

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA



**“EFECTO DE COLESTEROL EN ALIMENTO SOBRE EL CRECIMIENTO
DEL JUREL DE CASTILLA (*Seriola lalandi*) Y SU ACUMULACIÓN EN
HÍGADO Y MÚSCULO”.**

TESIS

**Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta

FERNANDO MAURITH GUERRA OLVERA

Ensenada, Baja California, Octubre de 2014.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

“EFECTO DE COLESTEROL EN ALIMENTO SOBRE EL CRECIMIENTO
DEL JUREL DE CASTILLA (*Seriola lalandi*) Y SU ACUMULACIÓN EN
HÍGADO Y MÚSCULO”.

TESIS

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

FERNANDO MAURITH GUERRA OLVERA

Aprobado por



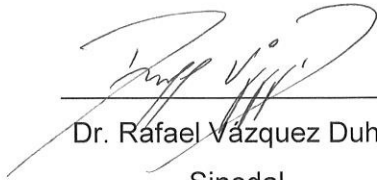
Dra. María Teresa Viana Castrillón

Directora de Tesis



Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Sinodal



Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Sinodal

RESUMEN

Se alimentó a juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) con cuatro dietas con diferente contenido de colesterol para estimar el efecto sobre el crecimiento y la acumulación de colesterol en tejidos de hígado y músculo. Las dietas incluyeron las siguientes concentraciones de colesterol: Dieta *Col0.0*: 530, *Col0.05*: 2,880, *Col0.12*: 4,120 y *Col0.19*: 6,170 mg kg⁻¹ de grasa cruda. Al término de 60 días el mayor crecimiento correspondió a los peces alimentados con la dieta *Col0.05*, resultando mayor que *Col0.0* y *Col0.19*, pero sin diferencias significativas con respecto a la dieta *Col0.12*. La concentración de colesterol en hígado y músculo no fue influenciada por el contenido de colesterol en las dietas. Se asume que juveniles de *Seriola lalandi* son capaces de sintetizar colesterol cuando se les suministra en cantidades reducidas en el alimento, pero este proceso es acompañado por reducción de crecimiento. Se concluye que el contenido de colesterol en las dietas acuícolas para *Seriola lalandi* tiene efectos sobre su crecimiento. El máximo crecimiento fue registrado con la concentración de 2,880 mg kg⁻¹. Se estimó el requerimiento de colesterol mediante regresión cuadrática como 3,020 mg kg⁻¹ de grasa cruda. No se detectaron precursores de la biosíntesis de colesterol en los tejidos de hígado y músculo de los jureles al final del experimento. La ausencia de acumulación en músculo e hígado de los fitoesteroles que son ingeridos en el alimento sugiere que estos son metabolizados rápidamente.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada gracias a una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Agradezco a José Vinicio Macías Zamora y Nancy Ramírez Álvarez por su apoyo con el análisis de muestras por medio de GC-MS y facilitar el equipo necesario. A la empresa Baja Seas S. A. de C. V. por la donación de los juveniles de Jurel de Castilla.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	VII
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	7
Objetivo general	7
Objetivos particulares	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Dietas experimentales	8
Sistema de cultivo	10
Análisis proximales	12
Extracción de lípidos y cuantificación de colesterol	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	14
RESULTADOS	15
Crecimiento y supervivencia	15
Colesterol en tejidos	16
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración típica de esteroides en lípidos de origen animal y vegetal.....	17
Figura 2. Cromatograma mostrando los esteroides identificados en las dietas experimentales con cuatro distintas concentraciones de colesterol.....	18
Figura 3. Regresión polinomial de segundo orden entre el peso final de juveniles de jurel de Castilla (<i>Seriola lalandi</i>) y cuatro concentraciones de colesterol en el alimento.....	19
Figura 4. Concentraciones de colesterol en hígado de jurel de Castilla (<i>Seriola lalandi</i>) alimentado con cuatro distintas concentraciones de colesterol.....	20
Figura 5. Concentraciones de colesterol en músculo de jurel de Castilla (<i>Seriola lalandi</i>) alimentado con cuatro distintas concentraciones de colesterol.....	21
Figura 6. Cromatograma de tejido de hígado de jurel de Castilla (<i>Seriola lalandi</i>).....	22
Figura 7. Cromatograma de tejido muscular de jurel de Castilla (<i>Seriola lalandi</i>).....	23

