n-9	18.29	20.33	38.95	18.64	25.30	22.59	20.40
Σ n-3 HUFA	17.96	10.23	10.11	10.95	8.84	6.91	7.43
Σ n-6 HUFA	1.32	0.88	0.79	0.83	0.73	0.63	0.60
n-3/n-6	1.44	0.46	0.88	2.85	1.71	0.30	2.09

*Inclusión a largo plazo de Aceites Vegetales – Hígado*

Tabla 8 b. Algunos ácidos grasos de los lípidos totales de las dietas experimentales suministradas a las lubinas (g/100g a.g.)

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
14:0	7.91	3.40	2.35	3.18	3.61	2.08	2.19
16:0	19.07	14.49	11.21	11.32	12.56	13.55	9.80
16:1n-7	7.11	3.16	3.39	3.12	3.35	1.87	2.06
16:2n-6	1.09	0.46	0.50	0.45	0.49	0.25	0.30
17:1	1.17	0.51	0.51	0.46	0.52	0.25	0.30
16:4n-3	1.53	0.63	0.64	0.59	0.65	0.28	0.35
18:0	3.21	2.98	2.24	2.90	2.88	2.76	3.01
18:1n-9	11.34	16.67	38.67	16.22	18.29	18.48	16.21
18:1n-7	2.57	2.04	n.d.	-	2.25	2.07	1.48
18:2n-6	3.92	30.54	13.67	12.01	14.51	39.66	13.18
18:3n-6	0.29	0.12	0.12	0.12	0.12	0.05	0.07
18:3n-3	0.88	4.66	5.03	27.11	20.18	4.10	37.50
18:4n-3	2.12	1.00	1.04	1.28	1.09	0.60	0.75
20:1n-9	2.46	1.79	2.28	2.16	1.93	1.94	1.65
20:4n-6	0.88	0.41	0.40	0.38	0.40	0.22	0.24
20:4n-3	0.57	0.26	0.26	0.27	0.26	0.16	0.16
20:5n-3	13.47	5.85	6.10	5.86	5.95	3.11	3.34
22:1n-11	2.47	2.03	1.75	2.49	1.73	2.51	1.83
22:1n-9	-	-	-	-	-	-	-
22:3n-6	0.48	0.22	0.23	0.21	0.22	0.11	0.13
22:4n-6	0.14	0.08	0.07	0.08	0.06	0.03	0.02
22:4n-3	0.07	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03
22:5n-3	1.51	0.66	0.70	0.62	0.64	0.38	0.33
22:6n-3	11.67	5.58	6.14	6.32	5.70	3.72	3.49
Σ Saturados	31.28	22.00	16.65	18.44	19.33	19.29	15.62
Σ Monoenos	27.67	26.51	46.23	24.93	27.65	27.39	23.70
Σ n-3	31.43	18.59	19.58	41.93	33.24	12.38	45.81
Σ n-6	3.25	31.50	14.51	13.06	15.03	40.15	13.79
Σ n-9	14.07	18.57	40.27	18.53	19.67	20.44	17.90
Σ n-3 HUFA	26.97	12.33	13.00	13.11	12.15	7.42	7.37
n-3/n-6	5.03	0.59	1.35	3.21	2.21	0.31	3.32

Se tomaron los hígados de 4 peces por cada tanque para el estudio histológico, un total de 12 hígados se estudiaron por cada dieta experimental y en cada punto de muestreo. Estos puntos de muestreo fueron a los 3 meses de alimentación, al final de cada experiencia y tras el periodo de recuperación (3 meses con dieta 100P) en el caso de las doradas. Los hígados se procesaron para su inclusión en parafina, según lo descrito en los apartados 2.4.2 de Material y Métodos. Los cortes de parafina (4 $\mu$ m) se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) (MARTOJA y MARTOJA-PIERSON, 1970).

### **3.4.2 RESULTADOS**

#### *Parámetros biológicos*

##### *Dorada*

La Tabla 10 muestra los pesos medios de doradas a lo largo del periodo de experimentación.

A los 3 meses de alimentación con las dietas experimentales no hubo diferencias significativas en el peso medio de los peces. Después de 6 meses de alimentación, todos los grupos experimentales alcanzaron el peso medio comercial (alrededor de 430g), aunque sí existieron diferencias entre los distintos grupos experimentales. Así, los peces alimentados con las dietas 80S y 80L crecieron significativamente menos ( $P < 0.05$ ) que el resto de grupos. Tras los 3 meses de alimentación con la dieta conteniendo 100% aceite de pescado (periodo de recuperación), los grupos 80S y 80L mostraron los menores crecimientos manteniendo las diferencias estadísticas con el resto de grupos.

La Tabla 11 muestra los valores obtenidos para diferentes parámetros hepáticos a lo largo del periodo experimental. A los 3 meses de alimentación con las dietas experimentales, no hubo diferencias significativas en cuanto al peso del hígado e índice hepatosomático entre los distintos grupos experimentales, aunque los valores de ambos parámetros en los peces alimentados con la dieta 60S, fueron ligeramente mayores al resto de grupos. En cuanto al porcentaje de lípidos del hígado, tampoco hubo diferencias significativas estadísticamente entre los distintos grupos experimentales.

Después de 6 meses de alimentación con las dietas experimentales, no hubo diferencias en el peso de los hígados entre los distintos grupos, aunque los peces alimentados con la dieta 100P presentaron el valor más bajo. En cuanto al índice hepatosomático, los peces alimentados con la dieta 100P y 60L tuvieron un HSI significativamente ( $P < 0.05$ ) menor que los peces alimentados con la dieta 80S. Estas mismas diferencias se encontraron en el porcentaje de lípidos en el hígado. El resto de grupos mostraron estadísticamente similares índices hepatosomáticos y contenidos lipídicos. Para este periodo, se estableció correlaciones positivas y significativas ( $P < 0.05$ ) entre el porcentaje de lípidos y el peso de los hígados e índices hepatosomáticos (Tabla 11)

Después de 3 meses de alimentación con la dieta conteniendo 100% aceite de pescado (periodo de recuperación), la media de los pesos de los hígados de las doradas fue de  $7.84 \pm 1.49$  (g). El índice hepatosomático medio de todos los grupos experimentales fue de  $1.16 \pm 0.16$ .

### *Lubina*

La Tabla 12 muestra los pesos medios y parámetros hepáticos de las lubinas a lo largo del periodo de experimentación.

A los 4 meses de alimentación con las dietas experimentales, los peces alimentados con la dieta 60L crecieron significativamente menos ( $P < 0.05$ ) que los peces alimentados con la dieta 100P. El resto de grupos no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo 100P. Después de 9 meses de alimentación, todos los grupos experimentales alcanzaron un peso medio alrededor de 350g, y no existieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

Respecto al índice hepatosomático y porcentaje de lípidos en el hígado, no existieron diferencias significativas entre las dietas experimentales a lo largo del todo el periodo experimental. En comparación con las doradas, el contenido de lípidos en el hígados de las lubinas fue alto superando el 60% después de 9 meses de alimentación.

### ***Histología del hígado***

#### ***Dorada***

A los 3 meses de alimentación con las distintas dietas experimentales, los peces alimentados con la dieta 100P mostraron un parénquima hepático homogéneo con hepatocitos de pequeño tamaño. El citoplasma estaba poco vacuolizado y los núcleos celulares, en posición central, se evidenciaron fácilmente (Fig. 23a). Además, en estos hígados se observó un acúmulo de grasa alrededor del tejido peripancreático (Fig. 23b). Los peces alimentados con la dieta 60S mostraron hepatocitos de morfología regular, aunque los núcleos se observaron desplazados hacia la periferia celular y el citoplasma de los hepatocitos estaba parcialmente vacuolizado, con moderada eosinofilia (Fig. 24a). El acúmulo de grasa peripancreática fue menor comparado con los peces alimentados con la dieta 100P (Tabla 9). El grupo 60C presentó similares características histológicas a los peces del grupo 60S (Fig. 25a y Tabla 9). Los peces alimentados con la dieta 60L y 60Mix mostraron hepatocitos pequeños similares al grupo 100P, con núcleos localizados

principalmente en posición central y citoplasma moderadamente eosinofílico (Figs. 26a y 27a). Los peces alimentados con las dietas 80S y 80L, mostraron una tendencia a la acumulación de grasa peripancreática (Fig. 28a y Tabla 9). Ambos grupos mostraron hepatocitos vacuolizados, con citoplasma claro y núcleos desplazados hacia la periferia celular (Figs. 28b y 29a).

Después de 6 meses de alimentación, la morfología estructural de los hígados fue similar para todos los grupos experimentales. Las figuras, 23c, 24b, 25b y 25c, 26b, 27b, 28c y 29b muestran estos cambios estructurales para cada grupo experimental. Esta morfología se caracterizó: a nivel del citoplasma, por un aumento en la vacuolización y un reducida eosinofilia citoplasmática; a nivel de núcleos, por un marcado desplazamiento nuclear hacia la periferia celular, que en determinadas zonas del hígado impedía la visualización de éstos. Y por último, un considerable aumento en el acúmulo de grasa peripancreática se observó en todos los grupos, aunque fue más evidente en los peces alimentados con las dietas 80S y 80L (Tabla 9).

Tras los 3 meses finales de alimentación con la dieta conteniendo 100% aceite de pescado (periodo de recuperación), se observaron cambios sustanciales en la morfología hepática de los distintos grupos experimentales. Las figuras, 24c y 24d, 25d, 28d, 29c y 29d muestran estos cambios estructurales, los cuales se caracterizaron por una considerable regresión de la vacuolización del citoplasma, mostrando una marcada eosinofilia, y una clara visualización de los núcleos celulares localizados principalmente en posición central. Esta morfología es comparable a la observada en peces de vida salvaje. No obstante, esta regresión en los lípidos hepáticos no afectó a los acúmulos de grasa peripancreática, los cuales aumentaron considerablemente tras este periodo de alimentación (Tabla 9). Ninguna alteración patológica, como necrosis o degeneración se observó en estos hígados.

Tabla 9. Evaluación de los cambios histológicos en hígados de dorada a lo largo del periodo de experimentación (n=12) \*

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
<b><i>3 meses de alimentación</i></b>							
Desplazamiento nuclear	1	2	2	1/2	1/2	1/2	2
Vacuolización del citoplasma	1	2	2	2	1/2	1/2	2
Grasa peripancreática	1/2	1	1	1	1	2	1/2
<b><i>6 meses de alimentación</i></b>							
Desplazamiento nuclear	3	3	3	2/3	2	3	3
Vacuolización del citoplasma	3	3	3	3	2	3	3
Grasa peripancreática	1	1/2	1/2	1/2	1/2	2	2
<b><i>Recuperación</i></b>							
Desplazamiento nuclear	-	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Vacuolización del citoplasma	-	1	1	1	1	1	1
Grasa peripancreática	-	2	2	2	2	3	3

\* 0 ausencia ; 1 poco; 2 medio; 3 mucho

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
Peso inicial (g) (n=65x3)	78.2 ± 7.2	79.5 ± 8.1	79.7 ± 7.6	79.6 ± 8.1	78.1 ± 7.9	79.0 ± 8.2	78.4 ± 8.3
Peso a los 3 meses (g) (n=65x3)	199.4 ± 20.8	199.5 ± 22.7	199.6 ± 18.0	206.5 ± 22.8	200.0 ± 22.2	201.3 ± 20.8	197.5 ± 23.3
Peso a los 6 meses (g) (n=53x3)	463.9 ± 50.2 <sup>a</sup>	457.1 ± 49.7 <sup>ab</sup>	443.9 ± 48.4 <sup>ab</sup>	461.1 ± 53.8 <sup>ab</sup>	451.6 ± 9.7 <sup>ab</sup>	432.0 ± 53.8 <sup>b</sup>	442.7 ± 53.2 <sup>b</sup>
Peso tras p.recuperación (g)(n= 25)	689.8 ± 95.6 <sup>a</sup>	683.8 ± 10.1 <sup>a</sup>	665.2 ± 105.7 <sup>a</sup>	633.6 ± 94.9 <sup>ab</sup>	683.8 ± 107.8 <sup>a</sup>	-	597.2 ± 117.9 <sup>b</sup>

Tabla 10: Crecimiento en peso de las doradas alimentadas con las distintas dietas a lo largo del periodo de experimentación (media ± desviación estándar). Valores con distinta letra en la misma fila son significativamente diferentes (P<0.05).

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
<b>3 meses de alimentación</b>							
Peso hígado (g)	2.52 ± 0.58 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.57 <sup>a</sup>	2.86 ± 0.62 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.61 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.66 <sup>a</sup>	2.82 ± 0.73 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.54 <sup>a</sup>
Índice hepatosomático (HSI)	1.28 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.25 <sup>a</sup>
% de lípidos (n=6x3)	39.0 ± 2.8	41.1 ± 2.6	42.2 ± 0.6	42.2 ± 3.2	40.6 ± 2.8	38.2 ± 1.2	38.1 ± 1.2
<b>6 meses de alimentación</b>							
Peso hígado (g)	6.58 ± 1.09 <sup>a</sup>	7.65 ± 1.76 <sup>a</sup>	6.87 ± 1.49 <sup>a</sup>	7.03 ± 1.77 <sup>a</sup>	7.36 ± 1.30 <sup>a</sup>	7.38 ± 1.87 <sup>a</sup>	7.17 ± 1.51 <sup>a</sup>
Índice hepatosomático (HSI)	1.47 ± 0.19 <sup>ab</sup>	1.64 ± 0.29 <sup>bc</sup>	1.53 ± 0.25 <sup>abc</sup>	1.50 ± 0.28 <sup>ab</sup>	1.63 ± 0.22 <sup>abc</sup>	1.73 ± 0.36 <sup>c</sup>	1.58 ± 0.28 <sup>abc</sup>
% de lípidos (n=6x3)	39.4 ± 4.4 <sup>a</sup>	48.5 ± 5.5 <sup>ab</sup>	42.2 ± 5.4 <sup>ab</sup>	48.1 ± 5.0 <sup>ab</sup>	48.3 ± 1.8 <sup>ab</sup>	53.7 ± 5.5 <sup>b</sup>	49.5 ± 3.0 <sup>ab</sup>
Relación peso hígado / % lípidos	y = 4.344 + 0.060 x; r = 0.797, P<0.05 (P=0.0319)						
Relación IHS / % lípidos	y = 0.845 + 0.016 x; r = 0.824, P<0.05 (P=0.0228)						

Tabla 11: Parámetros hepáticos de las doradas alimentadas con las distintas dietas a lo largo del periodo de experimentación (media ± desviación estándar). Valores con distinta letra en la misma fila son significativamente diferentes (P<0.05).

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
Peso inicial (g) (n=50x3)	83.84 ± 8.87	84.62 ± 8.86	82.80 ± 8.62	84.06 ± 8.29	83.72 ± 8.96	83.49 ± 8.76	84.18 ± 8.47
<b>4 meses de alimentación</b>							
Peso (g) (n=45x3)	173.30 ± 27.20 <sup>b</sup>	171.72 ± 25.79 <sup>ab</sup>	167.26 ± 25.81 <sup>ab</sup>	164.05 ± 24.58 <sup>a</sup>	165.33 ± 26.39 <sup>ab</sup>	171.97 ± 26.21 <sup>ab</sup>	169.65 ± 24.02 <sup>ab</sup>
HSI	2.12 ± 0.42	2.14 ± 0.33	2.04 ± 0.36	1.99 ± 0.35	2.17 ± 0.43	2.09 ± 0.38	2.14 ± 0.35
% de lípidos (n=6x3)	57.73 ± 6.35	57.07 ± 8.73	55.78 ± 1.41	54.89 ± 4.36	52.91 ± 11.39	51.89 ± 8.15	57.37 ± 6.09
<b>9 meses de alimentación</b>							
Peso (g) (n=25x3)	376.82 ± 44.77	371.04 ± 53.49	352.14 ± 53.85	361.26 ± 44.22	355.37 ± 49.12	-*	367.04 ± 56.74
HSI	2.55 ± 0.42	2.55 ± 0.42	2.57 ± 0.36	2.55 ± 0.47	2.59 ± 0.36	-	2.62 ± 0.39
% de lípidos (n=6x3)	63.10 ± 8.85	65.63 ± 1.98	60.92 ± 7.26	61.74 ± 8.78	64.21 ± 1.52	-	64.06 ± 2.85

\* Por motivos ajenos a este estudio, los peces correspondientes a la dieta 80S se perdieron.

Tabla 12: Crecimiento en peso y parámetros hepáticos de las lubinas alimentadas con las distintas dietas a lo largo del periodo de experimentación (media ± desviación estándar). Valores con distinta letra en la misma fila son significativamente diferentes (P<0.05).

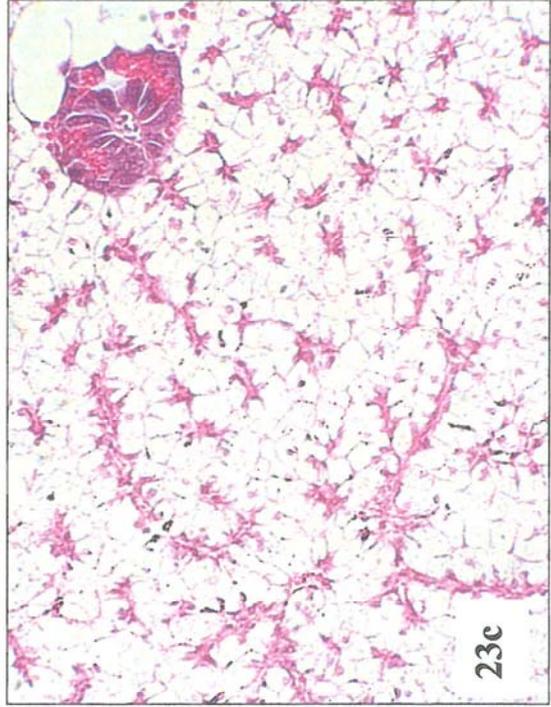
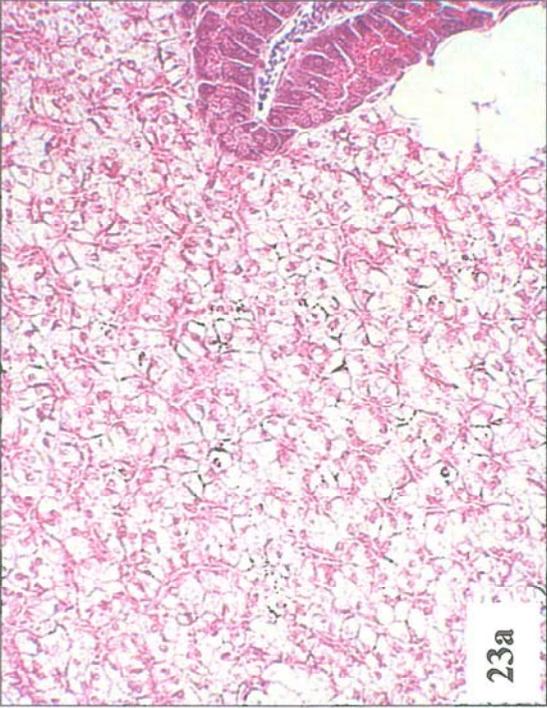
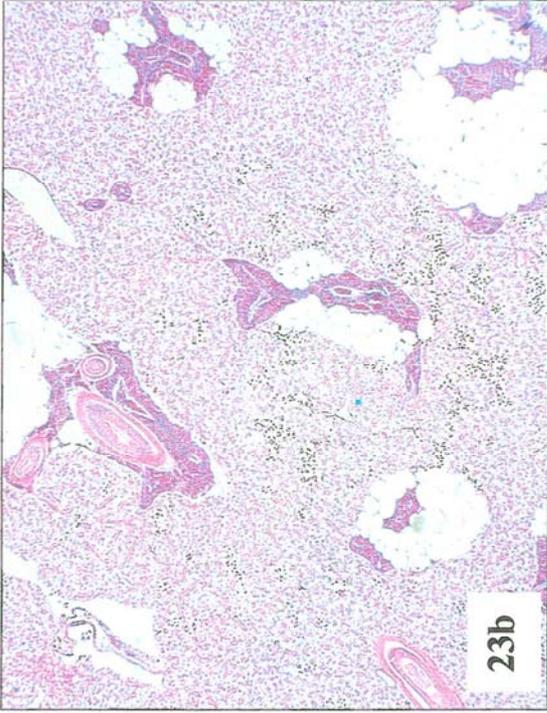
### **3.4.3 ICONOGRAFÍA**

*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 100P*

Figura 23a. 3 meses. Hepatocitos de pequeño tamaño, con núcleos localizados en posición central. H&E (×200).

Figura 23b. 3 meses. Acúmulos de grasa peripancreática. H&E (×40).

Figura 23c. 6 meses. Desplazamiento del núcleo hacia la periferia celular y vacuolización del citoplasma. H&E (×200)



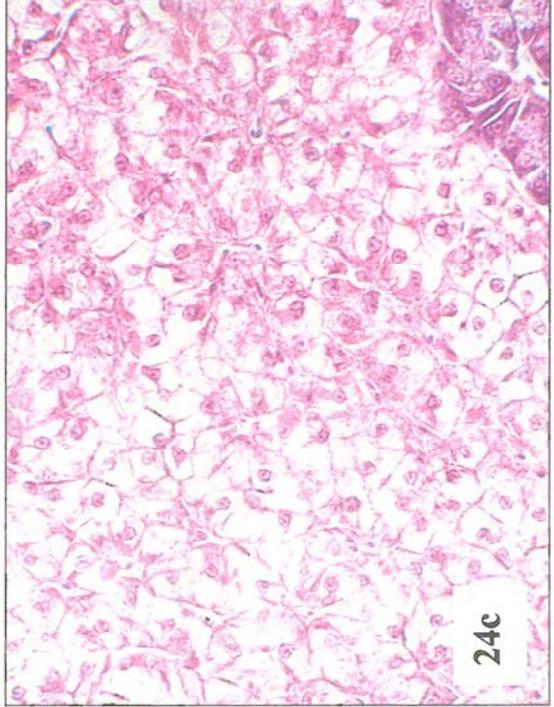
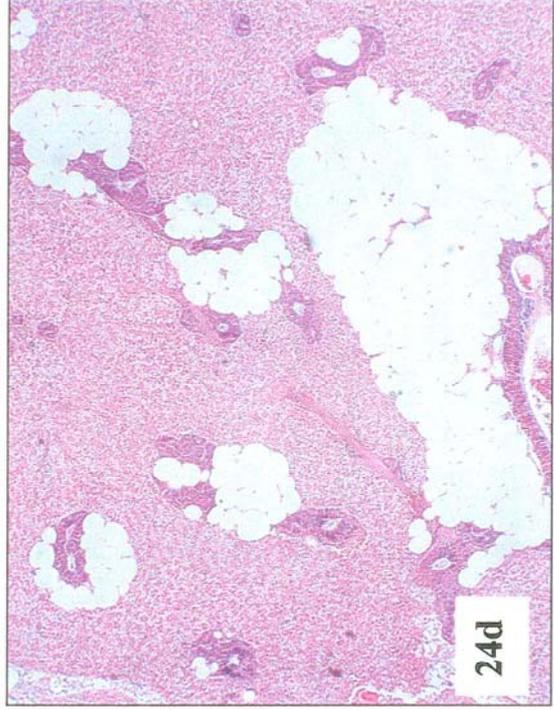
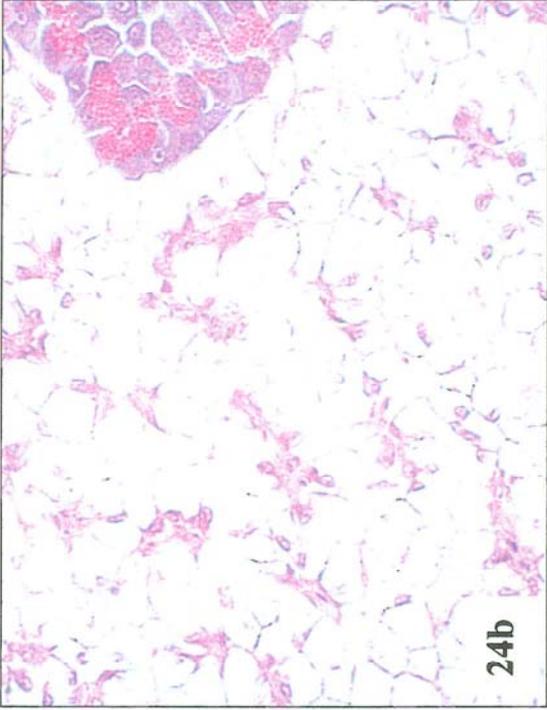
*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60S*

Figura 24a. *3 meses*. H&E (×400)

Figura 24b. *6 meses*. H&E (×400)

Figura 24c. *Periodo de Recuperación*. Regresión H&E (×400)

Figura 24d. *Periodo de Recuperación* Acúmulos de grasa peripancreática. H&E  
(×40)



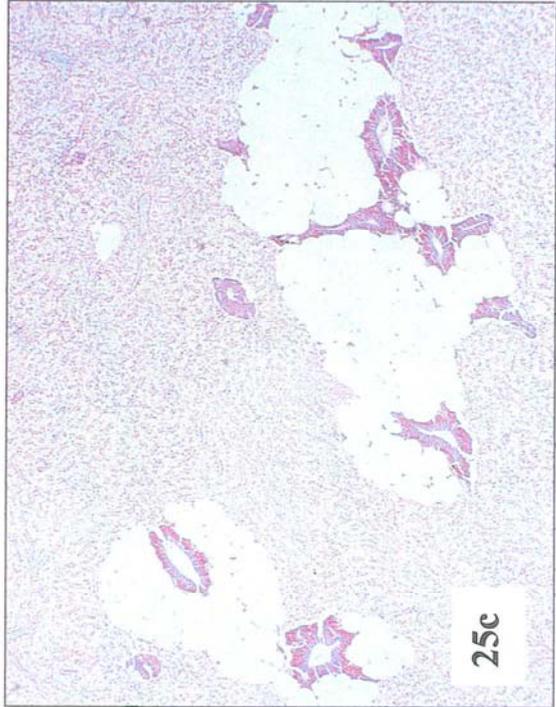
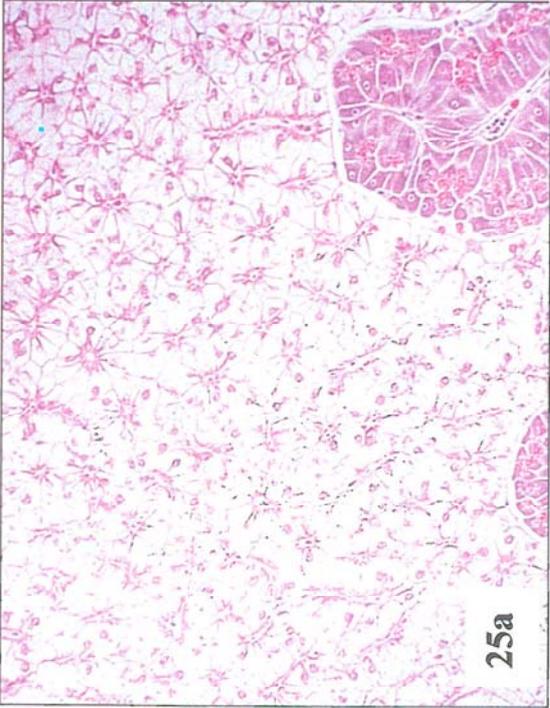
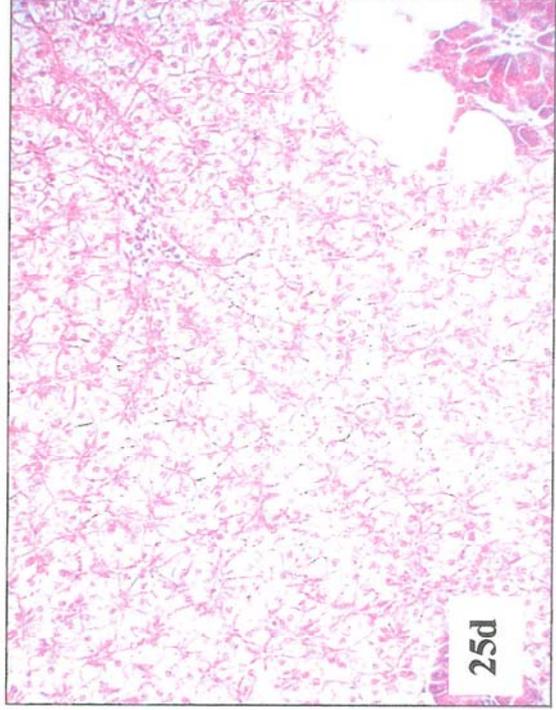
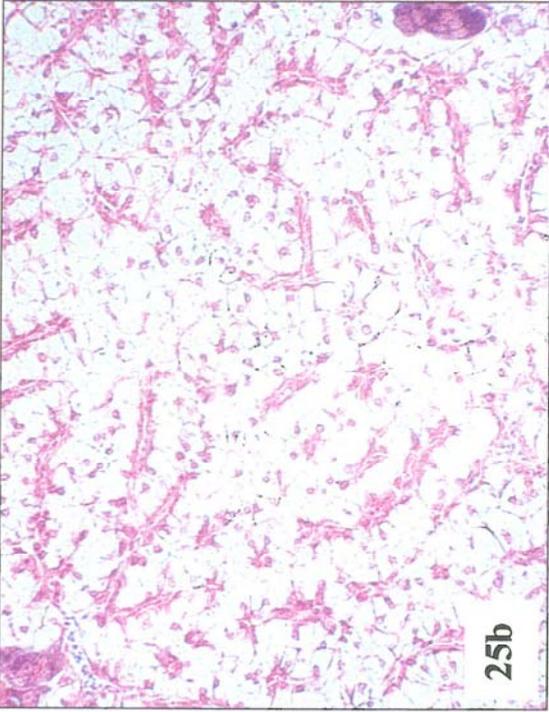
*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60C*

Figura 25a. *3 meses*. H&E (×200)

Figura 25b. *6 meses*. H&E (×200)

Figura 25c. *6 meses*. Grasa peripancreática. H&E (×40)

Figura 25d. *Periodo de recuperación*. H&E (×200)



*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60L*

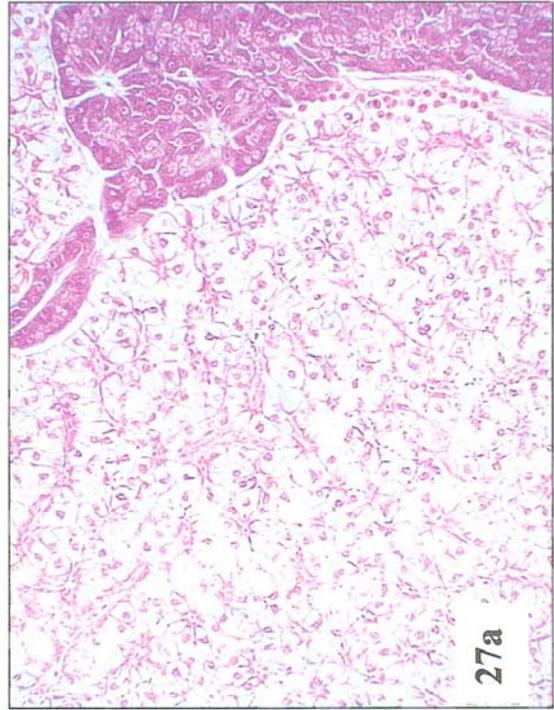
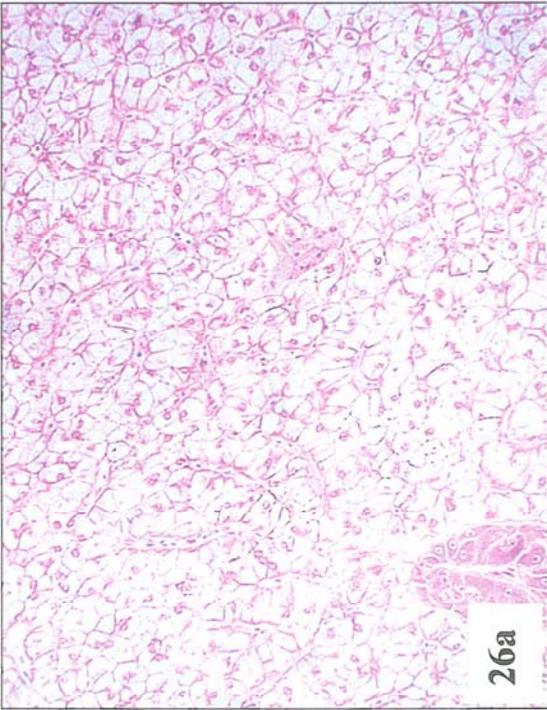
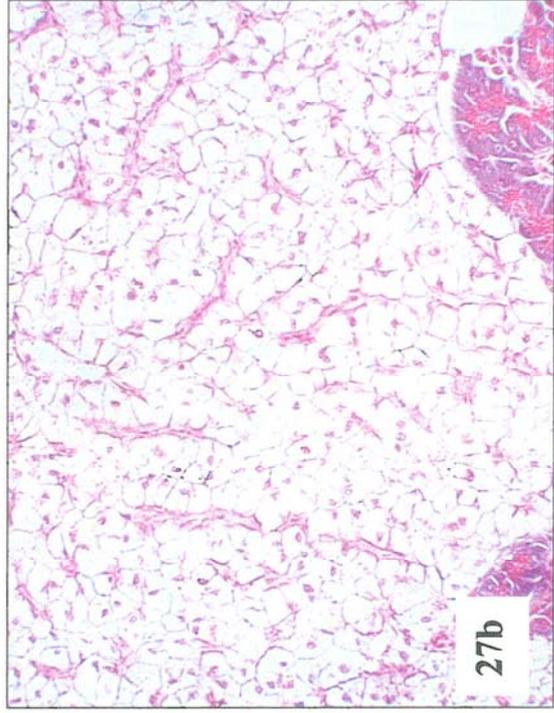
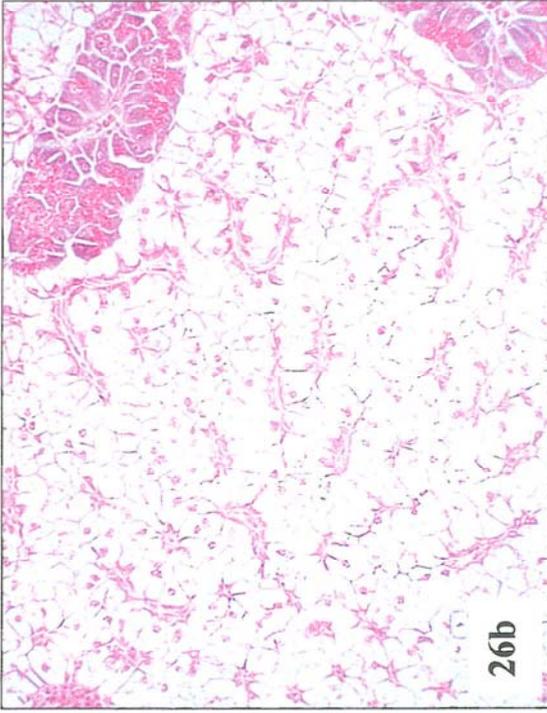
Figura 26a. 3 meses. H&E (×200)

Figura 26b. 6 meses. H&E (×200)

*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 60Mix*

Figura 27a. 3 meses. H&E (×200)

Figura 27b. 6 meses. H&E (×200)



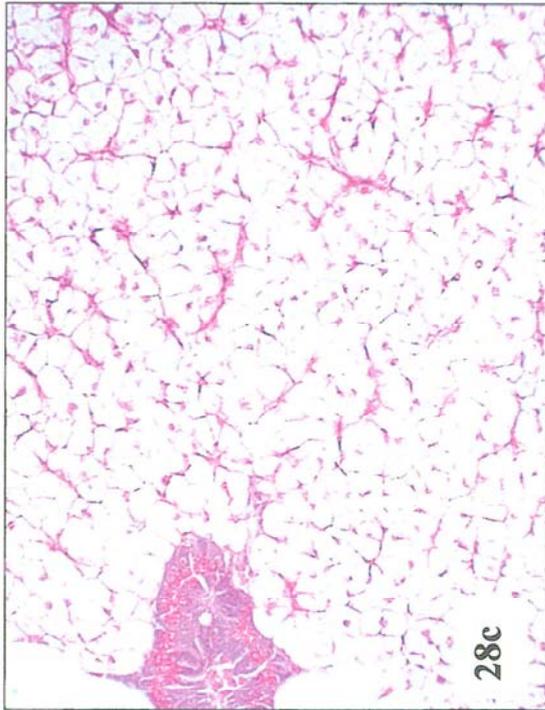
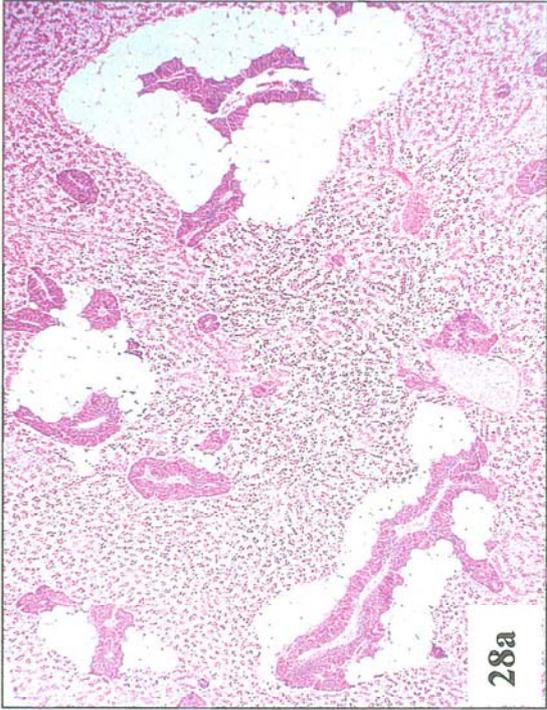
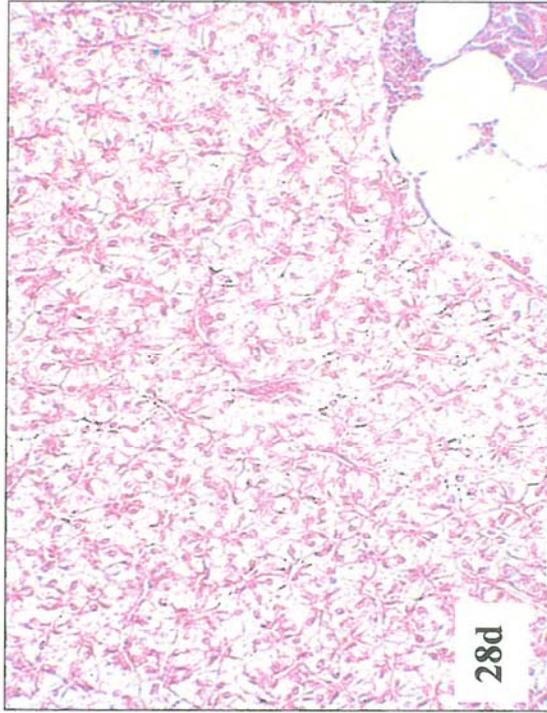
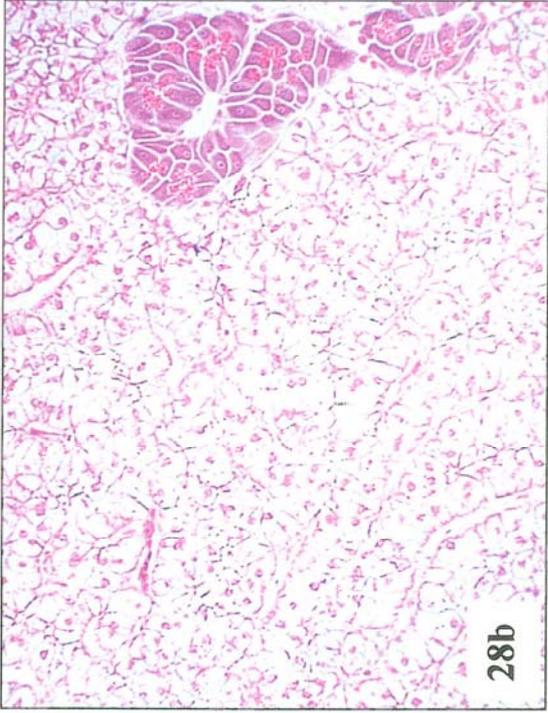
*Hígados de doradas alimentadas con la dieta 80S*

Figura 28a. *3 meses. Grasa peripancreática. H&E (×40)*

Figura 28b. *3 meses. H&E (×200)*

Figura 28c. *6 meses. H&E (×200)*

Figura 28d. *Periodo de recuperación. H&E (×200)*



*Higados de doradas alimentadas con la dieta 80L*

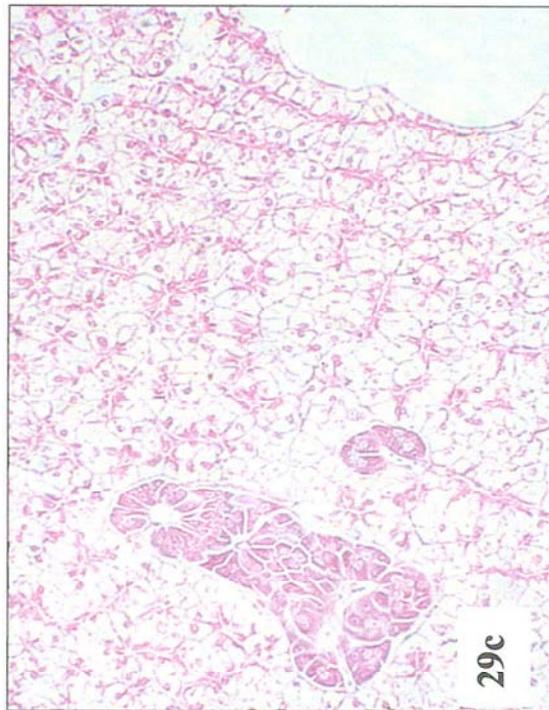
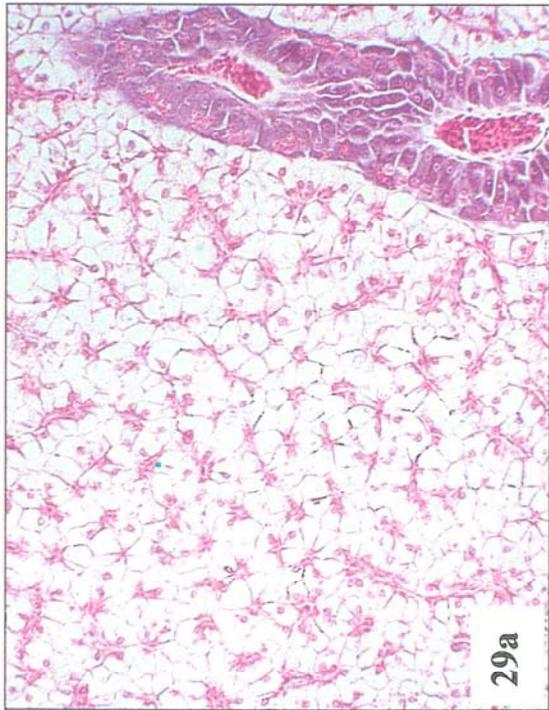
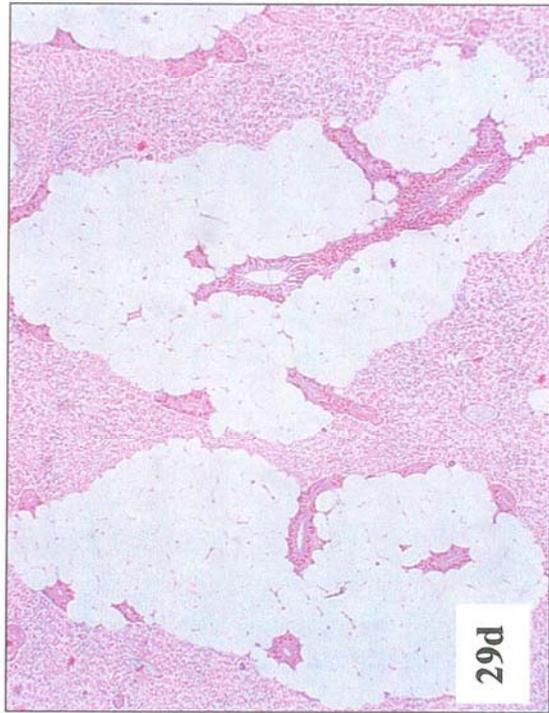
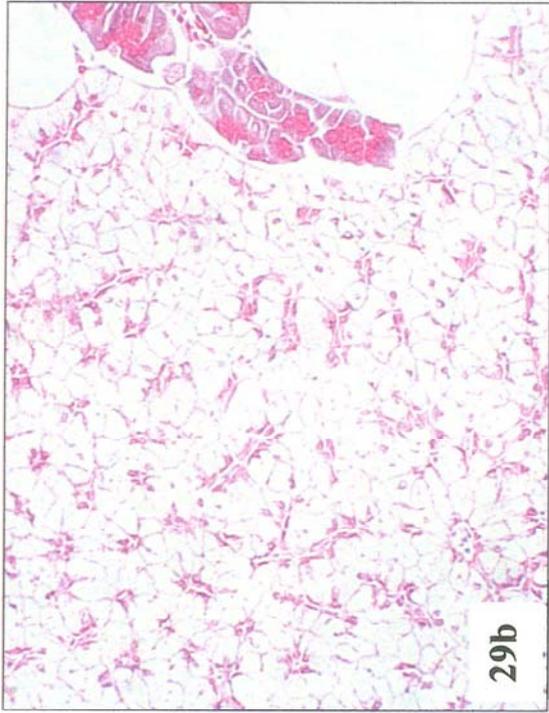
Figura 29a. *3 meses*. H&E (×200)

Figura 29b. *6 meses*. H&E (×200)

Figura 29c. *Periodo de recuperación*. H&E (×200)

Figura 29d. *Periodo de recuperación*. Intensa infiltración de grasa peripancreática.

H&E (×40)



### **3.4.4 DISCUSIÓN**

En el presente estudio durante el periodo experimental ( $\approx 3$  meses) comprendido desde que las doradas tienen un peso inicial alrededor de 79 g hasta que alcanzan un peso aproximado de 200 g, el reemplazamiento del 60% e incluso del 80% de aceite de pescado por aceites vegetales no afectó al crecimiento de estas, confirmando los resultados encontrados en el capítulo anterior. Sin embargo, la alimentación con estas dietas a largo plazo (6 meses) produjo diferencias en el crecimiento entre los distintos grupos experimentales. Así, aunque todos los grupos alcanzaron el peso medio comercial (alrededor 430g), los peces alimentados con 80% de aceite de soja y lino presentaron crecimientos más bajos que el resto de grupos. Estas diferencias podrían verse agravadas en condiciones de producción comercial intensa, donde el periodo de engorde de dorada se alarga hasta aproximadamente 12 meses. Este hecho parece estar relacionado con el menor nivel de n-3 HUFAs presente en las dietas con un 80% de sustitución, ya que afectan directamente al crecimiento de los peces. Hay que resaltar que estas diferencias en el peso final fueron, incluso, mantenidas tras el periodo de recuperación, indicando que el posible efecto positivo que la re-alimentación con niveles superiores de n-3 HUFAs puede producir sobre el crecimiento, requiere de un periodo superior a los tres meses de alimentación.

En el caso de las lubinas, el crecimiento no se vio afectado después de 9 meses de alimentación con las distintas dietas experimentales, aunque el crecimiento de estas fue inferior al de las doradas. Este hecho, junto con la mayor acumulación de grasa observada en los hígados de las lubinas sugeriría de nuevo que esta especie tiene una menor capacidad de adaptación a dietas con elevado contenido en lípidos, como anteriormente ha sido discutido en esta tesis (apartado 3.3).

Aunque no existieron diferencias significativas en el contenido de lípidos en el hígado de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales, las imágenes histológicas a los 3 meses de alimentación revelaron diferencias

estructurales en el hígado entre los distintos grupos experimentales, completando la información de cómo y dónde se acumulan los lípidos. Las doradas alimentadas con la dieta 100P mostraron hepatocitos poco vacuolizados y con núcleos con localización central. Esta morfología fue similar a aquella observada en los hígados de los peces alimentados con las dietas 60L y 60Mix. Esos resultados histológicos parecen estar relacionados con el diferente grado de oxidación hepática de los distintos ácidos grasos. Así, como hemos indicado en el capítulo anterior, el EPA (ácido poliinsaturado mayoritario en la dieta 100P) es altamente oxidado impidiendo la acumulación de lípidos en el hígado. Y trabajos recientes han mostrado que el 18:3n-3 (ácido graso de 18C mayoritario en las dietas 60L y 60Mix) es también altamente oxidado por hepatocitos aislados de salmón atlántico (STUBHAUG *et al.*, 2002). Sin embargo, los peces alimentados con las dietas 60S y 60C tuvieron una mayor vacuolización del citoplasma y mayor desplazamiento del núcleo celular, lo que parece estar relacionado con la menor oxidación de los ácidos grasos 18:1n-9 y especialmente 18:2n-6 (mayoritarios en las dietas 60C y 60S, respectivamente) en los hígados (STUBHAUG *et al.*, 2002). Por otro lado, en el caso de los peces alimentados con las dietas 80S y 80L, la acumulación de lípidos observada en los hígados podría estar relacionada también con una menor capacidad de síntesis de lipoproteínas, ya que es conocido que niveles bajos de n-3 HUFAs en las dietas producen una disminución en la síntesis de lipoproteínas impidiendo el transporte de lípidos desde el hígado a otros tejidos (WATANABE, 1982; IZQUIERDO *et al.*, 2000).