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Ingredientes (g por cada 100 g), composición proximal con base en peso seco (%) de cuatro dietas experimentales con diferentes concentraciones de colesterol.....24

Cuadro 2. Índices biológicos, tasa de supervivencia y concentraciones de colesterol en hígado y músculo de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*).....25

INTRODUCCIÓN

El jurel de Castilla (*Seriola lalandi*, YTK) es un pez marino con altos requerimientos energéticos (Pirozzi & Booth, 2009) y tiene una distribución mundial en aguas subtropicales y templadas. Debido a su crecimiento rápido (Moran *et al.*, 2009) es cultivado mundialmente, principalmente en jaulas en el mar (Fernandes & Tanner, 2008). También hay interés de cultivarlo en sistemas de recirculación acuícola con el fin de minimizar los impactos sobre el ambiente y alcanzar con mayor rapidez las tallas que demanda el mercado (Abbink *et al.*, 2011; Orellana *et al.*, 2013). Como ocurre con otras especies de importancia para la acuicultura, se realizan numerosos estudios con el fin de reemplazar la harina de pescado (FM) y el aceite de pescado (FO) con ingredientes alternativos. Aceite de pollo (PO) y aceite de canola (CO) en sustitución de FO (Bowyer *et al.*, 2012) y harina de soya (SBM) en lugar de FM (Bowyer *et al.*, 2013) han sido utilizados en dietas acuícolas para YTK. Debido a su impacto económico y sobre la sustentabilidad de las pesquerías, la necesidad de reducir el uso de FO y FM en las dietas acuícolas es bien conocida y ha sido un punto central en la investigación realizada sobre nutrición acuícola por más de una década (Tacon & Metian, 2009; Hardy, 2010).

La mayoría de los estudios sobre sustitución de FO por aceites vegetales (VO) se han enfocado en mantener en las dietas las cantidades necesarias de ácidos grasos poli insaturados de cadena larga (LC-PUFA) para el óptimo desarrollo de los peces. Principalmente los ácidos grasos esenciales eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA) (Turchini *et al.*, 2009; Nasopoulou & Zabetakis,

2012). Por el contrario, son escasos los estudios sobre la cantidad de colesterol necesaria para el desarrollo de los peces.

El colesterol es una biomolécula presente en todas las células animales. Tiene propiedades anfipáticas, conferidas por un grupo hidroxilo enlazado a un esqueleto de 27 átomos de carbono que contiene un núcleo rígido de cuatro anillos no aromáticos. Cumple funciones diversas, como formar parte de la bicapa lipídica de las membranas celulares, en las que modula su fluidez y permeabilidad. El colesterol es necesario para la síntesis de sales biliares, que facilitan la digestión de los lípidos al emulsificarlos, formando micelas e incrementando la actividad de lipasas (Iijima *et al.*, 1998). Es precursor de hormonas esteroideas, como los estrógenos y testosterona. Los corticosteroides, como progesterona, aldosterona y corticosterona, también derivados de colesterol, intervienen en la regulación del sistema inmunológico y reacciones inflamatorias. Todas estas funciones hacen del colesterol una biomolécula versátil y de gran importancia para organismos animales. El FO es una fuente abundante de colesterol, con concentraciones que oscilan entre 5,210 mg kg⁻¹ y 7,660 mg kg⁻¹ de aceite (Figura 1), cantidades muy superiores a las encontradas en otras grasas de origen animal. El PO contiene 580 mg kg⁻¹, la manteca de cerdo 930 mg kg⁻¹ y la grasa de res 1,090 mg kg⁻¹ (Higgs & Dong, 2000).

Los VO, frecuentemente utilizados en la formulación de alimentos para peces, tienen una composición de esteroides muy distinta respecto al FO, pues carecen de colesterol. En su lugar contienen fitoesteroides como β -sitosterol, stigmasterol, campesterol o brasicasterol, entre otros. La cantidad y proporción depende de la fuente vegetal, sin embargo el β -sitosterol suele ser el más abundante (Abidi, 2001). El

contenido de fitoesteroles en el aceite de palma varía de 362 a 627 mg kg⁻¹, el aceite de soya 1,837 ~ 4,089 mg kg⁻¹, el CO 4,824 ~ 11,276 mg kg⁻¹. Por lo tanto, cuando se sustituye FO por VO, el perfil de esteroides de las dietas acuícolas es modificado, reduciéndose la concentración de colesterol e incrementándose la de fitoesteroides. Los fitoesteroides, al ser ingeridos, no cumplen las mismas funciones que el colesterol en los animales. Los fitoesteroides compiten directamente con las moléculas de colesterol en los mecanismos de asimilación, desplazándolo de las micelas en el lumen intestinal, disminuyendo así su absorción. Esta característica ha promovido su uso como tratamientos para la hipercolesterolemia en humanos, reduciendo significativamente las concentraciones de colesterol en plasma sanguíneo cuando son ingeridos (Normen *et al.*, 2001; Ostlund, 2004; Ketomaki *et al.*, 2005).

En un trabajo con lobina europea (*Dicentrarchus labrax*), los peces fueron alimentados con dietas en donde se reemplazó casi toda la FM, rica en colesterol, por una mezcla de harinas vegetales (VM), por un periodo de doce semanas, sin presentar reducciones significativas en el crecimiento. A pesar de que se agregó FO a las dietas entre en un 15 y 20 %, encontraron una disminución significativa de las concentraciones de colesterol en plasma sanguíneo (Kaushik *et al.* 2004). Se han registrado efectos similares en otras especies. Hansen *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la substitución de la FM sobre el crecimiento del bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*); y encontraron que después de 28 semanas el crecimiento sólo disminuyó en los peces que fueron sometidos a substituciones superiores al 50 %. Sin embargo, la concentración de colesterol en la sangre disminuyó con todos los niveles de substitución (25, 50, 75 y 100 % por una mezcla de SBM, extracto de proteína de soya

-SPI- y gluten de harina de trigo -WGM-), presentando una relación inversa conforme disminuía la proporción de FM. Sitjà-Bobadilla *et al.* (2005) en un bioensayo con duración de seis meses también encontraron una alta correlación negativa ($r = -0.988$, $P < 0.05$) entre la concentración de colesterol en la sangre de los peces y la inclusión de VM como reemplazo de FM (sustituciones de 50, 75 y 100 %) en dietas para dorada (*Sparus aurata*).

En otro bioensayo con *Dicentrarchus labrax*, se substituyó el 60 % del FO por una mezcla de CO, linaza y palma durante 64 semanas; el crecimiento no disminuyó significativamente pero fue apreciable la presencia de hipocolesterolemia en los peces alimentados con los VO respecto a los alimentados con FO (Richard *et al.* 2006). En el caso del salmón del Atlántico (*Salmo salar*), cuando Jordal *et al.* (2007) substituyeron el 100 % del FO por una mezcla de VO (CO, palma y linaza), encontraron concentraciones de colesterol en plasma significativamente menores que aquellos alimentados con FO. Esta diferencia sólo la encontraron dentro de los primeros diez meses de engorda de los juveniles (de talla inicial de 0.160 ± 0.052 g), es decir, durante la etapa de vida en agua dulce. Tras la transición a agua de mar, las concentraciones de colesterol en plasma de ambos grupos de peces no presentaron diferencias. La hipocolesterolemia también fue observada en un ensayo de cinco semanas con YTK (Bowyer *et al.*, 2012); los peces fueron alimentados con dietas con reemplazos de 50 y 100 % de FO por CO y PO. El reemplazo de 50 % no produjo hipocolesterolemia, mientras que los reemplazos de 100 % tanto por CO como por PO, generaron disminuciones significativas en la concentración de colesterol en el plasma sanguíneo de los peces.

Aunque se sabe que los peces tienen la capacidad de sintetizar colesterol (Leaver *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2010), no hay evidencias concretas acerca de cuanto colesterol o con qué eficacia puede ser sintetizado. Los procesos metabólicos de regulación de homeostasis de colesterol en peces son desconocidos hasta la fecha, y dado que el colesterol puede ser sintetizado, no es considerado un nutriente esencial. Aún así, los reportes indican que la inclusión de VO y VM en dietas acuícolas para varias especies de peces, tienen efecto sobre el balance de colesterol, induciendo hipocolesterolemia. Por otra parte, cuando las dietas acuícolas son suplementadas con taurina, se ha observado una reducción de los signos hipocolesterolémicos en el medregal de Japón (jurel Japonés, *Seriola quinqueradiata*) (Maita *et al.*, 2006).