Después de un periodo largo de alimentación se observó una drástica vacuolización del citoplasma con el consiguiente desplazamiento del núcleo celular en todos los grupos experimentales. Estas imágenes coincidieron con un incremento en el porcentaje de lípidos principalmente en los peces alimentados con 80% de aceites vegetales. Estos hechos parecen confirmar la tendencia a la acumulación de lípidos en el hígado que tienen los peces de cultivo a largo plazo. En este sentido, algunos autores han señalado que el aumento del depósito de grasa en peces a largo plazo puede estar influenciado por otros factores diferentes a la composición de la

---

dieta, como es el caso del incremento del tamaño del pez (SHEARER, 1994; WATHNE, 1995). En mamíferos y en aves, el aumento en la deposición de lípidos en el hígado representa, en muchos casos una situación patológica irreversible (CHEVILLE, 1994). En peces, la acumulación de vacuolas lipídicas en los hepatocitos ha sido interpretado de varias formas. Primeramente, como una desviación en el metabolismo lipídico llegando a considerarla como una patología nutricional (GHITTINO, 1978). Más recientemente, como una respuesta fisiológica a un exceso de lípidos, representando únicamente un almacén de energía (STORCH et al., 1984; SEGNER y WITT, 1990). En el presente estudio, excepto cambios asociados con el depósito de lípidos, ninguna patología, como necrosis, depósitos de ceroides u otras degeneraciones irreversibles se observaron en los hígados tras un periodo largo de alimentación con las distintas dietas experimentales. Esto contrasta con los resultados de ALEXIS, (1997), que encuentra una concentración de macrófagos alrededor de zonas necróticas en los hígados de doradas alimentadas con aceite de soja y oliva. Esta diferencia podría ser debida a que las dietas formuladas por ALEXIS, (1997) contengan algún nutriente adicional que pueda provocar cierto grado de necrosis en los hígados. Focos de necrosis hepática han sido descritos en los hígados de doradas alimentadas con harina de soja (ROBAINA *et al.*, 1995).

Además en el presente estudio, la re-alimentación con una dieta con un 100% de aceite de pescado indujo la regresión de los dos fenómenos histológicos observados en los hígados: la vacuolización del citoplasma y el desplazamiento nuclear en todos los grupos experimentales. Esta regresión es indicativa del grado de reversibilidad de los cambios hepáticos asociados al depósito de vacuolas lipídicas y del carácter no patológico de esta acumulación lipídica en el hígado de la dorada. Como consecuencia de este hecho, cabría preguntarse: ¿cómo y por qué se produce la movilización de los depósitos de ácidos grasos en los hepatocitos cuando se realimenta con dietas conteniendo 100% de aceite de pescado? Las principales diferencias dietéticas producidas al cambio de alimentación de dietas conteniendo aceites vegetales a la dieta 100% aceite de pescado, fueron una equilibrada relación dietética n-3/n-6 y un aumento en el contenido de HUFAs. En concreto, esta mayor

cantidad de HUFAs podría ser el principal factor que promueve la movilización o utilización de los ácidos grasos almacenados en los hepatocitos. Así, recientes estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que los PUFA reducen la actividad de las enzimas implicadas en la lipogénesis, mientras que producen una activación de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal mediante la regulación de la expresión de genes encargados de estos mecanismos (JUMP *et al.*, 1995; SESSLER Y NTAMBI, 1998; DUPLUS *et al.*, 2000; CLARKE, 2001).

De manera que, el aumento dietético de HUFAs, principalmente n-3 HUFA durante el periodo de recuperación, podría inducir la actividad de la  $\beta$ -oxidación peroxisomal en los hepatocitos, reflejándose en una reducción de los depósitos de ácidos grasos, y a nivel histológico en una regresión de la vacuolización del citoplasma. No obstante, hay que resaltar el mantenimiento de los depósitos de grasa peripancreáticos tras este periodo de alimentación, lo que parece indicar una mayor facilidad en la utilización de los ácidos grasos intracelulares que extracelulares, como pudieran ser depósitos peripancreáticos o grasa perivisceral.

Por último cabría mencionar que la realimentación con una dieta rica en HUFAs en la última fase del engorde, podría tener un cierto interés desde una perspectiva comercial, puesto que la posible estimulación de la oxidación de los ácidos grasos llevada a cabo por los HUFAs, podría darse de igual forma en el músculo, modificándose la composición bioquímica y con ello las características organolépticas y sensoriales de este tejido. Ambas características están emplazadas dentro de los principales objetivos a cubrir cuando se sustituye el aceite de pescado por aceites vegetales en dietas para acuicultura, con el fin de mantener la calidad del pescado para el consumo humano.

En conclusión, es posible alimentar durante gran parte del engorde con aceites vegetales, siempre que los niveles de sustitución no superen el 60%, sin afectar el crecimiento de los peces y sin ocasionar alteraciones morfológicas de tipo patológico tales como necrosis. Sin embargo, niveles de sustitución del aceite de

---

pescado de hasta el 80% por distintos aceites vegetales puede llegar a reducir significativamente el crecimiento, aunque de nuevo no se observe daños patológicos. Finalmente, las alteraciones morfológicas observadas son recuperables, con lo que parece confirmarse que estas alteraciones son solamente un reflejo del incremento de las reservas energéticas en el hígado.

***ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LIPOPROTEÍNAS  
PLASMÁTICAS EN DORADA. EFECTO DE LA CALIDAD  
DE LOS LÍPIDOS.***

#### **4. ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DE LIPOPROTEÍNAS EN DORADA. EFECTO DE LA CALIDAD DE LOS LÍPIDOS DIETÉTICOS.**

##### **4.1 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

El transporte de lípidos y otros componentes liposolubles en peces hacia los tejidos es mediado principalmente por lipoproteínas. Así, los lípidos de origen exógeno absorbidos en el intestino son integrados preferentemente en quilomicrones, y los lípidos endógenos son transportados en forma de lipoproteína de muy baja densidad (very low density lipoprotein, VLDL), de baja densidad (low density lipoprotein, LDL) y lipoproteína de alta densidad (high density lipoprotein, HDL) (SHERIDAN, 1988). Existe un mecanismo de interrelación entre las lipoproteínas, de modo que las apoproteínas y lípidos constituyentes de estas partículas interactúan con enzimas o receptores celulares resultando en una degradación o transformación de un tipo de lipoproteína en otra, y en una transferencia de productos desde los tejidos a las lipoproteínas. Estos mecanismos ya han sido considerados en detalle en la Introducción.

La proporción y composición de lípidos en cada lipoproteína depende de una variedad de factores, tales como el estado de maduración sexual (FRÉMONT y MARION, 1982), o el estatus nutritivo (SHERIDAN *et al.*, 1985) entre otros. Puesto que la composición cualitativa de los lípidos dietéticos podría afectar la calidad y cantidad de las lipoproteínas plasmáticas, tal como se ha demostrado en otros vertebrados, la tendencia actual a la inclusión de aceites vegetales en las dietas comerciales para peces esta motivando a estudiar los efectos de estos aceites en el transporte de lípidos. Por ello, un primer objetivo del presente estudio fue la caracterización de las lipoproteínas en el suero de dorada. Y el segundo objetivo fue estudiar la influencia de la dieta y en particular de su perfil de ácidos grasos en la composición de lipoproteínas de doradas alimentadas con dietas conteniendo diferentes aceites vegetales.

## 4.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Las muestras de plasma se recogieron de las doradas alimentadas durante 3 meses con las siguientes dietas experimentales. Todas las dietas fueron isoenergéticas e iso-protéicas (45% proteínas) y con un contenido de lípidos alrededor de un 22%. La única fuente de lípidos añadida a la dieta 100P fue aceite de pescado. En las dietas 60S, 60C, 60L y 60Mix, el 60% del aceite de pescado se reemplazó por aceites de soja, colza, lino y una mezcla de los tres, respectivamente. Las dietas 80S y 80L se elaboraron reemplazando un 80% del aceite de pescado por aceite de soja y lino, respectivamente. Las dietas elaboradas con aceites vegetales mantuvieron un nivel de n-3 HUFA por encima del 3% para poder satisfacer los requerimientos en ácidos grasos esenciales de esta especie (MONTERO, 1996). La dieta 100P se caracterizó por un contenido superior en ácidos grasos saturados y en n-3HUFAs que el resto de las dietas. Además esta dieta también tuvo un porcentaje mayor de ácido araquidónico. La relación dietética n-3/n-6 varió entre las distintas dietas experimentales debido principalmente al contenido en ácido linoleico de los aceites vegetales usados, rondando el 0.46 y 0.30 para las dietas 60S y 80S, respectivamente. Inversamente, las dietas con aceite de lino mantuvieron la relación n-3/n-6 por encima de 2, en parte debido a su alto contenido en ácido linolénico. La dieta 60C se caracterizó por su alto contenido en monoeno, especialmente en 18:1n-9. Y las dietas 80S y 80L tuvieron un menor contenido en HUFA que el resto de las dietas, especialmente en ARA, EPA y DHA. La composición ácidos grasos de las dietas se muestra en la Tabla 13.

Las condiciones experimentales de cultivo de las doradas se describen en el apartado 3.4.1.

Las metodologías para la recogida de plasma y la separación de lipoproteínas se describen en los apartados 2.5.1 y 2.5.2 de Material y Métodos, respectivamente. El análisis de los ácidos grasos y clases lipídicas de cada fracción lipoprotéica se detalla en los apartados 2.5.4 y 2.5.5.

Tabla 13. Algunos ácidos grasos de los lípidos totales de las dietas experimentales  
(g/100g a.g.)

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
14:0	6.21	3.18	3.11	3.09	3.27	1.10	1.94
16:0	18.51	15.45	12.43	12.21	13.37	14.24	10.89
16:1n-7	6.46	3.41	3.39	3.31	3.45	2.20	2.10
16:2n-6	1.15	0.60	0.57	0.58	0.59	0.37	0.36
17:1	1.28	0.63	0.63	0.62	0.59	0.37	0.35
16:4n-3	1.85	0.88	0.85	0.88	0.71	0.44	0.44
18:0	3.18	3.21	2.35	3.37	3.30	3.30	3.45
18:1n-9	16.26	18.48	36.84	17.03	23.40	21.07	18.71
18:1n-7	2.47	1.84	n.d.	1.54	1.81	n.d.	n.d.
18:2n-6	13.07	31.28	17.04	12.29	15.29	38.54	17.66
18:3n-6	0.21	0.12	0.10	0.11	0.10	0.07	0.07
18:3n-3	1.41	3.24	4.64	26.72	18.27	4.03	30.63
18:4n-3	1.43	0.79	0.76	0.78	0.69	0.48	0.54
20:1n-9	1.89	1.63	2.08	1.58	1.81	1.49	1.61
20:4n-6	0.54	0.34	0.33	0.36	0.31	0.25	0.23
20:4n-3	0.43	0.25	0.26	0.25	0.24	0.22	0.19
20:5n-3	11.19	5.88	5.84	6.19	5.10	3.73	3.79
22:1n-11	1.95	1.49	2.13	2.13	1.77	2.01	1.78
22:1n-9	0.14	0.22	0.03	0.03	0.09	0.03	0.08
22:3n-6	0.53	0.33	0.29	0.29	0.26	0.22	0.22
22:4n-6	0.25	0.21	0.17	0.18	0.16	0.16	0.15
22:4n-3	0.19	0.15	0.12	0.14	0.11	0.10	0.08
22:5n-3	1.16	0.75	0.63	0.79	0.56	0.50	0.45
22:6n-3	4.99	3.20	3.26	3.58	2.83	2.36	2.92
Saturados	27.9	21.84	17.89	18.67	19.94	18.64	16.28
Monoenos	30.45	27.70	45.10	26.24	32.92	27.17	24.63
n-3	22.65	15.14	16.36	39.33	28.51	11.86	39.04
n-6	15.75	32.88	18.50	13.81	16.71	39.61	18.69
n-9	18.29	20.33	38.95	18.64	25.30	22.59	20.40
n-3 HUFA	17.96	10.23	10.11	10.95	8.84	6.91	7.43
n-6 HUFA	1.32	0.88	0.79	0.83	0.73	0.63	0.60
n-3/n-6	1.44	0.46	0.88	2.85	1.71	0.30	2.09

### **4.3 RESULTADOS**

#### *Composición de clases lipídicas de las fracciones HDL, LDL y VLDL*

HDL fue la fracción lipoprotéica predominante en el suero de dorada, con una concentración de  $236.4 \pm 32.22$  mg/ml de suero. La concentración plasmática de LDL y VLDL fue de  $127.8 \pm 40.36$  y  $172 \pm 40.72$  mg/ml, respectivamente. HDL se caracterizó por un alto porcentaje de proteína (34.18%), mientras que las fracciones LDL y VLDL tuvieron un porcentaje más bajo de proteína, 2.71 y 1.97%, respectivamente.

La distribución de las distintas clases lipídicas en relación al contenido en proteína para cada una de fracciones lipoprotéicas se muestra en la Fig. 30, donde los datos son expresados como g lípido/ g proteína. Niveles bajos en lípidos neutros fueron paralelos a un incremento en el nivel de proteína y de la densidad lipoprotéica (HDL > LDL > VLDL), siendo la fracción HDL la de mayor porcentaje de proteína (34%). Respecto a los lípidos polares, la fosfatidilcolina (PC) fue el principal fosfolípido en todas las fracciones lipoprotéicas. Otros fosfolípidos, tales como, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol se encontraron a niveles trazas (< 3%).

Cuando se comparan los datos de mg lípido por g plasma, las clases lipídicas de cada fracción se vieron afectadas por las distintas dietas experimentales. En la fracción HDL (Fig. 31) a pesar de que no hubo diferencias estadísticas en los mg de lípidos/ g plasma entre los distintos grupos, se puede reseñar que los peces alimentados con la dieta 100P mostraron un contenido ligeramente más bajo en lípidos totales que el resto de los peces (aproximadamente un 32% menos). No existieron diferencias en el contenido en proteína por g plasma de los distintos grupos experimentales. La Fig. 32 muestra los mg de cada clase lipídica por g plasma de la fracción HDL. Los peces alimentados con la dieta 100P mostraron el nivel más bajo en TAG, aunque siendo solamente significativamente ( $P < 0.05$ ) menor respecto al de aquellos peces alimentados con la dieta 80S, que tuvieron el nivel más alto de

TAG. Respecto al nivel de CHO, los peces alimentados con la dieta 100P tuvieron el nivel más bajo aunque no difirió significativamente de los grupos 60S, 60C y 60L. Y los peces alimentados con la dieta 60Mix, 80S y 80L tuvieron los niveles más altos en CHO, aunque solamente el grupo 80S difirió significativamente ( $P<0.05$ ) del grupo 100P y de los grupos con 60% de soja, lino y colza. No hubo diferencias significativas en el contenido de CE y PC entre los distintos grupos experimentales. No obstante, los peces alimentados con la dieta 100P tendieron a tener el nivel más alto de CE y el menor de PC, respecto al resto de grupos dietéticos.

La Fig. 33 muestra el nivel de proteína y los mg de lípidos por g plasma en la fracción LDL. No hubo diferencias estadísticas en el contenido de proteínas entre los distintos grupos experimentales. El nivel de lípidos totales fue proporcional al porcentaje de inclusión de aceites vegetales, encontrándose los mayores ( $P<0.05$ ) valores en los peces alimentados con 80S y 80L, y los menores en los peces alimentados con la dieta 100P. La Fig. 34 muestra los mg de cada clase lipídica por g plasma correspondientes a la fracción LDL. A nivel de triacilgliceroles, los peces alimentados con la dieta 100P tuvieron un menor contenido en TAG ( $P<0.05$ ), respecto al resto de grupos experimentales, que mostraron valores relativamente homogéneos para este parámetro. El nivel de CHO fue significativamente ( $P<0.05$ ) mayor en los peces alimentados con las dietas 80S y 80L y menor ( $P<0.05$ ) en los peces alimentados con la dieta 100P. En el contenido de CE y PC surgieron mayores diferencias estadísticas entre los grupos dietéticos, resaltando, los valores más bajos ( $P<0.05$ ) encontrados para ambas clases lipídicas en los peces alimentados con la dieta 100P.

La Fig. 35 muestra los mg de lípidos neutros, proteína y de CE, TAG, CHO por g plasma de la fracción VLDL de los peces experimentales. Aunque no hubo diferencias significativas en cuanto al total de lípidos neutros y el nivel de proteína entre los distintos grupos, el grupo 100P tendió a tener un menor contenido en ambos parámetros. Asimismo, este grupo se caracterizó por presentar los niveles más bajos en CHO, siendo significativamente ( $P<0.05$ ) diferente al resto de grupos, excepto del

---

grupo 60C. Los peces alimentados con las dietas 80S y 80L tuvieron los valores más altos en TAG aunque solamente difirieron significativamente ( $P < 0.05$ ) del grupo 100P y 60C. Este último grupo tuvo el nivel más alto de CE, siendo significativamente diferente al resto de los grupos experimentales. La Fig. 36 muestra los mg de lípidos polares y de PC por g plasma de la fracción VLDL. Aunque no existieron diferencias estadísticas entre los distintos grupos experimentales, los peces alimentados con la dieta 100P y 60C tendieron a tener un contenido menor en PC.

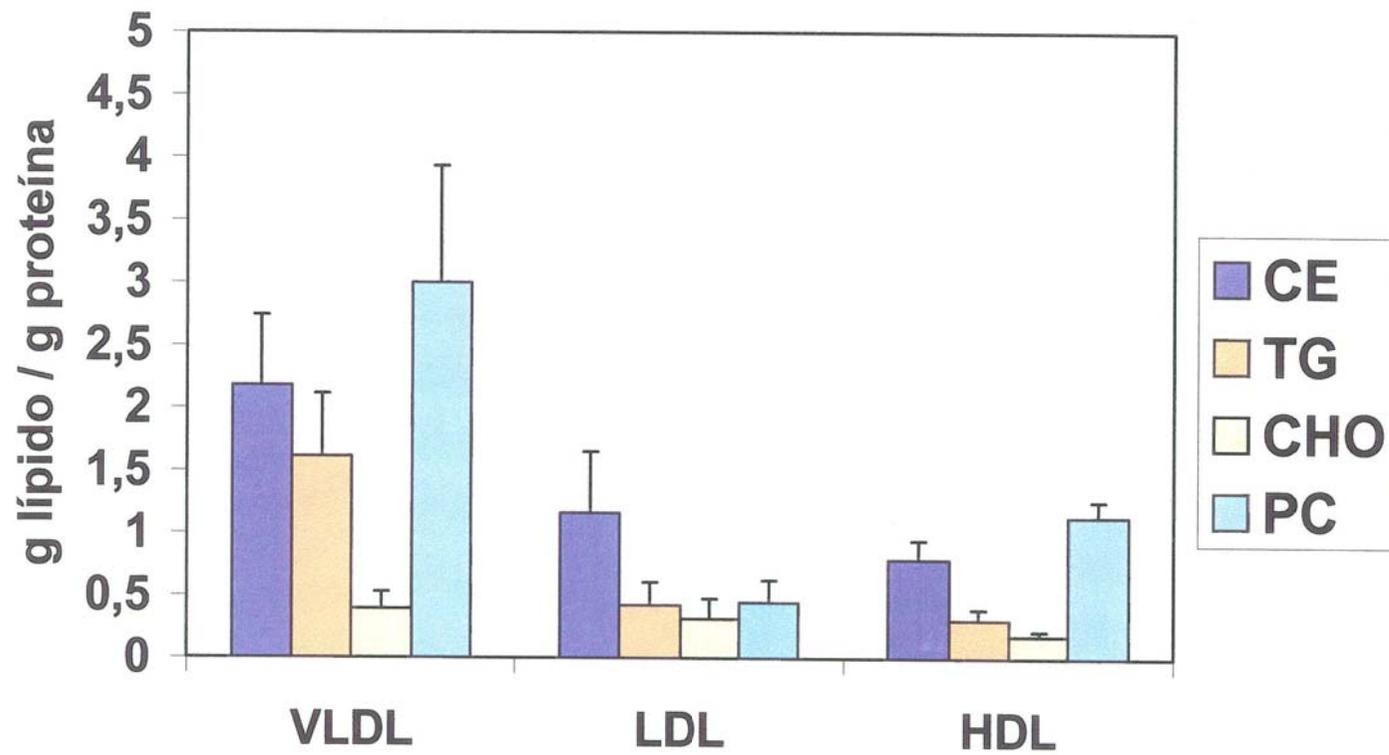


Fig. 30. Composición química de VLDL, LDL y HDL de doradas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos durante 3 meses.

Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar.

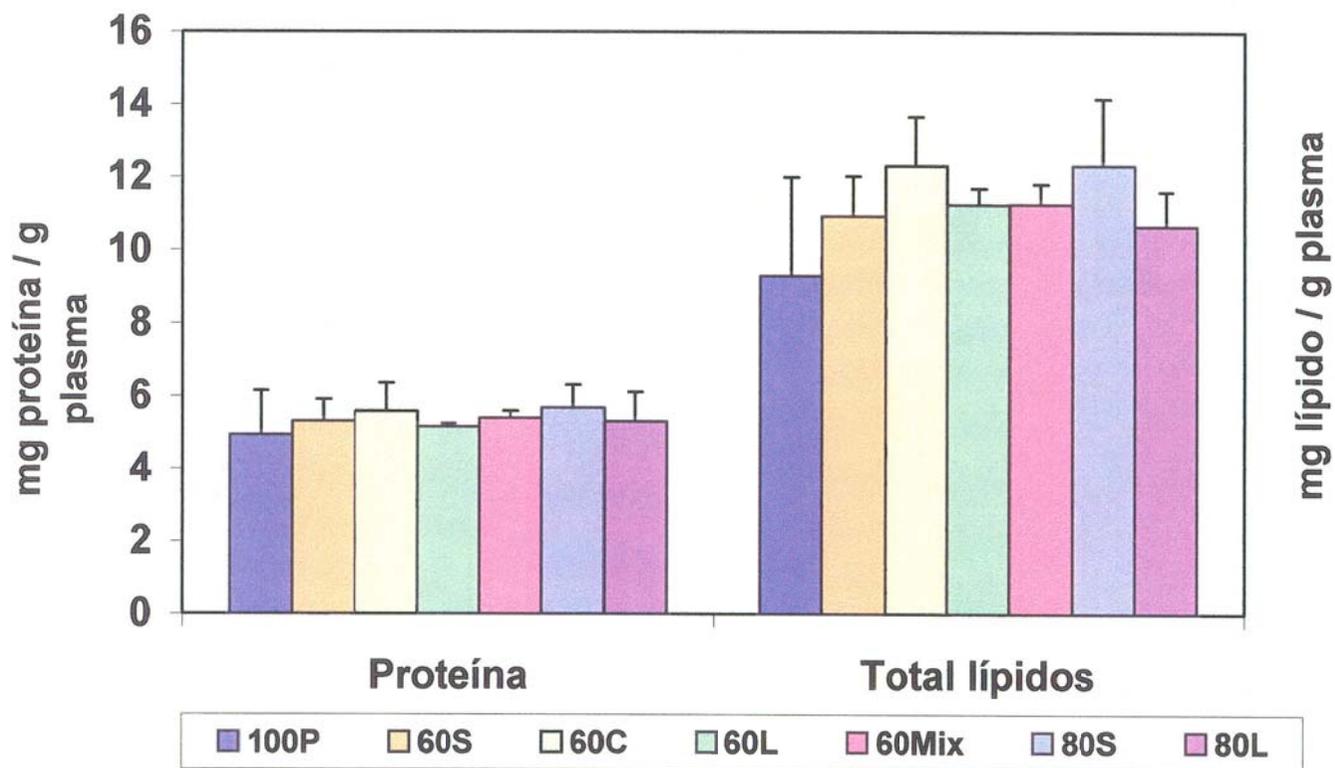


Fig. 31. Cantidad de proteína y de lípidos totales en HDL de doradas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos durante 3 meses. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

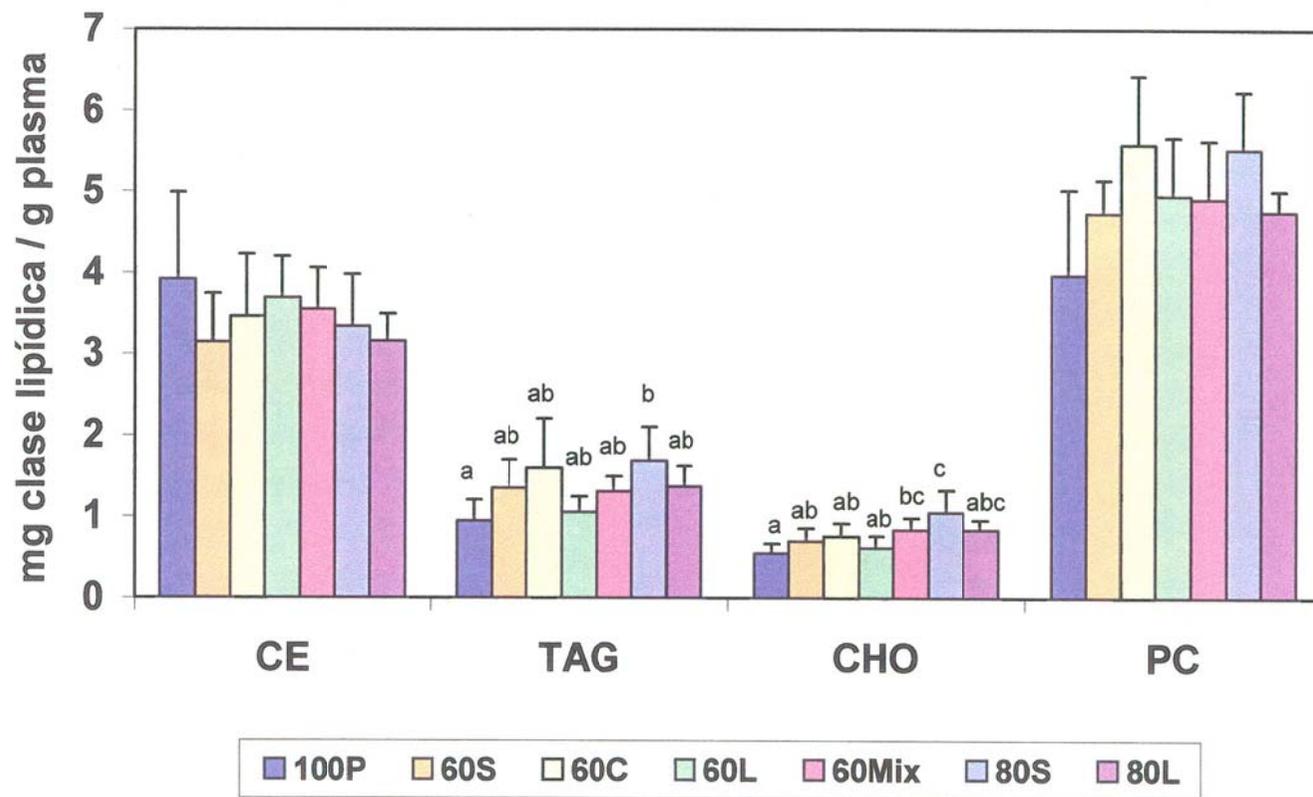


Fig. 32. Clases lipídicas de HDL en doradas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos durante 3 meses. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

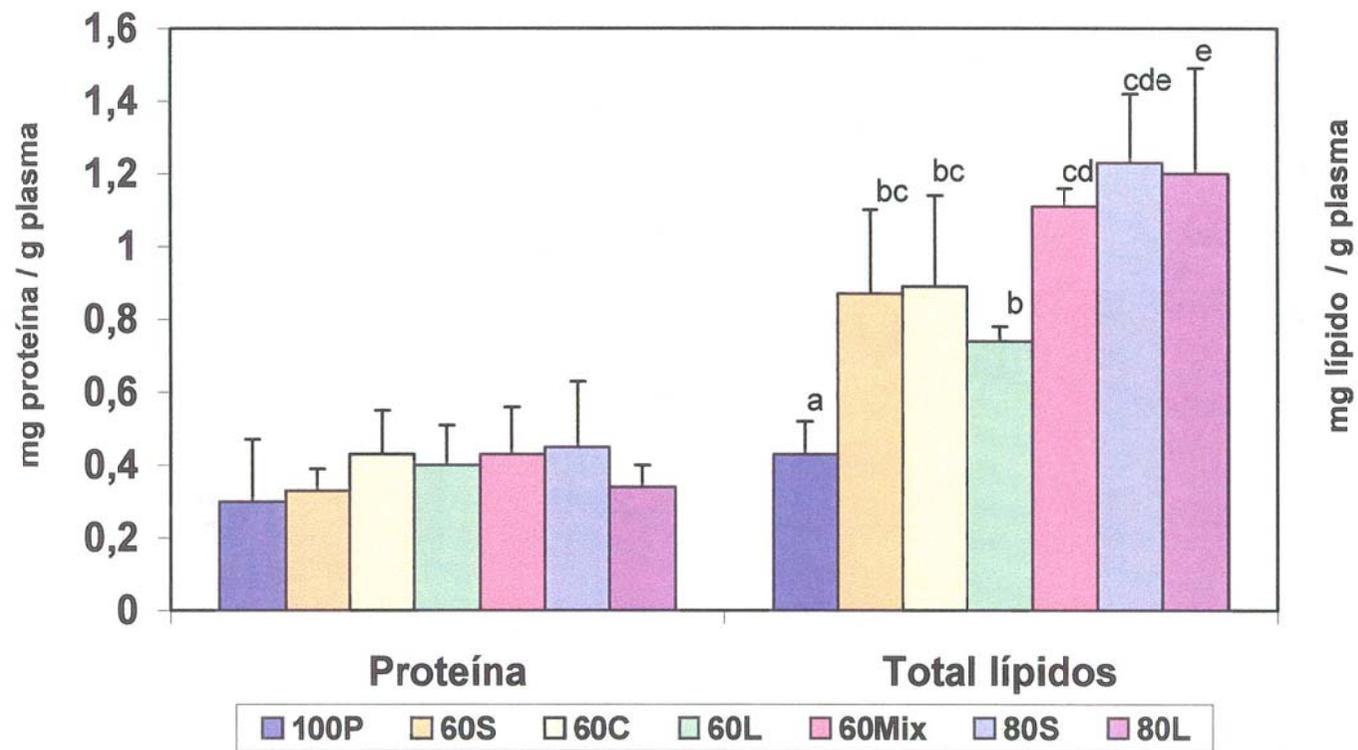


Fig. 33. Cantidad de proteína y de lípidos totales en LDL de doradas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos durante 3 meses. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

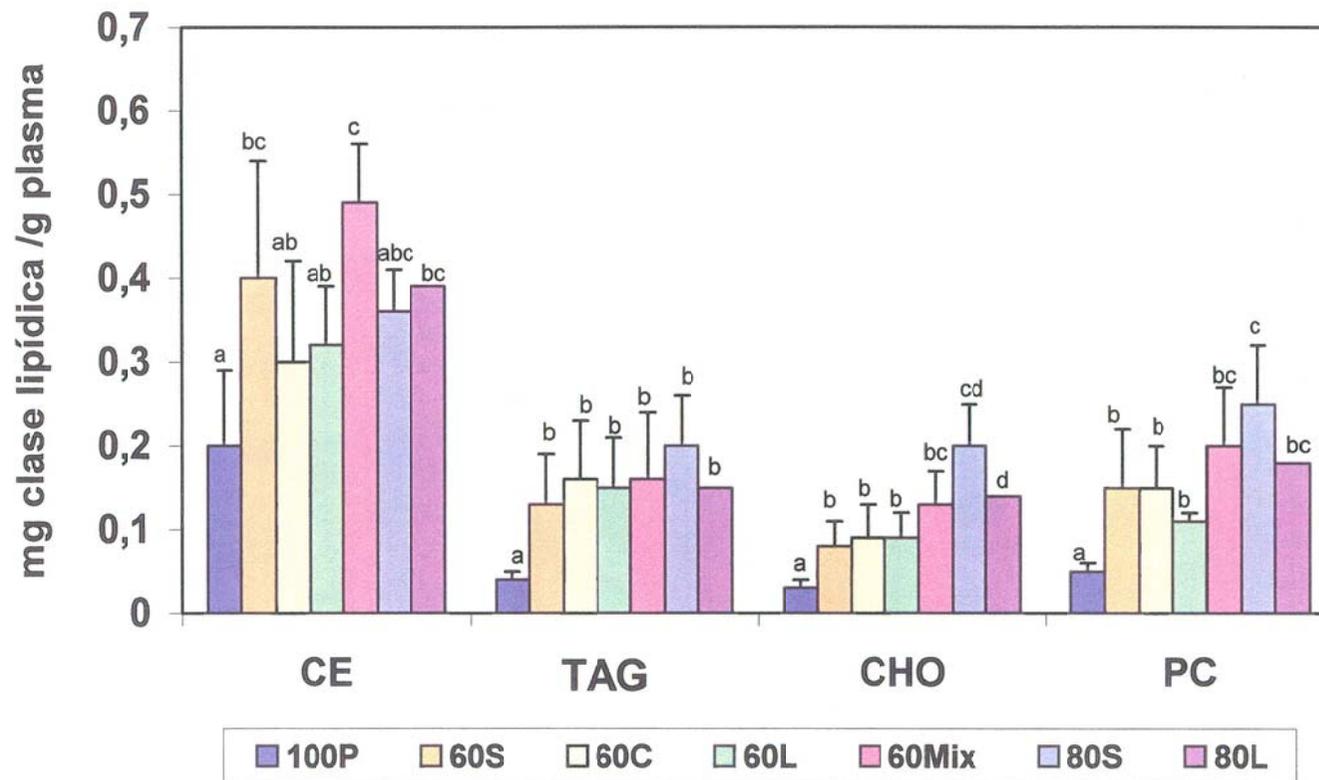


Fig. 34. Clases lipídicas de LDL en doradas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos durante 3 meses. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

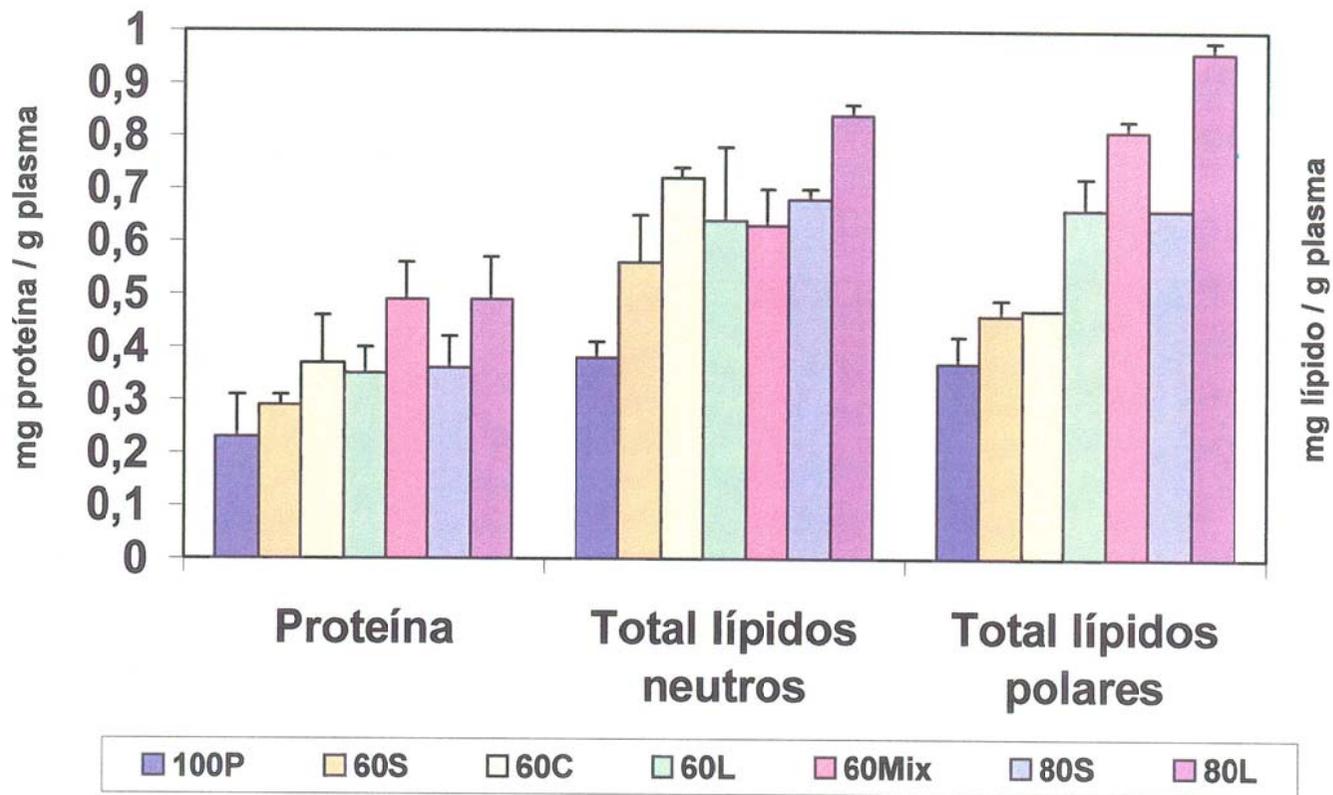


Fig. 35. Cantidad de proteína y de lípidos neutros y polares en VLDL de doradas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos durante 3 meses. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estandar (n=3)

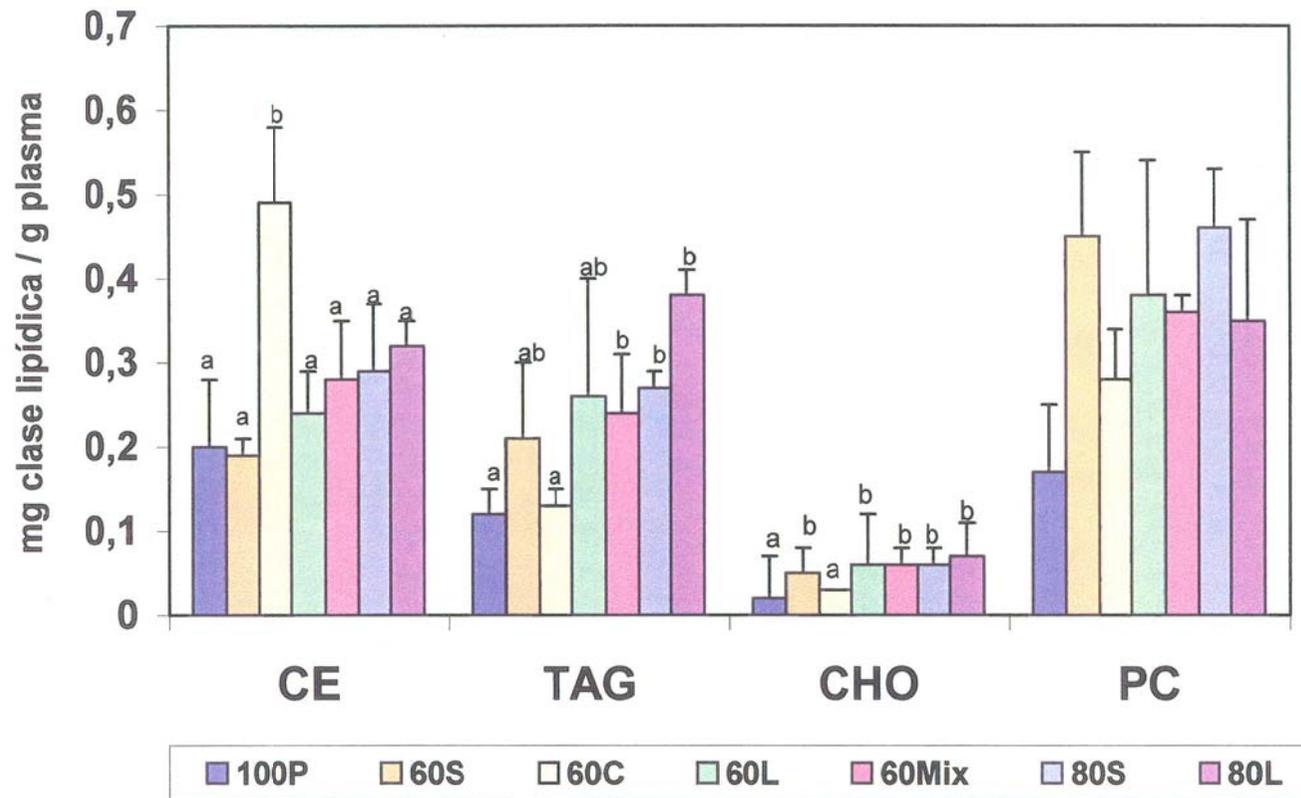


Fig. 36. Clases Lipídicas en VLDL de doradas alimentadas con diferentes fuentes de lípidos durante 3 meses. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

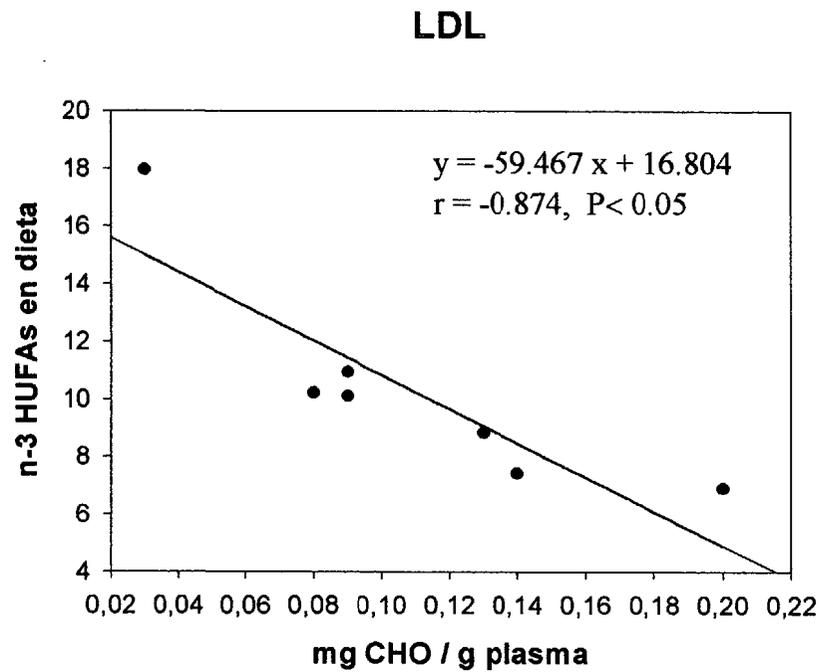
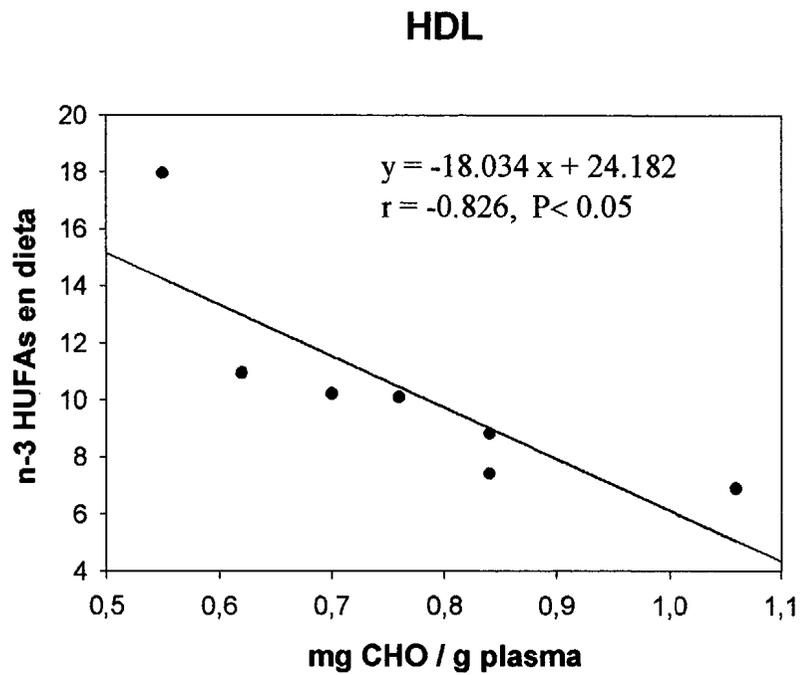


Fig. 37. Relación entre el nivel de n-3 HUFA de las dietas y el contenido de colesterol para las fracciones HDL y LDL.

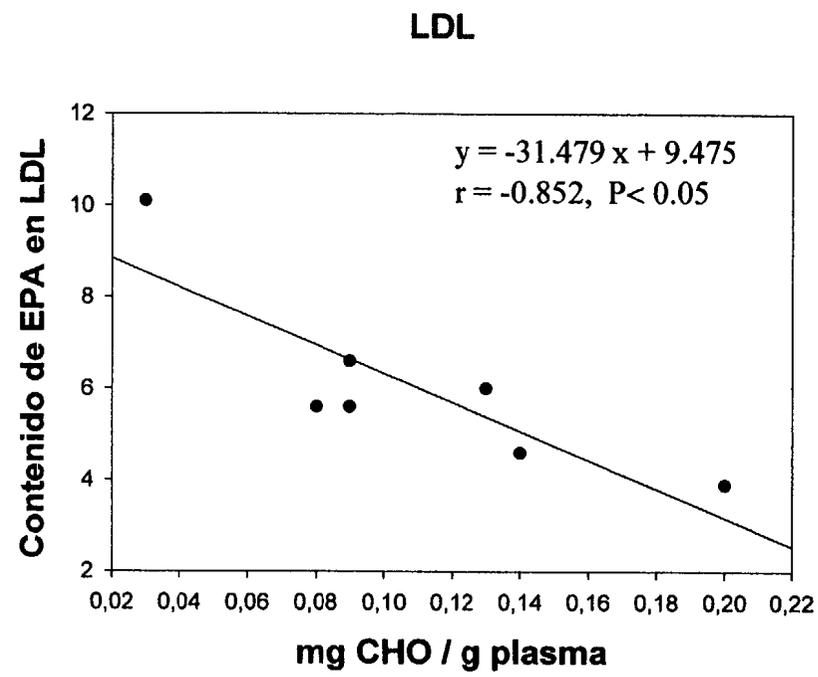
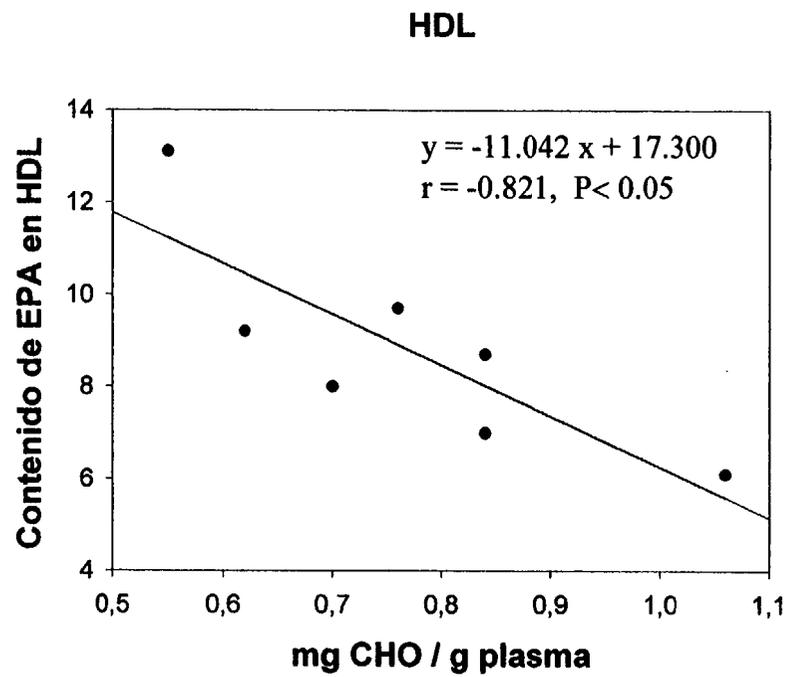


Fig. 38. Relación entre el contenido de EPA en la fracción HDL y LDL con el contenido de colesterol para dichas fracciones.

***Composición de ácidos grasos de las fracciones HDL, LDL y VLDL***

La Tabla 14 muestra la composición de los ácidos grasos de la fracción VLDL de los peces alimentados con las dietas experimentales.

La fracción VLDL se caracterizó por presentar un alto porcentaje de ácidos grasos saturados, principalmente de 16:0 y 18:0 y, en menor medida de 14:0, en todos los grupos experimentales. La influencia de la composición de las dietas se demostró por el alto contenido de 18:1n-9 en el grupo 60C, por los niveles de 18:2n-6 en los grupos 60S y 80S y por los de 18:3n-3 en los grupos 60L y 80L. Los niveles de n-3 HUFAs fueron elevados en todos los grupos, debido principalmente al aumento del 20:5n-3 y 22:6n-3. A este respecto, el grupo 100P mostró diferencias significativas con el resto de grupos debido a un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) del contenido de EPA, aunque esto no ocurrió con el DHA.

La Tabla 15 muestran la composición de los ácidos grasos de la fracción LDL de los peces alimentados con las dietas experimentales.