La taurina interviene en diversos procesos fisiológicos que incluyen la osmorregulación y la digestión de lípidos al conjugarse con el colato de sodio (sal derivada de colesterol) para formar el taurocolato de sodio, la principal sal biliar de YTK. La taurina ha sido establecida como un nutriente esencial para el YTK, entre otras especies, debido a su deficiente capacidad de síntesis (Takagi *et al.*, 2008). En dietas para rodaballo (pez plano, *Scophthalmus maximus*), el suplemento de taurina y colesterol registró el máximo crecimiento comparado con las dietas en donde sólo se agregó taurina, sólo colesterol o sin suplementos. Los autores propusieron un efecto sinérgico entre colesterol y taurina que promueve el crecimiento (Yun *et al.*, 2012).

La falta de colesterol en las dietas tiene también efectos sobre el sistema inmunológico de los peces. En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se ha registrado la disminución de la capacidad inmunológica cuando las dietas contienen cantidades mínimas de colesterol (Deng *et al.*, 2012), reflejada por una baja actividad

antioxidante y una menor resistencia a infecciones de patógenos (*Aeromonas hydrophila*). Mientras que el suplemento de taurina y colesterol mejoró la resistencia a infecciones bacterianas de *Lactococcus garvieae* en juveniles de *Seriola quinqueradiata* y mejoró su crecimiento (Maita *et al.*, 2006).

HIPÓTESIS

- Los peces marinos como el jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) son incapaces de mantener la homeostasis de colesterol mediante biosíntesis endógena, por lo que el colesterol debe agregarse en su alimentación.
- Las dietas ricas en aceites vegetales para el jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) tienen efecto sobre la acumulación de los fitoesteroles en el pez, además de reducir el crecimiento y supervivencia.
- La cantidad de colesterol presente en las dietas para jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) tiene influencia sobre la concentración de colesterol presente en los tejidos musculares y hepáticos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto de la concentración de colesterol en el alimento para el jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) sobre el crecimiento y supervivencia de los peces, así como la concentración de este nutriente en sus tejidos.

Objetivos particulares

- Estimar el efecto de cuatro diferentes concentraciones de colesterol en el alimento para juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) sobre el crecimiento y supervivencia.
- Establecer si la concentración de colesterol en el alimento tiene una relación directamente proporcional con la concentración de colesterol en el musculo y el hígado del jurel de Castilla (*Seriola lalandi*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Dietas experimentales

Se formularon cuatro dietas con la misma composición proximal (*Dieta Col0.0*, *Dieta Col0.05*, *Dieta Col0.12* y *Dieta Col0.19*), con 45 % de proteína cruda, proveniente de una mezcla de concentrado de proteína de soya (SPC) y FM. El contenido de grasa cruda fue de 21 %. La fuente de lípidos fue una mezcla de aceite de oliva y CO, además de FO bajo en colesterol. Se agregó colesterol (Sigma Chemicals, 92.5%) a las dietas disolviendo las siguientes cantidades en la mezcla de aceites: *Dieta Col0.0*: no se agregó colesterol, *Dieta Col0.05*: 5.8023 g por 10 kg de alimento, *Dieta Col0.12*: 12.5874 g, *Dieta Col0.19*: 19.3988 g. La composición de ingredientes y la composición proximal se muestran en el Cuadro 1. Los esteroides identificados en las dietas experimentales se muestran en la Figura 2. Grenetina y fécula de maíz fueron preparadas con agua caliente hasta disolverse y cristalizarse, respectivamente; se combinaron con el resto de los ingredientes hasta formar una masa homogénea en una mezcladora mecánica con capacidad para 10 kg. La mezcla se hizo pasar a través de un molino de carne con una matriz de 4 mm, los hilos de masa fueron cortados y distribuidos en charolas de malla de acero inoxidable que fueron colocadas en una estufa ventilada a 65 °C durante 24 h. El alimento fue empacado en bolsas plásticas, etiquetado y almacenado a -30 °C hasta ser utilizado.

La FM utilizada en las dietas fue desengrasada extrayendo los lípidos con hexano. Lotes de 5 kg de FM fueron inmersos en 10 L de hexano durante 24 h en cubetas de 19 L, utilizando una tela de algodón para retener la FM. Posteriormente el solvente fue drenado y la FM fue exprimida para eliminar el exceso de líquido. La FM fue colocada nuevamente en las cubetas y se agregaron 5 L adicionales de hexano limpio y se dejaron transcurrir 24 h. Se realizó un tercer ciclo de extracción repitiendo el proceso anterior y utilizando 5 L más de hexano limpio, totalizando 20 L de hexano por cada 5 kg de FM. Después del tercer ciclo de extracción se colocó la FM en charolas de plástico y se secó a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción para eliminar los restos del solvente.