La fracción LDL se caracterizó por un alto contenido de ácidos grasos saturados, particularmente del 16:0. Al igual que la fracción VLDL, los grupos 60C, 60S;80S y 60L;80L destacaron por sus contenidos en oleico, linoleico y linolénico, respectivamente, aunque los niveles de estos ácidos grasos encontrados en la fracción LDL fueron inferiores a los de VLDL. Todos los grupos experimentales se caracterizaron por presentar niveles altos de EPA y DHA en la fracción LDL, aunque el contenido de EPA del grupo 100P fue significativamente superior ( $P < 0.05$ ) al resto de grupos, excepto al del grupo 60L. No existieron diferencias significativas en el contenido de DHA entre los distintos grupos.

La Tabla 16 muestran la composición de los ácidos grasos de la fracción HDL de los peces alimentados con las dietas experimentales.

Lo más significativo de la composición de la fracción HDL fue el aumento considerable de n-3 HUFAs, debido principalmente al incremento en DHA, en todos los grupos experimentales. Además, los niveles de ARA (20:4n-6) en HDL fueron superiores a las otras fracciones. En cuanto a los contenidos de 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3, la fracción HDL también reflejó el perfil de las dietas, aunque el porcentaje de estos ácidos grasos fue menor que en las otras fracciones. Y de manera semejante a las otras lipoproteínas, altos contenidos de ácidos grasos saturados, principalmente 16:0, se encontraron en HDL en todos los grupos experimentales.

Tabla 14. Ácidos grasos de VLDL de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales durante 3 meses (g /100 a.g VLDL)

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
14:0	4.3±0.3	2.4±0.2	2.2±0.4	2.2±0.1	2.5±1.3	2.2±0.8	2.2±0.8
16:0	18.0±2.5	24.0±5.4	15.1±1.4	16.4±2.2	16.0±5.7	14.6±4.0	17.3±1.3
16:1 n-7	6.0±1.1	2.7±0.3	3.1±1.0	3.0±0.3	2.6±0.3	2.4±0.4	2.4±0.5
18:0	8.0±2.0	11.5±4.2	7.8±0.8	8.2±3.2	11.1±3.4	10.0±5.0	8.8±0.1
18:1 n-9	19.0±1.2 <sup>a</sup>	17.9±2.8 <sup>a</sup>	30.0±3.1 <sup>b</sup>	20.2±1.0 <sup>a</sup>	20.1±2.8 <sup>a</sup>	19.8±3.9 <sup>a</sup>	19.7±1.2 <sup>a</sup>
18:1 n-7	3.4±0.3	2.2±0.1	3.0±0.6	2.4±0.6	2.0±0.2	2.0±0.4	2.1±0.4
18:2 n-6	8.0±0.9 <sup>a</sup>	21.0±6.1 <sup>bc</sup>	19.3±1.5 <sup>b</sup>	18.3±1.4 <sup>b</sup>	18.7±6.0 <sup>b</sup>	26.2±6.5 <sup>c</sup>	12.4±0.7 <sup>ab</sup>
18:3 n-3	0.9±0.3 <sup>a</sup>	1.8±0.5 <sup>a</sup>	3.1±0.3 <sup>ab</sup>	12.3±0.6 <sup>c</sup>	7.3±1.6 <sup>bc</sup>	4.0±2.5 <sup>ab</sup>	17.9±0.7 <sup>d</sup>
20:4 n-6	0.7±0.0 <sup>a</sup>	0.4±0.1 <sup>a</sup>	0.5±0.2 <sup>a</sup>	0.7±0.3 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>	0.4±0.2 <sup>a</sup>	0.6±0.1 <sup>a</sup>
20:5 n-3	11.3±0.2 <sup>a</sup>	4.1±0.1 <sup>b</sup>	4.3±0.1 <sup>b</sup>	4.6±0.6 <sup>b</sup>	3.8±1.0 <sup>b</sup>	3.3±0.3 <sup>b</sup>	3.4±0.2 <sup>b</sup>
22:1 n-11	1.3±0.1	0.8±0.1	1.6±0.4	0.5±0.0	0.8±0.4	0.8±0.4	1.2±0.1
22:1 n-9	0.4±0.0	0.3±0.1	n.d.	n.d.	0.5±0.3	0.7±0.4	0.4±0.0
22:5 n-3	4.4±0.1	2.0±0.0	2.4±0.0	2.3±0.5	2.3±1.0	2.1±0.3	1.7±0.4
22:6 n-3	14.5±2.5 <sup>a</sup>	8.3±0.3 <sup>a</sup>	10.2±1.0 <sup>a</sup>	9.6±0.5 <sup>a</sup>	8.0±3.2 <sup>a</sup>	8.5±2.5 <sup>a</sup>	9.5±0.7 <sup>a</sup>
Saturados	30.3±4.3 <sup>a</sup>	37.9±9.4 <sup>a</sup>	25.1±1.8 <sup>a</sup>	26.8±5.3 <sup>a</sup>	29.9±10.6 <sup>a</sup>	26.7±8.9 <sup>a</sup>	28.3±0.7 <sup>a</sup>
Monoenos	30.1±2.3 <sup>ab</sup>	23.9±2.7 <sup>a</sup>	37.7±5.1 <sup>b</sup>	26.0±2.3 <sup>ab</sup>	26.0±4.2 <sup>ab</sup>	25.7±4.2 <sup>a</sup>	26.0±1.4 <sup>ab</sup>
n-3	31.1±1.9 <sup>a</sup>	16.3±0.7 <sup>b</sup>	20.0±1.8 <sup>b</sup>	28.8±1.1 <sup>c</sup>	21.4±6.7 <sup>bc</sup>	18.0±0.4 <sup>b</sup>	32.5±0.7 <sup>d</sup>
n-6	8.8±0.9 <sup>a</sup>	21.5±6.1 <sup>ab</sup>	19.8±1.5 <sup>ab</sup>	19.0±1.9 <sup>ab</sup>	19.0±5.0 <sup>ab</sup>	26.6±4.4 <sup>b</sup>	13.0±1.3 <sup>a</sup>
n-3HUFA	30.2±1.7 <sup>a</sup>	14.8±0.2 <sup>b</sup>	16.9±2.0 <sup>b</sup>	16.5±0.6 <sup>b</sup>	14.1±5.4 <sup>b</sup>	14.0±2.7 <sup>b</sup>	15.0±1.1 <sup>b</sup>

\* Valores con diferente letra en la misma línea son significativamente diferentes (P< 0.05); (media ± sd); n=3.

Tabla 15. Ácidos grasos de LDL de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales durante 3 meses (g /100 a.g LDL)

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
14:0	3.9±1.1	1.8±0.4	1.8±0.6	1.9±0.5	1.8±0.1	1.7±0.2	1.6±0.3
16:0	26.0±4.1	26.7±5.8	20.5±5.4	13.5±2.7	23.5±1.2	25.7±2.1	21.5±3.3
16:1 n-7	4.4±0.1	2.2±0.0	3.9±0.1	3.0±0.2	2.5±0.2	1.6±0.2	1.9±0.1
18:0	8.9±1.0	9.9±0.7	8.3±0.6	9.5±1.0	9.7±0.7	13.0±2.2	10.5±1.2
18:1 n-9	14.9±0.9 <sup>a</sup>	15.0±2.6 <sup>a</sup>	26.0±0.9 <sup>b</sup>	20.5±1.5 <sup>ab</sup>	18.7±0.5 <sup>a</sup>	12.8±2.8 <sup>a</sup>	16.2±1.0 <sup>a</sup>
18:1 n-7	2.7±0.4	2.0±0.2	9.4±2.0	2.4±0.2	2.2±0.0	1.6±0.3	1.7±0.1
18:2 n-6	3.6±0.2 <sup>a</sup>	14.8±1.4 <sup>b</sup>	10.8±2.6 <sup>ab</sup>	9.2±1.3 <sup>ab</sup>	9.0±0.1 <sup>ab</sup>	16.9±4.5 <sup>b</sup>	10.7±2.1 <sup>ab</sup>
18:3 n-3	0.4±0.1 <sup>a</sup>	1.3±0.1 <sup>a</sup>	1.6±0.3 <sup>a</sup>	13.0±2.0 <sup>c</sup>	6.9±0.3 <sup>b</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	13.7±1.1 <sup>c</sup>
20:1 n-9	1.4±0.4	1.0±0.1	1.5±0.4	1.3±0.1	1.2±0.1	0.9±0.2	1.2±0.2
20:4 n-6	0.3±0.0 <sup>a</sup>	0.8±0.0 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	0.7±0.5 <sup>a</sup>
20:4 n-3	0.6±0.1	n.d.	n.d.	0.6±0.0	n.d.	0.3±0.1	0.6±0.1
20:5 n-3	10.1±1.9 <sup>a</sup>	5.6±1.0 <sup>b</sup>	5.6±0.6 <sup>b</sup>	6.6±0.4 <sup>ab</sup>	6.0±0.8 <sup>b</sup>	3.9±0.1 <sup>b</sup>	4.6±0.6 <sup>b</sup>
22:1 n-11	2.7±2.5	0.6±0.0	0.8±0.5	0.9±0.0	0.8±0.1	0.6±0.1	0.9±0.2
22:1 n-9	0.5±0.1	0.5±0.1	0.7±0.0	n.d.	0.6±0.0	0.4±0.1	0.5±0.0
22:4 n-6	n.d.	0.3±0.0	n.d.	0.6±0.1	0.9±0.0	0.5±0.1	0.3±0.2
22:5 n-3	3.7±0.3	2.5±0.4	1.9±0.0	3.1±0.2	3.0±0.1	1.8±0.3	2.0±0.1
22:6 n-3	14.5±1.8 <sup>a</sup>	13.3±3.0 <sup>a</sup>	12.3±3.0 <sup>a</sup>	13.7±2.3 <sup>a</sup>	13.6±0.2 <sup>a</sup>	12.4±0.1 <sup>a</sup>	14.5±1.6 <sup>a</sup>
Saturados	38.8±2.9 <sup>a</sup>	38.4±3.8 <sup>a</sup>	30.6±5.5 <sup>ab</sup>	24.9±3.1 <sup>b</sup>	35.0±1.9 <sup>a</sup>	38.6±4.1 <sup>a</sup>	33.6±4.7 <sup>ab</sup>
Monoenos	26.6±1.4 <sup>ab</sup>	21.3±3.2 <sup>a</sup>	37.2±6.3 <sup>b</sup>	28.1±1.7 <sup>ab</sup>	25.7±0.5 <sup>ab</sup>	17.9±3.6 <sup>a</sup>	22.3±1.2 <sup>a</sup>
n-3	29.3±4.8 <sup>ab</sup>	22.7±5.1 <sup>ab</sup>	21.4±3.4 <sup>ab</sup>	37.0±2.3 <sup>b</sup>	29.5±1.0 <sup>ab</sup>	19.6±0.5 <sup>a</sup>	35.4±4.6 <sup>b</sup>
n-6	3.9±1.2 <sup>a</sup>	15.9±2.2 <sup>b</sup>	10.8±2.6 <sup>ab</sup>	9.8±1.9 <sup>ab</sup>	10.9±1.4 <sup>ab</sup>	18.5±4.1 <sup>ab</sup>	11.7±2.6 <sup>b</sup>
n-3HUFA	28.5±4.5 <sup>a</sup>	21.4±4.2 <sup>a</sup>	19.8±3.6 <sup>a</sup>	24.0±2.2 <sup>a</sup>	22.6±0.7 <sup>a</sup>	18.4±0.1 <sup>a</sup>	21.7±2.5 <sup>a</sup>

\* Valores con diferente letra en la misma línea son significativamente diferentes (P < 0.05); (media ± sd); n=3.

*Lipoproteínas plasmáticas*

Tabla 16. Ácidos grasos de HDL de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales durante 3 meses (g/100 a. g. HDL)

	DIETA						
	100P	60S	60C	60L	60Mix	80S	80L
14:0	1.7±0.2	1.1±0.2	1.1±0.1	1.1±0.1	1.1±0.0	0.9±0.1	0.9±0.1
16:0	26.1±2.6	23.6±3.6	18.6±1.0	22.1±1.7	21.7±1.9	22.4±2.1	20.0±3.1
16:1 n-7	2.8±0.2	2.0±0.3	1.5±0.8	1.9±0.1	1.9±0.1	1.5±0.1	1.5±0.1
18:0	8.3±0.7	8.4±1.4	6.3±0.3	8.5±0.4	8.3±0.8	8.9±0.8	9.0±2.1
18:1 n-9	12.2±0.9 <sup>a</sup>	15.1±1.6 <sup>b</sup>	21.8±0.7 <sup>c</sup>	14.9±0.7 <sup>b</sup>	17.1±0.3 <sup>b</sup>	14.6±0.5 <sup>ab</sup>	14.9±0.8 <sup>b</sup>
18:1 n-7	2.4±0.1	2.3±0.3	1.8±1.5	2.0±0.1	2.3±0.1	1.9±0.1	1.7±0.0
18:2 n-6	3.0±0.4 <sup>a</sup>	15.0±0.9 <sup>b</sup>	8.5±0.9 <sup>cd</sup>	6.8±0.2 <sup>c</sup>	8.3±0.4 <sup>cd</sup>	20.5±1.2 <sup>e</sup>	9.1±0.8 <sup>d</sup>
18:3 n-3	0.2±0.0 <sup>a</sup>	0.9±0.2 <sup>b</sup>	1.3±0.2 <sup>b</sup>	7.2±1.5 <sup>cd</sup>	5.0±0.5 <sup>c</sup>	1.2±0.1 <sup>b</sup>	10.8±2.1 <sup>d</sup>
20:1 n-9	0.77±0.1	0.8±0.0	1.3±0.1	0.8±0.1	1.0±0.2	0.8±0.1	0.8±0.1
20:2 n-6	0.2±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1	0.2±0.2	0.4±	1.0±0.1	0.4±0.0
20:4 n-6	1.7±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.4 <sup>bc</sup>	1.5±0.2 <sup>ab</sup>	1.3±0.0 <sup>b</sup>	1.4±0.1 <sup>b</sup>	0.8±0.4 <sup>bc</sup>	1.2±0.1 <sup>bc</sup>
20:4 n-3	0.8±0.3	0.5±0.1	0.9±0.4	0.8±0.1	0.7±0.1	0.4±0.0	0.8±0.1
20:5 n-3	13.1±1.2 <sup>a</sup>	8.0±2.0 <sup>bc</sup>	9.7±0.7 <sup>b</sup>	9.2±0.6 <sup>b</sup>	8.7±0.4 <sup>bc</sup>	6.1±0.7 <sup>bc</sup>	7.0±1.0 <sup>c</sup>
22:1 n-11	0.4±0.0	0.6±0.3	0.7±0.3	0.5±0.0	0.5±0.2	0.4±0.0	0.5±0.1
22:1 n-9	0.3±0.0	0.3±0.0	0.5±0.3	0.2±0.0	0.3±	0.3±	0.3±
22:4 n-6	1.3±0.9	0.9±0.0	0.6±0.5	0.9±0.4	0.9±0.5	0.9±0.0	0.9±0.4
22:5 n-3	3.6±0.4	2.7±0.7	3.3±0.6	2.7±0.3	2.7±0.3	2.1±0.4	2.0±0.1
22:6 n-3	21.4±1.8 <sup>a</sup>	17.3±4.0 <sup>a</sup>	20.0±1.2 <sup>a</sup>	19.0±0.8 <sup>a</sup>	18.2±1.8 <sup>a</sup>	16.1±2.4 <sup>a</sup>	18.3±2.2 <sup>a</sup>
Saturados	36.1±3.4 <sup>a</sup>	33.1±5.1 <sup>ab</sup>	26.0±1.3 <sup>b</sup>	31.7±2.0 <sup>ab</sup>	31.1±2.7 <sup>ab</sup>	32.1±2.8 <sup>ab</sup>	29.8±5.1 <sup>ab</sup>
Monoenos	18.9±1.2 <sup>a</sup>	20.4±2.2 <sup>a</sup>	27.5±2.4 <sup>b</sup>	20.3±1.0 <sup>a</sup>	22.9±0.4 <sup>a</sup>	19.4±0.8 <sup>a</sup>	19.0±1.4 <sup>a</sup>
n-3	39.0±3.7 <sup>a</sup>	29.2±6.7 <sup>ab</sup>	35.3±2.5 <sup>ab</sup>	38.8±2.8 <sup>a</sup>	35.3±2.9 <sup>ab</sup>	25.8±3.2 <sup>b</sup>	39.0±5.3 <sup>a</sup>
n-6	6.1±1.3 <sup>a</sup>	17.2±0.8 <sup>b</sup>	11.2±1.1 <sup>c</sup>	9.2±0.5 <sup>c</sup>	10.8±0.2 <sup>c</sup>	22.8±1.3 <sup>d</sup>	10.8±1.3 <sup>c</sup>
n-3HUFA	38.8±3.6 <sup>a</sup>	28.3±6.5 <sup>b</sup>	33.9±2.5 <sup>ab</sup>	31.6±1.4 <sup>ab</sup>	30.3±2.4 <sup>ab</sup>	24.6±3.1 <sup>b</sup>	28.1±3.2 <sup>b</sup>

\* Valores con diferente letra en la misma línea son significativamente diferentes (P < 0.05); (media ± sd); n=3.

#### 4.4 DISCUSIÓN

La principal lipoproteína encontrada en el suero de dorada fue la fracción HDL. Concentraciones elevadas de esta fracción han sido descritas en varias especies de peces, tales como trucha (CHAPMAN *et al.*, 1978,1980; BABIN y VERNIER, 1989), salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*) (NELSON y SHORE, 1974), carpa (IIJIMA *et al.*, 1990b), salmón atlántico (LIE *et al.*, 1993) ó lubina (SANTULLI *et al.*, 1989), sugiriendo que la HDL juega un importante papel en el transporte de lípidos en los peces. Algunos autores han apuntado que esta alta concentración de HDL sea consecuencia de varios hechos: una baja degradación de esta fracción, una rápida degradación de VLDL por la lipoproteína lipasa ó una síntesis alta tanto en el hígado como en el intestino (LÉGER, 1988; IIJIMA *et al.*, 1990a).

HDL y LDL son las dos principales lipoproteínas implicadas en el transporte y metabolismo del colesterol. HDL transporta el colesterol de los tejidos al hígado, para su posterior degradación y reutilización, por ejemplo, para la síntesis biliar, mientras que LDL es la encargada de suministrar el colesterol a los tejidos donde éste puede ser necesitado para formar las membranas celulares ó convertirse en otros metabolitos, como son las hormonas esteroideas (GURR y HARWOOD, 1991). En el presente experimento, la fracción LDL mostró mayores niveles de colesterol que HDL. No obstante, y en concordancia con estudios en otras especies de peces, (FARRELL y MUNT, 1983; FARRELL *et al.*, 1986; LEGER, 1988; LIE *et al.*, 1993) se confirma que la mayoría del colesterol es transportado por HDL en dorada, debido a la abundancia de esta lipoproteína en el suero.

VLDL es la lipoproteína encargada del transporte de triglicéridos a los tejidos (GURR y HARWOOD, 1991). Esta función está claramente reflejada por la alta cantidad de triglicéridos encontrados en esta lipoproteína, mientras que las fracciones LDL y HDL mostraron menores niveles en TAG. Un patrón similar ha sido descrito en otras especies, como carpa (FAINARU *et al.*, 1988), pez gato (*Ictalurus punctatus*) (McKAY *et al.*, 1985), ó trucha (BABIN y VERNIER, 1989). Por otra

---

parte, en el presente estudio una alta cantidad de VLDL se encontró en el suero de dorada, superior a los valores encontrados por LDL. Generalmente, los autores han descrito que la VLDL es la fracción que se encuentra en menor proporción en el suero, aunque su concentración esta íntimamente influenciada por factores como la maduración sexual (FREMONT *et al.*, 1984). Obviando este parámetro pues los peces experimentales se encontraban fuera de su época de maduración sexual, esta diferencia puede ser reflejo de la contribución del intestino en la síntesis de VLDL. En este experimento la extracción de sangre se realizó 24h después de la última toma de alimento, éste pudo ser un tiempo corto de evacuación de lípidos desde el epitelio intestinal hasta los órganos y tejidos periféricos, lo que podría implicar un aporte adicional de VLDL por el intestino. En este sentido, hay que señalar que estudios histológicos llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado que el material de naturaleza lipídica localizado entre los espacios intercelulares de las células intestinales e identificado como lipoproteínas no desaparecía hasta pasadas las 24h post-alimentación, sugiriendo una larga fase de absorción lipídica.

La proporción y composición de lípidos de las diferentes lipoproteínas se vieron afectadas directamente por la composición de la dieta. Así se encontraron niveles altos de colesterol en la fracción HDL y LDL de los peces alimentados con las dietas conteniendo 80% de aceites vegetales, y principalmente para el grupo 80S. Mientras que, los niveles más bajos se obtuvieron en los peces alimentados con la dieta 100P, sin diferencia con los de los peces alimentados con las dietas 60S, 60C y 60L en la fracción HDL. Contenidos altos de ácidos grasos saturados en las dietas han sido descritos como causantes de niveles crecientes de colesterol en plasma (GRUNDY y DENKE, 1990; HAYES *et al.*, 1997). No obstante, TORSTENSEN *et al.*, (2000) sugieren que, en peces, la baja digestibilidad de los distintos ácidos grasos saturados aminora el efecto hipercolesterolémico de estos ácidos grasos. Así, estos autores encontraron que salmones del Atlántico alimentados con 12.5% de saturados en dietas con aceite de girasol y 45.3% de saturados en dietas con aceite de palma, mostraron semejantes niveles de colesterol en las lipoproteínas, debido a la baja digestibilidad del 16:0 (principal ácido graso saturado en estas dietas) en ambos

grupos. En el presente estudio, la cantidad de ácidos grasos saturados en la dieta control fue relativamente superior a las dietas 80S y 80L (27.9% de saturados frente a 18.64 y 16.28%, respectivamente) (Tabla 13). Sin embargo, la diferencia más significativa entre dichas dietas fue el contenido en n-3 HUFAs, un 17.96% para la dieta 100P frente a un 6.91 y 7.43% para las dietas 80S y 80L, respectivamente (Tabla 13). Estos datos sugieren que los niveles de colesterol encontrados en las fracciones HDL y LDL están relacionados con los niveles dietéticos en n-3 HUFAs. Así, se estableció una correlación negativa ( $r(\text{HDL}) = -0.826$ ,  $r(\text{LDL}) = -0.874$ ) y significativa ( $P < 0.05$ ) entre el nivel de n-3 HUFAs de las dietas y el contenido de colesterol para ambas fracciones (Fig. 37). Cabe resaltar también que los niveles dietéticos de n-6 HUFA (Tabla 13) mantienen una relación directa con los niveles de colesterol en las lipoproteínas, inversa a la observada para los n-3 HUFA.

En peces existen escasos trabajos que aborden la relación entre la cantidad de n-3 ó n-6 HUFA en dieta y niveles de colesterol en plasma. LEMAIRE *et al.*, (1991) en lubina encontraron niveles plasmáticos bajos de TAG y colesterol, cercanos a valores fisiológicos de lubinas salvajes, cuando se alimentaron con una dieta rica en poliinsaturados. Sin embargo, esta relación ha sido ampliamente estudiada en humanos, demostrándose que los niveles de colesterol plasmáticos responden al siguiente orden dietético n-3 PUFA < n-6 PUFA < SFA (WILLIAMS, 1998). Los mecanismos implicados en estos efectos apuntan a dos puntos esenciales de la degradación y metabolismo de las lipoproteínas. La enzima *lecitina:colesterol aciltransferasa* (LCAT) localizada en la superficie de HDL y los receptores de membrana que reconocen especialmente a la fracción LDL.

La función de la enzima LCAT es la de transferir un ácido graso desde la fosfatidilcolina presente en la partícula de HDL a una molécula de colesterol procedente de los tejidos, para su transformación en ésteres de colesterol, los cuales son integrados en el interior de la partícula (GURR y HARWOOD, 1991). En el presente estudio, los peces alimentados con la dieta 100P tuvieron una relación de CHO / CE en la fracción HDL de 0.14, mientras que los peces alimentados con las

---

dietas 80S y 80L tuvieron una relación CHO / CE de 0.32 y 0.27, respectivamente. Además, aunque no hubo diferencias estadísticas en el contenido de PC, los peces de la dieta 100P tendieron a tener menos PC que los peces de las dietas 80S y 80L. Estos resultados reflejan modificaciones en la actividad de la enzima LCAT entre los distintos grupos experimentales, ya que colesterol, fosfatidilcolina y ésteres de colesterol son sustratos y producto respectivamente de la acción de esta enzima. La proporción de n-3 HUFAs en las dieta podría estar determinando la actividad enzimática de la LCAT. Varios trabajos en humanos han mostrado que dietas ricas en n-3 poliinsaturados afectan a la concentración de colesterol plasmático debido principalmente a cambios en la composición de los sustratos de la LCAT. Así, THORNBURG *et al.*, (1995) mostraron que dietas ricas en n-3PUFAs disminuyen la concentración de HDL-colesterol por una reacción baja de la PC con la enzima LCAT. PARKS *et al.*, (2000) confirmaron que las variaciones de ácidos grasos poliinsaturados en la posición sn-2 de la PC son responsables de la disminución de la reactividad de la enzima LCAT con la partícula de HDL.

En cuanto a la fracción LDL, la reducción de los niveles de CHO en los peces alimentados con la dieta 100P podría estar relacionado con un aumento en la degradación de la LDL, como resultado de un incremento en la actividad de los receptores de LDL en los tejidos. En este sentido, TRIPODI *et al.*, (1991) demostraron que la alta afinidad de LDL a sus receptores hepáticos es la responsable de la hipocolesterolemía encontrada en ratas alimentadas con aceite de pescado. Los receptores son proteínas incrustadas en las membranas celulares, diseñadas para el reconocimiento de moléculas específicas. Las propiedades funcionales de estos receptores están íntimamente relacionadas con el microambiente proporcionado por los lípidos de membrana (GURR y HARWOOD, 1991). Así, cambios estructurales y de composición en los lípidos de la membrana pueden inducir alteraciones funcionales en las proteínas de membrana. Además, es conocido que las propiedades físicas de las membranas celulares depende en gran medida de su contenido en ácidos grasos y especialmente del grado de insaturación de éstos, de forma que un aumento en la insaturación implica un aumento en la fluidez de la membrana celular

(BELL *et al.*, 1986). De este modo, los contenidos diferenciales en n-3 HUFA de las dietas (principalmente EPA y DHA) pueden ser los desencadenantes de las variaciones en el contenido de colesterol en la fracción LDL entre los distintos grupos experimentales. Así, estudios *in vitro* (ver revisión HUANG *et al.*, 1993) con células humanas (fibroblastos, mononucleares) expuestas a contenidos altos en PUFA han aumentado la actividad de sus receptores de LDL por un incremento en la insaturación de los fosfolípidos de la membrana. Además, SPADY, (1993) describe que niveles dietéticos altos de EPA y DHA reducen la concentración de LDL-colesterol debido a que ambos ácidos grasos estimulan la actividad de los receptores-LDL en el hígado.

Por otro lado, cabría destacar que el tipo de ácido graso parece afectar a la concentración de CHO y TAG. Así por ejemplo, el grupo 80S tendió a mostrar las concentraciones más altas en HDL- y LDL-colesterol, lo que parece denotar que el ácido graso linoleico tiene un efecto hipercolesterolémico más marcado que otros ácidos de 18C (ej. 18:2n-6 >18:3n-3), cuando su nivel dietético es elevado. En este punto, hay que hacer mención que según algunos autores al ácido linoleico, procedente de fuentes protéicas vegetales, se le atribuye un efecto hipocolesterolémico, sin embargo este efecto parece estar íntimamente asociado al mecanismo que ejercen los PUFA sobre el metabolismo del colesterol (HUANG *et al.*, 1993). En el presente estudio se estableció una correlación negativa ( $r(\text{HDL}) = -0.821$ ,  $r(\text{LDL}) = -0.852$ ) y significativa ( $P < 0.05$ ) entre el contenido de EPA de HDL y LDL con el contenido de CHO en dichas fracciones (Fig. 38), encontrando que las dietas 80S y 80L con un menor contenido de EPA en HDL y LDL mostraron un mayor contenido de CHO en dichas fracciones. De modo que la naturaleza del ácido graso puede ejercer una regulación sobre la concentración plasmática de CHO e incluso de TAGs.

En cuanto a los niveles de triglicéridos, la tendencia general observada en las tres fracciones lipoprotéicas fue la disminución de los valores de TAGs en aquellos peces alimentados con la dieta 100P, y el mayor contenido de TAGs en los peces de

---

las dietas 60Mix, 80S y 80L. En humanos, el nivel dietético de n-3 poliinsaturados (particularmente EPA y DHA) reduce los niveles de triglicéridos por una inhibición de la secreción de VLDL-triglicéridos, al interferir en la síntesis de triglicéridos principalmente en el hígado (HARRIS *et al.*, 1983). Además, el hecho que los TAG incrementen en aquellos peces de la dieta 80S, principalmente en la fracción HDL, podría estar en concordancia con los resultados de IKEDA *et al.*, (1998) quienes muestran que ratas alimentadas con dietas ricas en 18:2n-6 no tienen efecto hipotriglicéridémico en sangre, comparado con dietas ricas en n-3 HUFA.

Por otro lado, el proceso de lipólisis también podría verse afectado por los niveles de poliinsaturados en la dieta. En este proceso interviene la enzima *lipoproteína lipasa* (LPL) presente en el endotelio capilar de numerosos tejidos. La deficiencia en esta enzima, alteraciones en la apoproteína C2 (activadora de la lipoproteína lipasa) ó la baja reactividad de triglicéridos con las enzimas lipolíticas pueden ser las causas que afecten a la concentración de triglicéridos. Así, altos niveles de LPL se encontraron en ratas alimentadas con n-3 PUFAs, sugiriendo que la disminución de TAG plasmáticos fue debida a la alta actividad de esta enzima (GROOT *et al.*, 1988; LAI y NEY., 1995). Además, triglicéridos formados con un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados parecen ser mejores sustratos para la *lipoproteína lipasa* que aquellos triglicéridos constituidos por ácidos grasos saturados, provocando una disminución de los triglicéridos (GRUNDY y DENKE, 1990). Por todo esto, los niveles de TAG encontrados en las distintas fracciones lipoprotéicas podría ser también debidos a cambios en la actividad de la enzima lipoproteína lipasa como consecuencia de los niveles dietéticos de n-3HUFAs. Aunque recientemente en truchas alimentadas con dietas conteniendo aceites vegetales no se encontraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima al comparar con dietas con aceite de pescado (CORRAZE *et al.*, 2002).

La composición de ácidos grasos de las distintas lipoproteínas se vio claramente influenciada por la dieta. Coincidiendo con McKAY *et al.*, (1985) las distintas lipoproteínas plasmáticas responden rápidamente a la composición de

---

ácidos grasos de la dieta. En el presente estudio, las VLDL tuvieron una composición de ácidos grasos más parecida a la dieta que cualquiera de las otras dos fracciones, principalmente en cuanto a los ácidos grasos saturados y de 18C. De estos últimos, el 18:1n-9 estaba mayoritariamente integrado en la VLDL en comparación con los ácidos grasos 18:2n-6 ó 18:3n-3.

La LDL, como producto de la VLDL, se caracterizó por retener el ácido palmítico y aumentar el contenido de n-3 HUFAs. Sin embargo, en esta fracción el porcentaje de ácidos grasos de 18 carbonos, procedente principalmente de los aceites vegetales usados, fue menor que en la fracción VLDL, aunque de nuevo el ácido oleico fue encontrado en mayor porcentaje comparativamente con otros ácidos grasos de 18 carbonos. Este último resultado está en concordancia con el hecho de que el ácido oleico sea el sustrato preferente de la enzima *acil-CoA:colesterol aciltransferasa* (ACAT), siendo de esta manera altamente incorporado en los CE.

Estas diferencias en la composición de ácidos grasos parecen estar ligadas a las diferencias funcionales o metabólicas de cada lipoproteína. Así, VLDL es sintetizada tanto en el intestino como en el hígado, y cuando su núcleo de TAGs es hidrolizado por la lipoproteína lipasa se transforma en una partícula más pequeña del tipo LDL. La HDL puede ser sintetizada en varios lugares, intestino e hígado, ó proceder de la lipólisis de los quilomicrones. Hay que resaltar que esta lipoproteína se caracterizó principalmente por un alto nivel de 22:6n-3 independientemente de la composición de la dieta. Este resultado esta en concordancia con otros estudios (LIE *et al.*, 1993; TORSTENSE *et al.*, 2000), lo que parece indicar que la HDL es la lipoproteína encargada de transportar principalmente el DHA hacia los tejidos. Además, este transporte está favorecido por ser HDL la lipoproteína predominante en el plasma de los peces. MARTIN *et al.*, (1994) sugieren que los CE de la fracción HDL incorporan cantidades altas de DHA para su transporte a la retina o cerebro, tejidos ricos en este ácido graso. Asimismo, TORSTENSE, (2000) muestra que la composición de ácidos grasos de la HDL es muy parecida a la de la retina en salmón

atlántico, sugiriendo que esta fracción tiene un importante papel en el transporte de ácidos grasos hacia este tejido.

Por otro lado, en la fracción HDL, el contenido de ácido palmítico fue tan elevado como en la fracción LDL. LIE *et al.*, (1993) describieron que la composición de ácidos grasos de la PC en las fracciones VLDL, LDL y HDL se caracteriza por un contenido alto en 16:0. Esto hecho parece confirmar que este ácido graso tiene un importante papel principalmente en el mantenimiento de las membranas por su alta integración en los lípidos polares.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el nivel de n-3 HUFA y en menor medida el nivel de n-6 HUFA en la dieta parecen ser los factores directamente implicados en los niveles de colesterol y triglicéridos en las lipoproteínas, por afectar a los mecanismos involucrados en el metabolismo de éstas. De tal manera que, el nivel dietético de n-3 HUFA podría ser desencadenante de: 1) cambios en la composición de los sustratos disponibles para la LCAT que afecten a su actividad, 2) una alteración en la actividad de los receptores de LDL ó 3) una modificación en la actividad de la LPL. Estudios específicos deben ser llevados a cabo para clarificar estos mecanismos. Además, se ha mostrado que la composición de ácidos grasos de la dieta modifica el perfil de ácidos grasos de las lipoproteínas de dorada en el siguiente orden: VLDL > LDL > HDL, e influye también en la cantidad de CHO y TAG de dichas fracciones.

Asimismo, los resultados de este capítulo estarían concordancia con imágenes histológicas observadas en los hígados, y mostradas en los capítulos precedentes. Así, el alto porcentaje de TAG en la fracción HDL, sintetizada principalmente en el hígado, en doradas alimentadas con aceite de soja podría ser reflejo de la marcada esteatosis observada en los hígados de estos peces. Y de una manera similar, los niveles altos de TAG en las fracciones lipoprotéicas en aquellos peces alimentados con el 80% de soja y lino podrían reflejar la intensa acumulación de grasa observada en los hígados de estos peces. Pero además, el hecho concreto que estas dietas con un

80% de aceites vegetales tengan un nivel dietético más bajo en EPA y DHA, lo que podría estar interfiriendo la síntesis de lipoproteínas ya que como ha sido mostrado en esta capítulo las lipoproteínas requieren de una gran cantidad de estos ácidos grasos para su formación. Este hecho podría también explicar la acumulación creciente de grasa en los hígados de estos peces.

***EFFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA  
EN LA HISTOLOGÍA DEL INTESTINO***

## **5. EFECTO DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA EN LA HISTOLOGÍA DEL INTESTINO**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

El intestino es un órgano encargado de importantes funciones implicadas principalmente en la asimilación de los nutrientes. Cambios en la composición de la dieta pueden afectar a estas funciones. La acumulación de vacuolas lipídicas en las células intestinales es una de las principales alteraciones observadas recientemente en especies destinadas a cultivo intensivo. Así, daños en el epitelio intestinal como consecuencia de la excesiva acumulación de lípidos han sido descritos por varios autores para diferentes especies (DEPLANO *et al.*, 1989; OLSEN *et al.*, 2000). Estas alteraciones morfológicas parecen estar relacionadas con el alto porcentaje de lípidos en las dietas ó bien con la relación de los niveles dietéticos de los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 (OLSEN *et al.*, 1999).

Este capítulo tiene la finalidad de estudiar los cambios estructurales que se producen en el epitelio intestinal y sus repercusiones en el proceso de absorción cuando doradas y lubinas son alimentadas con dietas de diferente composición. Por esto, el primer objetivo fue evaluar los cambios histológicos que se producen en el intestino de doradas alimentadas con dietas conteniendo diferentes porcentajes de lípidos (apartado 5.2). Por otro lado, debido fundamentalmente a la creciente utilización de aceites vegetales como sustitutos del aceite de pescado en las dietas para peces, un segundo objetivo fue evaluar sí la inclusión de estos aceites vegetales inducen cambios en la morfología del intestino de doradas y lubinas (apartado 5.3). Por último, con la finalidad de completar la información sobre los efectos de los aceites vegetales se evaluó la relación entre los cambios morfológicos del intestino y su composición bioquímica en doradas alimentadas con dietas conteniendo diferentes porcentajes de aceites vegetales (apartado 5.4).

## **5.2 EFECTOS DEL PORCENTAJE DE LÍPIDOS Y LA CALIDAD DE HARINA DE PESCADO EN DIETAS DE ENGORDE PARA DORADA\***

### **5.2.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Mil ciento cuarenta doradas de aproximadamente 70g de peso medio inicial procedentes de la granja comercial ADSA se aclimataron en tanques de 2 m<sup>3</sup> durante 3 semanas, siendo alimentadas con una dieta comercial (Mistral 3mm, Proaqua S.A., Palencia, España). Después del periodo de aclimatación, los peces se anestesiaron con clorobutanol (200mg/l agua), se pesaron y distribuyeron al azar en 12 tanques cilindrocónicos de 400 l en grupos de 60 peces por tanque. Cuando el peso de los peces se aproximó a los 150g se transfirieron a tanques de 1 m<sup>3</sup>. Estos tanques estaban provistos de aireación, ciclo natural de luz natural y de un flujo continuo de agua de mar que se incrementó de 4 a 10 l/min en el transcurso del experimento. El rango de temperatura a lo largo del experimento osciló entre 20.8 y 24.4 °C. Los peces se alimentaron hasta saciedad aparente con las distintas dietas experimentales dos veces al día, 6 días a la semana durante los 6 meses de duración del experimento hasta que los peces alcanzaron un peso final aproximado de 400- 450g (peso comercial en el mercado Mediterráneo). Los tratamientos se ensayaron por duplicado.

Las dietas experimentales se diseñaron y elaboraron en colaboración con la empresa noruega *Norwegian Herring Oil and Meal Industry Research Institute* (SSF). Esta empresa realizó los análisis de calidad de las harinas y la elaboración de las dietas. Como principal fuente proteica se utilizó harina de pescado de dos diferentes calidades, una harina de pescado de calidad “estándar” (denominada en este estudio como BC:baja calidad) y otra harina obtenida a baja temperatura (Norse-LT 94®) (denominada en este estudio AC: alta calidad).

\* Comunicación personal: Caballero, M.J., López-calero, G., Socorro, J., Izquierdo, M.S. y Fernández, A.J., 1999. Efecto combinado del nivel de lípidos y la calidad de la harina de pescado en la absorción lipídica en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*). VII Congreso Nacional de Acuicultura. Las Palmas de Gran Canaria. Mayo 1999

Ambas harinas fueron suministradas por Norsildmel (Noruega). La calidad se evaluó dependiendo de su contenido en aminos biogénicos (especialmente cadaverina) y su digestibilidad proteica medida mediante visón (SKEDE, 1979). Para completar el nivel proteico de las dietas se utilizó harina de soja, pan rallado y harina de trigo. La composición bioquímica de las harinas se muestra en la Tabla 17.

La fuente lipídica utilizada en todas las dietas fue aceite de pescado (NorSea Oil®). Las mezclas de vitaminas y minerales usadas en la elaboración de las dietas se obtuvieron de Hoffman La Roche, Suiza.

Con estos ingredientes se formularon seis dietas experimentales con tres niveles de lípidos (15, 22 y 27 %) y cada nivel de lípidos se combinó con cada una de las calidades de harina ensayadas en este experimento. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 18. Las dietas se procesaron por extrusión y se formularon para ser aproximadamente isocalóricas en energía bruta y similares en el contenido proteico (Tabla 18). Las dietas experimentales tuvieron una composición similar en ácidos grasos. Las principales familias de ácidos grasos de las distintas dietas experimentales se muestran en la Tabla 19.

Tabla 17. Composición bioquímica de las harinas utilizadas para la elaboración de las dietas experimentales

	Harina de pescado alta calidad (AC)	Harina de pescado baja calidad (BC)	Harina de soja	Pan rallado	Harina de trigo
<i>(g/100g peso seco)</i>					
Proteínas (N x 6.25)	71.6	71.9	46.3	14.2	13
Lípidos	8.0	10.0	1.0	3.6	1.5
Cenizas	13.6	11.1	5.7	1.2	4.5
Humedad	8.3	7.2	11.6	5.2	12.9
Cadaverina	0.50	1.50	-	-	-
Histamina	0.20	0.24	-	-	-
Digestibilidad proteica <sup>a</sup>	91.6 ± 0.5	85.0 ± 1.2	-	-	-

<sup>a</sup> Digestibilidad para el visón (4 animales por muestra).

*Efectos del Porcentaje de Lípidos – Intestino*

Tabla 18. Ingredientes y análisis proximal de las dietas ensayadas en el experimento.

	DIETA					
	AC 15	BC 15	AC 22	BC 22	AC 27	BC 27
<i>Ingredientes (g/ 100g)</i>						
Harina de pescado alta calidad (AC)	44.6	0	48.6	0	52.6	0
Harina de pescado baja calidad (BC)	0	45.6	0	49.7	0	53.7
Aceite de pescado	7.4	6.4	13.4	12.3	19.4	18.3
Harina de soja	22	22	17	17	12	12
Pan rallado	22	22	17	17	12	12
Harina de trigo	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Lecitina de soja <sup>a</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitaminas <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Minerales <sup>c</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Análisis Proximal (g/ 100g peso seco)</i>						
Proteínas (N x 6.25)	47.7	51.7	47.5	49.8	48.3	49.7
Lípidos	15.1	16.0	22.8	24.1	27.0	29.2
Cenizas	9	7.4	8.5	11.3	9.2	7.7
Carbohidratos <sup>d</sup>	28.2	24.9	21.2	14.8	12.1	13.4
Energía bruta(MJ/ kg)	22	22	24	24	25	25

<sup>a</sup> Lecitina de soja obtenida de Denofa (Fredikstad, Norway).

<sup>b</sup> Por Kg de pienso: Vitamina A 3000 IU (Rovimix A 500P); vitamina D<sub>3</sub> 1600 IU (Rovimix D<sub>3</sub> 500); vitamina E 160mg (Rovimix E50SD); tiamina 12mg (thiamin mononitrate); riboflavina 24mg (Rovimix B280SD); piridoxina 12mg (pyrodoxin HCl); vitamina C 60mg (Rovimix Stay-C25); ácido pantoténico 48mg (Rovimix Calpan); biotina 0.6mg (Rovimix H2); ácido fólico 6.0mg (Rovimix Folic 80SD); niacina 120mg (Rovimix Niacin); vitamina B<sub>12</sub> 0.024mg (B12 1% FG); menadiona Na-bisulfito 12mg.

<sup>c</sup> Por Kg de pienso: MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 10mg; MgHPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 500mg; FeSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 50mg; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 80mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 5mg; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 400mg; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400mg; K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 400mg; CaCO<sub>3</sub>, 18.89 mg.

<sup>d</sup> Carbohidratos = NFE + fibra = 1000-proteína-lípidos-cenizas.

Tabla 19. Principales ácidos grasos de los lípidos totales de las distintas dietas experimentales (n=3)

	DIETA					
	AC 15	BC 15	AC 22	BC 22	AC 27	BC 27
Σ Saturados	24,40	26,41	25,46	25,60	25,07	24,17
Σ n-3	20,20	19,81	18,44	19,57	18,13	17,61
Σ n-6	5,63	7,78	5,40	5,57	3,81	3,52
Σ n-9	12,94	13,14	14,48	13,10	14,36	11,84
Σ n-3 HUFA	15,48	14,99	14,52	14,94	14,17	15,53

Al final del experimento, se tomaron 4 muestras de intestino anterior por tanque y un total de 12 muestras por cada dieta experimental para el estudio histológico. El tramo de intestino anterior se seleccionó para el estudio histológico, considerando que en experiencias previas sobre enzimas lipolíticas, esta porción presentó una alta actividad lipásica y fosfolipásica, lo que sugiere la importancia de este segmento para la digestión y absorción de lípidos dietéticos (IZQUIERDO *et al.*, 1997). Además, en el presente estudio las muestras se recogieron 4 horas tras la alimentación, periodo de tiempo determinado por la presencia de la digesta en el tracto digestivo desde el estómago hasta el recto en cada uno de los peces.

La totalidad de la mucosa intestinal del intestino anterior se examinó al microscopio óptico, siguiendo un orden en la visualización de los campos al microscopio. Para el estudio ultraestructural, cada muestra de intestino anterior se troceó en pequeñas piezas y se embebió en los correspondientes bloques en resina. Se tomaron al azar dos bloques por cada muestra. De cada uno de estos bloques se realizaron al azar un corte de la mucosa intestinal, que se colocó sobre una rejilla de cobre para su estudio con el microscopio electrónico. Aproximadamente de cada rejilla se examinaron 10 campos por sección (240 campos por dieta), usando los bordes de la rejilla de cobre como guías.

## **5.2.2 RESULTADOS**

### *Histología del intestino anterior*

En general, la mucosa intestinal observada al microscopio óptico estaba compuesta por un epitelio columnar simple. La superficie apical del epitelio estaba cubierta por un borde de microvillosidades y la superficie basal estaba separada de la lámina propia por una delgada membrana electrodensa (membrana basal). Se encontraron algunos linfocitos intraepiteliales en la mucosa intestinal. Ultraestructuralmente, la morfología del enterocito del intestino anterior de dorada fue similar a la descrita en otras especies de peces. Así, el citoplasma de los enterocitos estaba ocupado por cisternas del retículo endoplásmico rugoso y cisternas del Complejo de Golgi y en su parte basal por mitocondrias alrededor del núcleo celular. Los enterocitos adyacentes estaban separados por espacios intercelulares. La lámina propia estaba constituida por material lipídico y algunas células tales como fibroblastos, glóbulos rojos, linfocitos y células musculares lisas y fibras de colágeno.

La presentación de los resultados histológicos del presente apartado se realizará describiendo las imágenes de microscopía óptica y electrónica del intestino anterior para cada nivel de lípidos (15, 22 y 27%) y comparando calidades de harina de pescado para cada uno de ellos.

#### *15% de lípidos*

El intestino anterior de peces alimentados con dietas conteniendo 15% de lípidos presentaron similares características histológicas para ambas calidades de harina.

Al microscopio óptico se observó vacuolización supranuclear en el epitelio intestinal. El núcleo celular grande y esférico se encontraba en posición central en el

enterocito. Se observaron escasos lípidos entre los espacios intercelulares y lámina propia. (Fig. 39a). El estudio ultraestructural confirmó la presencia de grandes vacuolas lipídicas supranucleares que ocupaban gran parte del enterocito. Pequeñas partículas lipídicas se observaron en el interior del retículo endoplásmico situado en la parte apical del enterocito y en las cisternas del complejo de Golgi cercanas a la membrana lateral intercelular. Asimismo, este tipo de partículas de pequeño tamaño también se observaron tanto en los espacios intercelulares como en la lámina propia (Figs. 39b y 30c). Las partículas de un tamaño inferior a 100nm se identificaron como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Esta identificación se realizó comparando tamaño de partículas con aquellos obtenidos por otros autores en diversas especies de peces (CHAPMAN *et al.*, 1978; SIRE *et al.*, 1981; EZEASOR y STOKOE, 1981).

#### *22% de lípidos*

Tampoco fue evidente el efecto de la calidad de la harina en el intestino anterior de los peces alimentados con dietas conteniendo 22% de lípidos.

Al microscopio óptico, el intestino anterior mostró grandes espacios intercelulares donde se observaron algunos linfocitos. Los núcleos celulares eran alargados y estrechos. El citoplasma de la zona apical del enterocito era moderadamente eosinofílico. En la lámina propia y en los vasos quilíferos se detectó la presencia de material presumiblemente de naturaleza lipídica (Fig. 40a).

Ultraestructuralmente, lo más relevante en el intestino anterior fue la intensa acumulación de partículas lipídicas de gran tamaño en los espacios intercelulares que causaban el estrechamiento de los enterocitos (Fig. 40b). La mayoría de las partículas tenían un tamaño superior a 100nm y se identificaron como quilomicrones (QM), según los trabajos de CHAPMAN *et al.*, (1978); SIRE *et al.*, (1981) y EZEASOR y STOKOE, (1981).

*27% de lípidos*

En los peces alimentados con las dietas conteniendo el mayor nivel de lípidos sí se encontraron diferencias relevantes en la histología del intestino anterior dependiendo de la calidad de harina utilizada.

En el intestino de los peces alimentados con un *27% de lípidos y harina de BC* se observaron al microscopio óptico células intestinales estrechas y alargadas debido a la gran acumulación de material lipídico en los espacios intercelulares. Este material también estaba presente en la lámina propia y en los vasos quilíferos (Fig. 41a). Al microscopio electrónico se evidenciaron partículas lipídicas de gran tamaño del tipo quilomicon semejantes a las encontradas para el 22% de lípidos, localizadas en los espacios intercelulares y lámina propia (Fig. 41b).

El intestino anterior de los peces alimentados con dietas conteniendo *27% de lípidos y harina de AC* mostró grandes oquedades supranucleares en el epitelio. El núcleo celular de los enterocitos era grande, esférico y situado en posición central (Fig. 42a). El estudio ultraestructural confirmó la presencia de vacuolas lipídicas de gran tamaño situadas preferentemente en posición supranuclear. En el interior del retículo endoplásmico y complejo de Golgi se observaron pequeñas partículas lipídicas correspondientes a lipoproteínas del tipo VLDL semejantes a las observadas para el 15% de lípidos, que fueron también visibles en los espacios intercelulares y en la lámina propia (Fig. 42b).

### **5.2.3 ICONOGRAFÍA**

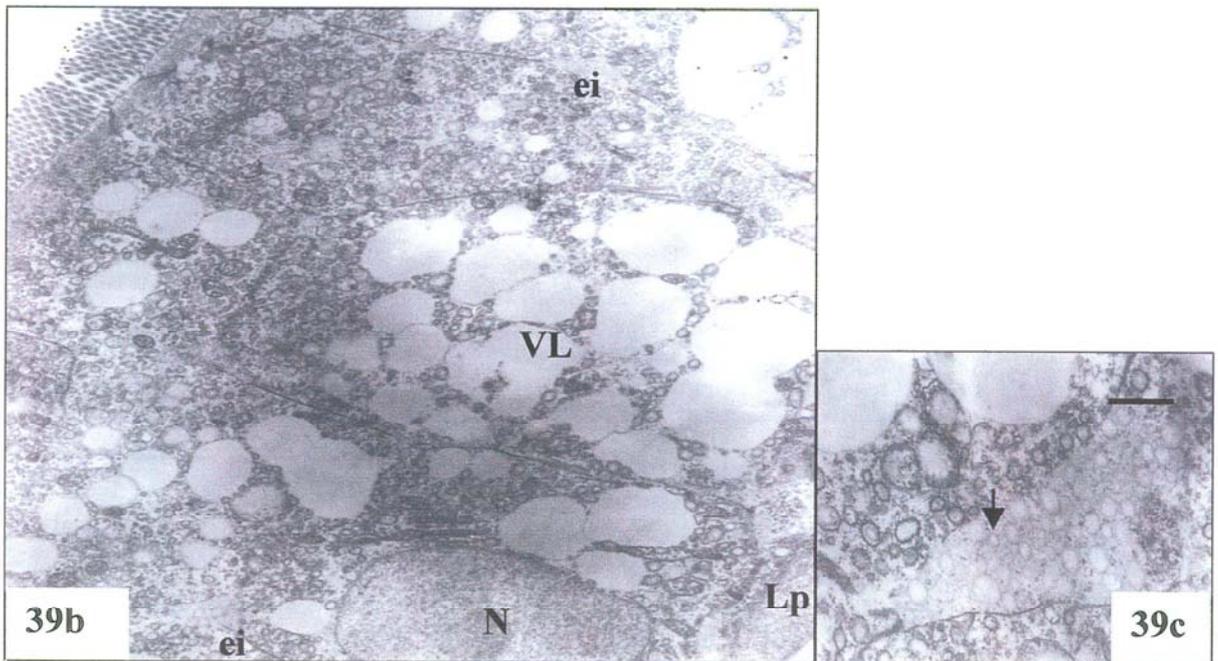
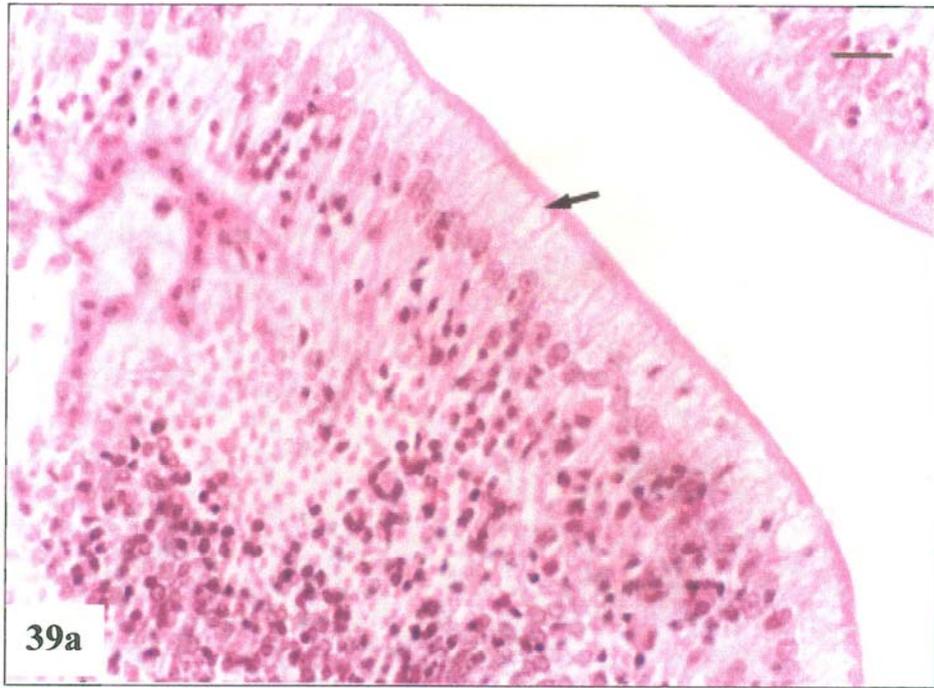
*15% de lípidos*

Figura 39a. Epitelio intestinal con vacuolización supranuclear. Núcleo celular grande y esférico en posición central. H&E ( $\times 1000$ ).

Figura 39. b) Presencia de grandes vacuolas lipídicas supranucleares. VL: vacuola lipídica; N: núcleo; Lp: lámina propia; es espacio intercelular.

c) Detalle de pequeñas partículas lipídicas en el espacio intercelular (flecha).

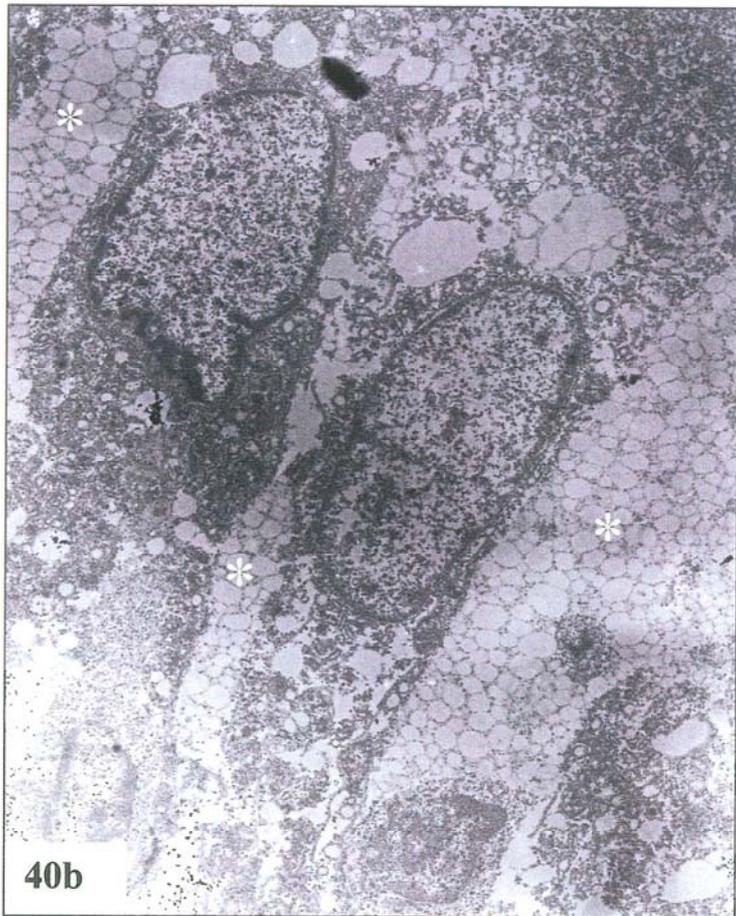
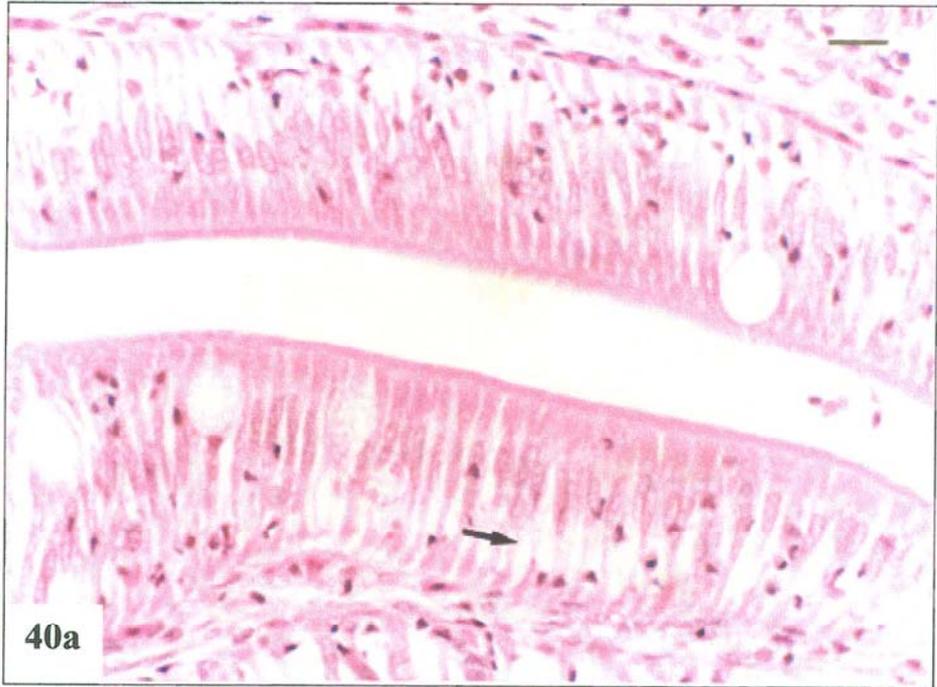




*22% de lípidos*

Figura 40a. Presencia de oquedades entre los enterocitos (flecha). Núcleos celulares alargados y estrechos. Citoplasma en la zona apical moderadamente eosinofílico. H&E (×1000).

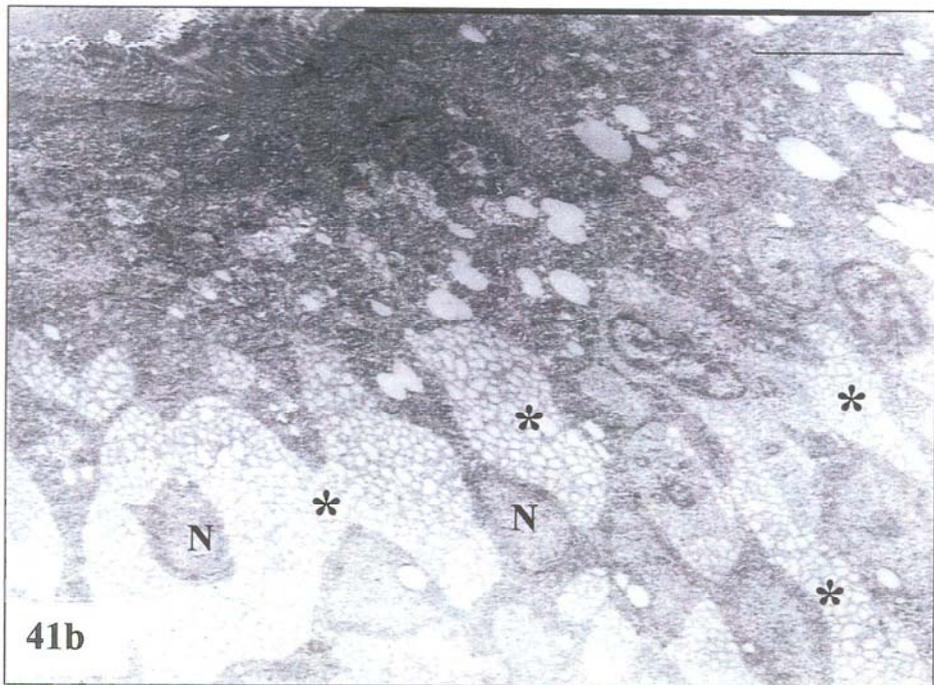
Figura 40b. Intensa acumulación de grandes partículas lipídicas en los espacios intercelulares (\*).



*27% de lípidos. Harina de pescado baja calidad (BC)*

Figura 41a. Enterocitos estrechos y alargados debido a la gran acumulación de material lipídico en los espacios intercelulares (flecha). Este material también está presente en la lámina propia. H&E (× 1000).

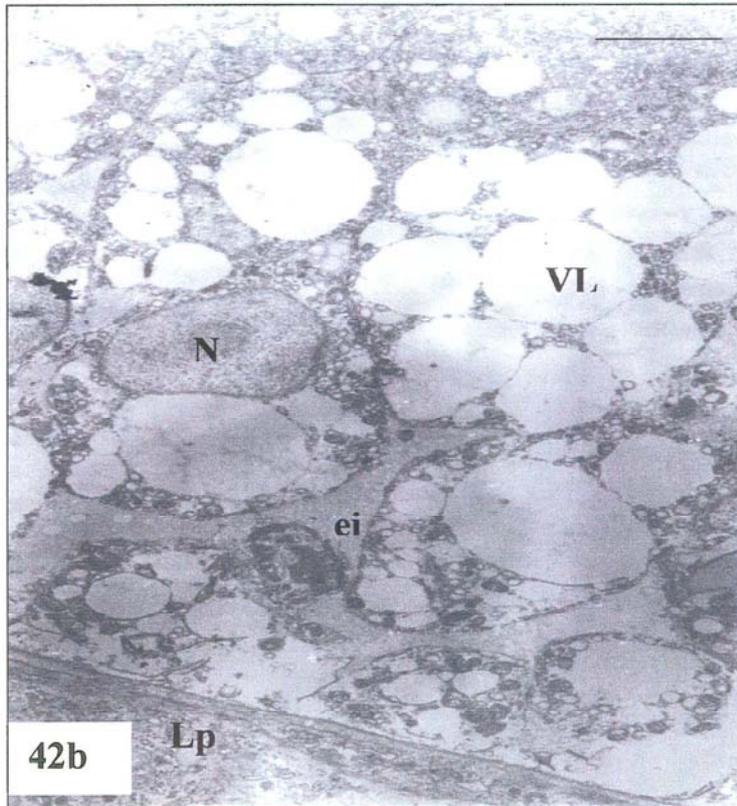
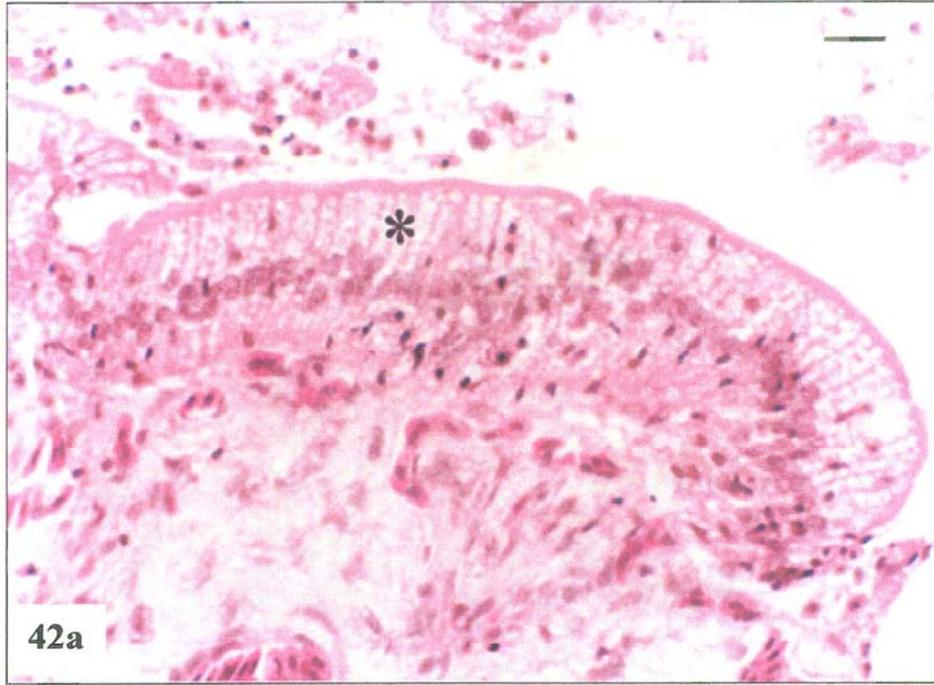
Figura 41b. Grandes partículas lipídicas se localizan en los espacios intercelulares (\*).



*27% de lípidos. Harina de pescado alta calidad (AC)*

Figura 42a. Grandes oquedades supranucleares en el epitelio (\*). Núcleos centrales grandes y esféricos. H&E ( $\times 1000$ ).

Figura 42b. Grandes vacuolas lipídicas supranucleares. Pequeñas partículas lipídicas en el espacio intercelular (es). VL: vacuola lipídica; N: núcleo; Lp: lámina propia.



#### 5.2.4 DISCUSIÓN

Las pequeñas partículas lipídicas observadas ultraestructuralmente en los espacios intercelulares de los peces alimentados con el 15% de lípidos, se identificaron como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), en comparación con los trabajos de SIRE y VERNIER, (1981) y DEPLANO *et al.*, (1989). Estos autores sugieren que el tamaño de las lipoproteínas puede variar dependiendo del contenido de lípidos en las dietas. Estudios ultraestructurales en trucha arco-iris han descrito que las dietas con el menor porcentaje de lípidos inducen a la formación de lipoproteínas del tipo VLDL (SIRE *et al.*, 1981). Así pues, la formación de estas partículas en estos peces, podría ser consecuencia del bajo nivel de lípidos de estas dietas. Estudios en ratas corroboran esta hipótesis ya que muestran que mientras la secreción de los QM es lineal con respecto al contenido de grasa en las dietas, la secreción de VLDL es sigmoidal, lo que significa que a menores porcentajes de lípidos en dieta tienden a la formación y secreción de VLDL (KALOPISSIS *et al.*, 1982).

Otro hecho apoyaría la formación preferencial de VLDL a nivel intestinal en los peces. La vía del *glicerol-3-fosfato* ha sido propuesta como la vía principal de reaclación intestinal en teleósteos (JOHNSTON, 1978; LÉGER *et al.*, 1979; SIRE *et al.*, 1981). Esta es utilizada conjuntamente para la síntesis de glicerofosfolípidos y triacilgliceroles, de este modo, en peces, la síntesis de materiales de superficie (principalmente fosfolípidos) para las lipoproteínas sería superior a la de vertebrados superiores tendiendo, por ello, a la formación de lipoproteínas del tipo VLDL.

Por otro lado, la vacuolización del epitelio intestinal y la observación ultraestructural de grandes vacuolas lipídicas supranucleares en los enterocitos de peces alimentados con el 15% de lípidos pueden ser reflejo de una alta absorción de ácidos grasos que exceda la capacidad de síntesis de VLDL, provocando de este modo su acumulación en el citoplasma. Esta idea ha sido sugerida en varios trabajos (BERGOT y FLECHON, 1970; NOAILLAC-DEPEYRE y GAS, 1979; SIRE *et al.*, 1981; FONTAGNÉ *et al.*, 1998). Estos autores están de acuerdo, en que esta

acumulación lipídica no representa una situación patológica sino un reflejo de una alta absorción lipídica. Son varios los fenómenos que pueden explicar esta alta absorción lipídica en el intestino anterior. Por una parte debido a la alta actividad de la lipasa no específica – dependiente de sales biliares (BAL) que poseen los peces (LIE *et al.*, 1987; IJIMA *et al.*, 1998; IZQUIERDO y HENDERSON, 1998). Esta enzima hidroliza la mayoría de los triacilgliceroles dietéticos sin depender de posiciones determinadas de ácidos grasos siendo los ácidos grasos libres los principales productos de su hidrólisis, lo que favorece una mayor absorción de éstos, al contrario de lo que ocurre con la lipasa pancreática específica, la cual tiene preferencia por ácidos grasos en posición 2 (GURR y HARWOOD, 1991; IZQUIERDO y HENDERSON, 1998). Por otra, la NL tiene una mayor afinidad por ácidos grasos insaturados y entre éstos, por aquellos de mayor número de insaturaciones (GANGL *et al.*, 1980; LIE *et al.*, 1987; IJIMA *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 2000) lo que junto al hecho de que las dietas de dorada están formuladas con elevados porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados (KALOGEROPOULOS *et al.*, 1992; IBEAS *et al.*, 1994), favorece la difusión de ácidos grasos insaturados al interior del enterocito.

Asimismo, hay que añadir a estos acontecimientos que la reaclación de ácidos grasos también puede estar favorecida por dos hechos. El primero, que la vía *glicerol-3-fosfato* preferente en peces encargada de la reaclación, tiene más afinidad por ácidos grasos libres, que son los principales productos de la hidrólisis luminal por la BAL. El segundo, que la proteína fijadora FABP (fatty acid binding protein) tiene mayor afinidad por ácidos grasos insaturados que están presentes en mayor porcentaje en las dietas para dorada (SIRE *et al.* 1981). En definitiva, la consecuencia de todos estos fenómenos es el acumulo temporal de ácidos grasos preferentemente en el citoplasma de los enterocitos hasta ser integrados en lipoproteínas para su transporte.

El estudio ultraestructural del intestino de peces alimentados con un 22% de lípidos, evidenció que la dilatación de los espacios intercelulares eran consecuencia

---

---

de un gran acúmulo de partículas lipídicas de gran tamaño del tipo quilomicron. Los QM se caracterizan por ser partículas de gran tamaño ( $\varnothing > 1000\text{\AA}$ ) que transportan un alto contenido de triacilglicerol. La presencia de QM en los espacios intercelulares podría ser consecuencia de varios acontecimientos. Primero, el incremento de lípidos en las dietas (de 15 a 22%) aumentaría la cantidad de productos de la hidrólisis luminal (ácidos grasos libres), lo que facilitaría una alta absorción de éstos. Este hecho podría conllevar una saturación en la síntesis de VLDL, y una estimulación para la síntesis de QM que transportan más cantidad de lípidos y requiere menos materiales de superficie para su constitución. Está demostrado por varios autores (SIRE y VERNIER, 1981; DEPLANO *et al.*, 1990) en peces que un incremento de lípidos en las dietas provoca paralelamente un incremento en el tamaño de las lipoproteínas. También en rata (HAYASHI *et al.*, 1990) y conejo (CARTWRIGHT y HIGGINS, 1999) ha sido descrito que la respuesta intestinal a un incremento de TAGs es la producción de grandes quilomicrones, aunque no se aumente su número. En definitiva, la presencia de QM puede ser consecuencia de un desfase entre la síntesis de fosfolípidos y triacilglicerol en las células intestinales, viéndose favorecida la síntesis de estos últimos.

Por otra parte, si la formación de QM sobrepasa la capacidad de transporte, éstos se tienden a acumular en los espacios intercelulares y lámina propia como ha sido evidente en los resultados de este trabajo. En este sentido, DEPLANO *et al.*, (1989) sugieren que un aumento de tamaño de las lipoproteínas puede impedir su evacuación acumulándose en los espacios intercelulares y lámina propia.

El efecto de la calidad de la harina de pescado fue manifiesto en los peces alimentados con el mayor porcentaje de lípidos (27%). Así, los peces alimentados con 27% de lípidos y harina de BC mostraron imágenes histológicas del intestino similares a las observadas para peces alimentados con 22% de lípidos y la misma calidad de harina, encontrándose espacios intercelulares dilatados y ocupados por grandes partículas lipoprotéicas del tipo de quilomicron. De manera semejante a lo

---

expuesto para los peces alimentados con 22% de lípidos, estas imágenes podrían ser consecuencia de sucesivos hechos: del aumento de lípidos en la dieta (27%), del incremento de absorción de ácidos grasos libres, de la saturación en la síntesis de VLDL y la consiguiente estimulación de una ruta alternativa de formación de QM que puede sobrepasar la capacidad de transporte, acumulándose éstos en los espacios intercelulares.

Por el contrario, en los peces alimentados con harina de AC y 27% de lípidos no se mantuvo la tendencia a la formación de quilomicrones que fue manifiesta para 22% de lípidos y la misma calidad de harina. Así, se observaron grandes vacuolas lipídicas supranucleares y lipoproteínas del tipo VLDL en los espacios intercelulares. Esto podría ser consecuencia de una mayor disponibilidad de proteína, que potenciaría de nuevo la ruta de síntesis de VLDL, que requiere mayor porcentaje de proteínas para su formación. Esta disponibilidad de proteína sería debida al empleo en estas dietas de una alta calidad de harina de pescado que cubriría completamente las necesidades proteicas del pez. En vertebrados superiores, la síntesis de lipoproteínas es reducida cuando hay una inadecuada suplementación de ciertos amino ácidos tales como lisina y arginina (HUANG *et al.*, 1993). En ratas, la inhibición de la síntesis intestinal de proteínas altera la composición y morfología de las lipoproteínas, siendo significativamente mayores en tamaño y disminuyendo su contenido de apoproteínas (MANSBACH *et al.*, 2001). En este punto hay que hacer una consideración, el hecho de que la calidad de harina tenga efecto sobre la síntesis de VLDL o de QM y que haya sido evidente solamente al nivel más alto de lípidos 27%, podría ser consecuencia de que a niveles más bajos de lípidos (22%), no exista un exceso de proteína disponible, puesto que la mayor parte de la proteína, sea tanto de alta como de baja calidad, está siendo requerida para crecimiento.

En resumen, se confirma que el incremento de lípidos en la dieta promueve la formación de lipoproteínas de un mayor tamaño. Además, la calidad de la proteína y con ello la disponibilidad de aminoácidos en el intestino parece interferir en el tipo de lipoproteína sintetizada.

### **5.3 EFECTOS A MEDIO PLAZO DE LA INCLUSIÓN DE NIVELES MODERADOS DE ACEITES VEGETALES EN DIETAS SOBRE LA MORFOLOGÍA DEL INTESTINO DE DORADA Y LUBINA**

#### **5.3.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Las doradas y lubinas fueron suministradas por la empresa local ADSA. Trescientas doradas de aproximadamente 10 g de peso medio se distribuyeron en tanques circulares de polietileno de 100 L de capacidad (20 peces/ tanque). Cada tanque estaba provisto de un flujo continuo de agua de mar (36 ‰) y aireación. El rango de temperatura del agua a lo largo del experimento fue de 20.0 - 24.2°C y el oxígeno disuelto entre 5.0 - 8.3 ppm. Los peces se sometieron a un fotoperiodo natural de 12h luz/ 12h oscuridad. Tras la finalización del experimento con dorada, cuatrocientas cincuenta lubinas de aproximadamente 8 g de peso medio se distribuyeron en los tanques (30 peces/tanque). La temperatura del agua a lo largo de este experimento osciló entre 21.5 – 22.8°C y el oxígeno disuelto entre 5.2 – 7.4 ppm.

En ambos experimentos los peces se aclimataron en los tanques durante 2 semanas con la dieta control previamente a la suministración de las distintas dietas experimentales. Las dietas se suministraron hasta saciedad aparente tres veces al día, durante 3 meses. Las dietas experimentales se ensayaron por triplicado.

Cinco dietas experimentales se formularon en colaboración con la empresa noruega *Nutreco Aquaculture Research Centre A/S* y el *Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA)*. Las dietas fueron iso-energéticas e iso-protéicas (45% proteína) y con un contenido de lípidos alrededor de un 25%. La única fuente de lípidos añadida a la dieta control (100P) fue aceite de pescado, mientras que en el resto de las dietas el 60% del aceite de pescado se reemplazó por aceites vegetales. Así, aceite de soja, colza y lino y una combinación de los tres aceites se usaron en las dietas 60S, 60C, 60L y 60Mix, respectivamente.

Las dietas elaboradas con aceites vegetales mantuvieron un nivel de n-3 HUFA por encima del 3% en orden a cubrir los requerimientos en ácidos grasos esenciales para estas especies (MONTERO, 1996; LANARI *et al.*, 1999). Así, mientras la dieta 100P contenía 6.71% en peso seco de n-3 HUFAs, las otras dietas contenían entre un 3.5 - 4 % de n-3 HUFAs (Tabla 20). El contenido en EPA y DHA de la dieta 100P fue mayor que en el resto de las dietas (13.9 y 8.9%, respectivamente), que tuvieron semejante porcentaje en cada uno de estos ácidos grasos (7.5 y 5.4%, respectivamente). Por otra parte, la proporción de ácidos grasos de la serie n-3 con respecto a los de la serie n-6 (n-3/n-6) varió en gran manera entre las dietas experimentales, debido principalmente al contenido en ácido linoleico de los aceites vegetales usados, así la relación n-3/n-6 fue de 0.8 para la dieta 60S y de 3.3 para la dieta 100P. El ácido mayoritario de la dieta 60C fue el ácido oleico con un porcentaje del 27.8% y las dietas 60L y 60Mix destacaron por su alto contenido en 18:3n-3 (23.0 y 18.2%, respectivamente). El contenido de ácido ARA fue mayoritario en las dietas 100P y 60S comparado con el resto de dietas que tuvieron el mismo porcentaje. La composición en ácidos grasos de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Porcentaje de lípidos y principales ácidos grasos de las distintas dietas experimentales

	DIETA				
	100P	60S	60C	60L	60Mix
<i>Lípidos (%)</i>	26.7	23.2	25.8	26.6	28.5
<i>Ácidos grasos (%)</i>					
14:0	5.9	3.4	3.1	3.1	3.0
16:0	15.5	13.4	11.3	11.0	11.2
16:1n-7	6.6	3.8	3.6	3.4	3.4
16:2n-6	0.9	0.5	0.4	0.4	0.4
16:4n-1	1.8	1.0	0.9	0.9	0.9
18:0	2.8	3.3	2.4	2.9	2.8
18:1n-9	11.4	14.4	27.8	15.1	17.8
18:1n-7	2.4	1.9	2.7	1.7	1.9
18:2n-6	7.3	26.2	16.0	13.0	14.6
18:3n-3	3.8	4.7	5.2	23.0	18.2
18:4n-3	2.2	1.4	1.3	1.2	1.2
20:0	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
20:1n-9	2.1	1.8	2.3	1.8	1.9
20:4n-6	0.6	0.4	0.3	0.3	0.3
20:4n-3	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3
20:5n-3	13.9	8.1	7.5	7.3	7.3
22:0	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2
22:1n-11	1.9	1.8	1.9	1.8	1.9
22:5n-6	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
22:5n-3	1.3	0.8	0.7	0.7	0.7
22:6n-3	8.9	5.6	5.4	5.3	5.4
$\Sigma$ Saturados	25.0	20.9	17.8	17.6	17.8
$\Sigma$ Monoinsaturados	25.9	24.8	39.5	25.1	28.2
$\Sigma$ n-3	31.2	21.3	20.7	38.2	33.4
$\Sigma$ n-6	9.4	27.5	17.2	14.1	15.7
$\Sigma$ n-9	14.2	16.7	30.9	17.7	20.5
n-3/n-6	3.3	0.8	1.2	2.7	2.1
n-3 HUFA	25.2	15.2	14.2	13.9	14.0
n-3 HUFA (% p.s.)	6.7	3.5	3.7	3.7	4.0

Al final del experimento, se tomaron 4 muestras de intestino anterior por tanque y un total de 12 muestras por cada dieta experimental para el estudio histológico. El tramo de intestino anterior se seleccionó para el estudio histológico, considerando que en experiencias previas sobre enzimas lipolíticas, esta porción presentó una alta actividad lipásica y fosfolipásica, lo que sugiere la importancia de este segmento para la digestión y absorción de lípidos dietéticos (IZQUIERDO *et al.*, 1997). Además, en el presente estudio las muestras se recogieron 4 horas tras la alimentación, periodo de tiempo determinado por la presencia de la digesta en el tracto digestivo desde el estómago hasta el recto en cada uno de los peces. Este mismo patrón se utilizó en el caso de la lubina.

La totalidad de la mucosa intestinal del intestino anterior se examinó al microscopio óptico, siguiendo un orden en la visualización de los campos al microscopio. Para el estudio ultraestructural, cada muestra de intestino anterior se troceó en pequeñas piezas y se embebió en los correspondientes bloques en resina. Dos bloques por muestra se tomaron al azar. De cada uno de estos 2 bloques se realizaron al azar un corte de la mucosa intestinal, que se colocó en rejilla de cobre para su estudio empleando el microscopio electrónico. Aproximadamente de cada rejilla se examinaron 10 campos por sección (240 campos por dieta), usando los bordes de la rejilla de cobre como guías.

### 5.3.2 RESULTADOS

#### *Histología del intestino anterior*

Daños en la mucosa intestinal tales como pérdida de microvillosidades, necrosis, degeneración o vacuolización autolítica de organelas celulares no se observaron en ningún grupo experimental. De modo que solamente diferencias en la cantidad, tamaño o localización del material lipídico se encontraron entre los distintos grupos experimentales, datos sobre los que se centró nuestro estudio.

#### *Dorada*

Las doradas alimentadas con la dieta 100P mostraron algunas vacuolas lipídicas supranucleares en el citoplasma de los enterocitos en aquellas zonas de los pliegues intestinales en contacto más directo con el lumen. Además, los espacios intercelulares estaban ocupados por material lipídico que se detectó con la tinción AT&FB (técnica de tinción específica para lípidos) (Fig. 43a). El estudio ultraestructural confirmó la presencia de vacuolas lipídicas de diferente tamaño (entre 2.1-5.1 $\mu$ m de diámetro) en el citoplasma apical de los enterocitos. En los espacios intercelulares se observaron partículas de lipoproteínas (Fig. 43b). Éstas se diferenciaban por su tamaño y electrodensidad, encontrando partículas de mayor tamaño con baja electrodensidad (tamaño medio entre 85-143 nm) entre partículas más pequeñas de alta electrodensidad (tamaño medio entre 42-71 nm) (ver detalles Figs. 43c y 43d). Las de un tamaño inferior a 100nm se identificaron como lipoproteínas de baja densidad (VLDL), aquellas de tamaño superior se identificaron como quilomicrones (QM). Esta identificación se realizó comparando tamaño de partículas con aquellos obtenidos por otros autores en diversas especies de peces (CHAPMAN *et al.*, 1978; SIRE *et al.*, 1981; EZEASOR y STOKOE, 1981).

A lo largo de toda la mucosa intestinal de doradas alimentadas con la dieta 60S se observó un gran acúmulo de material lipídico en los espacios intercelulares

principalmente en la parte basal del epitelio y en la lámina propia. Sin embargo, no se observaron vacuolas lipídicas en el citoplasma de los enterocitos (Fig. 44a). A nivel ultraestructural, la parte apical del citoplasma contenía numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso dilatadas que contenían pequeñas partículas de lipoproteínas (tamaño medio de 28-60 nm) (Fig. 44c). En la parte basal del epitelio, los espacios intercelulares estaban dilatados como consecuencia de una intensa acumulación de partículas lipoprotéicas de diferentes tamaños y electrodensidades (partículas de 57-105 nm y de 28- 42 nm) (Figs. 44b y 44d).

La mucosa del intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60C, presentó un acumulo de vacuolas lipídicas de gran tamaño en la zona apical de los pliegues intestinales (Fig. 45a). Ultraestructuralmente, se observaron numerosas vacuolas lipídicas que en ocasiones ocupaban gran parte del citoplasma de los enterocitos y desplazaban a los organelas citoplasmáticas (algunos diámetros de vacuolas excedían a 12 $\mu$ m) (Fig. 45b). En los espacios intercelulares se observaron partículas de lipoproteínas de tamaños similares a las del grupo experimental 100P (tamaño medio de 85-146 nm y de 37-60 nm) (Figs. 45c y 45d).

Las doradas alimentadas con la dieta 60L mostraron una mucosa intestinal con escasas zonas de acumulo de vacuolas lipídicas, en comparación con el grupo control (Fig. 46a). El estudio ultraestructural confirmó la escasa presencia de vacuolas lipídicas, aunque partículas de lipoproteínas se encontraron en los espacios intercelulares (Fig. 46b).

En la mucosa intestinal de doradas alimentadas con la dieta 60Mix se observaron numerosos acúmulos de vacuolas lipídicas en las zonas del epitelio en contacto con el lumen. Se observó material lipídico en la lámina propia (Fig. 47a). El estudio ultraestructural confirmó la presencia de numerosas vacuolas lipídicas de diferente tamaño (3.4 - 9.2 $\mu$ m) que ocupaban parte del citoplasma apical de los enterocitos (Fig. 47b). En los espacios intercelulares se observaron lipoproteínas de

muy baja electrodensidad y con un tamaño medio de entre 142-197 nm, superior al observado en los otros grupos experimentales (ver detalles Figs. 47c y 47d).

### *Lubina*

Lubinas alimentadas con la dieta 100P, 60C y 60Mix mostraron una mucosa intestinal con acúmulos de vacuolas lipídicas de diferentes tamaños en determinadas zonas de los pliegues intestinales (Figs. 48, 49a, 50). No obstante, la impresión visual fue que el grupo 100P tuvo una incidencia más baja de vacuolas lipídicas.

Lubinas alimentadas con la dieta 60S presentaron a lo largo de la mucosa intestinal, acúmulos de vacuolas lipídicas localizados en posición infranuclear y de un tamaño inferior a las encontradas en los otros grupos experimentales. Los núcleos celulares se encontraban en posición central (Fig. 51a). El estudio ultraestructural confirmó estas observaciones y reveló la presencia de lipoproteínas en los espacios intercelulares y en la lámina propia (Fig. 51b).

Poca incidencia de vacuolas lipídicas se encontró en el epitelio intestinal de las lubinas alimentadas con la dieta 60L (Fig. 52).

### 5.3.4 ICONOGRAFÍA

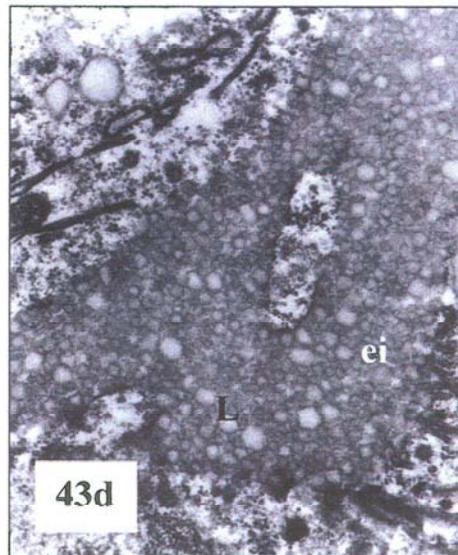
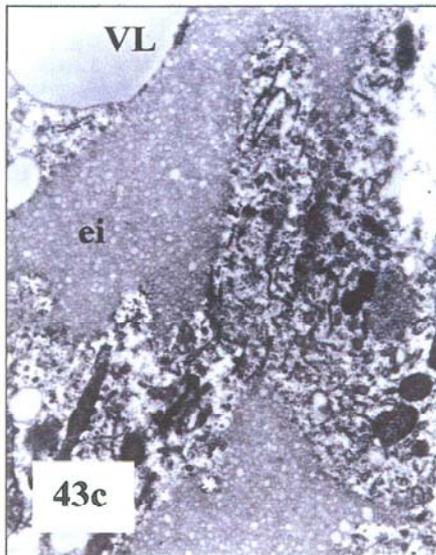
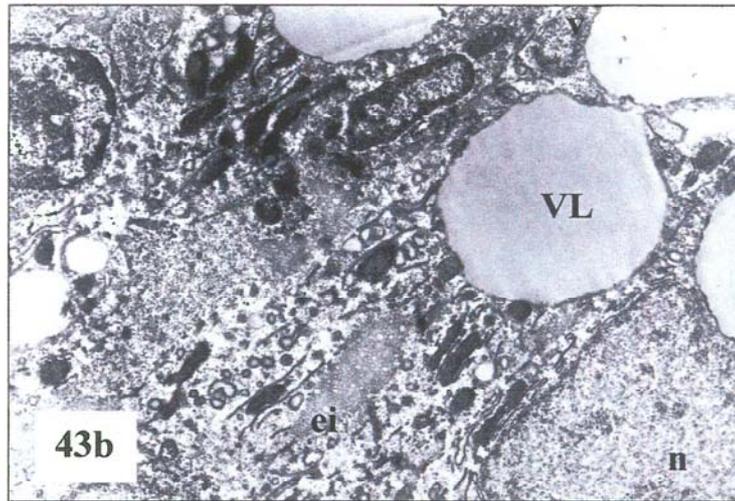
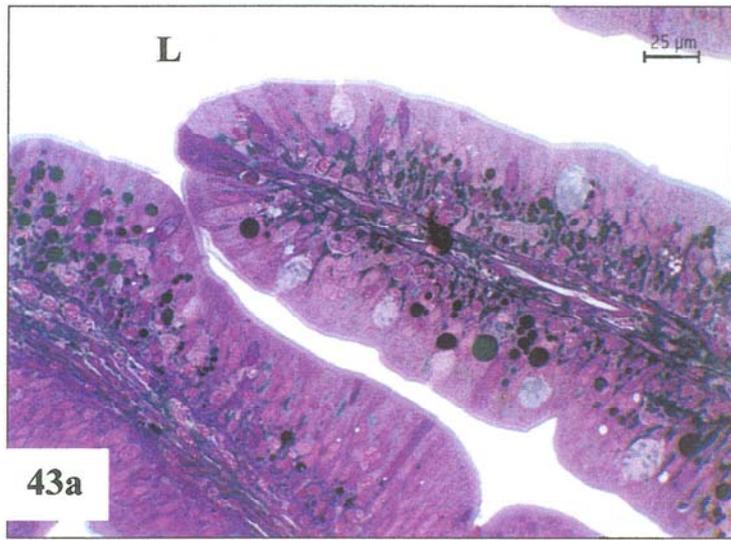
Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 100P

Figura 43a. Corte semifino teñido con AT&FB. Vacuolas lipídicas supranucleares en el citoplasma de los enterocitos ( $\times 400$ ). L: lumen intestinal

Figura 43b. Vacuolas lipídicas y partículas de lipoproteínas en el espacio intercelular (ei)  $\times 5000$ . VL: vacuola lipídica; ei: espacio intercelular

Figura 43c. Detalle de las partículas de lipoproteínas en el espacio intercelular  $\times 8000$ .

Figura 43d. Detalle de las partículas de lipoproteínas en el espacio intercelular  $\times 20000$



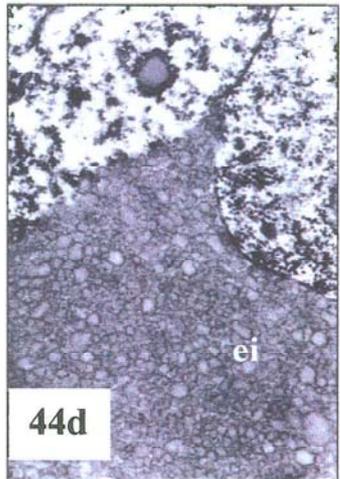
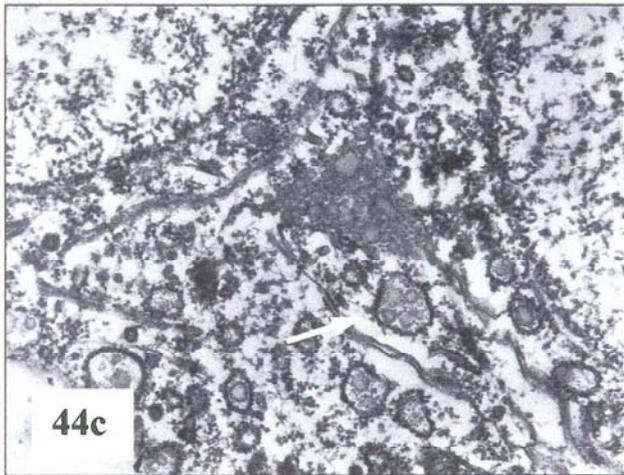
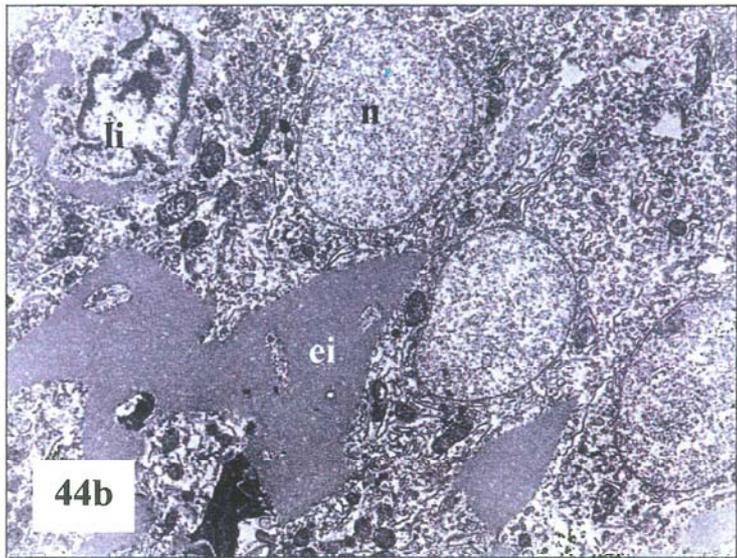
*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60S*

Figura 44a. Corte semifino teñido con AT&FB. Acúmulo de lípidos en los espacios intercelulares, principalmente en la parte basal del epitelio ( $\times 400$ ).

Figura 44b. Acumulación de lipoproteínas en los espacios intercelulares ( $\times 3000$ ). Li: linfocito

Figura 44c. Cisternas de RER dilatadas que contienen pequeñas partículas de lipoproteínas (flecha) ( $\times 20000$ )

Figura 44d. Detalle de las partículas de lipoproteínas ( $\times 20000$ )



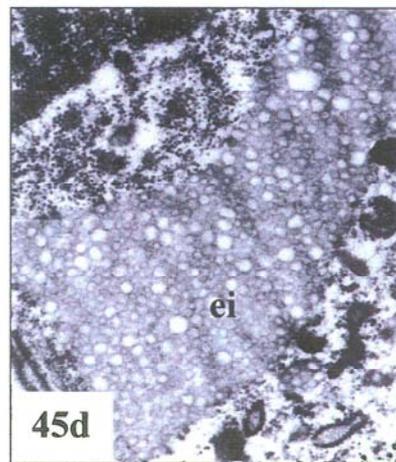
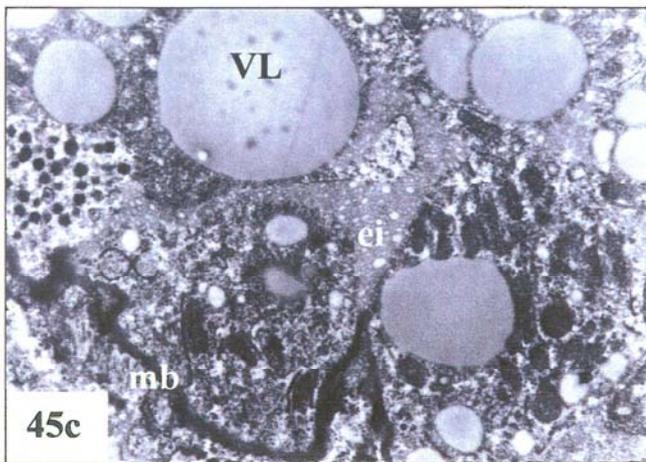
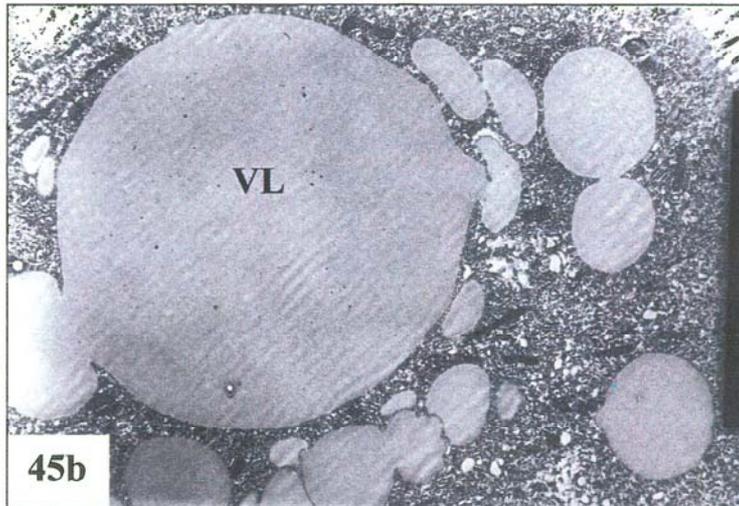
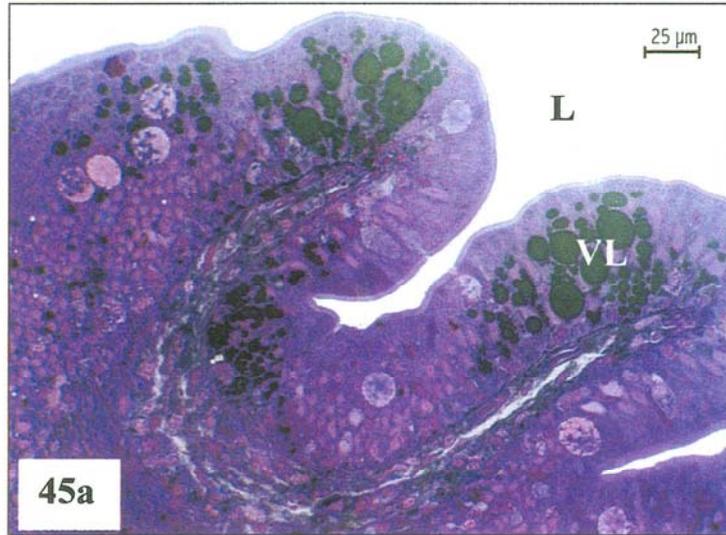
*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60C*

Figura 45a. Corte semifino teñido con AT&FB. Acúmulo de vacuolas lipídicas en la parte apical de los pliegues intestinales (x400)

Figura 45b. Grandes vacuolas lipídicas en posición supranuclear (x4000)

Figura 45c. (x8000). Mb: membrana basal

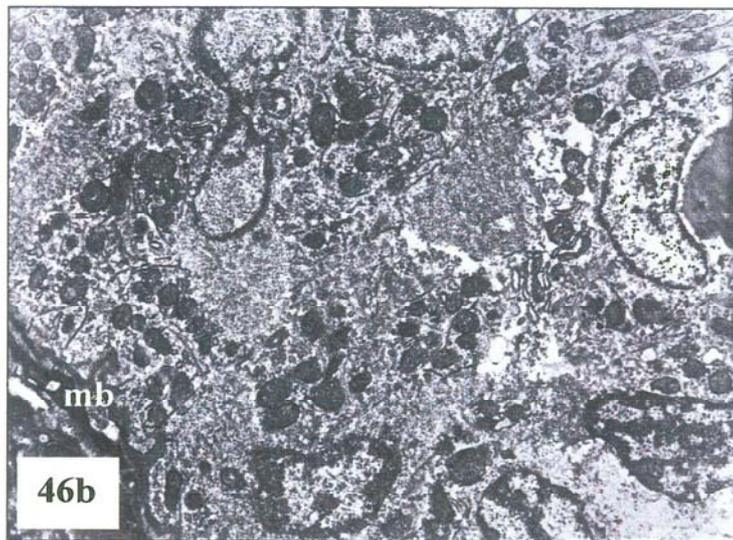
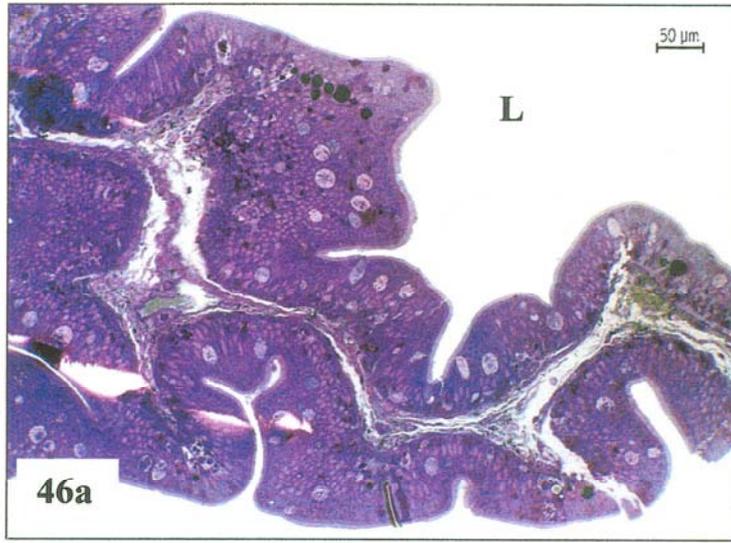
Figura 45d. Detalle de las partículas de lipoproteínas en el espacio intercelular (x20000)



*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60L*

Figura 46a. Corte semifino teñido con AT&FB (x200)

Figura 46b. (x5000)



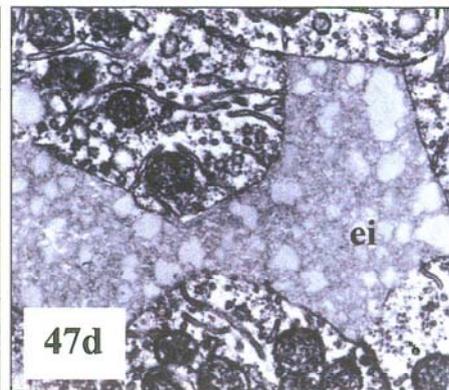
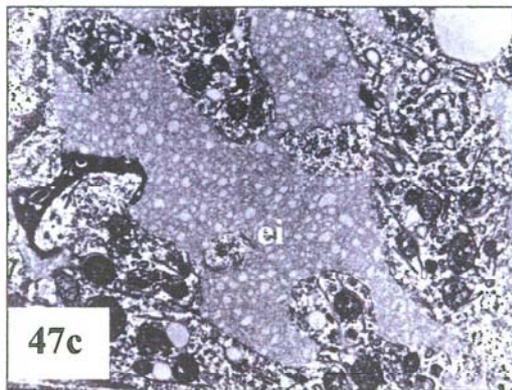
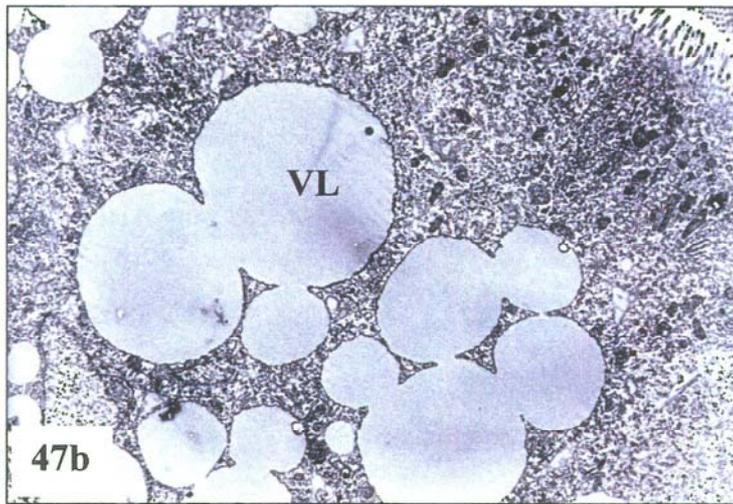
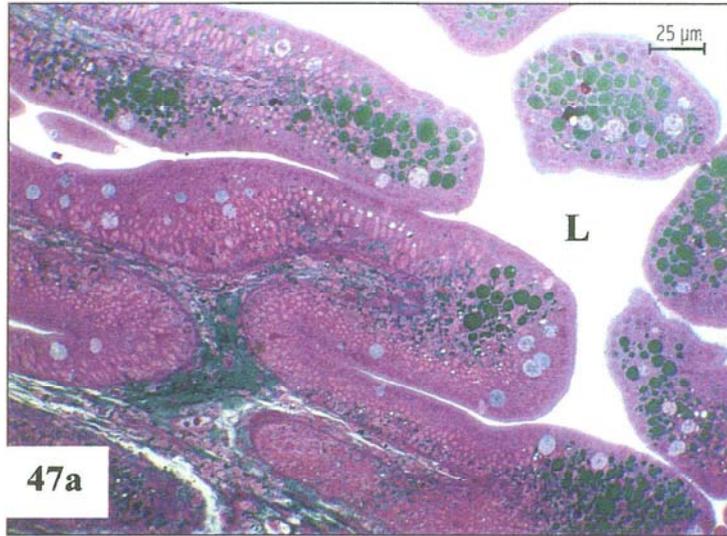
*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60Mix*

Figura 47a. Corte semifino teñido con AT&FB. Vacuolas lipídicas en los pliegues intestinales (x400)

Figura 47b. (x3000)

Figura 47c. Detalle de partículas de lipoproteínas en el espacio intercelular (x8000)

Figura 47d. Detalle de partículas de lipoproteínas en el espacio intercelular (x20000)



*Intestino anterior de lubinas alimentadas con la dieta 100P*

Figura 48. H&E (x200)

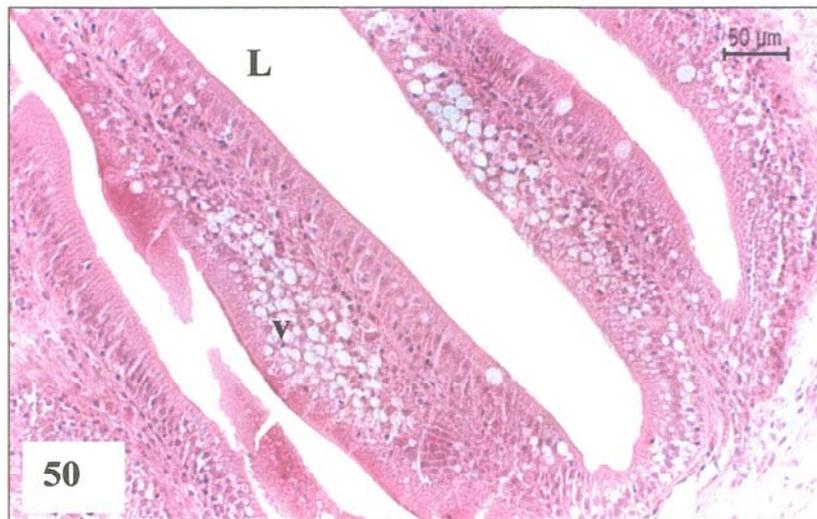
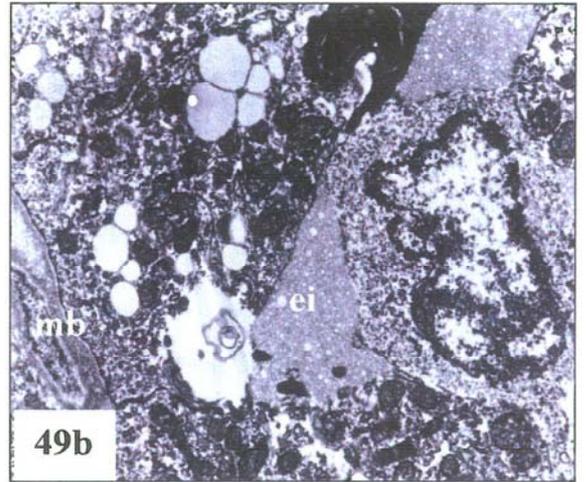
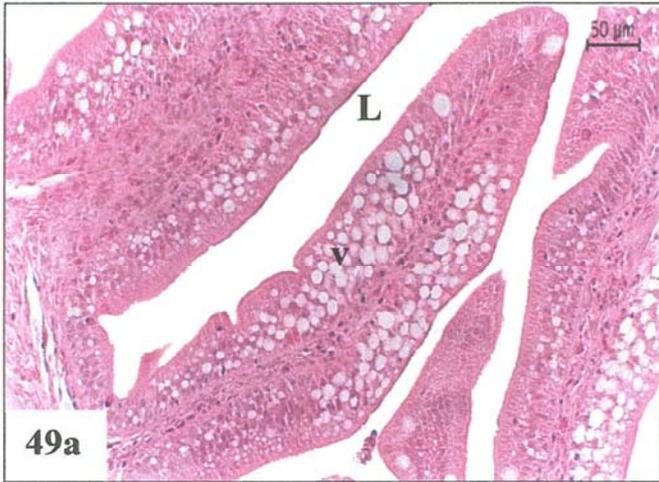
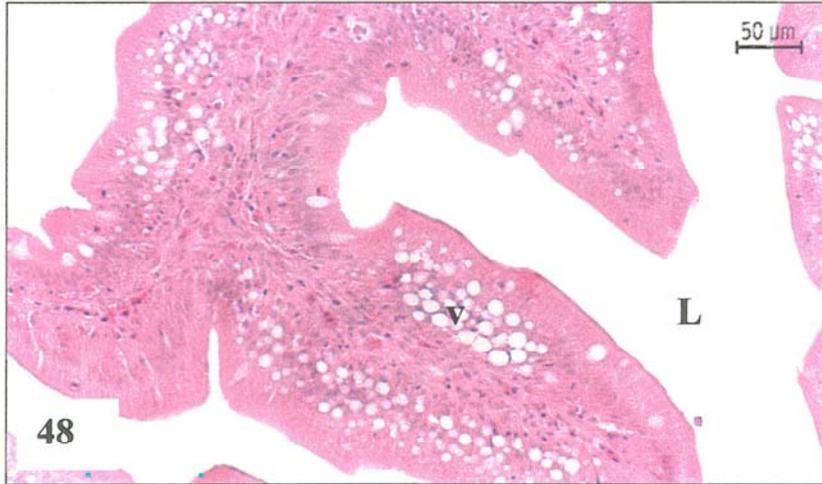
*Intestino anterior de lubinas alimentadas con la dieta 60C*

Figura 49a. H&E (x200) --

Figura 49b. (x8000)

*Intestino anterior de lubinas alimentadas con la dieta 60Mix*

Figura 50. H&E (x200)



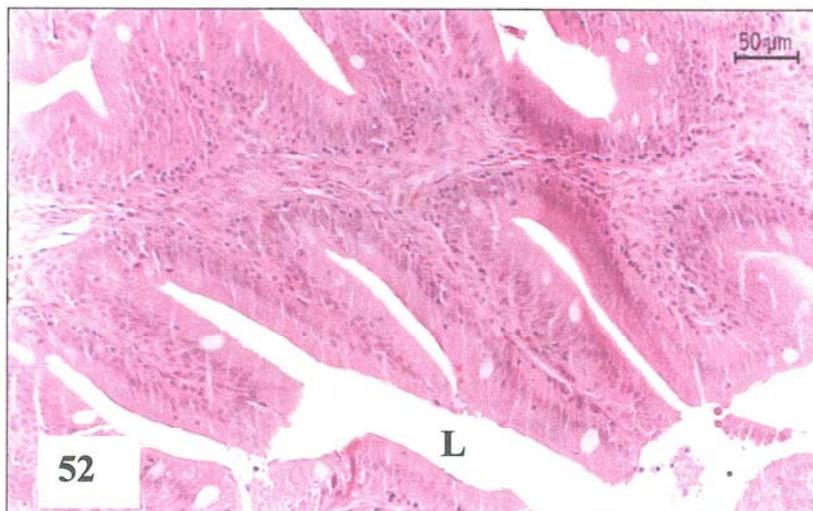
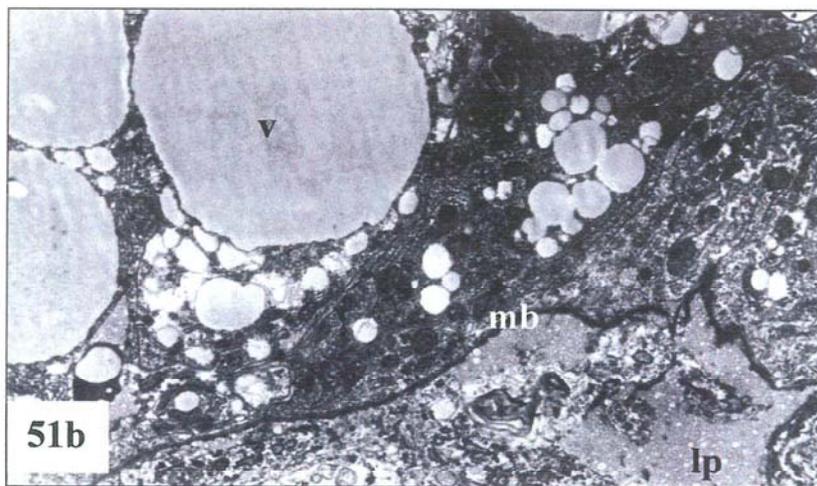
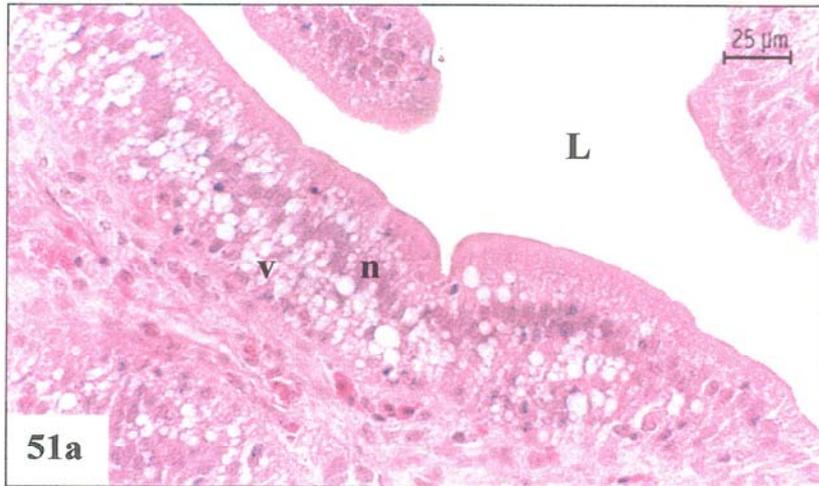
*Intestino anterior de lubinas alimentadas con la dieta 60S*

Figura 51a. H&E Vacuolas lipídicas localizadas principalmente en posición infranuclear en el epitelio intestinal (x400)

Figura 51b. Partículas de lipoproteínas en la lámina propia (x3000)

*Intestino anterior de lubinas alimentadas con la dieta 60L*

Figura 52. H&E (x200)



### 5.3.3 DISCUSIÓN

La acumulación de vacuolas lipídicas supranucleares fue manifiesta en los intestinos de doradas y lubinas alimentadas con la dieta 60C con respecto a la dieta control (100P). Dicha dieta se caracteriza por un porcentaje alto de monoinsaturados. Aunque la digestibilidad de los monoenoicos es menor que la de los ácidos grasos poliinsaturados (LIED y LAMBERTSEN, 1982; RINGØ y OLSEN, 1994), la proporción de monoinsaturados en las heces de doradas y lubinas alimentadas con las dietas 60C disminuyó con respecto a los otros grupos (IZQUIERDO *et al.*, datos no publicados), indicando una alta absorción principalmente del ácido oleico (ácido graso monoinsaturado presente en altas cantidades en el aceite de colza). De este modo aunque el ácido oleico es absorbido bien por las células intestinales, la acumulación de lípidos en los intestinos de los peces alimentados con la dieta 60C podría ser reflejo de una limitada capacidad de reaclación del ácido oleico en triacilgliceroles o fosfolípidos que podría disminuir la formación de lipoproteínas impidiendo de esta manera la evacuación intestinal de los lípidos absorbidos.

Por el contrario, una menor presencia de lípidos en los intestinos se observó tanto en las doradas como en las lubinas alimentadas con la dieta 60L. Este hecho parece indicar que una mayor proporción de 18:3n-3 en las dietas que cualquier otro ácido graso de 18 carbonos favorece la reaclación de los lípidos absorbidos por el enterocito en los TAG y fosfolípidos evitando la acumulación de estos. Hay que hacer una consideración con un trabajo de OLSEN *et al.*, (2000), quienes han mostrado que cantidades crecientes de aceite de lino, con alto contenido en 18:3n-3 promueven la acumulación masiva de vacuolas lipídicas en el intestino de charr ártico (*Salvelinus alpinus*). Sin embargo, hay que resaltar que dichas dietas se formularon libres de ácidos grasos poliinsaturados, lo que podría ser un factor determinante en los resultados obtenidos por estos autores, ya que es conocido que la deficiencia de ácidos grasos poliinsaturados principalmente de la serie n-3 interfiere en la síntesis de lipoproteínas provocando la acumulación de lípidos en los tejidos (WATANABE, 1982; KANAZAWA, 1985; SARGENT *et al.*, 1989).

Cuando la relación dietética n-6/n-3 se ve favorecida por la cantidad de ácidos grasos de la familia n-6, como es el caso de los peces alimentados con la dieta 60S, una diferencia morfológica significativa se observó en esta dieta con respecto al resto de los grupos experimentales. Así y especialmente en el caso de la dorada, la ausencia de vacuolas lipídicas en el epitelio intestinal fue acompañada de una dilatación de los espacios intercelulares como consecuencia de intensa acumulación de partículas de lipoproteínas, las cuales se observaron incluso en numerosas cisternas del retículo endoplásmico rugoso. Estas imágenes parecen ser reflejo de una estimulación en la síntesis de lipoproteínas, que podría ser consecuencia de una estimulación en la producción de fosfolípidos que facilitan la formación de las lipoproteínas. Particularmente, la fosfatidilcolina (PC) ha sido identificado como un factor que incrementa la secreción de lipoproteínas intestinales (MANSBACH *et al.*, 1985). Este efecto parece ser debido a la acción que ejerce sobre los eventos intracelulares que ocurren durante la síntesis y secreción de las lipoproteínas (TSO *et al.*, 1981). De manera que esta posible estimulación en la síntesis de lipoproteínas cuando la célula intestinal absorbe grandes cantidades de 18:2n-6 podría ser reflejo de una alta reutilización de este ácido graso preferentemente en los fosfolípidos facilitando con ello la formación de lipoproteínas, y por consiguiente, disminuyendo la acumulación de lípidos en el citoplasma de los enterocitos. Además, esta hipótesis parece estar apoyada por el hecho de que la inmensa mayoría de lipoproteínas encontradas en estos peces correspondían a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). TSO *et al.*, (1984) han sugerido que cuando hay un aumento de la síntesis de PL en el intestino, los triacilgliceroles son excretados de la célula intestinal principalmente en forma de lipoproteínas de pequeño tamaño del tipo VLDL, en vez de en quilomicrones.

En este punto, cabría mencionar que la dilatación de los espacios intercelulares y la intensa acumulación de lipoproteínas en la lámina propia observada en las doradas alimentadas con la dieta 60S podría interpretarse además como una saturación en el proceso de evacuación de éstas. DEPLANO *et al.*, (1989) sugieren que defectos en la evacuación de las lipoproteínas son concomitantes con

una situación general de saturación lipídica en el organismo, que es expresada con la aparición de esteatosis hepática. Esta idea esta en concordancia con nuestros resultados, desde que doradas y lubinas alimentadas con la dieta 60S tuvieron una alta incidencia de esteatosis hepática, como ha sido mencionado en el apartado 3.3.

En el resto de grupos experimentales se observó dos tipos de lipoproteínas: VLDL y quilomicrones. En concreto, para el grupo 60Mix las mayoría de las lipoproteínas observadas tuvieron un diámetro superior a las del resto de los grupos, entrando en la gama de lipoproteínas del tipo quilomicron. En concordancia con lo sugerido anteriormente, la relación entre la síntesis de TAG y PL en el enterocito parece determinar el tipo de lipoproteína sintetizada. En términos generales, la vía *monoacilglicerol* es la implicada principalmente en la síntesis de TAG, y la *glicerol-3-fosfato* en la de PL. De modo que la estimulación de una vía u otra en determinadas condiciones nutricionales puede conllevar la formación de diferentes tipos de lipoproteínas, dependiendo de la relación TAG/PL en el intestino.

Por último hay que hacer una consideración con los resultados obtenidos en otros trabajos. DEPLANO *et al.*, (1989) y OLSEN *et al.*, (1999) catalogaron de carácter patológico la acumulación de vacuolas lipídicas, debido al grado de erosión encontrado en la mucosa intestinal. Por el contrario, en el presente estudio no se observaron daños en la mucosa intestinal, indicando que las dietas experimentales no producen trastornos estructurales en el intestino de dorada y lubina, aunque su perfil de ácidos grasos parece influir en el desarrollo de los eventos intracelulares ocurridos durante la absorción de lípidos.

En conclusión, la inclusión de distintos tipos de aceites vegetales en las dietas para estas especies afecta de manera distinta la morfología del enterocito, sugiriendo que el metabolismo de los lípidos en estas células, y tanto su reaclación como la síntesis de lipoproteínas se ven afectadas. La inclusión de aceite de lino da lugar a morfologías más parecidas a la del aceite de pescado, mientras que el aceite de colza produce un acumulo de vacuolas lipídicas supranucleares en los enterocitos. Y la inclusión de aceite de soja parece inducir la producción de lipoproteínas intestinales.

---

## **5.4 EFECTOS DE LA INCLUSIÓN DE NIVELES MODERADOS Y EXTREMOS DE ACEITES VEGETALES EN SUSTITUCIÓN DEL ACEITE DE PESCADO SOBRE LA MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DEL INTESTINO DE DORADA\***

### **5.4.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Las doradas utilizadas en esta experiencia fueron suministradas por la empresa local ADSA. Mil quinientas sesenta doradas de aproximadamente 79g de peso medio se distribuyeron en tanques circulares de polietileno de 500 L de capacidad (65 peces/ tanque). Cada tanque estaba provisto de un flujo continuo de agua de mar (36 ‰) y aireación. El rango de temperatura del agua a lo largo del experimento fue de 21-24°C y el oxígeno disuelto entre 6.0-8.0 ppm. Los peces se sometieron a un fotoperiodo natural de aproximadamente 12h luz/ 12h oscuridad. Cuando los peces alcanzaron un peso medio de 200g se transfirieron a tanques de 1000 L de capacidad. En estos tanques, el rango de temperatura fue de 21.2-24°C y el oxígeno disuelto de 6.0-8.0 ppm.

Previamente al suministro de las distintas dietas experimentales los peces se aclimataron en los tanques durante 2 semanas con la dieta control. Las dietas se suministraron hasta aparente saciedad, tres veces al día, durante 3 meses. Cada dieta experimental se ensayó por triplicado.

---

\* Comunicación personal: Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjærsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Rosenlund, G., 2002. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus auratus*) fed diets containing different lipid sources. *10<sup>th</sup> International Symposium on Nutrition and Feeding in Fish*. Rhodas (Grecia). 2-7 Junio 2002

Seis dietas experimentales se formularon en colaboración con la empresa noruega *Nutreco Aquaculture Research Centre A/S* y el *Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA)*. Las dietas fueron iso-energéticas e iso-protéicas (45%) y con un contenido de lípidos alrededor de un 22%. Aceite de pescado fue la única fuente de lípidos añadida a la dieta 100P. El 60% del aceite de pescado se reemplazó por aceites vegetales, de soja, colza y lino en las dietas 60S, 60C, 60L, respectivamente. Y las dietas 80S y 80L se elaboraron reemplazando un 80% del aceite de pescado por aceite de soja y lino, respectivamente.

Las dietas elaboradas con aceites vegetales mantuvieron un nivel de n-3 HUFA por encima del 3 % para poder satisfacer los requerimientos en ácidos grasos esenciales de esta especie (MONTERO, 1996). La dieta 100P se caracterizó por un contenido superior en ácidos grasos saturados y en n-3HUFAs que el resto de las dietas. Además esta dieta también tuvo un porcentaje mayor de ácido araquidónico. La relación dietética n-3/n-6 varió entre las distintas dietas experimentales debido principalmente al contenido en ácido linoleico de los aceites vegetales usados, rondando el 0.46 y 0.30 para las dietas 60S y 80S, respectivamente. Inversamente, las dietas con aceite de lino mantuvieron la relación n-3/n-6 por encima de 2, en parte debido a su alto contenido en ácido linolénico. La dieta 60C se caracterizó por su alto contenido en monoeno, especialmente en 18:1n-9. Y las dietas 80S y 80L tuvieron un menor contenido en HUFA que el resto de las dietas, especialmente en ARA, EPA y DHA. La composición en ácidos grasos de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Algunos ácidos grasos de los lípidos totales de las dietas experimentales (g/100g a.g.).

	DIETA					
	100P	60S	60C	60L	80S	80L
14:0	6.21	3.18	3.11	3.09	1.10	1.94
16:0	18.51	15.45	12.43	12.21	14.24	10.89
16:1n-7	6.46	3.41	3.39	3.31	2.20	2.10
16:2n-6	1.15	0.60	0.57	0.58	0.37	0.36
17:1	1.28	0.63	0.63	0.62	0.37	0.35
16:4n-3	1.85	0.88	0.85	0.88	0.44	0.44
18:0	3.18	3.21	2.35	3.37	3.30	3.45
18:1n-9	16.26	18.48	36.84	17.03	21.07	18.71
18:1n-7	2.47	1.84	n.d.	1.54	n.d.	n.d.
18:2n-6	13.07	31.28	17.04	12.29	38.54	17.66
18:3n-6	0.21	0.12	0.10	0.11	0.07	0.07
18:3n-3	1.41	3.24	4.64	26.72	4.03	30.63
18:4n-3	1.43	0.79	0.76	0.78	0.48	0.54
20:1n-9	1.89	1.63	2.08	1.58	1.49	1.61
20:4n-6	0.54	0.34	0.33	0.36	0.25	0.23
20:4n-3	0.43	0.25	0.26	0.25	0.22	0.19
20:5n-3	11.19	5.88	5.84	6.19	3.73	3.79
22:1n-11	1.95	1.49	2.13	2.13	2.01	1.78
22:1n-9	0.14	0.22	0.03	0.03	0.03	0.08
22:3n-6	0.53	0.33	0.29	0.29	0.22	0.22
22:4n-6	0.25	0.21	0.17	0.18	0.16	0.15
22:4n-3	0.19	0.15	0.12	0.14	0.10	0.08
22:5n-3	1.16	0.75	0.63	0.79	0.50	0.45
22:6n-3	4.99	3.20	3.26	3.58	2.36	2.92
Σ Saturados	27.9	21.84	17.89	18.67	18.64	16.28
Σ Monoenos	30.45	27.70	45.10	26.24	27.17	24.63
Σ n-3	22.65	15.14	16.36	39.33	11.86	39.04
Σ n-6	15.75	32.88	18.50	13.81	39.61	18.69
Σ n-9	18.29	20.33	38.95	18.64	22.59	20.40
Σ n-3 HUFA	17.96	10.23	10.11	10.95	6.91	7.43
Σ n-6 HUFA	1.32	0.88	0.79	0.83	0.63	0.60
n-3/n-6	1.44	0.46	0.88	2.85	0.30	2.09

Al final del experimento, se tomaron 4 muestras de intestino anterior por tanque para el estudio histológico, con un total de 12 intestinos para cada dieta experimental. Se seleccionó el tramo de intestino anterior considerando que en experiencias previas sobre enzimas lipolíticas, ésta porción de intestino presentó una alta actividad lipásica y fosfolipásica, lo que sugiere la importancia de este segmento para la digestión y absorción de los lípidos dietéticos (IZQUIERDO *et al.*, 1997). Además, en el presente estudio las muestras se recogieron 4 horas tras la alimentación, periodo de tiempo determinado por la presencia de la digesta en el tracto digestivo desde el estómago hasta el recto en cada uno de los peces.

La totalidad de la mucosa intestinal del intestino anterior se examinó al microscopio óptico (siguiendo un orden en la visualización de los campos al microscopio). Para el estudio ultraestructural, cada muestra de intestino anterior se troceó en pequeñas piezas y se embebió en los correspondientes bloques en resina. Dos bloques por muestra se tomaron al azar. De cada uno de estos bloques se realizó al azar un corte de la mucosa intestinal, que se colocó sobre una rejilla de cobre para su estudio empleando el microscopio electrónico. De cada rejilla se examinaron aproximadamente 10 campos por sección, usando los bordes de la rejilla de cobre como guías. Se examinó un total de 120 campos por dieta.

Un análisis morfométrico se realizó sobre negativos de fotos tomadas en el microscopio electrónico, calculando el porcentaje de epitelio intestinal ocupado por vacuolas lipídicas o espacios intercelulares (ver apartado 2.4.5.2 de Material y Métodos). Este último porcentaje se realizó para evaluar la acumulación de lipoproteínas en dichos espacios.

La extracción de los lípidos totales de las muestras de intestino anterior se realizó siguiendo el método de FOLCH *et al.*, (1957) descrito en el apartado 2.5.3 de Material y Métodos. Las fracciones de los triacilgliceroles (TAG), los ácidos grasos libres (AGLs) y los lípidos polares (LP) se separaron mediante cromatografía de capa fina (Thin-layer chromatography, TLC) usando hexano:dietileter:ácido acético

glacial (80:20:1, v/v) como solvente de desarrollo. Las placas de sílica se pulverizaron con 2',7'-diclorofluoresceína al 0.2% en etanol y se expusieron bajo luz ultravioleta para la visualización e identificación de las respectivas bandas. Las bandas de TAG, AGLs y LP se rasparon y transfirieron a tubos con cloroformo:hexano (1:1, v/v) en el caso de TAG y AGLs y con cloroformo:metanol (1:1, v/v) para LP, y se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 minutos. El solvente se evaporó con N<sub>2</sub> y los lípidos se cuantificaron. Posteriormente para la determinación de los ácidos grasos de cada fracción se procedió a la metilación de éstos como ha sido descrito en el apartado 2.5.6 de Material y Métodos. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos así obtenidos se purificaron y se determinaron usando cromatografía en fase líquida y gaseosa (GLC) usando las condiciones descritas por IZQUIERDO *et al.*, (1990).

#### **5.4.2 RESULTADOS**

##### *Histología del intestino anterior*

No se observaron daños en la mucosa intestinal tales como pérdida de microvillosidades, necrosis, degeneración o vacuolización autolítica de organelas celulares en ningún grupo experimental. De modo que solamente se encontraron diferencias en la cantidad, tamaño o localización del material lipídico entre los distintos grupos experimentales.

Las doradas alimentadas con la dieta 100P mostraron una mucosa intestinal de apariencia normal con vacuolas lipídicas de pequeño tamaño en el citoplasma de los enterocitos en aquellas zonas de los pliegues intestinales en contacto más directo con el lumen. Además, los espacios intercelulares y lámina propia estaban ocupados por material lipídico que se detectó con la tinción AT&FB (técnica de tinción

específica para lípidos) (Fig. 53a). El estudio ultraestructural confirmó la presencia de vacuolas lipídicas de un diámetro medio de 1.9-3.0 $\mu$ m en el citoplasma de los enterocitos. En los espacios intercelulares se observaron partículas de lipoproteínas (Fig. 53b). El tamaño de estas partículas oscilaba de 300 a cerca de 800nm de diámetro (Fig. 53c), entrando en el tamaño de las lipoproteínas del tipo quilomicron, en concordancia con diversos trabajos (CHAPMAN *et al.*, 1978; SIRE *et al.*, 1981; EZEASOR y STOKOE, 1981).

A lo largo de toda la mucosa intestinal de las doradas alimentadas con la dieta 60S se observó un gran acumulo de material lipídico entre los espacios intercelulares principalmente en la parte basal del epitelio y en la lámina propia (Figs. 54a y 54b). A nivel ultraestructural, la parte apical del citoplasma contenía numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso ocupadas en su interior por pequeñas partículas lipídicas (Fig. 54c). En la parte basal del epitelio, los espacios intercelulares estaban ampliamente dilatados como consecuencia de una intensa acumulación de partículas lipoprotéicas. La mayoría de estas partículas tenían un diámetro medio que oscilaba entre 56-133nm, tamaño correspondiente a lipoproteínas del tipo VLDL, (SIRE *et al.*, 1981; DEPLANO *et al.*, 1989), aunque algunas partículas excedían de los 360nm de diámetro (Fig. 54d).

La mucosa del intestino anterior de las doradas alimentadas con la dieta 60C, presentó una acumulación de vacuolas lipídicas en la zona apical de los pliegues intestinales superior a la observada en la dieta 100P. En la lámina propia se observó material lipídico (Fig. 55a). Ultraestructuralmente, se confirmó la presencia de vacuolas lipídicas principalmente supranucleares de un tamaño aproximado entre 2.0 y 3.0  $\mu$ m de diámetro, que en ocasiones ocupaban gran parte del citoplasma de los enterocitos (Fig. 55b). En los espacios intercelulares y lámina propia se observaron partículas de lipoproteínas de un tamaño similar a las del grupo experimental 100P (tamaño medio de 300-800 nm) (Fig. 55c).

Las doradas alimentadas con la dieta 60L mostraron una mucosa intestinal con vacuolas lipídicas, aunque no fueron tan numerosas como las observadas para la dieta 60C, de un tamaño medio de diámetro entre 1.8-3.0  $\mu\text{m}$  (Fig. 56a). Al microscopio electrónico se evidenció un acumulo de partículas lipoprotéicas en los espacios intercelulares y lámina propia inferior al encontrado para la dieta 60S, donde predominan aquellas de un diámetro superior a 500nm semejante a las dietas 100P y 60C. (Figs. 56b y 56c).

Las doradas alimentadas con las dietas 80S y 80L mostraron una mucosa intestinal con una intensa acumulación de vacuolas lipídicas de gran tamaño localizadas a lo largo de todo el enterocito (Figs. 57a y 58a). Ultraestructuralmente, se observó como el acumulo de estas vacuolas ocupaba por completo el citoplasma del enterocito, desplazando al núcleo celular y a otras estructuras celulares (Figs. 57b y 58b). Sin embargo, en el grupo 80S la mayoría de las lipoproteínas observadas principalmente en la lámina propia tenían un tamaño inferior a 100nm (Fig. 57c) similares a las observadas en el grupo 60S, mientras que en el grupo 80L se observó la presencia de lipoproteínas de un tamaño mayor comprendido entre 500-800 nm de diámetro, semejantes a las observadas en los grupos 100P, 60C y 60L.

### ***Análisis morfométrico***

La Tabla 22 muestra el porcentaje de epitelio intestinal ocupado por vacuolas lipídicas y por espacios intercelulares de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales.

El epitelio intestinal de doradas alimentadas con la dieta 100P mostró significativamente ( $P < 0.05$ ) un bajo porcentaje de vacuolas lipídicas con respecto al resto de los grupos experimentales. Los grupos 60S y 60L tuvieron significativamente similar porcentaje de vacuolas, siendo aproximadamente 2.3

veces mayor que el grupo 100P. Los mayores porcentajes ( $P < 0.05$ ) se obtuvieron en los grupos 60C, 80S y 80L, siendo aproximadamente 5 veces más altos que el grupo 100P.

Con respecto al porcentaje de epitelio ocupado por los espacios intercelulares, los intestinos de doradas alimentadas con la dieta 60S tuvieron mayores porcentajes significativamente ( $P < 0.05$ ) que el resto de dietas. En las dietas 60C, 80S y 80L donde el porcentaje de epitelio ocupado por vacuolas lipídicas fue alto, se encontraron bajos porcentajes de espacios intercelulares, aunque estos no difirieron significativamente de la dieta 100P. El grupo 60L mostró un porcentaje relativamente alto, aunque fue significativamente similar al grupo 100P.

Tabla 22. Porcentaje de epitelio intestinal ocupado por vacuolas lipídicas y por espacios intercelulares en doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales\*

DIETA	% Vacuolas lipídicas	% Espacios intercelulares
100P	$3.22 \pm 0.87^a$	$2.50 \pm 0.70^{ab}$
60S	$6.63 \pm 1.32^b$	$4.60 \pm 0.60^c$
60L	$7.11 \pm 0.54^b$	$3.54 \pm 0.87^b$
60C	$12.40 \pm 1.12^c$	$1.97 \pm 0.50^a$
80S	$10.51 \pm 2.07^c$	$1.55 \pm 0.24^a$
80L	$13.04 \pm 2.36^c$	$1.80 \pm 0.55^a$

\* Valores con diferente letra en la misma columna son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ); (media  $\pm$  sd).

***Composición de ácidos grasos de las principales clases lipídicas del intestino anterior***

La Tabla 23 muestra los porcentajes en peso seco de ácidos grasos libres, triacilgliceroles y fosfolípidos del total de lípidos del intestino anterior de doradas alimentadas con las diferentes dietas experimentales. Aproximadamente un 15% correspondió a triacilgliceroles. Los lípidos polares representaron aproximadamente un 5%, y los ácidos grasos libres un 3.5%. Para ninguna de las clases lipídicas se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

Tabla 23. Porcentajes de lípidos totales y de las principales clases lipídicas del intestino anterior de doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales\*

	DIETA					
	100P	60S	60C	60L	80S	80L
% Lípidos (p.s.)	39.4±5.8	47.0±8.8	37.4±1.4	38.0±10.5	37.0±4.3	43.0±4.1
Ácidos g. libres	3.2±1.1	3.3±1.6	3.9±1.4	3.7±1.0	3.1±0.5	3.2±1.5
Triacilgliceroles	15.9±3.6	16.7±7.0	13.4±2.6	12.0±4.1	16.5±3.6	13.7±2.7
Lípidos polares	5.1±1.1	5.0±1.3	5.1±1.7	5.6±2.7	4.0±0.3	6.0±0.9

\* Valores con diferente letra en la misma línea son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ); (media  $\pm$  sd); n=6x3.

La Tabla 24 y la Fig. 59 muestran la composición de los ácidos grasos libres de los lípidos totales de intestino de los peces alimentados con las dietas experimentales.

En todos los grupos experimentales el contenido de ácidos grasos saturados fue superior al de las dietas, debido principalmente a un aumento del 18:0 en los intestinos. El contenido de 18:1n-9 de los AGLs fue significativamente mayor ( $P<0.05$ ) en los intestinos de los peces alimentados con la dieta 60C. Los intestinos de los peces alimentados con las dietas 60S y 80S tuvieron significativamente ( $P<0.05$ ) los mayores contenidos en 18:2n-6, y los de las dietas 60L y 80L en 18:3n-3, reflejando el perfil de ácidos grasos de las dietas.

El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados fue alto en todos los grupos experimentales, debido básicamente a un aumento de los niveles de 20:5n-3 y 22:6n-3. Aunque existieron diferencias entre las distintas dietas, así, los intestinos de los peces alimentados con la dieta 100P tuvieron significativamente ( $P<0.05$ ) mayor porcentaje de EPA que el resto de dietas. El nivel de DHA fue mayor ( $P<0.05$ ) en los intestinos de las doradas de las dietas 100P y 60L, aunque no difirió significativamente del resto de los grupos experimentales, excepto del grupo 80L. El contenido de 20:4n-6 también fue superior en los AGLs que en las dietas, encontrándose significativamente ( $P<0.05$ ) un mayor porcentaje en los intestinos de la dieta 100P que en el resto de los grupos experimentales.

Tabla 24. Composición de ácidos grasos libres de los lípidos de intestino de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales (g/100 a.g.)\*

	DIETA					
	100P	60S	60C	60L	80S	80L
14:0	3.4±0.6	1.8±0.2	1.9±0.3	1.6±0.2	1.3±0.1	1.4±0.2
16:0	18.7±2.4 <sup>a</sup>	16.0±2.4 <sup>ab</sup>	14.3±0.4 <sup>ab</sup>	14.4±0.9 <sup>ab</sup>	15.0±1.2 <sup>ab</sup>	13.0±1.2 <sup>b</sup>
16:1n-7	5.5±0.6	2.4±0.6	3.0±0.5	2.3±0.2	2.0±0.1	2.2±0.1
17:0	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
18:0	5.9±0.7 <sup>a</sup>	5.0±0.8 <sup>a</sup>	4.7±0.3 <sup>a</sup>	6.2±0.7 <sup>a</sup>	5.6±1.0 <sup>a</sup>	6.5±0.2 <sup>a</sup>
18:1n-9	14.4±0.5 <sup>a</sup>	16.6±5.0 <sup>a</sup>	35.6±2.8 <sup>b</sup>	14.7±0.6 <sup>a</sup>	16.3±0.9 <sup>a</sup>	17.1±1.1 <sup>a</sup>
18:1n-7	3.3±0.2	2.5±0.3	nd	1.5±1.2	2.6±0.4	2.2±0.2
18:2n-6	6.2±1.2 <sup>a</sup>	25.2±1.4 <sup>d</sup>	15.9±0.5 <sup>c</sup>	11.7±0.4 <sup>b</sup>	37.2±1.0 <sup>e</sup>	16.7±0.5 <sup>c</sup>
18:3n-9	0.3±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0	0.2±0.1	0.0±0.0	0.3±0.3
18:3n-6	0.2±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1
18:4n-6	0.3±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
18:3n-3	0.7±0.1 <sup>a</sup>	2.3±0.7 <sup>a</sup>	3.5±0.1 <sup>a</sup>	15.9±1.7 <sup>b</sup>	2.7±0.1 <sup>a</sup>	24.3±0.7 <sup>c</sup>
18:4n-3	0.8±0.1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.4±0.1	0.2±0.1	0.4±0.1
20:0	0.1±0.0	0.2±0.1	0.2±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.2±0.1
20:1n-9	0.8±0.1	0.7±0.1	1.2±0.0	0.7±0.0	0.8±0.2	0.9±0.2
20:2n-6	0.1±0.0	0.4±0.1	0.3±0.0	0.2±0.1	0.6±0.1	0.7±0.0
20:4n-6	1.9±0.2 <sup>a</sup>	1.2±0.2 <sup>b</sup>	1.0±0.3 <sup>b</sup>	1.5±0.3 <sup>ab</sup>	0.9±0.1 <sup>b</sup>	0.9±0.1 <sup>b</sup>
20:4n-3	0.5±0.1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
20:5n-3	17.7±2.3 <sup>a</sup>	10.0±3.3 <sup>b</sup>	6.9±2.5 <sup>b</sup>	11.0±1.0 <sup>b</sup>	5.0±0.8 <sup>b</sup>	4.6±0.1 <sup>b</sup>
22:0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0
22:1n-11	0.6±0.0	0.5±0.0	0.8±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1	0.8±0.3
22:3n-6	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.1	nd	0.1±0.0
22:4n-6	0.2±0.1	0.1±0.1	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
22:5n-3	2.0±0.2	1.5±0.3	1.3±0.1	2.0±0.3	1.0±0.2	1.0±0.0
22:6n-3	11.8±2.0 <sup>a</sup>	10.2±3.4 <sup>ab</sup>	5.9±2.4 <sup>ab</sup>	11.7±0.2 <sup>a</sup>	6.0±2.6 <sup>ab</sup>	4.6±0.9 <sup>b</sup>
Saturados	29.0±3.4 <sup>a</sup>	23.6±3.2 <sup>ab</sup>	21.9±1.0 <sup>ab</sup>	23.0±1.6 <sup>ab</sup>	22.6±2.3 <sup>ab</sup>	21.7±1.4 <sup>b</sup>
Monoenos	26.6±0.5	23.4±6.1	41.1±3.5	20.2±0.6	22.7±1.3	23.5±1.7
n-3	31.9±2.4	24.5±6.4	18.7±5.0	41.9±2.6	15.3±3.5	36.0±0.5
n-6	9.3±2.0	27.5±1.7	17.7±0.2	14.1±1.0	39.1±0.8	18.2±0.5
n-9	16.3±0.1	17.7±5.3	37.0±2.9	16.0±0.5	17.2±0.8	18.2±1.1
n-3HUFA	29.9±2.5	22.0±6.9	14.5±5.1	25.5±1.0	12.2±3.6	11.1±1.0
n-3/n-6	3.5±0.5	0.9±0.2	1.1±0.3	3.0±0.4	0.4±0.1	2.0±0.0

\* Valores con diferente letra en la misma línea son significativamente diferentes (P < 0.05); (media ± sd); n=3.

La Tabla 25 y la Fig. 60 muestran la composición de triacilgliceroles de los lípidos totales de intestino de los peces alimentados con las dietas experimentales.

En general, los triacilgliceroles se caracterizaron por presentar un alto contenido de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos de 18 carbonos. Entre los ácidos grasos saturados, el 16:0 se encontró en mayor porcentaje, principalmente en el grupo 100P. Una alta reesterificación del 18:1n-9 se observó en los triacilglicéridos del intestino de los peces de la dieta 60C, así como una alta incorporación del 18:2n-6 en los intestinos de peces alimentados con las dietas 60S y 80S, y del 18:3n-3 en los alimentados con las dietas 60L y 80L, reflejando el perfil de ácidos grasos de las dietas. No obstante, hay que resaltar que el 18:2n-6 se incorporó en mayor cantidad en los TAG que el ácido oleico ó linolénico.

En todos los grupos experimentales la incorporación de 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3 en los triacilglicéridos fue baja, incluso por debajo de los niveles dietéticos de estos ácidos grasos. Aunque los intestinos de doradas alimentadas con la dieta 100P presentaron un mayor porcentaje ( $P < 0.05$ ) de dichos ácidos grasos que el resto de los grupos experimentales, que mantuvieron un nivel similar en ARA, EPA y DHA sin diferencias significativas entre ellos.

Tabla 25. Composición de triacilglicéridos de los lípidos de intestino de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales (g/100 a.g.)\*

	DIETA					
	100P	60S	60C	60L	80S	80L
14:0	8.3±0.3	3.6±0.1	3.6±0.4	3.5±0.1	2.2±0.1	2.2±0.1
16:0	19.0±0.7 <sup>a</sup>	14.8±0.1 <sup>b</sup>	14.5±2.1 <sup>b</sup>	12.9±0.4 <sup>bc</sup>	14.6±1.9 <sup>b</sup>	10.4±0.5 <sup>c</sup>
16:1n-7	9.9±0.5	4.2±0.1	3.6±0.4	4.2±0.4	2.7±0.1	3.0±0.6
17:0	0.4±0.1	0.2±0.0	0.3±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
18:0	3.1±0.2 <sup>ab</sup>	3.1±0.1 <sup>ab</sup>	2.7±0.3 <sup>a</sup>	3.5±0.5 <sup>ab</sup>	3.8±0.6 <sup>b</sup>	3.5±0.2 <sup>ab</sup>
18:1n-9	20.5±2.7 <sup>a</sup>	21.2±2.0 <sup>ab</sup>	42.5±2.2 <sup>c</sup>	20.3±0.8 <sup>a</sup>	21.7±0.9 <sup>ab</sup>	20.6±1.1 <sup>ab</sup>
18:1n-7	3.5±0.2	2.7±0.2	4.1±0.0	2.3±0.3	1.6±1.3	1.8±0.2
18:2n-9	0.3±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0
18:2n-6	6.8±0.6 <sup>a</sup>	34.5±1.2 <sup>d</sup>	15.9±1.0 <sup>bc</sup>	13.0±0.6 <sup>b</sup>	40.0±1.7 <sup>e</sup>	17.1±0.9 <sup>c</sup>
18:3n-9	0.4±0.0	0.2±0.2	0.1±0.0	0.2±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
18:3n-6	0.3±0.0	0.2±0.2	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
18:4n-6	0.3±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0
18:3n-3	0.8±0.0 <sup>a</sup>	3.3±0.1 <sup>ab</sup>	4.0±0.4 <sup>b</sup>	27.1±0.6 <sup>c</sup>	3.7±0.6 <sup>ab</sup>	32.1±1.6 <sup>d</sup>
18:4n-3	1.8±0.0	0.7±0.1	0.5±0.1	0.8±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1
18:4n-1	0.5±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.1	0.2±0.0
20:0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.3±0.1	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0
20:1n-9	1.7±0.1	1.3±0.1	1.9±0.2	1.3±0.1	1.2±0.2	1.3±0.0
20:4n-6	0.4±0.0 <sup>a</sup>	0.2±0.0 <sup>b</sup>	0.1±0.0 <sup>b</sup>	0.2±0.0 <sup>b</sup>	0.1±0.0 <sup>b</sup>	0.1±0.0 <sup>b</sup>
20:4n-3	0.5±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0
20:5n-3	7.9±0.7 <sup>a</sup>	2.7±0.6 <sup>b</sup>	1.6±0.4 <sup>b</sup>	2.5±0.5 <sup>b</sup>	1.2±0.3 <sup>b</sup>	1.3±0.2 <sup>b</sup>
22:0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0
22:1n-11	1.5±0.2	1.3±0.1	1.7±0.3	1.3±0.2	1.3±0.2	1.5±0.1
22:4n-6	0.4±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
22:5n-3	1.8±0.3	0.8±0.1	0.6±0.1	0.8±0.2	0.5±0.1	0.4±0.1
22:6n-3	4.0±0.5 <sup>a</sup>	2.1±0.3 <sup>b</sup>	1.6±0.5 <sup>b</sup>	2.0±0.3 <sup>b</sup>	1.6±0.5 <sup>b</sup>	1.7±0.2 <sup>b</sup>
Saturados	31.4±1.4	22.3±0.1	21.8±3.0	20.7±0.8	21.5±2.3	16.8±0.7
Monoenos	39.2±0.6	30.6±0.5	51.8±0.7	30.2±1.1	29.1±0.3	28.2±1.0
n-3	17.8±1.2	10.4±1.1	9.0±1.5	34.2±1.5	8.0±1.7	36.9±2.0
n-6	8.4±0.8	35.4±1.0	16.5±1.0	13.7±0.4	40.6±1.5	17.4±0.9
n-9	24.6±2.7	22.8±2.2	44.6±2.4	22.0±0.7	23.3±1.0	22.2±1.1
n-3HUFA	13.5±1.3	5.9±0.7	4.1±1.0	5.8±0.0	3.6±1.0	4.0±0.5
n-3/n-6	2.1±0.0	0.3±0.0	0.5±0.1	2.5±0.2	0.2±0.0	2.1±0.2

\*Valores con diferente letra en la misma línea son significativamente diferentes (P < 0.05); (media ± sd); n=3.

La Tabla 26 y la Fig. 61 muestran la composición de los fosfolípidos de los lípidos totales de intestino de los peces alimentados con las dietas experimentales.

Un alto porcentaje en ácidos grasos saturados se encontró en los fosfolípidos, debido principalmente a un incremento significativo de los niveles de los ácidos grasos 16:0 y 18:0.

La cantidad de 18:1n-9 y 18:2n-6 en los PL fue menor que la encontrada en los triglicéridos, especialmente en el caso del ácido oleico. No obstante se mantuvieron las diferencias dietéticas de estos ácidos grasos en los PL del intestino. Así, los intestinos de doradas de la dieta 60C presentaron un mayor porcentaje de oleico y los de las dietas 60S y 80S de ácido linoleico. Aunque estas diferencias entre los distintos grupos no fueron tan marcadas como en el caso de los triacilglicerolos.

El nivel de 18:3n-3 en los fosfolípidos fue más bajo comparado con otros ácidos grasos de 18C. Las dietas 60L y 80L tuvieron significativamente ( $P<0.05$ ) los mayores contenidos de ácido linolénico, reflejando el perfil dietético de ácidos grasos.

En general, el incremento de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3, fue muy manifiesto en los fosfolípidos del intestino en todos los grupos experimentales. Aunque, el nivel ARA y EPA fue mayor significativamente ( $P<0.05$ ) en los intestinos del grupo 100P, y no hubo diferencias significativas en el nivel de DHA entre los distintos grupos experimentales.

Tabla 26. Composición de fosfolípidos de los lípidos de intestino de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales (g/100 a.g.)\*

	DIETA					
	100P	60S	60C	60L	80S	80L
14:0	2.0±0.3	1.1±0.2	1.2±0.1	1.1±0.1	0.8±0.1	0.9±0.0
15:0	1.0±0.1	0.7±0.2	0.6±0.1	0.7±0.2	0.7±0.1	0.6±0.2
16:0	22.8±0.9 <sup>a</sup>	20.9±1.0 <sup>a</sup>	18.8±1.4 <sup>ab</sup>	20.8±2.1 <sup>a</sup>	19.0±1.5 <sup>ab</sup>	13.7±5.6 <sup>b</sup>
16:1n-7	1.7±0.0	1.1±0.2	1.1±0.1	1.0±0.1	0.8±0.3	0.9±0.0
17:0	0.5±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.2	0.3±0.2	0.4±0.0
16:4n-1	1.0±0.1	0.8±0.0	0.7±0.2	1.0±0.4	1.0±0.2	1.0±0.3
16:4n-3	1.0±0.2	1.0±0.1	1.6±0.3	1.1±0.5	1.0±0.1	1.2±0.2
18:0	11.0±1.4 <sup>a</sup>	11.9±0.7 <sup>ab</sup>	9.8±1.0 <sup>a</sup>	14.5±0.6 <sup>b</sup>	11.7±1.4 <sup>ab</sup>	13.9±0.4 <sup>b</sup>
18:1n-9	8.6±0.7 <sup>a</sup>	11.4±2.3 <sup>a</sup>	17.5±1.6 <sup>b</sup>	11.0±1.6 <sup>a</sup>	9.9±1.0 <sup>a</sup>	11.1±1.3 <sup>a</sup>
18:1n-7	2.8±0.2	2.7±0.2	3.0±0.4	2.2±0.1	2.6±0.2	2.0±0.1
18:2n-6	2.8±0.2	14.3±1.4	10.1±1.0	6.8±0.4	20.7±2.1	10.9±1.7
18:3n-3	0.2±0.0 <sup>a</sup>	0.9±0.3 <sup>a</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>	5.6±0.6 <sup>b</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>	8.2±0.4 <sup>c</sup>
20:0	0.1±0.0	0.2±0.1	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.3±0.1
20:1n-9	0.6±0.0	0.7±0.1	1.0±0.1	0.7±0.0	0.6±0.1	0.8±0.0
20:2n-6	0.1±0.0	0.4±0.3	0.5±0.2	0.3±0.0	0.9±0.1	0.5±0.0
20:4n-6	2.5±0.2 <sup>a</sup>	1.8±0.1 <sup>b</sup>	2.1±0.3 <sup>ab</sup>	1.8±0.2 <sup>b</sup>	1.6±0.2 <sup>b</sup>	1.7±0.1 <sup>b</sup>
20:4n-3	0.3±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
20:5n-3	13.6±2.2 <sup>a</sup>	8.4±1.5 <sup>b</sup>	8.4±1.7 <sup>b</sup>	8.7±0.2 <sup>b</sup>	6.3±1.2 <sup>b</sup>	8.5±1.3 <sup>b</sup>
22:0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.0
22:1n-11	0.3±0.0	0.4±0.0	0.4±0.1	0.4±0.0	0.4±0.1	0.5±0.0
22:3n-6	0.2±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	±0.1
22:4n-6	0.3±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0	0.3±0.1
22:5n-3	2.9±0.2	2.4±0.3	2.6±0.1	2.4±0.4	2.2±0.1	2.3±0.2
22:6n-3	21.7±1.4 <sup>a</sup>	16.6±3.7 <sup>a</sup>	18.1±2.4 <sup>a</sup>	17.4±2.2 <sup>a</sup>	16.6±2.0 <sup>a</sup>	18.1±2.5 <sup>a</sup>
Saturados	38.5±1.0	35.5±1.6	29.7±1.0	37.9±2.6	32.9±3.3	29.7±5.8
Monoenos	14.6±0.9	16.8±2.7	22.3±0.7	15.0±0.9	14.6±1.7	15.7±1.5
n-3	38.6±0.7	29.7±5.3	33.8±3.1	36.0±2.6	27.2±2.9	39.3±3.6
n-6	6.4±0.5	17.1±1.6	13.1±1.3	9.6±0.5	23.8±2.3	13.8±1.9
n-9	9.4±0.9	12.3±2.4	17.7±0.0	12.1±1.3	10.9±1.3	12.2±1.3
n-3HUFAs	37.1±0.7	27.7±5.5	31.0±3.4	29.2±2.4	25.2±3.1	29.8±4.0
n-3/n-6	6.1±0.6	1.8±0.5	2.6±0.5	3.8±0.3	1.1±0.1	2.9±0.4

\* Valores con diferente letra en la misma línea son significativamente diferentes (P < 0.05); (media ± sd); n=3.

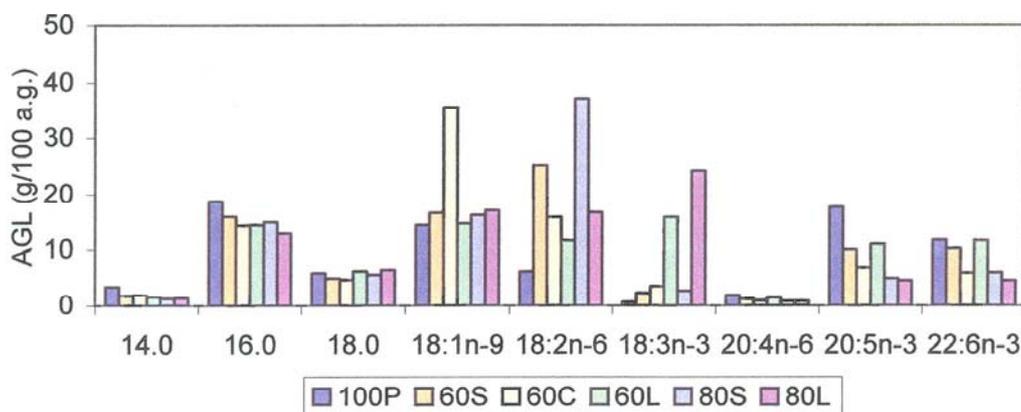


Fig. 59. Principales **ácidos grasos libres** del intestino anterior de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales

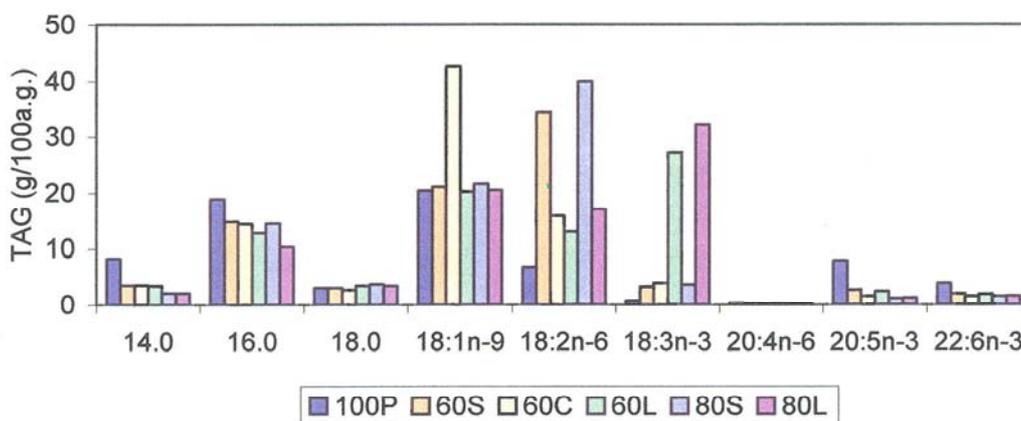


Fig. 60. Principales ácidos grasos de los **triacilgliceroles** del intestino anterior de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales

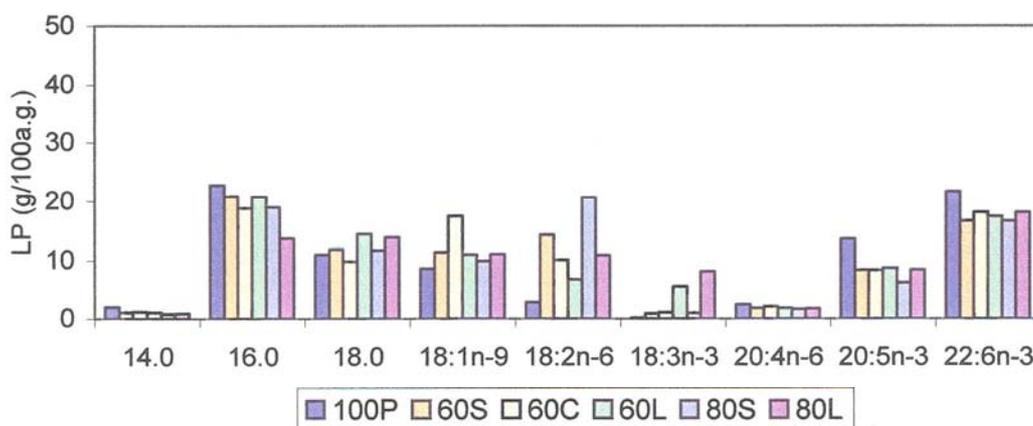


Fig. 61. Principales ácidos grasos de los **fosfolípidos** del intestino anterior de las doradas alimentadas con las distintas dietas experimentales

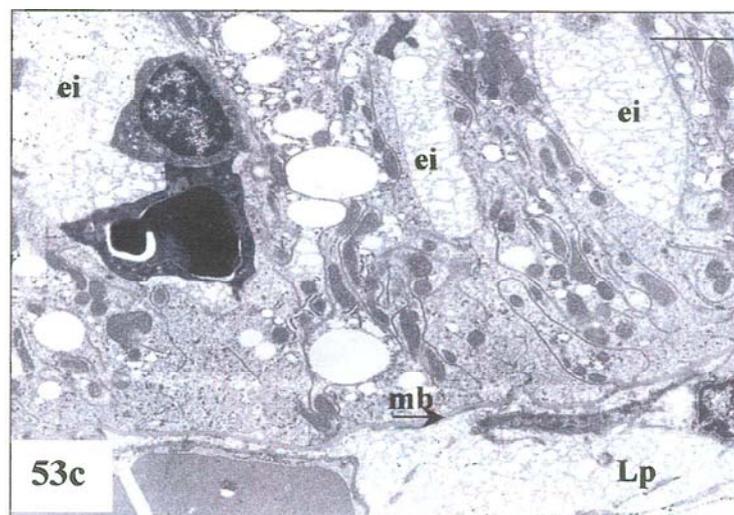
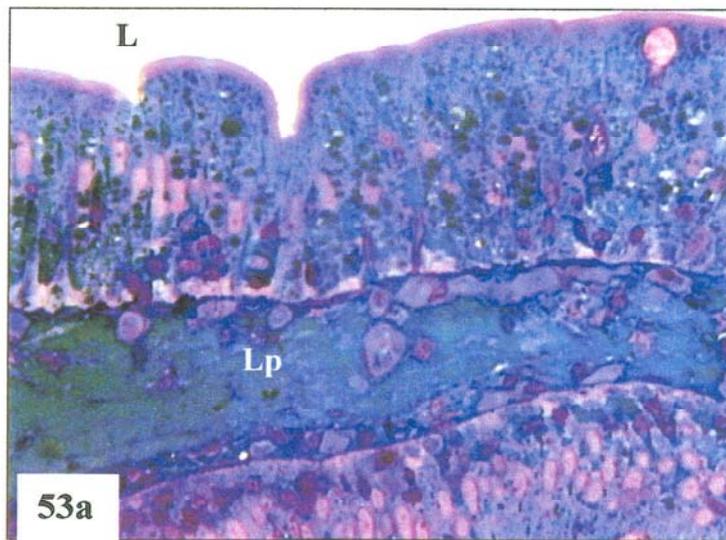
#### **5.4.4 ICONOGRAFÍA**

*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 100P*

Figura 53a. Corte semifino teñido con AT&FB. Vacuolas lipídicas de pequeño tamaño en el epitelio intestinal ( $\times 400$ ). Lp: Lámina propia

Figura 53b. ( $\times 2200$ ). Cm: célula mucosa; n: núcleo

Figura 53c. Partículas de lipoproteínas en los espacios intercelulares ( $\times 3900$ ). Ei: espacio intercelular; mb: membrana basal



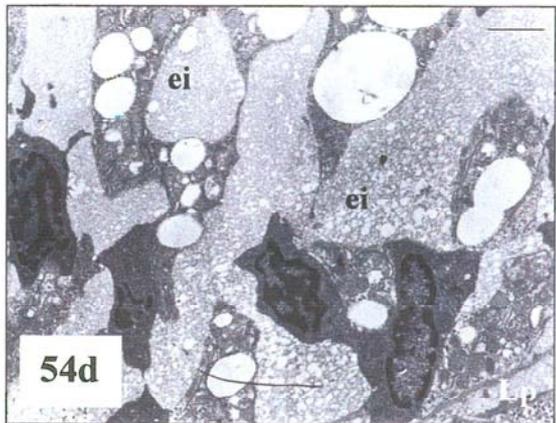
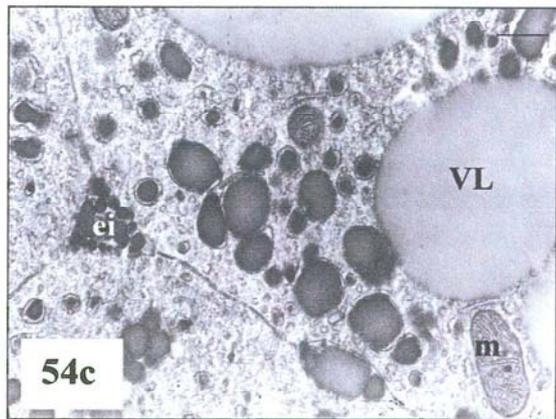
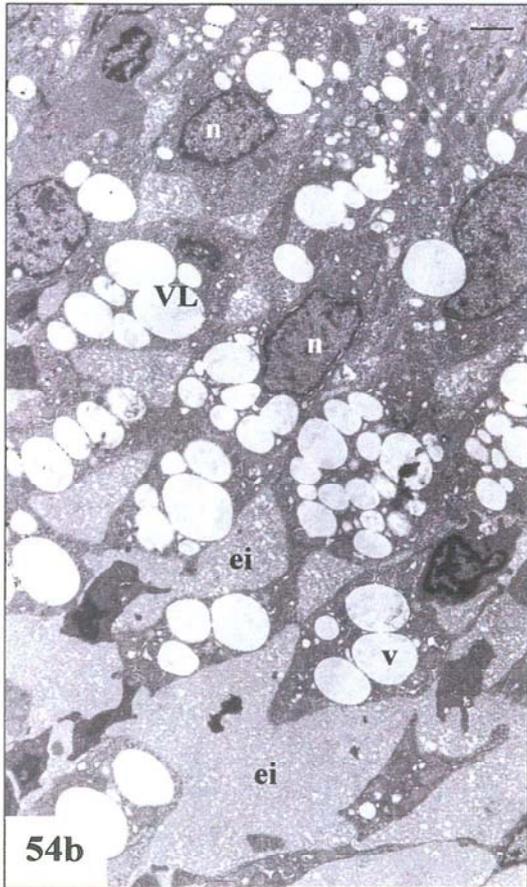
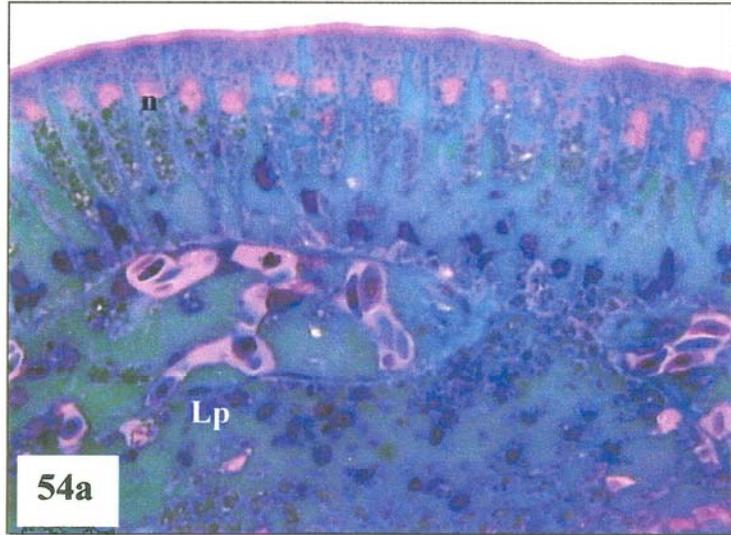
*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60S*

Figura 54a. Corte semifino teñido con AT&FB. Gran acúmulo de lípidos en los espacios intercelulares (×400)

Figura 54b. (×2200)

Figura 54c. Parte apical de un enterocito con cisternas del RER ocupadas por partículas de lipoproteínas (×15500)

Figura 54d. Parte basal del epitelio intestinal con acúmulo de lipoproteínas (×3900)

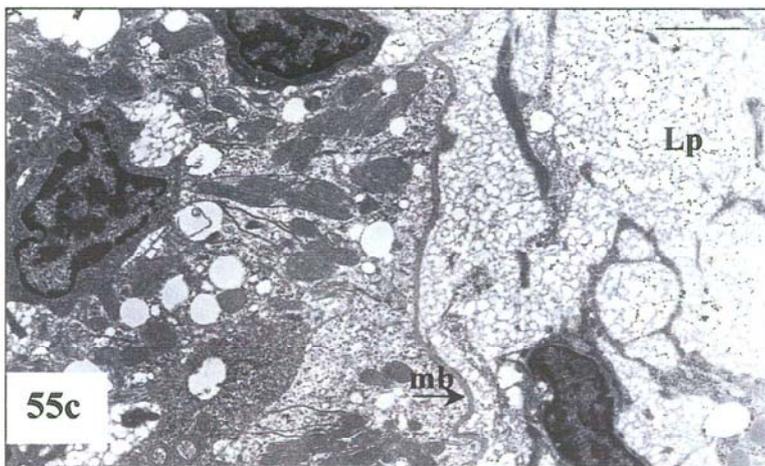
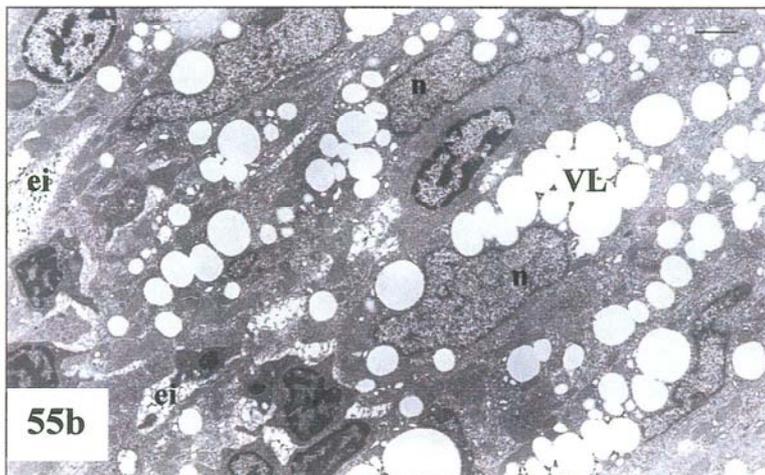
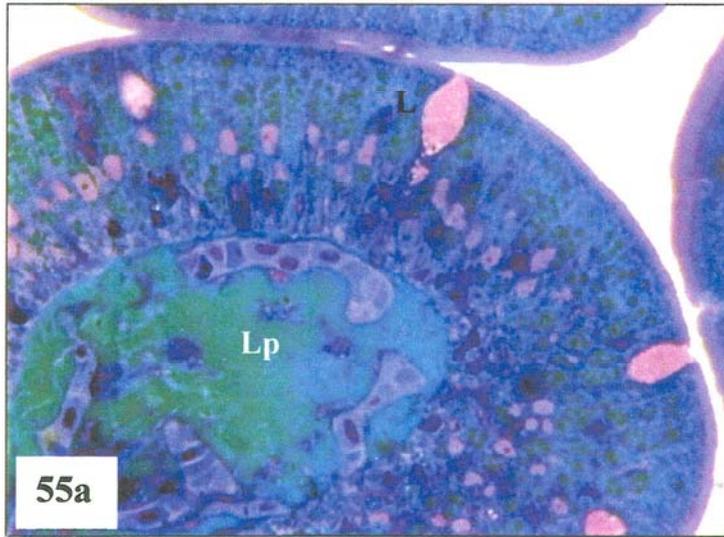


*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60C*

Figura 55a. Corte semifino teñido con AT&FB (×400)

Figura 55b. Vacuolas lipídicas en los enterocitos (×2200)

Figura 55c. Lipoproteínas en la lámina propia (×3900)

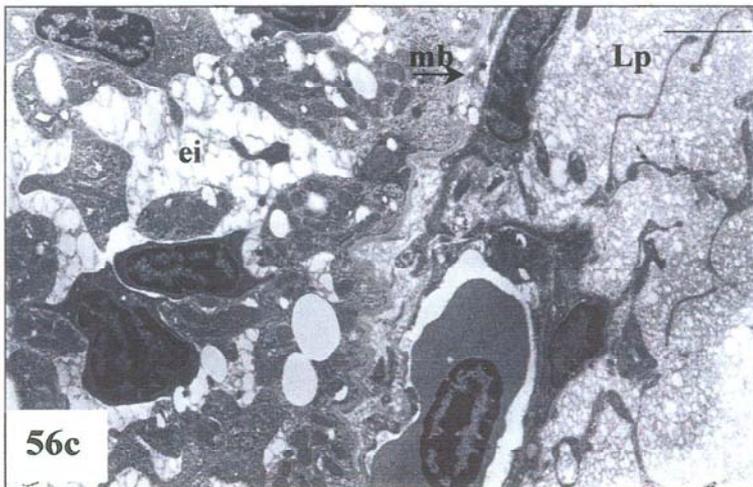
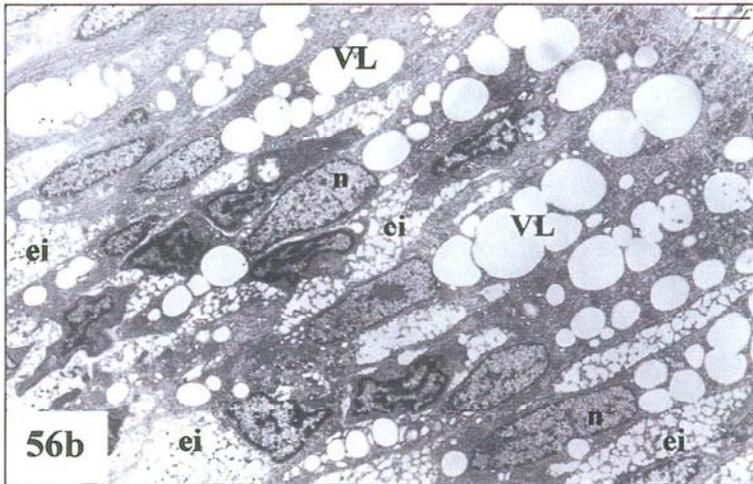
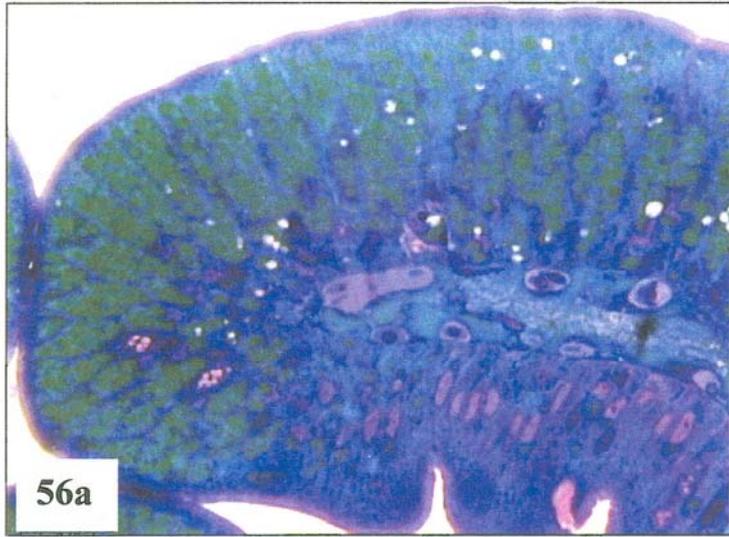


*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 60L*

Figura 56a. Corte semifino teñido con AT&FB (×400)

Figura 56b. Lipoproteínas en el espacio intercelular (×2200)

Figura 56c. Lipoproteínas en la lámina propia (×3900)

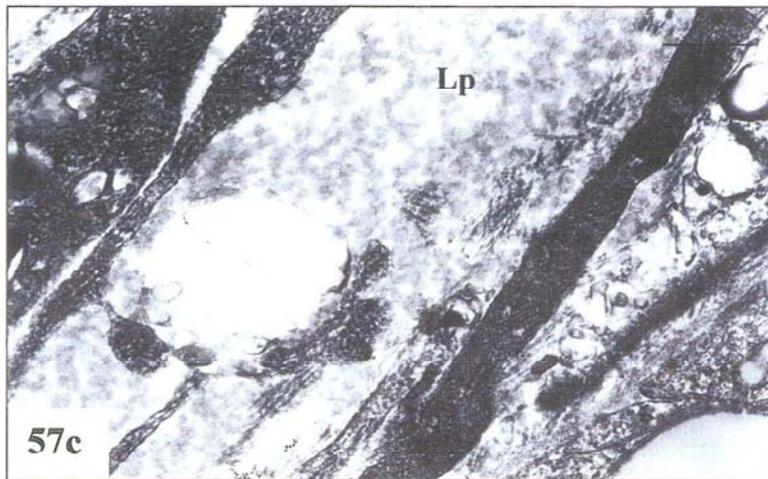
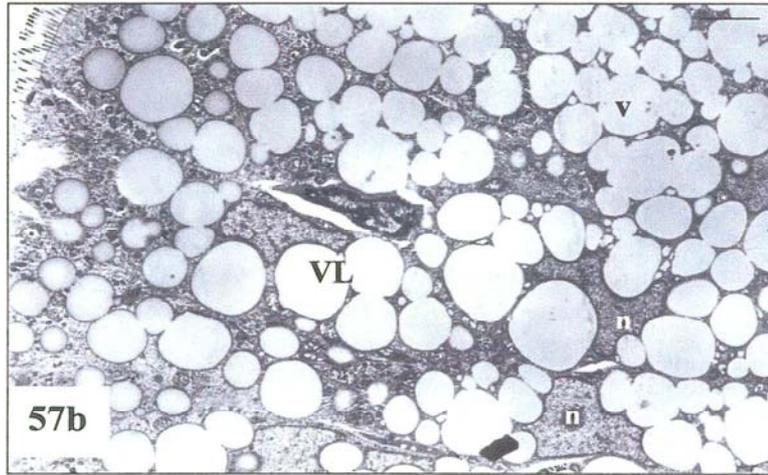
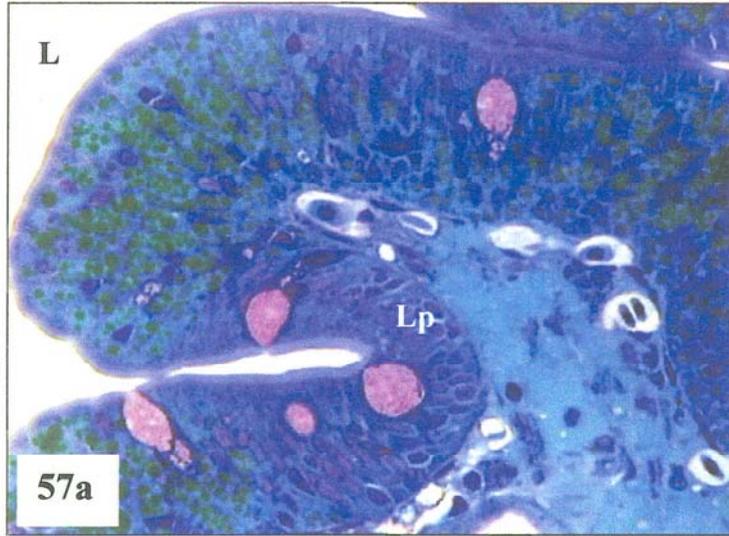


*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 80S*

Figura 57a. Corte semifino teñido con AT&FB (×400)

Figura 57b. (×2200)

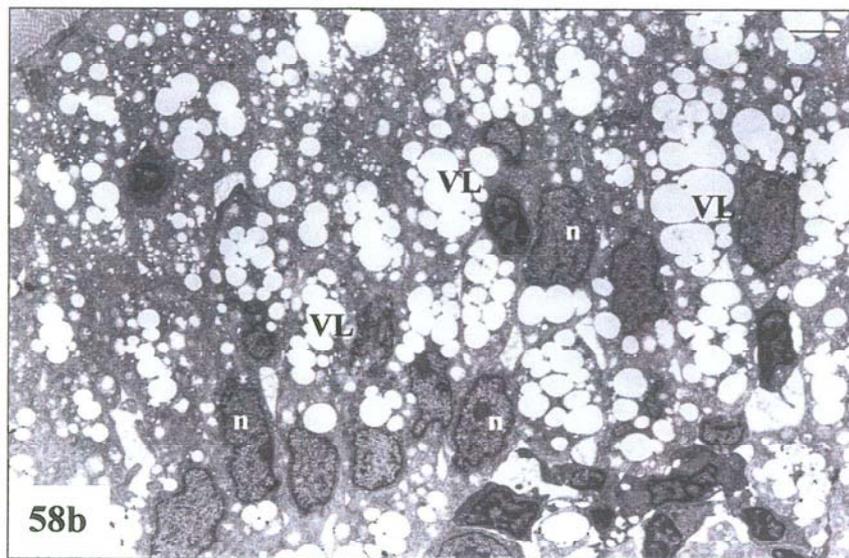
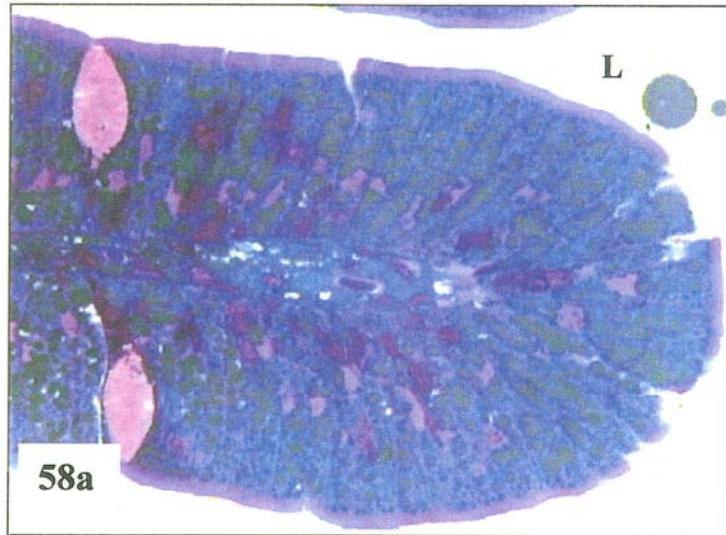
Figura 57c. Lipoproteínas en la lámina propia (Lp) (×15500)



*Intestino anterior de doradas alimentadas con la dieta 80L*

Figura 58a. Corte semifino teñido con AT&FB (×400)

Figura 58b. (×1650)



### 5.4.3 DISCUSIÓN

En el presente estudio, los intestinos presentaron un porcentaje relativamente alto de ácidos grasos libres en comparación con cualquier otro tejido (POLVI y ACKMAN, 1992; McCLELLAND *et al.*, 1995). RODRÍGUEZ *et al.*, (2001) también encontraron una cantidad alta de AGLs en los enterocitos de dorada aislados de diferentes tramos del intestino. Este resultado refleja el proceso de predigestión de los lípidos dietéticos que se lleva a cabo en el lumen intestinal, por el cual la mayoría de los triacilgliceroles de la dieta son hidrolizados en ácidos grasos libres para que puedan atravesar la membrana del enterocito. A este respecto, OLSEN *et al.*, (1998) encontraron altas cantidades de ácidos grasos libres en la digesta de peces, sugiriendo la predominancia de la enzimas lipásicas no específicas en el intestino de los peces, que degradan los TAGs de la dieta principalmente en AGLs. Por otro lado, el perfil de ácidos grasos libres del intestino fue similar al de las dietas. Aunque es interesante resaltar que para todos los grupos experimentales el contenido de ácidos grasos saturados en los AGLs fue ligeramente mayor que su nivel dietético, e incluso fue también más alto en los lípidos polares, lo que parece denotar una posible biosíntesis endógena de ácidos grasos saturados en los enterocitos. En cuanto al contenido de ácidos grasos insaturados de 18 carbonos, los AGLs de los intestinos reflejaron el perfil de las dietas, así se encontró un alto porcentaje de 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 en los intestinos de las dietas 60C, 60S;80S y 60L;80L, respectivamente. Estos resultados sugieren que el intestino asimila fácilmente los ácidos grasos dietéticos en sus lípidos, incluso más rápidamente que cualquier otro tejido. Sin embargo hay que destacar que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en los intestinos fue bastante superior al de las dietas, básicamente por el incremento en los ácidos grasos 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3. Este hecho parece indicar que la célula intestinal tiene preferencia por la asimilación de los PUFAs, lo que podría estar asociado a la alta afinidad que la proteína fijadora de ácidos grasos (FABP) posee sobre estos ácidos grasos, facilitando su absorción (SIRE y VERNIER, 1981). Además es conocido que en peces los PUFAs son buenos

sustratos para la actividad lipolítica de las enzimas digestivas (KOVEN *et al.*, 1994; IZQUIERDO *et al.*, 2000).

El porcentaje más alto de los lípidos del intestino anterior correspondió a triacilglicéridos, aproximadamente un 15% del total de lípidos en peso seco. En trucha, SIRE *et al.*, (1981) encontraron que una alta proporción (aproximadamente un 77%) de (1-<sup>14</sup>C) ácido palmítico ó de (1-<sup>14</sup>C) ácido linoleico es incorporado a los triglicéridos. Este hecho refleja el proceso de reacilación llevado a cabo en la célula intestinal, por el cual los ácidos grasos absorbidos son reesterificados en triglicéridos antes de ser integrados en las lipoproteínas para su transporte. En el presente estudio, los ácidos grasos insaturados de 18 carbonos se esterificaron fundamentalmente en triglicéridos. Además, las variaciones en la composición de estos ácidos grasos entre las distintas dietas se reflejaron claramente en el perfil de ácidos grasos de los triacilglicéridos, destacando la incorporación de 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 en los intestinos de los peces alimentados con las dietas conteniendo aceite de colza, soja y lino, respectivamente. Sin embargo, los triacilgliceroles mostraron un bajo contenido de n-3HUFAs en todos los grupos experimentales. Aunque hay que señalar, que a pesar de que en las dietas con 80% de sustitución del aceite de pescado los niveles de EPA y DHA fueron más bajos, curiosamente los valores de estos ácidos grasos en los intestinos fueron similares a las otras dietas difirieron solamente de los del grupo 100P.

La proporción de lípidos polares en los intestinos fue alrededor de un 5% del total de lípidos en peso seco. La importancia de los fosfolípidos en el intestino esta asociada principalmente al proceso de síntesis de lipoproteínas. En las cisternas del retículo endoplásmico se lleva a cabo la síntesis de fosfolípidos principalmente por la vía de reacilación *glicerol-3-fosfato*. Posteriormente estos LP son conjugados con los TAG, colesterol y apoproteínas, constituyendo las lipoproteínas. Los resultados del presente estudio muestran que los fosfolípidos son la principal forma de transporte de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del 20:5n-3 y 22:6n-3 que se esterificaron altamente en los lípidos polares. Estos resultados están en concordancia

con otros estudios (PÉREZ *et al.*, 1999), donde una alta incorporación de EPA y DHA se encontró en la fracción polar de los enterocitos de trucha. Este hecho podría estar relacionado con la alta afinidad de la enzima *1-lisofosfatidilacilCoA transferasa* por los ácidos grasos poliinsaturados (GURR y HARWOOD, 1991), denotando la importancia que el EPA y DHA tienen en el mantenimiento de la estructura y funciones de las membranas celulares (SARGENT *et al.*, 1995). Asimismo es interesante resaltar, que de igual modo que se encontró en los triacilgliceroles, el contenido de EPA en los LP fue mayor significativamente en los peces alimentados con la dieta 100P, manteniéndose sin embargo los niveles de DHA en el resto de los grupos experimentales. IZQUIERDO *et al.*, (2001) mostraron una predominancia por la incorporación del DHA en los LP de larvas de dorada, aunque existan variaciones dietéticas en el contenido de n-3HUFAs, denotando la alta afinidad de las enzimas PC y PE  *sintetasas* por el DHA particularmente en posición 2.

El contenido de 20:4n-6 también aumentó en la fracción polar de los intestinos de todos los grupos experimentales. BELL *et al.*, (1983; 1985) mostraron que el ARA se resintetiza preferentemente en el fosfatidilinositol, favoreciendo la función osmoreguladora del epitelio. Por otro lado, en los fosfolípidos se observó una alta esterificación de ácidos grasos saturados, principalmente 16:0 y 18:0. Ambos ácidos grasos son componentes estructurales importantes de éstos, especialmente de la fosfatidilcolina (MOURENTE *et al.*, 1993). La particular abundancia del ácido palmítico en los fosfolípidos del enterocito, hace presuponer que este juega un papel importante en la regulación de los procesos fisiológicos que tienen lugar durante la absorción de lípidos. En este sentido, OLSEN *et al.*, (2000) mostraron que un incremento de 16:0 en la dieta disminuye la acumulación de vacuolas lipídicas en los enterocitos de charr ártico (*Salvelinus alpinus*), al contribuir a la síntesis de PC en el enterocito, manteniéndose con ello un adecuado rango de síntesis de lipoproteínas. Esta idea está en concordancia con estudios anteriores (VAN GREEVENBROEK *et al.*, 1995) que mostraron que el 16:0 se incorpora eficientemente en los fosfolípidos de la célula intestinal Caco-2, causando

acumulación de los precursores de éstos, tales como el ácido fosfatídico y el diacilglicerol. También, LIE *et al.*, (1993) encontraron que la composición de ácidos grasos de la PC en las distintas fracciones de lipoproteínas se caracteriza por altos niveles de 16:0 y 22:6n-3, independientemente de la composición dietética.

Las imágenes histológicas del intestino anterior revelaron la presencia de vacuolas lipídicas en los intestinos de los peces, encontrándose diferencias en la cantidad y distribución de grasa acumulada entre las distintas dietas ensayadas. Así, una mayor acumulación de vacuolas lipídicas se observó en los peces alimentados con las dietas conteniendo 80% de soja y lino con respecto a aquellos peces alimentados con las dietas conteniendo un 60% de estos mismos aceites. Además, en estos cuatro grupos la acumulación de vacuolas lipídicas fue superior al control (100P).

El estudio morfométrico confirmó que el porcentaje de epitelio intestinal ocupado por vacuolas lipídicas fue 5 veces mayor en los grupos 80S y 80L y 2.3 veces mayor en los grupos 60S y 60L que el grupo 100P. No obstante, hay que señalar que la intensa acumulación de gotas lipídicas no provocó daños patológicos en el epitelio intestinal, observándose microvillosidades intactas y sin signos de necrosis o degeneración. La aparición de vacuolas lipídicas en el epitelio intestinal parece estar relacionado con el nivel de n-3 HUFAs en las dietas, especialmente en las dietas 80S y 80L donde el porcentaje de n-3 HUFAs es aproximadamente un 60% menor que en la dieta 100P y un 32% que en las dietas 60S y 60L. De este modo, la acumulación de lípidos podría ser explicada como consecuencia de una reducción en la síntesis de lipoproteínas que se produce cuando los niveles dietéticos de n-3 HUFAs disminuyen (WATANABE, 1982; KANAZAWA, 1985; SARGENT *et al.*, 1989).

No obstante hay que resaltar que los peces alimentados con la dieta 60C, rica en 18:1n-9, presentaron un porcentaje tan elevado de vacuolas lipídicas como aquellos intestinos de peces alimentados con las dietas conteniendo un 80% de

aceites vegetales, aunque con una distribución principalmente apical. El análisis morfométrico no reveló diferencias cuantitativas entre estos grupos. En este caso, es importante añadir que sí bien el efecto de los n-3HUFAs sobre la síntesis de lipoproteínas podría estar produciendo esta acumulación de lípidos como ha sido mencionado anteriormente. El análisis bioquímico mostró un alto porcentaje de ácido oleico tanto en los ácidos grasos libres como en los triacilgliceroles de estos peces, pero sin embargo, la reaclación del 18:1n-9 en los fosfolípidos fue más baja comparada, por ejemplo, con la del 18:2n-6. Este hecho parece indicar que el oleico es menos utilizado para la constitución de los lípidos polares, pudiendo por ello interferir en la síntesis de lipoproteínas y provocando una mayor acumulación de lípidos en el intestino. Esto estaría en concordancia con la idea general de que el ácido oleico forma parte principalmente de la fuente de reserva de energía que son los triglicéridos (LÉGER *et al.*, 1981).

El estudio ultraestructural del intestino reveló la presencia de dos tamaños de lipoproteínas tanto en los espacios intercelulares como en la lámina propia. Así, mientras que en los intestinos de los peces alimentados con la dieta 60S y 80S se observaron partículas de lipoproteínas principalmente de un tamaño aproximado de 100nm (entrarían en la gama de lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL). En los intestinos del resto de los grupos experimentales, la mayoría de las lipoproteínas observadas tenían un tamaño mayor, alcanzando incluso los 800nm de diámetro (tamaño correspondiente a lipoproteínas del tipo quilomicron).

La presencia de partículas de pequeño tamaño en los intestinos de los peces de las dietas 60S y 80S podría estar relacionada con el hecho que en los intestinos de los peces alimentados con estas dietas, el 18:2n-6 se reacla más altamente en los TAG y LP que cualquier otro ácido graso de 18C (18:2n-6 >18:1n-9 >18:3n-3), lo que podría estar indicando que el ácido linoleico induce una estimulación de la síntesis de materiales para la formación de lipoproteínas. En este sentido, SIRE *et al.*, (1981) sugieren que cuando el rango de síntesis de materiales de la superficie de las

lipoproteínas es alto, el resultado es la formación de partículas pequeñas del tipo VLDL. Además, las vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas observadas en los enterocitos del grupo 60S estaban situadas preferentemente en la zona infranuclear, indicando una alta reesterificación de los ácidos grasos absorbidos en TAG, puesto que es el lugar del enterocito donde principalmente se concentran las cisternas del retículo endoplásmico y mitocondrias para la reacidilación de los ácidos grasos absorbidos.

Por último, cabría mencionar el hecho que en los intestinos del grupo 60S se observó una intensa dilatación basal de los espacios intercelulares que no fue evidente en los intestinos de los peces alimentados con la dieta 80S. Así, el análisis morfométrico confirmó que un alto porcentaje del área del epitelio intestinal estaba ocupada por espacios intercelulares en el caso del grupo 60S. Esta diferencia podría estar ligada al efecto, mencionado anteriormente, de los n-3HUFAs dietéticos sobre la síntesis de lipoproteínas, de modo que en el grupo 80S con una cantidad menor de n-3 HUFAs en la dieta estaría reducida la síntesis de lipoproteínas, lo que impediría la acumulación de éstas en los espacios intercelulares.

En resumen, todos estos resultados muestran, que tanto la cantidad de grasa acumulada en los enterocitos, como el tamaño de las lipoproteínas depende de la composición de ácidos grasos de la dieta, posiblemente por su influencia en los mecanismos de reacidilación de los lípidos absorbidos durante el proceso de absorción intestinal. Así, la inclusión de aceites vegetales en las dietas para dorada incrementan la deposición de grasa en el enterocito, debida a la acumulación preferente de los ácidos grasos de 18 carbonos, abundantes en dichos aceites, en los triacilgliceroles de la célula. De forma semejante a lo observado en el capítulo anterior, la inclusión de aceite de colza ocasiona principalmente una acumulación de vacuolas lipídicas supranucleares debido a la incorporación preferencial de 18:1n-9 en los triacilgliceroles. La inclusión de soja sin embargo incrementa la aparición de vacuolas lipídicas principalmente en la zona basal y la formación de VLDL debido a la incorporación de 18:2n-6 en los fosfolípidos. Además, a niveles de 60% de

---

inclusión ocasiona un ensanchamiento de los espacios intercelulares. Finalmente, a pesar del incremento en la aparición de vacuolas lipídicas ocasionado por la inclusión de aceite de lino a 60%, la morfología de los enterocitos asemeja más la de los peces alimentados exclusivamente con aceite de pescado.

***ESTUDIO DE LAS RUTAS DE REACILACIÓN DE  
TRIACILGLICEROLES Y FOSFOLÍPIDOS EN  
MICROSOMAS INTESTINALES DE DORADA. EFECTO  
DE LA CALIDAD DE LOS LÍPIDOS DIETÉTICOS.***

## **6. ESTUDIO DE LAS RUTAS DE REACILACIÓN DE TRIACILGLICEROLES Y FOSFOLÍPIDOS EN MICROSOMAS INTESTINALES DE DORADA. EFECTO DE LA CALIDAD DE LOS LÍPIDOS DIETÉTICOS.**

### **6.1 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Los estudios histológicos del intestino llevados a cabo para el desarrollo de esta tesis han mostrado una serie de fenómenos ocurridos en las células intestinales durante la ingestión de lípidos como fueron la acumulación de vacuolas lipídicas en el citoplasma de los enterocitos o la formación de determinadas lipoproteínas dependiendo de la naturaleza y cantidad de lípidos (capítulo 5).

Las rutas de biosíntesis de triacilgliceroles y fosfolípidos en el intestino podrían constituir un factor determinante en el desarrollo de estos efectos. Las principales rutas para la esterificación de ácidos grasos en los enterocitos son las vías *monoacilglicerol* y *glicerol-3-fosfato*, ambas tienen como común intermediario, los diacilgliceroles, que son a su vez precursores de la síntesis de fosfolípidos. La vía *monoacilglicerol* acepta como sustratos monoacilgliceroles que, con la incorporación de ácidos grasos, son convertidos en diacilgliceroles y por último, en triacilgliceroles. La vía *glicerol-3-fosfato* integra  $\alpha$ -glicerofosfatos que son transformados en sn-1,2 diacilgliceroles, y estos a su vez en triacilgliceroles o fosfolípidos. Como se detalló en la Introducción, las principales enzimas encargadas de estos procesos son: *1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa* (GPAT), *2,1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa*, *fosfatídico fosfohidrolasa* (PPH-1), *DG:colina fosfotransferasa* (DGCPT), *DG:etanolamina fosfotransferasa* (DGEPT), *diacilglicerol aciltransferasa* (DGAT), *monoacilglicerol aciltransferasa* (MGAT) (ver Fig. 62). Los TAG resintetizados son incorporados en lipoproteínas del tipo quilomicron y VLDL que son liberadas en el torrente sanguíneo.

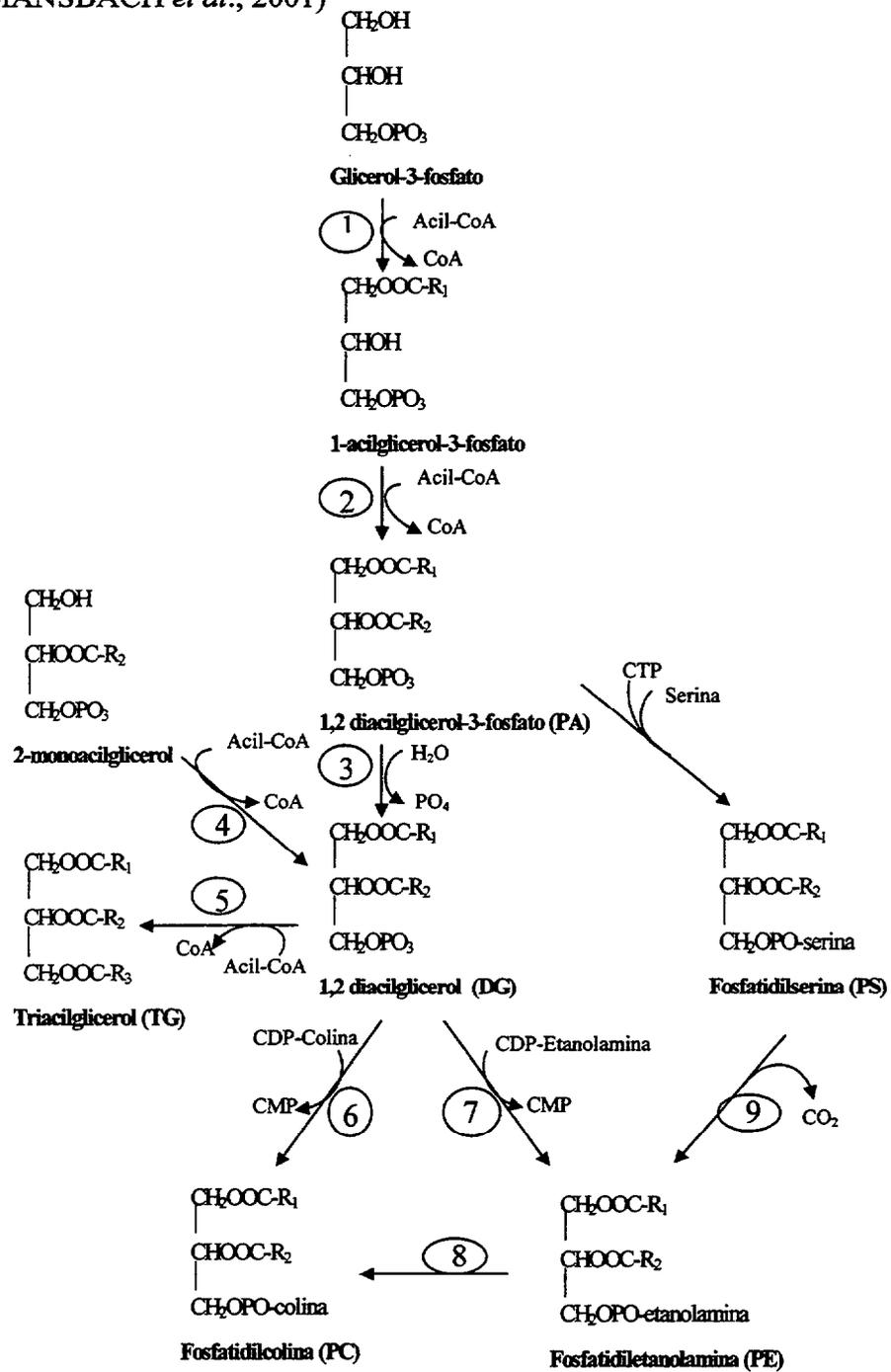
En mamíferos, se han estudiado *in vitro* muchos aspectos de estas rutas: aislamiento de enzimas (JOHNSTON, 1977; KUKSIS y MANGANARO, 1986),

---

fisiología (TSO, 1994) o esteroquímica (KUKSIS y MANGANARO, 1986), principalmente mediante el uso de sustratos radioactivos y en extractos intestinales de hamster, rata o cerdo de Guinea. Sin embargo, ambas rutas de reaclación han sido muy poco estudiadas en peces. Por ejemplo, IJIMA *et al.*, (1983) mostraron la influencia de los lípidos oxidados en la incorporación de [1-<sup>14</sup>C]-palmítico ó [(U)-<sup>14</sup>C]L glicerol-3-fosfato en homogenizados de enzimas intestinales en carpa.

Por ello, las experiencias de este capítulo se llevaron a cabo, para tratar de conocer mejor los mecanismos de reaclación en peces marinos, y comprender los efectos que la calidad de los lípidos dietéticos ejercen sobre los patrones morfológicos observados en el epitelio intestinal. Para ello, se validaron las condiciones de aislamiento y actividad de microsomas intestinales en dorada, se estudió el efecto de los CDP-nucleótidos, que son cofactores de determinadas reacciones enzimáticas en las rutas de resíntesis, y por último se determinó la influencia de la dieta en la biosíntesis intestinal de triacilgliceroles y fosfolípidos en doradas alimentadas con dietas conteniendo diferentes aceites vegetales.

Fig. 62. Biosíntesis de triacilgliceroles y fosfolípidos en el enterocito (Tomado de MANSBACH *et al.*, 2001)



- 1: 1-acilglicerol-3-fostato aciltransferasa (GPAT)      6: DG:colina fosfotransferasa (DGCPT)  
 2: 2,1-acilglicerol-3-fostato aciltransferasa      7: DG:etanolamina fosfotransferasa (DGEPT)  
 3: fosfatídico fosfohidrolasa (PPH1)      8: fosfatidiletanolamina metil transferasa  
 4: monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT)      9: fosfatidilserina descarboxilasa  
 5: diacilglicerol transferasa (DGAT)      10: intercambio de bases

## **6.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES**

Las muestras de intestino destinadas a este estudio se tomaron de las doradas alimentadas con las siguientes dietas experimentales. La dieta 100P donde la única fuente de lípidos fue aceite de pescado. Las dietas 60S y 60C, donde el 60% del aceite de pescado se reemplazó por aceite de soja y colza, respectivamente. Y las dietas 80S y 80L con un 80% de aceite de soja y lino, respectivamente. La composición en ácidos grasos de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 21 (pág. 191).

Las condiciones experimentales de cultivo de los peces están descritas en el apartado 5.4.1.

La recogida de muestras y la preparación de microsomas intestinales se llevó a cabo según se indicó en los Apdos. 2.6.2 y 2.6.3 del capítulo de Material y Métodos. Las incubaciones con los diferentes sustratos radiactivos se ensayaron como se describen en el Apdo. 2.6.4. La dinámica de incorporación del L-[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en los productos de la vía glicerol-3-fosfato se determinó con ensayos incubados a distintos tiempos (0, 5', 10', 15' y 30') o con diferente concentración de proteína microsomal (0.3 y 0.6 mg/ml). Para estudiar el efecto de los CDP-nucleótidos en la incorporación de L-[<sup>14</sup>C(U)]glicerol-3-fosfato y de [1-<sup>14</sup>C]Palmitoil-CoA en fosfolípidos y lípidos neutros, se realizaron una serie de incubaciones donde distintos CDP-nucleótidos fueron añadidos a la solución basal. La mezcla de las incubaciones se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Mezcla de incubación con los CDP-nucleótidos

<i>Material</i>	<i>Mezcla de incubaciones</i>			
	Control	CDP-colina	CDP-etanolamina	CTP
Solución basal 1*,2**	+	+	+	+
CDP-colina <sup>1</sup>	-	+	-	-
CDP-etanolamina <sup>2</sup>	-	-	+	-
CTP <sup>3</sup>	-	-	-	+

\* Solución basal 1: para vía *glicerol-3-fosfato* (ver apartado 2.6.4.1 Material y métodos)

\*\* Solución basal 2: para vía *monoacilglicerol* (ver apartado 2.6.4.2 Material y métodos)

<sup>1</sup> Citidin difosfato colina: 0.600µmol

<sup>2</sup> Citidin difosfato etanolamina: 0.600µmol

<sup>3</sup> Citidin trifosfato: 0.600µmol

Tanto el estudio del efecto del tiempo y de la concentración de proteína microsomal, como el de la adición de CDP-nucleótidos se realizó con microsomas intestinales de doradas alimentadas con la dieta 100P (100% aceite de pescado). El efecto de la dieta en las vías de reacilación se ensayó con microsomas intestinales de doradas alimentadas durante 3 meses con las distintas dietas experimentales. Se tomaron 4 muestras de intestino por cada dieta para los correspondientes análisis. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### 6.3 RESULTADOS

*Utilización del glicerol-3-fosfato para la síntesis de acil y fosfoglicérol en microsomas intestinales de dorada.*

La Fig. 63 muestra el rango de incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en diacilglicérol, triacilglicérol y fosfatidilcolina en microsomas intestinales de dorada a diferentes tiempos de incubación. En general, la incorporación fue alta en la fosfatidilcolina, en menor medida en diacilglicérol y, sobre todo, en triacilglicérol. Mientras que la incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato a DAG y TAG presentó la máxima pendiente a los 5 minutos de incubación, manteniéndose durante el resto del ensayo, la incorporación a PC fue máxima tras 10 minutos de incubación, viéndose reducida durante los últimos minutos del ensayo. Así, el incremento en la síntesis de PC coincidió con la reducción en la pendiente de incorporación a los diacilglicérol (relación PC/DAG de 2.3:1), mientras que a los 15 minutos, la relación PC/DAG disminuyó en 1.1:1. En base a estos resultados se decidió que el tiempo de incubación de los distintos ensayos fuera de 10 minutos, ya que este tiempo recogió el potencial de producción neto de esta ruta enzimática. Este mismo tiempo fue escogido, cuando se ensayó la *vía monoacilglicérol*, con la incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA, siguiendo el método de LEHNER y KUKSIS, (1995).

La incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en diacilglicérol, triacilglicérol y fosfatidilcolina en microsomas intestinales de dorada incrementó proporcionalmente con la cantidad de proteína microsomal. De igual manera que en la curva-tiempo, la mayor incorporación se produjo en fosfatidilcolina, seguida de diacilglicérol y triacilglicérol. Los datos son mostrados en la Fig. 64.

*Efecto de CDP-nucleótidos en la síntesis de acil y fosfogliceroles en microsomas intestinales de dorada*

*Vía glicerol-3-fosfato*

Los resultados obtenidos de la adición de CDP-nucleótidos a las incubaciones son mostrados en la Fig. 65. En ausencia de CDP-nucleótidos (control) la mayor incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato se observó en la fosfatidilcolina. La incorporación en diacilgliceroles fue el doble que en triacilgliceroles, con una relación de TAG/DAG de 0.5:1. Se encontró muy poca incorporación en fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico.

Cuando se añadió CDP-colina al ensayo la incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en la PC fue el triple que en el control. Además, en este caso la formación de triacilgliceroles marcados radiactivamente fue significativamente menor que en el control y aproximadamente 8 veces menor que la incorporación en los DAG, siendo la relación TAG/DAG de 0.13:1.

La adición de CDP-etanolamina al ensayo aumento ligeramente la incorporación en PC respecto al grupo control, aunque la incorporación en fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico no se vio afectada. La relación TAG/DAG (0.13:1) se mantuvo con respecto al ensayo con CDP-colina.

Un descenso significativo (más del doble) en la incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en fosfatidilcolina y diacilgliceroles se observó con la adición de CTP al ensayo. Además, no hubo un aumento en la formación de PE ni se registró radioactividad en fosfatidilserina (PS).

*Vía monoacilglicerol*

La Fig. 66 muestra los datos de incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA en fosfolípidos y lípidos neutros cuando se añadieron distintos CDP-nucleótidos al ensayo. Tanto en ausencia de CDP-nucleótidos (control) como en presencia de CDP-colina y CDP-etanolamina, la mayor incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA se cuantificó en los lípidos neutros, siendo superior en los diacilgliceroles que en los triacilgliceroles. La relación de TAG/DAG fue aproximadamente de 0.6:1 para todos los grupos. La formación de fosfolípidos marcados radiactivamente fue bastante baja en los tres grupos, siendo la fosfatidilcolina la que mostró mayor incorporación. Aunque en presencia de CDP-etanolamina la formación de PC marcada radiactivamente fue ligeramente superior a la de los otros grupos.

*Efecto de la dieta en la síntesis de acil y fosfogliceroles en microsomas intestinales de dorada*

*Vía glicerol-3-fosfato*

Las figuras 67 y 68 muestran los datos de incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en lípidos neutros y fosfolípidos en microsomas intestinales de dorada alimentadas con las distintas dietas experimentales. En general, el rango de incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en las distintas clases lipídicas fue el siguiente: PC > DAG > TAG, en todos los grupos experimentales. Los peces alimentados con la dieta 100P y 60S mostraron relaciones semejantes de TAG/DAG de 0.6:1 y de PC/DAG (12.7:1 y 13.8:1, respectivamente)(Tabla 28). Una disminución en la síntesis de TAG se observó en los peces alimentados con la dieta 60C por lo que la relación TAG/DAG en este grupo disminuyó hasta 0.3:1, aunque el valor de la relación PC/DAG no se vio afectado (13:1) para este grupo (Tabla 28). Se observó una sustancial síntesis de PC para los peces alimentados con 80S y

especialmente, en aquellos peces alimentados con la dieta 80L. Este grupo alcanzó una relación PC/DAG de 80.3:1. Este aumento de PC fue acompañado de una disminución en la formación de TAG en estos grupos. No obstante, los peces alimentados con la dieta 80S, mostraron una mayor incorporación en DAG que los peces alimentados con 80L. Los valores de las distintas relaciones entre los productos de las reacciones enzimáticas se muestran en la Tabla 28.

La incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en otros fosfolípidos, como fosfatidiletanolamina o ácido fosfatídico fue insignificante, obteniéndose valores próximos al “background”.

Tabla 28. Relaciones de incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en microsomas intestinales de dorada alimentadas con las distintas dietas experimentales.

<i>Dietas</i>	TAG / DAG	PC / DAG	TAG / PC
100P	0.6	12.7	5 10 <sup>-2</sup>
60S	0.6	13.8	4 10 <sup>-2</sup>
60C	0.3	13	2 10 <sup>-2</sup>
80S	0.2	18.7	1 10 <sup>-2</sup>
80L	0.2	80.3	3 10 <sup>-3</sup>

*Vía monoacilglicerol*

Las Figuras 69 y 70 muestran los datos de incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA en lípidos neutros y fosfolípidos en microsomas intestinales de dorada alimentadas con las distintas dietas experimentales. En general, el rango de incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA fue el siguiente: DAG > TAG > PC > PE. Los peces alimentados con la dieta 100P mostraron una alta incorporación de [1-<sup>14</sup>C]

Palmitoil CoA en DAG, aunque no fue significativamente mayor a los grupos 60S, 80S y 80L (Fig. 69). Este mismo patrón se observó en la formación de TAG. Los peces alimentados con la dieta 60C mostraron la menor incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA en DAG y TAG (Fig. 69).

A nivel de fosfolípidos, los peces alimentados con las dietas 80S y 80L mostraron una mayor incorporación en fosfatidilcolina, aunque la formación de PC del grupo 80L no fue significativamente mayor al de los otros grupos experimentales (Fig. 70). Así, la relación PC/DAG en los grupos 80S y 80L fue mayor que aquella de los peces alimentados con las dietas 100P y 60S, mientras que la relación TAG/PC fue menor que en estos dos últimos grupos (Tabla 29). La incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA en PE fue menor que en PC aunque se obtuvieron las mismas diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Fig. 70). Los valores de las relaciones se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Relaciones de incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA en microsomas intestinales de dorada alimentadas con las distintas dietas experimentales

<i>Dietas</i>	TAG / DAG	PC / DAG	TAG / PC
100P	0.7	0.1	5.8
60S	0.8	0.2	4.1
60C	0.8	0.4	2.2
80S	1.2	0.3	2.9
80L	0.8	0.3	2.9

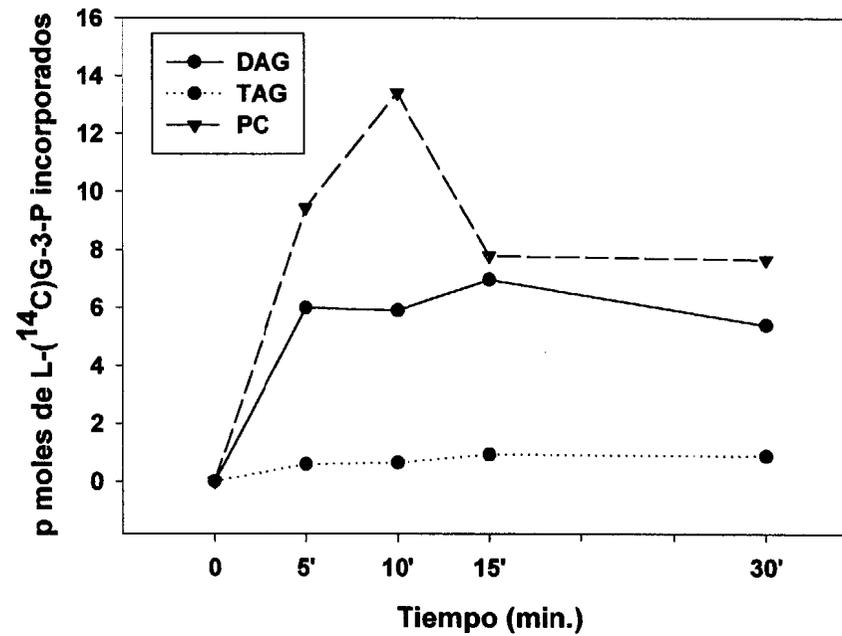


Fig. 63. Efecto del tiempo de incubación en la incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en diacilgliceroles (DAG), triacilgliceroles (TAG) y fosfatidilcolina (PC). Microsomos intestinales de dorada (200μl~0.6mg proteína) fueron incubados a 37°C con L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato y palmitoil-CoA como ha sido descrito en el apartado 2.6.4.1 de Material y Métodos. Cada punto representa la media de al menos dos determinaciones.

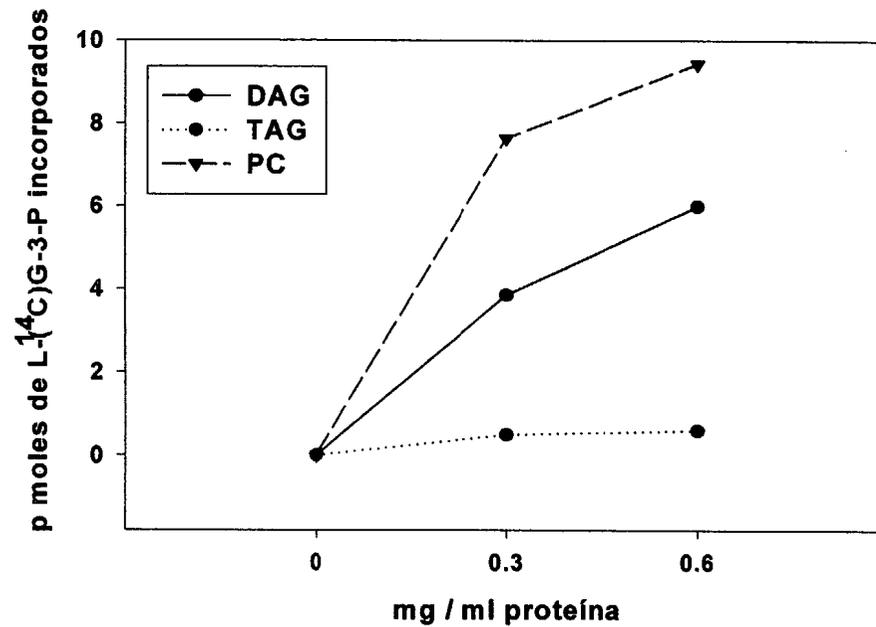


Fig. 64. Efecto del incremento de la proteína microsomal en la incorporación de L-[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en diacilgliceroles (DAG), triacilgliceroles (TAG) y fosfatidilcolina (PC). Microsomas intestinales de dorada fueron incubados a 37°C durante 5 minutos con L-[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato y palmitoil-CoA como ha sido descrito en el apartado 2.4.6.1 de Material y Métodos. Cada punto representa la media de al menos dos determinaciones.

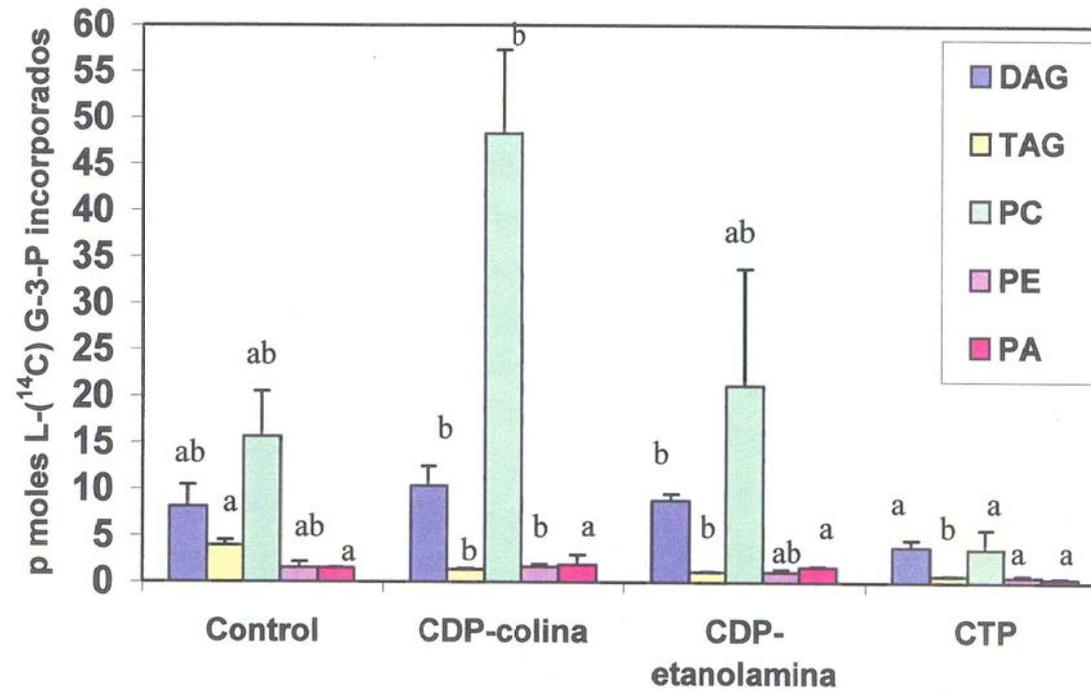


Fig. 65. Efecto de CDP-nucleótidos en la incorporación de L-[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en diacilgliceroles (DAG), triacilgliceroles (TAG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y ácido fosfatídico (PA) en microsomas intestinales de dorada. Ver Tabla 27 para la mezcla de las incubaciones. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar. La estadística esta realizada comparando cada clase lípidica entre las distintas incubaciones ( $n^{\circ}$  determinaciones=3).

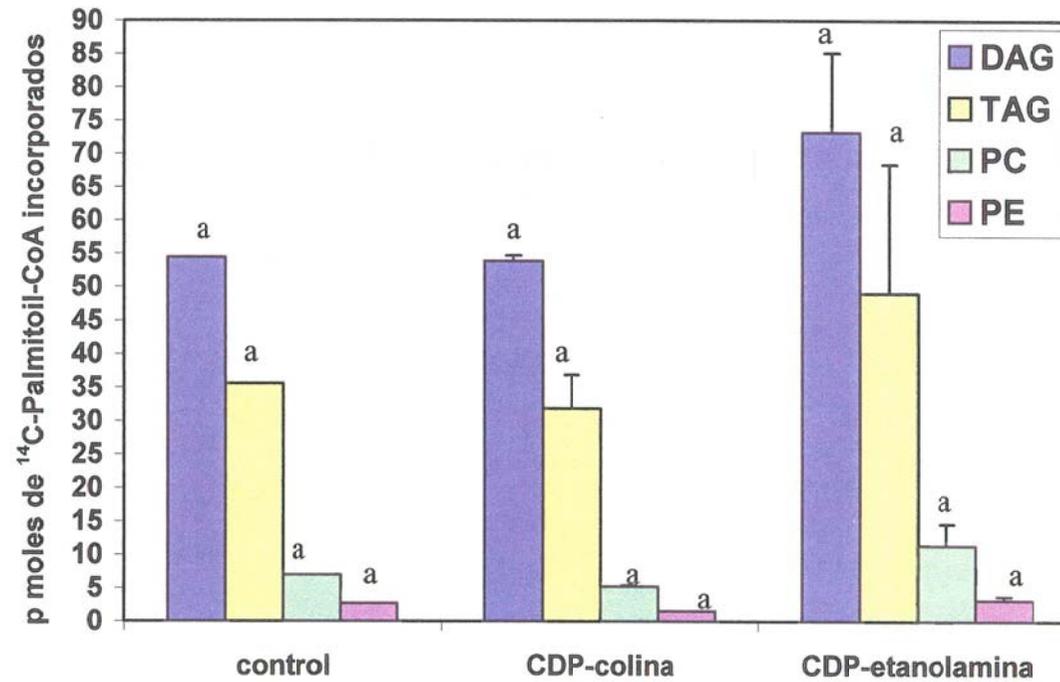


Fig. 66. Efecto de CDP-nucleótidos en la incorporación de  $[1-^{14}\text{C}]$  Palmitoil CoA en diacilgliceroles (DAG), triacilgliceroles (TAG), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) en microsomas intestinales de dorada. Ver Tabla 27 para la mezcla de las incubaciones. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar. La estadística esta realizada comparando cada clase lípidica entre las distintas incubaciones ( $n^\circ$  determinaciones=3).

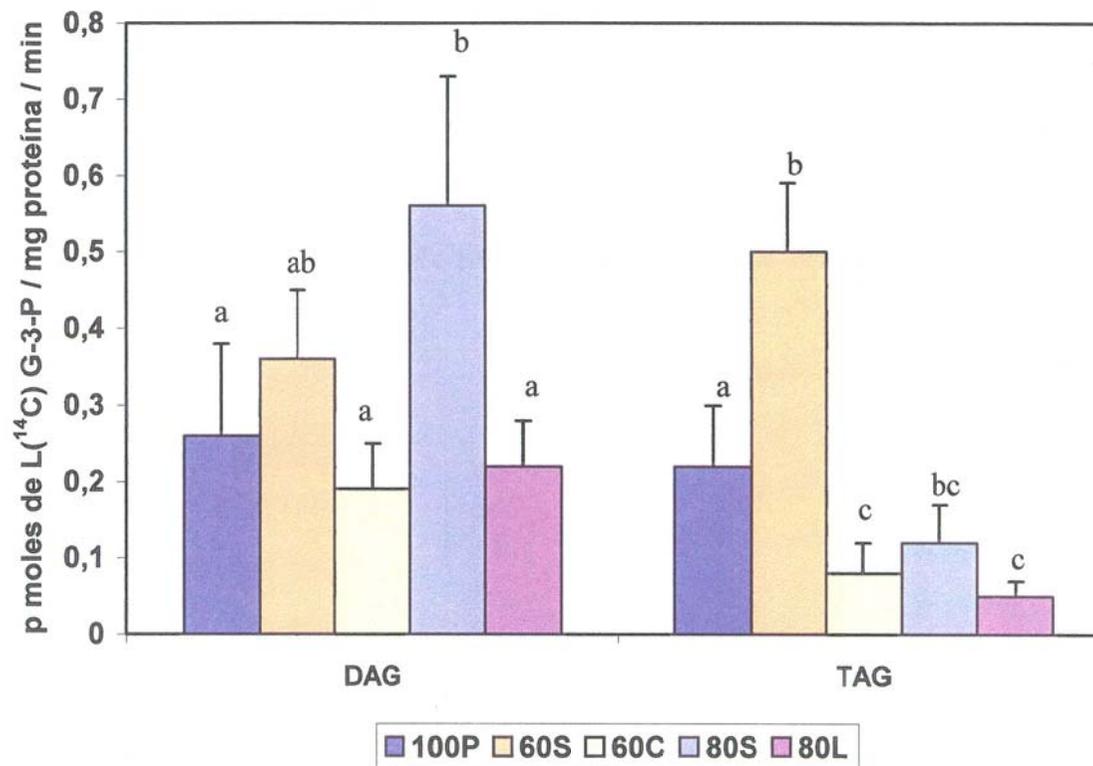


Fig. 67. Efecto de la inclusión de aceites vegetales en dietas de dorada en la incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en lípidos neutros, diglicéridos (DAG) y triglicéridos (TAG). Microsomas intestinales de dorada (200µl) fueron incubados a 37°C durante 10 minutos con L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato y palmitoil-CoA como ha sido descrito en el apartado 2.6.4.1 de Material y Métodos. Datos son dados como media ± desviación estándar (n=4).

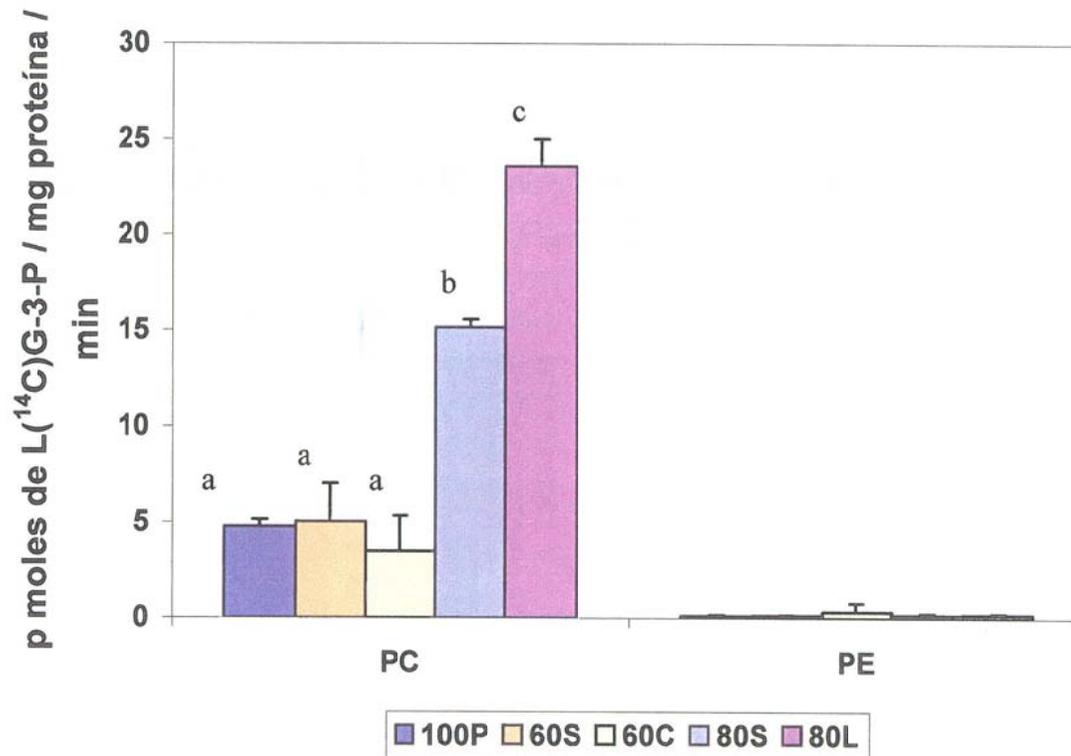


Fig. 68. Efecto de la inclusión de aceites vegetales en las dietas de dorada en la incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en los lípidos polares, fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE). Microsomas intestinales de dorada (200μl) fueron incubados a 37°C durante 10 minutos con L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato y palmitoil-CoA como ha sido descrito en el apartado 2.6.4.1 de Material y Métodos. Datos son dados como media ± desviación estándar (n=4).

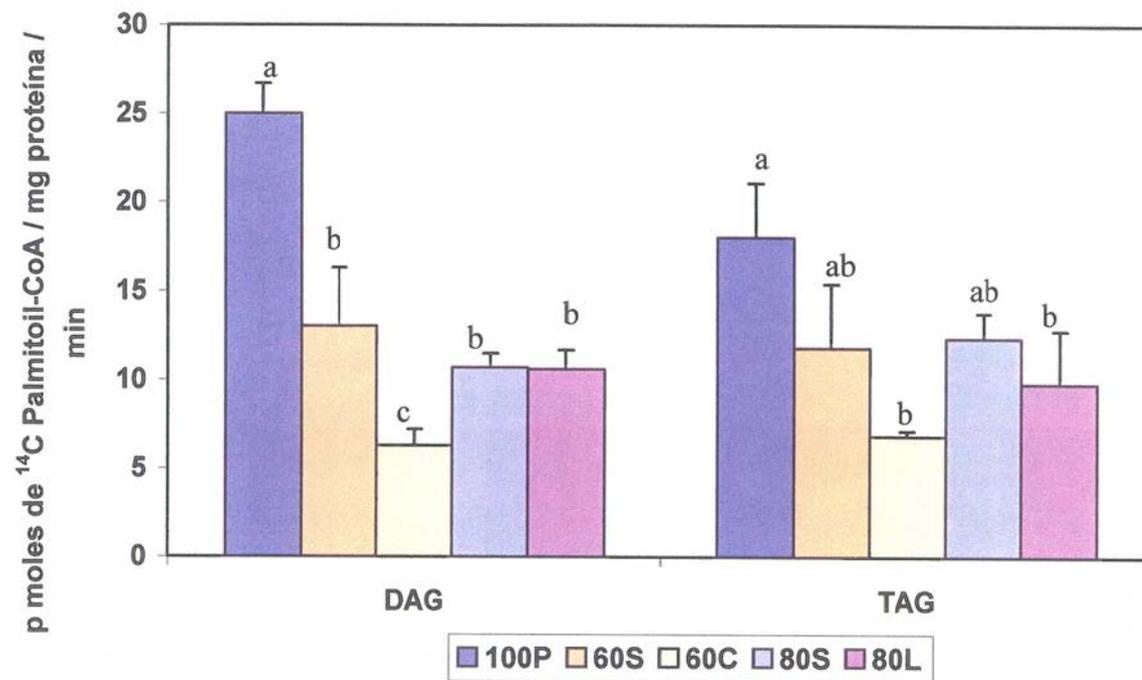


Fig. 69. Efecto de la inclusión de aceites vegetales en las dietas de dorada en la incorporación de [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA en diacilgliceroles (DAG), triacilgliceroles (TAG). Microsomas intestinales de dorada (200μl) fueron incubados a 37°C durante 10 minutos con [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA y 1-monopalmitoil-rac-glicerol como ha sido descrito en el apartado 2.6.4.2 de Material y Métodos. Datos son dados como media ± desviación estándar (n=4).

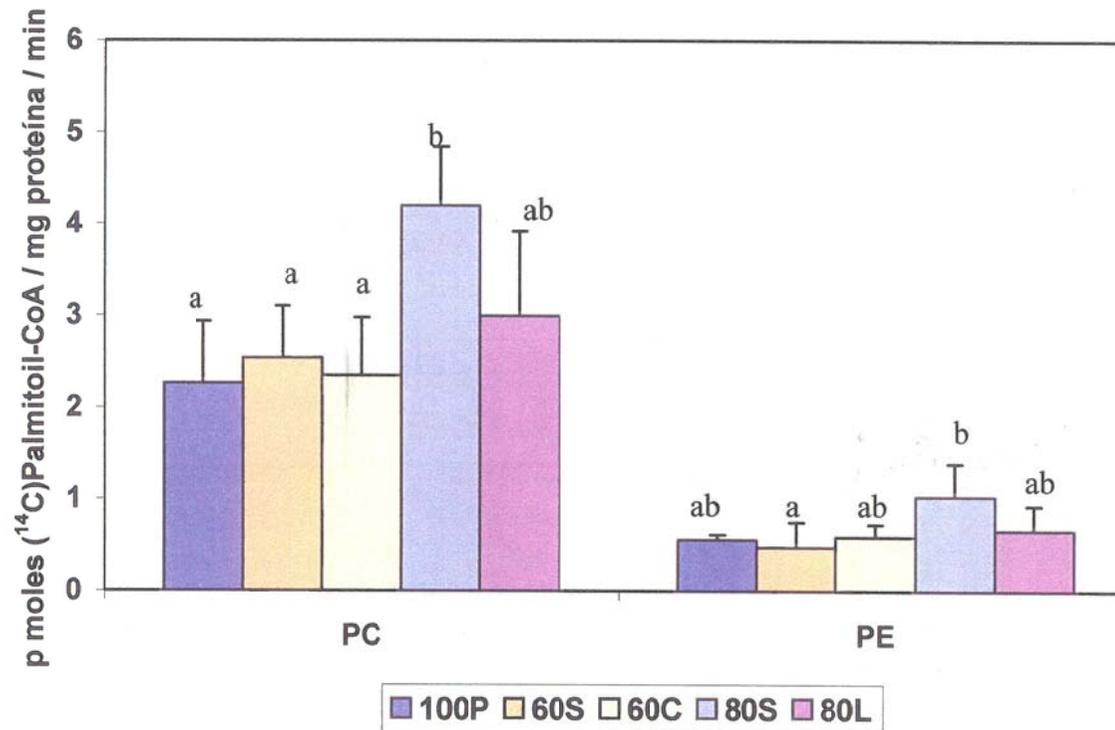


Fig. 70. Efecto de la inclusión de aceites vegetales en las dietas de dorada en la incorporación de  $[1-^{14}\text{C}]$  Palmitoil CoA en fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE). Microsomas intestinales de dorada ( $200\mu\text{l}$ ) fueron incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos con  $[1-^{14}\text{C}]$  Palmitoil CoA y 1-monopalmitoil-rac-glicerol como ha sido descrito en el apartado 2.6.4.2 de Material y Métodos. Datos son dados como media  $\pm$  desviación estándar ( $n=4$ ).

## 6.4 DISCUSIÓN

En este estudio se demostró la validez de las técnicas desarrolladas en rata por LEHNER y KUKSIS, (1995) para el aislamiento de microsomas y el ensayo de su actividad enzimática en células del epitelio intestinal de dorada.

La adición de CDP-colina al sustrato L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato incrementó la formación de PC, y el descenso en la formación de TAG refleja un desvío del pool de DAG hacia la síntesis de PC por la activación de la enzima *diacilglicerol:colina transferasa* (DGCPT). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por STALS *et al.*, (1992) en hepatocitos de rata, donde encuentran que en presencia de suficiente cantidad de CDP-colina, la afinidad de la DGCPT por los diacilgliceroles es mucho mayor que la de DGAT, favoreciendo la síntesis de fosfatidilcolina. Además, como el mismo “pool” de DAG es compartido por las enzimas DGAT y DGCPT parece evidente que la formación de triacilgliceroles depende de la disponibilidad de estos sustratos comunes. Así pues, es conveniente resaltar que en presencia de CDP-colina, la cinética de la enzima DGCPT es superior a la de la enzima DGAT.

La adición de CDP-etanolamina produjo un ligero aumento de la PC con respecto al grupo control, aunque no se detectó incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en la fosfatidiletanolamina. Este hecho parece indicar que la conversión de PE en PC realizada por una *metil-transferasa* se produce más rápidamente que la formación de PE a partir de DAG, confirmando la importancia de la fosfatidilcolina como la fracción principal en los lípidos polares. Estos resultados concuerdan con los encontrados por IJIMA *et al.*, (1983) en homogenizados intestinales de carpa, donde la adición de CDP-etanolamina no indujo la síntesis de PE, aunque provocó un ligero aumento de la PC. La adición de CTP a los ensayos produjo una considerable disminución en la síntesis de DG y PC, lo que podría reflejar una inhibición de la enzima *fosfatídico fosfohidrolasa* (PPH-1). Además, el hecho de que no aumentara la incorporación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato en la PE y no fuera registrada

---

radiactividad en fosfatidilserina (PS) cuando se adición CTP, parece indicar que la principal ruta de síntesis de PE es a través de la incorporación del radical etanolamina a los diacilgliceroles. Todos estos resultados sugieren que la principal vía de síntesis de PC en el epitelio intestinal es la del glicerol-3-fosfato, y que las enzimas DGCPT y DGAT son los dos principales puntos de regulación de la biosíntesis de fosfolípidos y triacilgliceroles en el enterocito. SIRE *et al.*, (1981), la vía glicerol-3-fosfato podría ser la principal vía de reacilación en peces, debido en parte a la hidrólisis total de los triglicéridos de la dieta que se produce durante la digestión de los lípidos. Este hecho indicaría que en peces la síntesis de glicerofosfolípidos es mayor que en mamíferos, ya que en éstos últimos la vía monoacilglicerol tiene mayor importancia.

La vía monoacilglicerol es encargada principalmente de la síntesis de lípidos neutros (NL), e incluso la adición de CDP-colina o CDP-etanolamina al sustrato [ $^{14}\text{C}$ ] Palmitoil CoA no contribuye al aumento en la incorporación en fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina, respectivamente, denotando la escasa implicación que posee la vía monoglicerol en la formación de fosfolípidos. En el presente estudio, la formación de fosfatidilcolina fue menos de la mitad que la observada en la vía glicerol-3-fosfato, mientras que una mayor incorporación se encontró en los lípidos neutros, especialmente en diacilgliceroles.

Hay que señalar que la mayor diferencia encontrada *in vivo* e *in vitro* en la reacilación de lípidos es la acumulación del "pool" de DAG observada *in vitro*, mientras que un alto contenido de TAG es encontrado *in vivo*, como fue puesto de manifiesto en el capítulo anterior. Esto podría ser debido a que la actividad de la enzima DGAT sea superior *in vivo* que *in vitro*, facilitando así la conversión de DAG a TAG. Algunos autores han señalado que esta enzima requiere de una proteína citoplasmática que estimula su actividad (LEHNER Y KUKSIS, 1995), así pues la disminución de esta proteína en los extractos microsomales podría ser la causa de la acumulación *in vitro* de DAG. Además la menor disponibilidad de ácidos grasos libres *in vitro* puede ser otra causa del aumento de DAG.

---

En resumen, cuando se activa la vía *glicerol-3-fosfato*, se sintetizan principalmente fosfolípidos, en particular PC; por el contrario, cuando se activa la vía *monoacilglicerol* se produce la síntesis de triacilgliceroles, y se observa una considerable disminución en la síntesis de fosfolípidos. Por ello cabe preguntarse, ¿por qué la fosfatidilcolina no es sintetizada en similares cantidades por ambas vías, si éstas tienen como intermediario común el diacilglicerol?

Haciendo un análisis de los trabajos más relevantes podemos apreciar algunas discrepancias entre los autores con respecto a esta pregunta. Investigaciones pioneras de JOHNSTON *et al.* (1970) en hámster demostraron que los diacilgliceroles sintetizados mediante reaclación de monoacilgliceroles no eran convertidos en PC, proponiendo la hipótesis de una separación compartimental de ambas vías en la célula. Más tarde, un estudio de LEHNER y KUKSIS (1992), aseguró que los estudios de JOHNSTON y colaboradores fueron desarrollados en condiciones inhibitorias de la enzima DGCPT, y demostraron en rata y hámster que bajo condiciones no inhibitorias de esta enzima, los DAG formados por la vía monoacilglicerol son fácilmente convertidos en PC. Como consecuencia de esto, LEHNER y KUKSIS (1992) plantearon la presencia de un "pool" común de DAG microsomaes para ambas vías, sugiriendo la existencia de una sola enzima DGAT. Los resultados del presente estudio están de acuerdo con estos últimos autores, ya que una cierta cantidad de PC fue sintetizada cuando se ensayó la vía monoacilglicerol en los microsomas intestinales de dorada, aunque la proporción de PC con respecto a TAG o DAG fue relativamente pequeña.

Bajo las condiciones experimentales de los ensayos del presente estudio, la estereoespecificidad en la acilación del 1-monopalmitoil-rac-glicerol podría ser otra explicación para el hecho de que dichas vías de reaclación sintetizen cantidades diferentes de PL y NL. De este modo, en el presente estudio los ensayos de la vía glicerol-3-fosfato que se realizaron con la incubación de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato resultan necesariamente en un "pool" de sn-1,2 diacilgliceroles, ya que la enzima *1-acilglicerol-3-fosfato transferasa* transfiere el grupo acil a la posición 1 del glicerol-

---

3-fosfato y la enzima *2-acilglicerol-3-fosfato* lo transfiere en la posición 2 formándose el ácido fosfatídico, y el resultado tras su desfosforilación es la obtención de sn-1,2 diacilglicerol. Además, solamente el sn-1,2 diacilglicerol puede ser sustrato para la síntesis de fosfatidilcolina, y debido a la alta especificidad de la enzima DGCPT por estos intermediarios, la actividad de la enzima DAGT se vería desplazada y consecuentemente disminuida la formación de TAG cuando se activa la vía glicerol-3-fosfato. Sin embargo, la incubación de 1-monopalmitoil-rac-glicerol con [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA realizada para el estudio de la vía monoacilglicerol, podría dar lugar a la formación conjunta de sn-1,2 y sn-1,3 diacilgliceroles, ya que ambos isómeros han sido obtenidos por esta vía por distintos autores. Particularmente el isómero sn-1,3 podría ser el más abundante debido a que la enzima DGAT reacila el 1-monopalmitoil principalmente en la primera posición. YANG y KUKSIS, (1991) y LEHNER y KUKSIS, (1993) han corroborado la presencia de productos sn-2,3 y sn-1,2 diacilgliceroles tras la incubación de microsomas intestinales de rata con un 2-oleoilglicerol radiactivo y oleil-CoA. Asimismo, es importante señalar que estudios más recientes (KUKSIS y LEHNER, 2001) han sugerido la posibilidad de que una lipasa pancreática presente en las células intestinales de rata pueda generar productos sn-1,2 y 2,3-diacilgliceroles por hidrólisis de triacilgliceroles, contribuyendo a la resíntesis de diacilgliceroles. Así pues, esta mezcla de isómeros podría estar interfiriendo en la actividad de la DGCPT, por una disminución en la cantidad del sustrato específico de esta enzima (sn-1,2 diacilglicerol), con la consecuente reducción en la formación de PC y aumento de TAG cuando se activa la vía monoacilglicerol. En resumen, la importancia relativa de una u otra vía de reacilación en el enterocito podría verse afectada por la estereoisometría de los sustratos disponibles.

Por otra parte, los resultados previos obtenidos en los estudios histológicos del intestino llevados a cabo en esta tesis han sugerido que la composición de ácidos grasos de la dieta afecta a los procesos de reacilación de TAG y PL en los enterocitos. Por ello, en el presente estudio se realizaron una serie de ensayos enzimáticos donde extractos intestinales de doradas alimentadas con las diferentes

dietas experimentales se incubaron con los dos sustratos radiactivos, para ensayar ambas vías de reacidación.

Los extractos de la dieta 60C mostraron un descenso significativo en la incorporación tanto de L[<sup>14</sup>C(U)] glicerol-3-fosfato y [1-<sup>14</sup>C] Palmitoil CoA en los TGs e incluso en los PL. Estos hechos parecen sugerir que el 18:1n-9 es menos esterificado en TAG y PL que otros ácidos grasos de 18C, como linoleico. En concordancia con la mayor presencia de vacuolas lipídicas supranucleares encontradas en las imágenes histológicas de los intestinos de estos peces, reflejo de la disminución en los procesos de reacidación intestinal que provoca la acumulación de los ácidos grasos absorbidos.

Sí bien la inclusión de un 60% de soja no produjo diferencias significativas con el grupo control (100P) sí mostró una tendencia hacia la síntesis de PL, la cual se vio favorecida cuando el porcentaje de aceite de soja o incluso lino fue incrementado hasta un 80%. Así, en los microsomas intestinales de los peces alimentados con las dietas 80S y 80L en ambas rutas, sobre todo en la glicerol-3-fosfato, aparece una tendencia a la síntesis de PL en detrimento de la de TAG, y puesto que provienen de animales en inanición y la presencia de sustratos provenientes de la dieta sería escasa, podría ser debida a alteraciones en la composición de ácidos grasos de las membranas de los enterocitos, como se demostró en el capítulo anterior, ya que muchas de las enzimas de estas rutas están asociadas a ellas.

Por otro lado, la relación TAG/PC varió entre las distintas dietas. Por ejemplo, esta relación fue menor para las dietas 60S y 80S con respecto a la dieta control en la que predominó la síntesis de TAG sobre la de PL en ambas vías de resintetización. Estas diferencias parecen estar relacionadas con el tipo de lipoproteína sintetizada en estos grupos. Así, los peces alimentados con las dietas 60S y 80S mostraron principalmente lipoproteínas del tipo VLDL, mientras que en aquellos de la dieta control predominaron los quilomicrones (resultados presentados en el capítulo anterior). En vertebrados superiores cuando la producción de

---

materiales de superficie (como son los PL) para la formación de lipoproteínas es superior a la síntesis de TAG, las lipoproteínas que se forman son fundamentalmente del tipo VLDL que están constituidas por un porcentaje mayor de fosfolípidos (SIRE *et al.*, 1981).

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que en los enterocitos de dorada la principal vía de síntesis de PL es la del glicerol-3-fosfato. Si bien la importancia relativa de una u otra vía podría depender de la esteroisometría de los sustratos disponibles, la vía del monoacilglicerol parece tener en peces menos importancia que en mamíferos. Además, se pone de manifiesto en este estudio que la composición de los lípidos de la dieta afecta la reasimilación de los mismos en el enterocito. Así, se confirma que la aparición de vacuolas lipídicas supranucleares cuando se alimenta con aceite de colza, es debida a la reducción de la reesterificación de los lípidos dietéticos y por ello a la menor síntesis de TAG y sobre todo PL. Asimismo, se confirma que la aparición de lipoproteínas del tipo VLDL en los enterocitos de doradas alimentadas con aceite de soja, es ocasionada por una mayor síntesis relativa de PL en comparación con los TAG. De esta forma, los estudios enzimáticos realizados en este capítulo nos ha permitido comprender mejor las imágenes histológicas observadas en capítulos precedentes.

## ***CONCLUSIONES GENERALES***

## **7. CONCLUSIONES GENERALES**

1. Los resultados de esta tesis doctoral demuestran cómo los estudios de las alteraciones histológicas de hígado e intestino de los peces de cultivo reflejan la capacidad de utilización de los nutrientes dietéticos y ofrecen una buena idea del estado nutricional de los mismos.
2. En cuanto al hígado, el incremento de los niveles dietéticos de lípidos ocasiona un aumento en la deposición de grasa sin consecuencias patológicas aparentes. Además, la calidad de la proteína utilizada puede afectar asimismo la utilización metabólica de los lípidos dietéticos y por ello la morfología hepática.
3. La sustitución del 60% de aceite de pescado por aceites vegetales no afecta el crecimiento de la dorada y la lubina a lo largo de su periodo de engorde. Sin embargo, sustituciones de un 80% pueden llegar a reducir significativamente el crecimiento.
4. La aparición de esteatosis en los hígados de dorada y lubina esta ligada principalmente a la calidad de los distintos ácidos grasos no esenciales incluidos en la dietas y que son abundantes en los aceites vegetales, siendo más acusada en peces alimentados con aceite de soja y menos acusada en peces alimentados con aceite de lino y colza.

5. Se confirma en dorada que la reducción del contenido de ácidos grasos esenciales por la inclusión de niveles extremos de aceites vegetales tiende a ocasionar una deposición de lípidos en el hígado.
  
6. La marcada esteatosis, el acúmulo de oleico, y el incremento de la relación 18:1n-9/DHA en los hígados de las lubinas demuestra la menor capacidad de utilización de los lípidos dietéticos en esta especie y sugiere diferencias en los requerimientos de ácidos grasos esenciales en comparación con la dorada.
  
7. La inclusión a largo plazo de aceites vegetales no ocasiona patologías hepáticas. Más aún, las alteraciones morfológicas observadas en los hígados son recuperables confirmando la importante función de éste órgano como almacén de energía.
  
8. La inclusión de niveles extremos de aceites vegetales en las dietas provoca un incremento del contenido de colesterol y triglicéridos en las lipoproteínas, debido principalmente al contenido bajo de n-3 HUFA de estas dietas. Este incremento es más acentuado con la inclusión de aceite de soja que con la de aceite de lino.
  
9. La composición de ácidos grasos de VLDL y LDL refleja claramente el perfil de ácidos grasos de la dieta, mientras que la HDL es más constante en su composición independientemente del perfil de la dieta.

10. El incremento de los niveles dietéticos de lípidos promueve la formación de lipoproteínas de un mayor tamaño. No obstante, la calidad de la proteína utilizada y con ello la disponibilidad de amino ácidos en el enterocito influyen modificando el tipo de lipoproteína sintetizada por éste.

11. La inclusión de aceites vegetales en las dietas incrementa la deposición de grasa en el enterocito. No obstante, el tipo de aceite vegetal afecta de manera distinta a la morfología del enterocito debido principalmente a la acumulación preferente de los ácidos grasos de 18 carbonos, abundantes en dichos aceites.

12. La inclusión de un 60% de aceite de colza ocasiona principalmente una acumulación de vacuolas lipídicas supranucleares debido a la incorporación preferencial de 18:1n-9 en los triacilgliceroles. La inclusión de un 60% de aceite de soja incrementa la formación de VLDL debido a la incorporación del 18:2n-6 en los fosfolípidos. La inclusión de un 60% de aceite de lino da lugar a una morfología del enterocito más parecida a la de los peces alimentados exclusivamente con aceite de pescado.

13. La inclusión de un 80% de aceite de soja y lino en las dietas produce un acúmulo intenso de grasa en el enterocito como consecuencia del contenido bajo de n-3 HUFA en estas dietas.

14. Se confirma en dorada que la principal vía de síntesis de fosfolípidos es la del glicerol-3-fosfato, mientras que la del monoacilglicerol es encargada principalmente de la síntesis de triacilgliceroles. No obstante, la importancia relativa de una u otra vía parece depender de la esteroisometría de los sustratos disponibles.

15. La inclusión de aceites vegetales en las dietas afecta la reaclación de los lípidos en el enterocito. La inclusión de aceite de colza induce una disminución en la reesterificación de los lípidos dietéticos. La inclusión de aceite de soja ocasiona una mayor síntesis relativa de fosfolípidos en comparación con los triacilgliceroles.

***REFERENCIAS CITADAS***

---

---

**8. REFERENCIAS CITADAS**

- AKSNES, A. y MUNDHEIM, H., 1997. The impact of raw material freshness and processing temperature for fish meal on growth, feed efficiency and chemical composition of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 149: 87-106.
- AKSNES, A., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VERGARA, J. y MONTERO, D., 1997. Influence of fish meal quality and feed pellet on growth, feed efficiency and muscle composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 153: 251-261.
- ALEXIS, M.N., 1997. Fish meal and fish oil replacers in mediterranean marine fish diets. *Proceedings of the workshop of the CIHEAM Network on technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM)*, Mazarrón, (España), 24-26 Junio 1996.
- ANGERMÜLLER, S., y DARIUSH FAHIMI, H., 1982. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *Histochemical J.*, 14: 823-835.
- ARZEL, J., MARTINEZ LÓPEZ, F.X., MÉTAILLER, R., STÉPHAN, G., VIAU, M., GANDEMER, G. y GUILLAUME, J., 1994. Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. *Aquaculture*, 123: 361-375.
- AVILA, E.M., 1986a. Evaluation of practical diets in the culture of the rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch) (Pisces: Siganidae) using liver ultrastructural methods. *Zool. Anz. Jena*, 217: 178-191.
- AVILA, E.M., 1986b. The ultrastructural of the hepatocyte of the giant seaperch, *Lates calcarifer* (Bloch) (Pises: Centropomidae) during starvation and refeeding with different diets. *Asian Mar.Biol.*, 3: 129-137.
- AVIRAM, A., 1983. Plasma lipoprotein separation by discontinues density gradient ultracentrifugation in hyperlipo-proteinemic patients. *Biochem. Med.*, 30: 111-118.
- 
-

- BABIN, P.J. y VERNIER, J.M., 1989. Plasma lipoproteins in fish. *J. Lipid Res.*, 30: 467-489.
- BANCROFT, J.D. y STEVENS, A., 1996. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4ª edición. Churchill-Livingstone. Nueva York
- BAUERMEISTER, A.B., SIRE, B.J.S y SARGENT, J.R., 1979. An electron microscopic study of lipid absorption in the pyloric caeca of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed wax esters-rich zooplankton. *Cell Tissue Res.*, 200: 475-486.
- BAUTISTA, M.N., y DE LA CRUZ, M. C., 1988. Linoleic ( $\omega 6$ ) and linolenic ( $\omega 3$ ) acids in the diet of fingerling Milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). *Aquaculture* 71: 347-358.
- BEAMISH, F.W.H. y MEDLAND, T.E., 1986. Protein sparing effects in large rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 55: 35-42.
- BELL, M.V., SIMPSON, C.M.F. y SARGENT, J.R., 1983. (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in the phosphoglycerides of salt secreting epithelia from two marine fish species. *Lipids*, 18: 720-726.
- BELL, M.V., HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R., 1985. Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 193-198.
- BELL, M.V., HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R., 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 911-919
- BERGE, R.K., MADSEN, L., VAAGENES, H., TRONSTAD, K.J., GOTTLICHER, M. y RUSTAN, A.C., 1999. In contrast with docosahexaenoic acid, eicosapentanoic acid and hypolipidaemic derivatives decrease hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreased diacylglycerol acyltransferase activity and stimulation of fatty acid oxidation. *Biochem. J.*, 343: 191-197.
- BERGOT, P. y FLECHON, J.E., 1970. Forme et voie d' absorption des acides gras à chaîne longue chez la Truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* Rich.). II. Lipides "étales". *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 10: 473-480.

- BLACK, D., YOUSSEF, A.M. y SKINNER, E.R., 1983. The mechanism of lipid uptake by tissues in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem Soc. Trans.*, 11: 93-94.
- BREAZILE, J.E., 1971. *Textbook of Veterinary physiology*. Febiger, Philadelphia.
- BRECKENRIDGE, W.C. y KUKSIS, A., 1972. Stereochemical course of diacylglycerol formation in rat intestine. *Lipids*, 7: 256-259.
- BREMMER, J., 1997. The role of carnitine in cell metabolism. En: *Carnitine Today* (C. De Simone y G. Famularo, eds.) Landes Bioscience, Austin, pp.1-38.
- CABALLERO, M.J., LÓPEZ-CALERO, G., SOCORRO, J., ROO, F.J., IZQUIERDO, M.S. y FERNÁNDEZ, A.J., 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179: 277-290.
- CABALLERO, M.J., OBACH, A., ROSENLUND, G., MONTERO, D., GISVOLD, M. y IZQUIERDO, M.S., en prensa. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, en prensa
- CARMAN, G.M., 1997. Phosphatidate phosphatases and diacylglycerol pyrophosphate phosphatases in *Sacchromyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1348: 45-55.
- CARTWRIGHT, I.J., HIGGINS, J.A., WILKINSON, J., BELLEVIA, S., KENDRICK, J.S. y GRAHAM, J.M., 1997. Investigation of the role of lipids in the assembly of very low density lipoproteins in rabbit hepatocytes. *J. Lipid Res.*, 38: 531-545.
- CARTWRIGHT, I.J. y HIGGINS, J.A., 1999. Increased dietary triacylglycerol markedly enhances the ability of isolated rabbit enterocytes to secrete chylomicrons: An effect related to dietary fatty acid composition. *J. Lipid Res.*, 40(10): 1858-1866.
- CASES, S., SMITH, S.J., ZHENG, Y-W., MYERS, H.M., LEAR, S.R., SANDE, E., NOVEAK, S., COLLINS, C., WELCH, C.B., LUSIS, A.J., ERICKSON, S., y FARESE, R.V., Jr., 1998. Identification of a gene encoding and acyl

- CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 13018-13023.
- CATALDI, E., CATAUDELLA, S., MONACO, G., ROSSI, A. y TANCIONI, L., 1987. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. J. Fish. Biol., 30: 135-145.
- CHAPMAN, M.J., GOLDSTEIN, S., MILLS, G.L. LEGER, C., 1978. Distribution and characterization of serum lipoproteins and their apoproteins in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biochemistry, 17: 4455-4464.
- CHAPMAN, M.J., 1980. Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. J. Lipid Res., 21: 789-853.
- CHEVILLE, N.E., 1994. Ultrastructural pathology. An introduction interpretation. Iowa state university press/ames.
- CHOU, B-S. y SHIAU, S-Y., 1996. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. Aquaculture, 143: 185-195.
- CHRISTIE, W.W., 1982. Lipid analysis. Pergamon press, Oxford.
- CLARKE, S.D., 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 281 (4): 865-869.
- COLEMAN, R.A., y BELL, R.M., 1983. Topographic localization of membrane-bound enzymes that metabolize lipids. En: *The Enzymes*, vol.16, eds. Academic, Nueva York
- COLEMAN, R.A., LEWIN, T.M. y MUOIO, D., 2000. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. Annu. Rev. Nutr. 20: 77-103.
- CORRAZE, G., LARROQUET, L., y KAUSHIK, S., 2002. Effect of replacement of fish oil by vegetable oils on growth and lipid deposition in rainbow trout. *Proceeding 10<sup>th</sup> International symposium on nutrition and feeding in fish*. Rhodas (Grecia). Junio
- CROSS, P.C., 1993. Cell and Tissue Ultrastructure. A functional Perspective. Freeman and Company. Nueva York.
-

- DANIELSSEN, D.S., GULBRANDSEN, K.E. y HJERTNES, T., 1989. Fish meal quality in dry feed for turbot (*Scophthalmus maximus* L.). European Aquaculture Society, Special Publication 7: 83-84.
- DEPLANO, M., CONNES, R., DIAZ, J.P. y PARIS, J., 1989. Intestinal steatosis in the farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*. Dis. Aquat. Org., 6: 121-130.
- DEPLANO, M., CONNES, R., y DIAZ, J.P., 1990. Deux types de pathologie intestinale d'origine nutritionnelle chez le Loup (*Dicentrarchus labrax*) en élevage et leur évolution en fonction des saisons. Rec. Méd.Vét., 167(1): 63-72.
- DIAS, J., ALVAREZ, M.J., DIEZ, A., ARZEL, J., CORRAZE, G., BAUTISTA, J.M. y KAUSHIK, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein / energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 161: 169-186.
- DUPLUS, E., GLORIAN, M. y FOREST, C., 2000. Fatty acid regulation of gene transcription. J. Biol. Chem., 275: 30749-30752.
- EL-KERDAWY, A. y SALAMA, A., 1997. Effect of dietary lipid sources on the growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Proceedings of the workshop of the CIHEAM Network on technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM)*, Mazarrón, (España), 24-26 Junio 1996.
- ERFANULLAH, J., 1998. Effect of dietary carbohydrate- to-lipid ratio on growth and body composition of walking cat fish (*Clarias batrachus*). Aquaculture, 16(1-4): 159-168.
- ESCAFFRE, A.M. y BERGOT, P., 1986. Morphologie quantitative du foie des alevins de truite arcen-ciel (*Salmo gairdneri*) issus de gros ou de petits oeufs: incidence de la date de premier repas. Arch. Hydrobiol. 107, 331-348.
- EZEASOR, D.N. y STOKOE, W.M., 1981. Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine, caeca and rectum of the adult rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Rich. J. Fish. Biol., 18: 527-544.
- FAINARU, M., SCHAFFER, Z., GAVISH, D., HAREL, A. y SCHWARTZ, M., 1988. Interactions between human and carp (*Cyprinus carpio*) low density

- lipoproteins (LDL) and LDL receptors. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B: 331-338.
- FARRELL, A.P. y MUNT, B., 1983. Cholesterol levels in the blood of Atlantic salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75A: 239-242.
- FARRELL, A.P., SAUNDERS, L.R., FREEMAN, H.C. y MOMMSEN, T.P., 1986. Arteriosclerosis in Atlantic salmon. Effect of dietary cholesterol and maturation. *Arteriosclerosis*, 6: 453-461.
- FAWCET, D.W., 1992. El hígado y la vesícula biliar. Intestino. En: *Tratado de Histología*. Ed. Interamericana-McGraw Hill, Madrid
- FEAP, [www.aqua-media.com](http://www.aqua-media.com)
- FOLCH, J., LEES, M. y SLOANE-STANLEY, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Biochem.*, 226: 497-509.
- FONTAGNÉ, S., GEURDEN, Y., ESCAFFRE, A.M. y BERGOT, P., 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 161: 213-223.
- FRÉMONT, L. y MARION, D., 1982. A comparison of the lipoprotein profiles in male trout (*Salmo gairdneri*) before maturity and during spermiation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 849-855.
- FRÉMONT, L., LÉGER, C., PETRIDOU, B. y GOZZELINO, M.T., 1984. Effects of a (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet on profiles of serum vitellogenin and lipoprotein in vitellogenic trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 19(7): 522-528.
- FRIEDMAN, H.I. y CARDELL, J.R., 1976. Alterations in the endoplasmic reticulum and golgi complex of intestinal epithelial cells during fat absorption and after termination of this process: a morphological and morphometric study. *Anat. Rec.*, 188: 77-102.
- FRØYLAND, L., HELLAND, K., TOTLAND, G.K., KRYVI, H., y BERGE, R.K., 1996. A hypolipidemic peroxisome proliferating fatty acid induces polydispersity of rat liver mitochondria. *Biol. Cell*, 87: 105-112.

- FRØYLAND, L., MADSEN, L., VAAGENES, H., TOTLAND, G.K., AUWERX, J., KRYVI, H., STAELS, B. y BERGE, R.K., 1997. Mitochondrion is the principal target for nutritional and pharmacological control of triglyceride metabolism. *J. Lipid Res.*, 38: 1851-1858.
- FRØYLAND, L., MADSEN, L., ECKHOFF, K.M., LIE, Ø., y BERGE, R.K., 1998. Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltransferase II, and Acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids*, 33: 923-930.
- FRØYLAND, L., LIE, Ø., y BERGE, R.K., 2000. Mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Nutr.*, 6: 85-89.
- GANGL, A., KORNAUTH, W., MLCZUCH, J. SULM, O y KLOSE, B., 1980. Different metabolism of saturated and unsaturated long chain plasma free fatty acids by intestinal mucosa of rats. *Lipids*, 15: 75-79.
- GEURDEN, I., REYES, O.S., BERGOT, P., COUTTEAU, P. y SORGELOOS, P., 1998. Incorporation of fatty acids from dietary neutral lipid in eye, brain and muscle of postlarval turbot fed diets with different types of phosphatidylcholine. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 365-375.
- GODINO, C., SANTIAGO, A., SANTAMARIA, J., 1990. Estudio histopatológico de las alteraciones producidas en hígado de doradas (*Sparus aurata*) alimentadas con piensos almacenados a diferentes temperaturas. *Actas III Congreso Nac. Acuicult.*: 715-720.
- GROOT, P.H.E., BOER, B.C., HADDEMAN, E., HOUTSMULLER, U.M.T., y HÜLSMANN, W.C., 1988. Effect of dietary fat composition on the metabolism of triacylglycerol-rich plasma lipoproteins in the postprandial phase in meal-fed rats. *J. Lipid Res.*, 29: 541-551.
- GRUNDY, S.M. y DENKE, M.A., 1990. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J. Lipid Res.*, 31: 1149-1172.
- GHITTINO, P., 1978. L' ascite della cieca (*Anguilla anguilla*) d' allevamento da degenerazione lipoidea epatica. *Riv. It. Piscic. Ittiop.A.* 13, 97-100.
- GHADIALLY, F.N., 1988. *Ultrastructural pathology of the Cell and Matrix*. 3ª ed. Butterworths, London, England, vol.1, pp. 442-445
-

- GLICKMAN, R.M. y SABESIN, S.M. 1988. Lipoprotein Metabolism. En: *The liver, Biology and Pathobiology*, 2<sup>nd</sup> ed. Press, Nueva York.
- GREENE, D.H.S., y SELIVONCHICK, D.P., 1987. Lipid metabolism in fish. *Prog. Lipid Res.* 26: 53-85.
- GURR, M.I. y HARWOOD, J.L., 1991. *Lipid Biochemistry. An introduction*. 4<sup>a</sup> edición. Chapman and Hall, Londres. 407 pp.
- GUZMAN, M. y GEELLEN, M.J.H., 1993. Regulation of fatty acids oxidation in mammalian liver. *Biochem. Biophys. Acta*, 1167: 227-241.
- HALVER, J.E., 1989. Lipid requeriments. En: *Fish nutrition*. J.E. Halver (Ed). Academic press, San Diego: 31-109.
- HANLEY, F., 1991. Effects of feeding supplementary diets containig varying levels of lipid on growth, food conversion, and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 93: 323-334.
- HARRIS, W.S., CONNOR, W.E. y McMURRY, M.P., 1983. The comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: salmon oil versus vegetable oils. *Metabolism.*, 32:179-184
- HAVEL, R.J., EDER, H.A. y HAVEL, R.J., 1955. The distribution and chemical composition of ultra-centrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 34: 1345-1353.
- HAYASHI, H., FUJIMOTO, K., CARDELL, J.A., NUTTING, D.F., BERGSTEDT, S. y TSO, P., 1990. Fat feeding increases size, but not the number, of chylomicrons produced by small intestine. *Am. J. Physiol.*, 259: 709-719.
- HAYES, K.C., KHOSLA, P., HAJRI, T. y PRONCZUK, A., 1997. Saturated fatty acids and LDL receptor modulation in humans and monkeys. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 57: 411-418.
- HENDERSON, R.J., 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Anim. Nutr.*, 49: 5-22
- HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R., 1984. Lipid metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containig partially hydrogenated fish oil. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B(3): 557-564.

- HOFFMAN, E.O., FLORES, T.R., COOVER, J. y GARRETT, H.B., 1983. Polychrome stains for high resolution light microscopy. *Laboratory Medicine*, vol14, 12: 779-781.
- HUANG, Y-S., KOKA, K., HORROBIND.F. y SUGANO, M., 1993. Interrelationship between dietary protein, cholesterol and n-6 polyunsaturated fatty acid metabolism. *Prog. Lipid Res.*, 32: 123-137.
- IBEAS, C., IZQUIERDO, M.S. y LORENZO, A., 1994. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 127: 177-188.
- IDE, T., 2000. Effect of dietary alpha-linolenic acid on the activity and gene expression of hepatic fatty acid oxidation enzymes. *Biofactors*, 13: 9-14.
- IJIMA, N., ZAMA, K. y KAYAMA, M., 1983. Effect of the oxidized lipids on the metabolic pathway of lipid biosynthesis in the intestine of carp (*Cyprinus carpio*). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49(9):1465-1470.
- IJIMA, N., AIDA, S., MANKURA, M. y KAYAMA, M., 1990a. Intestinal absorption and plasma transport of dietary triglyceride and phosphatidylcholine in the carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 96A: 45-55.
- IJIMA, N., UEKI, T. y YOSHITAKE, S., 1990 b. Isolation and characterization of carp plasma lipoproteins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 1113-1122.
- IJIMA, N., TANAKA, S. y OTA, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 56-69.
- IKEDA, I., CHA, J.Y., YANAGITA, T., NAKATANI, N., OOGAMI, K., IMAIZUMI, K., y YAZAMA, K., 1998. Effects of dietary alpha-linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on hepatic lipogenesis and  $\beta$ -oxidation in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62: 675-680.
- IZQUIERDO, M.S., 1988. Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de peces marinos. Modificación de la composición lipídica de las presas. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna. 205 pp

- IZQUIERDO, M.S., ARANTZAMENDI, L. y CABALLERO, M.J., 1997. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of sparids by fluorescence-bases assays. 3<sup>th</sup> International Symposium on Research for Aquaculture: fundamental and applied aspects. Barcelona, 24-27 Agosto, 1997.
- IZQUIERDO, M.S., WATANABE, T., TAKEUCHI, T., ARAKAWA, T. y KITAJIMA, C., 1990. Optimum EFA levels in artemia to meet the EFA requirements of red sea bream (*Pagrus major*). En: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture* (M. Takeda y T. Watanabe, eds.), Tokyo Univ. Fisheries, Tokyo, pp. 221-232.
- IZQUIERDO, M.S. y HENDERSON, R.J., 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 153-162.
- IZQUIERDO, M.S., SOCORRO, J., ARANTZAMENDI, L. y HERNÁNDEZ-CRUZ, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish. Physiol. Biochem.*, 22: 97-107
- IZQUIERDO, M.S., TANDLER, A., SALHI, M. y KOLKOVSKI, S., 2001. Influence of dietary polar lipids quantity and quality on ingestion and assimilation of labelled fatty acids by larval gilthead seabream. *Aquacult. Nutr.* 6: 153-160.
- IZQUIERDO, M.S., ROSELUND, G., ARANTZAMENDI, L., ROBAINA, L., MONTERO, D., y OBACH, A., Dietary lipid sources for seabream and seabass I: Growth performance, tissue composition and flesh quality. En preparación.
- JOBLING, M., KNUDSEN, R., PEDERSEN, P.S. y DOS SANTOS, J., 1991. Effects of dietary composition and energy content on the nutritional energetics of cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 92: 243-257.
- JOHNSTON, J.M., PALTAUF, F., SCHILLER, C.M. y SCHULTZ, L.D., 1970. The utilization of the  $\alpha$ -glycerophosphate and monoglyceride pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in the intestine. *Biochem. Biophys. Acta*, 218: 124-133.

- JOHNSTON, J.M., 1977. Gastrointestinal tissue. En: *Lipid Metabolism in Mammals* (F. Snyder, ed), Plenum Press, New York, pp. 151-187.
- JOHNSTON, J.M., 1978. Esterification reactions in the intestinal mucosa and lipid absorption. En: *Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism*. J.M.Dietschy, A.M. Gotto y J. A. Ontko, (eds). American Physiological Society. Bethesda, MD: 57-68.
- JUANEDA, P. y ROCQUELIN, G., 1985. Rapid and convenient separation of phospholipids and non-phosphorous lipids from rat using silica cartridges. *Lipids*, 20: 40-41.
- JUMP, D.B., REN, B., CLARKE, S.D., y THELEN, A. 1995. Effects of fatty acids on hepatic gene expression. *Prostaglandins Leuko. Essent. Fatty Acids*, 52: 107-111
- KABIR, Y., e IDE, T., 1996. Activity of hepatic fatty acid oxidation enzymes in rats fed alpha-linolenic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 1304: 105-119.
- KALOGEROPOULOS, N., ALEXIS, M.N. y HENDERSON, R.J., 1992. Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 104: 293-308.
- KALOPISSIS, A.D., GRIGLIO, S., y LE LIEPVRE, X., 1982. Intestinal very low density lipoprotein secretion in rats fed various amounts of fat. *Biochem. Biophys Acta*, 711(1): 33-39.
- KANAZAWA, A., 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. En: *Nutrition and feeding in fish*. (C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell, eds.), Academic press, Londres: 281-298.
- KARNORSKY, M.J., 1971. Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. 14<sup>th</sup> Meeting, Am.Soc.Cell Biol., New Orleans, L.A., USA, p.146.
- KAUSHIK, S.J. 1997. Nutritional and the improvement of the seabass and seabream production in the Mediterranean Region. En: *Recent developments in the nutrition and feeding of marine finfish of interes to the Mediterranean*. ALIA Tradesshow, Thessaloniki, Grecia.
-

- KAUSHIK, S.J y MEDALE, F., 1994. Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture*, 124: 81-87.
- KENT, C. 1997. CTP: phosphocholine cytidylyltransferase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1348: 79-90.
- KIESSLING, K.H. y KIESSLING, A., 1993. Selective utilization of fatty acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) red muscle mitochondria. *Can. J. Zool.*, 71: 248-251
- KNIGHTS, M. 1985. Energetics and fish farming. En: *Fish energetics, new perspectives*. P.Tyler y P. Calow (eds). Groom Helm, Londres: 309-340.
- KOVEN, W.M., HENDERSON, R.J. y SARGENT, J.R., 1994. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) I: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiol. Biochem.*, 13: 69-79.
- KRAJNOVIC-OZRETIC, M., NAJDEK, M. y OZRETIC, B., 1994. Fatty acids in liver and muscle of farmed and wild sea bass (*Dicentrachus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 109(3): 611-617.
- KUKSIS, A. y MANGANARO, F., 1986. Biochemical characterization and purification of intestinal acylglycerol acyltransferases. En: *Fat absorption*, Vol. I (A. Kuksis, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 223-259.
- KUKSIS, A. y LEHNER, 2001. Intestinal synthesis of triacylglycerols. En: *Intestinal lipid metabolism* (Mansbach, C.M., Tso, P. y Kuksis, A. eds.) Kluwer Academic /Plenum Publishers, Nueva York: 185-213.
- KUMAMOTO, T., e IDE, T., 1998. Comparative effects of alpha- and gamma-linolenic acids on rat liver fatty acid oxidation. *Lipids*, 33: 647-654.
- KUMAR, N.S. y MANSBACH, C.M., 1997. Determinants of triacylglycerol transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi in intestine. *Am. J. Physiol.*, 273: 18-30.
- KWON, H.C., HAYASHI, S. y MUGIYA, Y., 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B: 381-386.

- LAI, H-C., y NEY, D.M., 1995. Corn oil, palm oil and butterfat fractions affect postprandial lipemia and lipoprotein lipase in meal-fed rats. *J. Nutr.*, 125: 1536-1545.
- LANARI, D., POLI, B.M., BALLESTRAZI, R., LUPI, P., D'AGARO, E. y MECATTI, M., 1999. The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. *Aquaculture*, 179: 351-364.
- LÉGER, C., 1988. Digestion, absorption and transport of lipids. En: *Nutrition and feeding in fish*. (Editado por Cowey, C.B., Mackie, A.M. y Bell, J.G). Academic press. 299-331.
- LÉGER, C., FREMONT, L., BERGOT, P., y FLANZY, J., 1979. Quelques recherches sur la digestion, l'absorption, le transport et le stockage des lipides chez le poisson. Intérêt d'une biochimie comparée des lipides. *Médecine et Nutrition*, vol.15, n°1: 61-67.
- LÉGER, C., FREMONT, L. y BOUDON, M., 1981. Fatty acid composition of lipids in the trout. I. Influence of dietary fatty acids on the triglyceride fatty acid desaturation in serum, adipose tissue, liver, white and red muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 99-105.
- LEHNER, R. y KUKSIS, A., 1992. Utilization of 2-monoacylglycerols for phosphatidylcholine biosynthesis in the intestine. *Biochem. Biophys. Acta*, 1125: 171-179.
- LEHNER, R. y KUKSIS, A., 1993. Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J. Biol. Chem.*, 268: 8781-8786.
- LEHNER, R. y KUKSIS, A. 1995. Triacylglycerol synthesis by purified triacylglycerol synthetase of rat intestinal mucosa: Role of acyl-CoA acyltransferase. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 270, 23(9): 13630-13636.
- LEHNER, R., KUKSIS, A. y ITABASHI, Y., 1993. Stereospecificity of monoacylglycerol and diacylglycerol acyltransferases from rat intestine as
-

- determined by chiral phase high-performance liquid chromatography. *Lipids*, 28: 29-34.
- LEMAIRE, P., DRAI, P., MATHIEU, A., LEMAIER, S., CARRIÈRE, S., GIUDICELLI, J. y LAFAURIE, M., 1991. Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 93: 63-75.
- LIED, Ø. y LAMBERTSEN, G., 1982. Apparent availability of fat and individual fatty acids in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fisk.Dir.Skrifter, Ser.Ernæring*, II, 63-75.
- LIE, Ø., LIED, E. y LAMBERTSEN, G., 1986. Liver retention of fat and of fatty acids in cod (*Gadus morhua*) fed different oils. *Aquaculture*, 59: 187-196.
- LIE, Ø., LIED, E. y LAMBERTSEN, G., 1987. Lipid digestion in cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 88B: 697-700.
- LIE, Ø., SANDVIN, A. y WAAGBØ, R., 1993. Influence of dietary fatty acids on the lipid composition of lipoproteins in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 249-260.
- LIE, Ø., SANDVIN, A. y WAAGBØ, R., 1994. Transport of alpha-tocopherol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during vitellogenesis. *Fish Physiol. Biochem.*, 13: 241-247.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193: 265-275.
- MADSEN, L., RUSTAN, A.C. VAAGENES, H., BERGE, K., DYROY, E. y BERGE, R.K., 1999. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids*, 34(9): 951-963.
- MANSBACH, C.M., ARNOLD, A. y COX, M.A., 1985. Factors influencing triacylglycerol delivery into mesenteric lymph. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 249: 642-648.
- MANSBACH, C.M., TSO, P. y KUKSIS, A., 2001. *Intestinal Lipid Metabolism*. Ed. Kluwer Academic, Nueva York, 433 pp

- MARTIN, R.E., RODRÍGUEZ de TURCO, E.B. y BAZAN, N.G., 1994. Developmental maturation of hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid metabolism: suplí of docosahexaenoic acid to retina and brain. *J. Nutr. Biochem.*, 5: 151-160.
- MARTOJA, R. y MARTOJA-PIERSON, M., 1970. *Técnicas de Histología Animal*. Ed. Toray-Masson S.A., Barcelona, 350 pp
- McCALLUM, I.M. y HIGGS, D.A., 1989. Aspects of protein utilisation in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Nutritive value of marine protein sources considering the effects of processing conditions. *Aquaculture*, 77: 181-200.
- McKAY, M.C., LEE, R.F., y SMITH, M.A.K., 1985. The characterization of the plasma lipoproteins of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Physiol. Zool.*, 58: 693-704.
- McCLELLAND, G., ZWINGELSTEIN, G., WEBER, J-M. y BRICHON, G., 1995. Lipid composition of tissue and plasma in two mediterranean fishes, the gilthead seabream (*Chrysophrys auratus*) and the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 52: 161-170.
- MOKSNESS, E., ROSENLUND, G. y LIE, O., 1995. Effect of fish meal quality on growth of juvenile wolffish, *Anarhichas lupus* L.. *Aquacult. Res.*, 26: 109-115.
- MONTERO, D., 1996. Efecto de las deficiencias nutricionales de  $\alpha$ -tocoferol y n-3 HUFA sobre la resistencia a condiciones estresantes de cultivo en juveniles de dorada (*Sparus aurata*). Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, pp. 262.
- MONTERO, D, y IZQUIERDO, M.S., 1998. Efecto de los lípidos dietéticos en la salud y resistencia a estrés en peces. Act. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, México. Noviembre 1998.
- MONTERO, D., ROBAINA, L.E., SOCORRO, J., VERGARA, J.M., TORT, L. Y IZQUIERDO, M.S., 2001. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high

## Referencias

---

- stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiol. Biochem.*, 24: 63-72.
- MOSCONI-BAC, N., 1987. Hepatic disturbances induced by artificial feed in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first year of life. *Aquaculture* 153: 251-261.
- MOSCONI-BAC, N., 1990. Reversibility of artificial feed-induced hepatocyte disturbances in cultured juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*): an ultrastructural study. *Aquaculture*, 88: 363-370.
- MOURENTE, G. y TOCHER, D., 1993. Incorporation and metabolism of <sup>14</sup>C-labelled polyunsaturated fatty acids in juvenile seabream *Sparus aurata* L. *in vivo*. *Fish Physiol. Biochem.*, 10(6): 443-453.
- MOURENTE, G., RODRÍGUEZ, A., TOCHER, D. y SARGENT, J.R., 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture*, 112: 79-98.
- MUNDHEIM, H. y OPSTVEDT, O., 1989. Effect of dietary level of protein and fiber on apparent protein digestibility in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and salmon (*Salmon salar*) and comparison of protein digestibility in mink (*Mustela vison*), rainbow trout and salmon. En: *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.) Laboratory of Fish Nutrition, Tokyo, pp. 195-200.
- NELSON, G.J., y SHORE, V.G., 1974. Characterization of the serum high density lipoproteins of pink salmon. *J. Biol. Chem.*, 259: 536-542.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J. y GAS, N., 1979. Structure and function of the intestinal epithelial cells in the perch (*Perca fluviatilis* L.). *Anat. Rec.*, 195: 621-640.
- OCKNER, R.K., y MANNING, J.A., 1976. Fatty acid binding protein: Role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine. *J. Clin. Invest.*, 58: 632-641.
- OLSEN, R.E., y RINGØ, E., 1997. Lipid digestibility in fish : A review. *Recent Res. Devel. In Lipids Res.*, 1: 199-265.

- OLSEN, R.E., HENDERSON, R.J. y RINGØ, E., 1998. The digestion and selective absorption of dietary fatty acids in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquacult. Nutr.*, 4: 13-21.
- OLSEN, R.E., MYKLEBUST, R., KAINO, T., y RINGØ, E., 1999. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.* 21: 35-44.
- OLSEN, R.E., MYKLEBUST, R., RINGØ, E., y MAYHEW, T.M., 2000. The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiol. Biochem.* 22: 207-216.
- OSMUNDTSEN, H., BREMER, J. y PEDERSEN, J.I., 1991. Metabolic aspects of peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *Biochem. Biophys. Acta*, 1085: 141-158.
- PARKS, J.S. HUGGINS, K.W., GEBRE, A.K. y BURLESON, E.R., 2000. Phosphatidylcholine fluidity and structure affect lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.*, 41(4): 546-553.
- PÉREZ, H. y OLIVA-TELES, A., 1999. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179: 325-334.
- PÉREZ, J.A., RODRÍGUEZ, C. y HENDERSON R.J., 1999. The uptake and esterification of radiolabelled fatty acids by enterocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 20: 125-134.
- PIKE, I.H., ANDORSDDOTTIR, G. y MUNDHEIM, H., 1990. The role of fish meal in diets for salmonids. *IAFMM, Techn. Bull. n° 24*, March.
- POLVI, S.M. y ACKMAN, R.G., 1992. Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle lipids and their response to alternative dietary fatty acids sources. *J. Agric. Food Chem.*, 40: 1001-1007.
- POUMES-BALLIHAUT, C., LANGELIER, B., HOULIER, F., ALESSANDRI, J.M., DURAND, G., LATGE, C., y GUESNET, P., 2001. Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. *Lipids*, 36: 793-800.
-

- RINGØ., E. y OLSEN, R.E., 1994. Lipid nutrition in arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): a mini review. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 823-838.
- ROBAINA, L., IZQUIERDO, M.S., MOYANO, F.J., SOCORRO, J., VERGARA, J.M., MONTERO, D. y FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 130: 219-233.
- ROBERTS, R.J., y BULLOCK, A.M., 1989. Nutritional pathology. En: *Fish nutrition*. (J.E. Halver eds.). Academic press, San Diego: 423-473.
- RODRÍGUEZ, C., DÓPIDO, R., GÓMEZ, T. y DÍAZ, M., 2001. Perfil de clases lipídicas y ácidos grasos de enterocitos aislados a lo largo del tracto intestinal de la dorada (*Sparus aurata*). VIII Congreso Nacional de Acuicultura, Santander (España), 22-25 Mayo, 2001
- RUSTAN A.C., CHRISTIANSEN, E.N., y DREVON, C.A, 1992. Serum lipids, hepatic glycerolipid metabolism and peroxisomal fatty acid oxidation in rats fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Biochem. J.*, 283: 333-339.
- SANTULLI, A., CURATOLO, A., MODICA, A. y D'AMELIO, A. 1989. Serum lipoproteins of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Purification and partial characterization by density gradient ultracentrifugation and agarosa column chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B: 613-619.
- SANTULLI, A., MESSINA, C.M. y D'AMELIO, A. 1997. Variations of lipid and apolipoprotein content in lipoproteins during fasting in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A: 1233-1239.
- SARGENT, J.R., HENDERSON, R.J. y TOCHER, D.R., 1989. The lipids. En: *Fish nutrition* (J.E. Halver ed.). Academic press, San Diego: 153-218.
- SARGENT, J.R., BELL, J.G., BELL, M.V., HENDERSON, R.J. y TOCHER, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.*, 11: 183-198.
- SEGNER, H. y BRAUNBECK, T., 1988. Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. *Fish Physiol. Biochem.*, 5 (2): 79-97.

- SEGNER, H. y WITT, U., 1990. Weaning experiments with turbot (*Scophthalmus maximus*): electron microscopic study of liver. *Mar. Biol.* 105: 353-361.
- SEGNER, H., OREJANA-ACOSTA, B. y JUARIO, J.V., 1984. The dietary value of *Brachionus plicatilis* grown on three different species of phytoplankton on the ultrastructure of the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsk.) fry. *Aquaculture*, 42: 109-115.
- SEGNER, H., BURKHARDT, P., AVILA, E.M., JUARIO, J.V. y STORCH V. 1987. Nutrition-related histopathology of intestine of milkfish *Chanos chanos* fry. *Dis. Aquat. Org.*, 2: 99-107.
- SESSLER, AM. y NTAMBI, J.M., 1998. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.* 128: 923-926.
- SHEARER, K.D. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119: 63-88.
- SHERIDAN, M.A., 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B, 4: 679-690.
- SHERIDAN, M.A., FRIEDLANDER, J.K.L. y ALLEN, W.V. 1985. Chylomicra in the serum of postprandial steel head trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 281-284.
- SIGURGISLADOTTIR, S., LALL, S.P., PARRISH, C.C. y ACKMAN, R.G., 1992. Cholestane as a digestibility marker in the absorption of polyunsaturated fatty acid ethyl esters in Atlantic salmon. *Lipids*, 27: 418-424.
- SIRE, M.F. y VERNIER, J.M., 1981. Étude ultrastructurale de la synthèse de chylomicrons au cours de l'absorption intestinale des lipides chez la Truite. Influence de la nature des acides gras ingérés. *Bio. Cell*, 40: 47-62.
- SIRE, M.F., LUTTON, C. y VERNIER, J.M., 1981. New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *J. Lipid Res.* 22: 81-94.
- SKREDE, A., 1979. Utilization of fish and animal byproducts in mink nutrition: IV. Fecal excretion and digestibility of nitrogen and amino acids in mink fed cod fillet or meat-and bone-meal. *Act. Agric. Scand.*, 29: 241-257.
-

- SKINNER, E.R. y ROGIE, A. 1978. The isolation and partial characterization of the serum lipoproteins and apoproteins of the rainbow trout. *Biochem. J.*, 173: 507-520.
- SOKAL, R.R. y ROLF, F. J., 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* 3<sup>rd</sup> edn. W.H. Freeman & Co, New York, 419pp.
- SPADY, D.K., 1993. Regulatory effects of individual n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on LDL transport in the rat. *J. Lipid Res.*, 34(8): 1337-1346.
- SPISNI, E., TUGNOLI, M., PONTICELLI, A., MORDENTI, T. y TOMASI, V., 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *J. Fish Dis.*, 21: 177-184.
- STAKE, P.E., FREDRICKSON, T.N. y BOURDEAU, C.A., 1980. Induction of fatty liver-hemorrhagic syndrome in laying hens by exogenous  $\beta$ -estradiol. *Avian Dis.*, 25(2): 410-422.
- STALS, H.K., MANNAERTS, G.P. y DECLERCQ, P.E., 1992. Factors influencing triacylglycerol synthesis in permeabilized rat hepatocytes. *Biochem. J.*, 283: 719-725.
- STORCH, V. y JUARIO, J.V., 1983. The effect of starvation and subsequent feeding on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings and fry. *J. Fish Biol.*, 23: 95-103.
- STORCH, V., SEGNER, H., JUARIO, J.V. y DUARY, M.N., 1984. Influence of nutrition on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Chanidae: teleostei). *Zool. Anz.*, 213(3/4): 151-160.
- STRÜSSMAN, C.B. y TAKASHIMA, F., 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish. Biol.* 36: 59-65.
- STUBHAUG, I., FRØYLAND, L., y TORSTENSEN, B.E., 2002. Fatty acid catabolism in atlantic salmon, *Salmo salar* L. Effects of replacing dietary capelin oil with rapeseed oil and olive oil. *Proceeding 10<sup>th</sup> International symposium on nutrition and feeding in fish.* Rhodas (Grecia). Junio

- TACON, A.G.J., 1996. Lipid nutritional pathology in farmed fish. Arch. Anim. Nutr., 49: 33-39.
- TAKEUCHI, T., TOYOTA, M., SATOH, S. y WATANABE, T., 1990. Requeriments of juvenile red seabream, *Pagrus major*, for eicosapentaenoic and docosaexaenoic acids. Nippon Suisan Gakkaishi, 56: 1263-1269.
- THORNBURG, J.T., PARKS, J.S. y RUDEL L.L., 1995. Dietary fatty acid modification of HDL phospholipid molecular species a lecithin:cholesterolacyltransferase reactivity in cynomolgus monkeys. J. Lipid. Res., 36(2): 277-289.
- TIJBURG, L.B.M., HUELEN, M.J.H. y VAN GOLDE, L.M.G., 1989. Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. Biochem. Biophys. Acta, 1004: 1-19.
- TORSTENSEN, B.E., 2000. Transport and metabolism of lipids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Tesis doctoral. Universidad de Bergen (Noruega), pp. 84
- TORSTENSEN, B.E., LIE, Ø., y FRØYLAND, L., 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. Lipids, 35: 653-663.
- TOTLAND, G.K., MADSEN, L., KLEMENTSEN, B., VAAGENES, H., KRYVI, H., FRØYLAND, L., HEXEBERG, S y BERGE, R.K., 2000. Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acid acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids. Biol. Cell, 92(5): 317-329.
- TRÍPODI, A., LORIA, P., DILENGITE, M.A. y CARULLI, N., 1991. Effect of fish oil and coconut oil diet on the LDL receptor activity of rat liver plasma membranes. Biochem. Biophys. Acta, 1083: 298-304.
- TSO, P., 1994. Intestinal lipid absorption. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (L.R. Johnson, ed), Raven press, Nueva York, pp.1867-1907.
- TSO, P., KENDRICK, M., BALINT, J.A., y SIMMONDS, W.J., 1981. Role of biliary phosphatidylcholine in the absorption and transport of dietary triolein in the rat. Gastroenterol., 80: 60-65.
-

- TSO, P., DRAKE, D.S., BLACK, D.D. y SABESIN, S.M., 1984. Evidence for separate pathways of chylomicron and very low density lipoprotein assembly and transport by rat small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 247: 599-610.
- TSUJITA, T., MIYAZAKI, T., TABELI, R. y OKUDA, H., 1996. Coenzyme A-independent monoacylglycerol acyltransferase from rat intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.*, 271: 2156-2161.
- VAN DER MEER, M.B., ZAMORA, J.E. y VERDEGEM, M.C.J., 1997. Effect of dietary lipid level on protein utilization and the size and proximate composition of body compartments of *Colossoma macropomun* (Cuvier). *Aquacult. Res.*, 28: 405-417.
- VAN GREEVENBROEK, M.M.J., VOORHOUT, W.F., ERKELENS, D.W., VAN MEER, G. y de BRUIN, T.W.A., 1995. Palmitic acid and linoleic acid metabolism in Caco-2 cells: different triglyceride synthesis and lipoprotein secretion. *J. Lipid. Res.*, 36: 13-24.
- VERGARA, J.M., ROBAINA, L., IZQUIERDO, M.S. y DE LA HIGUERA, M., 1996. Protein sparing effect of lipids in diets for fingerlings of gilthead seabream. *Fisheries Sci.*, 62: 624-628.
- WARNICK, G.R., CHEUNG, M.C. y ALBERS, J.J., 1979. Comparison of current methods for high density lipoprotein cholesterol quantitation. *Clin.Chem.*, 25: 596-604.
- WATANABE, T., 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp.Biochem.Physiol.*, 73B: 3-15.
- WATHNE, E. 1995. Strategies for directing slaughter quality of farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) with emphasis on diet composition and fat deposition. Tesis doctoral, 230pp.
- WEATHERUP, R.N. MCCRACKEN, K.J., FOY, R., RICE, D., MCKENDRY, J., MAIRS, R.J. y HOEY, R., 1997. The effects of dietary fat content on performance and body composition of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 151: 173-184.
- WEIBEL, E.R., 1979. Stereological methods, vol.1 Academic press, Nueva York.

- WILLIAMS, C.M., 1998. Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance. *Atherosclerosis*, 141(1): 87-92.
- YANG, L-Y., y KUKSIS, A., 1991. Apparent convergence (at 2-monoacylglycerol level) of phosphatidic acid and 2-monoacylglycerol pathways of synthesis of chylomicron triacylglycerol. *J. Lipid Res.*, 32: 1173-1186.
- YILDIZ, M., y SENER, E., 1997. Effect of dietary supplementation with soybean oil, sunflower oil or fish oil on the growth of seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Proceedings of the workshop of the CIHEAM Network on technology of aquaculture in the Mediterranean (TECAM)*, Mazarrón, (España), 24-26 Junio 1996.