Para remover el colesterol del aceite de pescado se aprovechó su afinidad por los fosfolípidos. Con este fin se utilizó lecitina granular de soya como fuente de fosfolípidos. Se preparó pasta de lecitina, mezclando lecitina granular de soya y agua destilada (1:1, peso:volumen). Lotes de 900 g de FO fueron mezclados con 90 g de pasta de lecitina en un procesador de alimentos de $\frac{3}{4}$ hp. La mezcla resultante fue vertida en tubos Falcon de 50 mL y centrifugada a 4 rcf durante 10 min, permitiendo la separación de dos fases. El sobrenadante fue vertido nuevamente en el procesador de alimentos, el precipitado (pasta de lecitina enriquecida con colesterol) fue desechado. Se repitieron dos ciclos más de mezclado con pasta de lecitina y centrifugación utilizando siempre pasta de lecitina recién preparada.

Sistema de cultivo

Se utilizaron 84 juveniles de YTK con talla promedio de 125 g, obtenidos de una granja comercial (Baja Seas S. A. de C. V., Ensenada, Baja California, México). Se usaron doce estanques de 500 L, con siete peces por estanque, con tres repeticiones por cada tratamiento. Los estanques estuvieron conectados a un biofiltro en un sistema de recirculación con 5 % de recambio diario de agua. La temperatura del agua fue mantenida a 21 ± 1 °C utilizando calentadores eléctricos controlados por un termostato dentro de un reservorio posterior al biofiltro. Los peces fueron alimentados a mano diariamente, cuatro veces al día (8:00, 11:00, 14:00 y 17:00 hrs.) hasta su saciedad aparente, durante 60 días.

Al transcurrir los 60 días, los peces dejaron de ser alimentados durante las últimas 24 h para evacuar sus intestinos. Se capturaron con redes de mano todos los peces de cada estanque y fueron colocados en tanques plásticos de 200 L previamente llenados con agua con hielo. Los peces permanecieron en el estanque con hielo hasta morir por hipotermia. Al morir los peces se registró su peso, y se continuó con el estanque siguiente hasta concluir con los doce. Se utilizaron cinco peces por estanque para tomar muestras de hígado y músculo, que fueron procesadas como se indica en la sección *Extracción de lípidos y cuantificación de colesterol*.

Se calcularon los siguientes índices para evaluar el crecimiento de los peces:

Ganancia de peso (WG):

$$\text{WG (\%)} = [(\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) \times 100 \div \text{Peso inicial}]$$

Tasa específica de crecimiento (SGR):

$$\text{SGR } (\% \text{ d}^{-1}) = [(\ln \text{ Peso final} - \ln \text{ Peso inicial}) \div d] \times 100$$

Donde d es tiempo de alimentación en días.

Coeficiente térmico de crecimiento (TGC):

$$\text{TGC} = [(\text{Peso final}^{1/3} - \text{Peso inicial}^{1/3}) \div (T \times t)] \times 1000$$

Donde T es temperatura en °C y t es tiempo de alimentación en días.

Requerimiento de colesterol

Se utilizó un análisis de regresión polinomial de segundo orden para estimar el requerimiento preliminar de colesterol. El requerimiento se consideró como el 95 % de $I_{\max}$:

$$R = a + bI + cI^2$$

$$I_{\max} = -0.5 \times (b \div c)$$

Donde R es peso final (g), I es la concentración de colesterol (mg kg^{-1} de grasa cruda), $I_{\max}$ es la concentración de colesterol que genera mayor crecimiento.

Análisis proximales

La composición proximal de las dietas fue analizada por triplicado y se expresa como porcentaje con base en materia seca de acuerdo con los procedimientos estandarizados (AOAC, 1995). El contenido de humedad de cada dieta fue calculado con muestras de 2 g pulverizadas con un mortero de porcelana y secadas a peso seco constante a una temperatura de 60 °C. El contenido de nitrógeno total se determinó por el método micro-Kjeldahl, utilizando 50 mg de muestras pulverizadas. El porcentaje de proteína cruda fue calculado como $\% N \times 6.25$. La concentración de grasa cruda fue determinada gravimétricamente por el método Soxhlet. Se utilizaron muestras de 1 g y éter de petróleo como solvente de acarreo. El contenido de cenizas fue estimado calcinando 1 g de muestra a una temperatura de 550 °C durante 6 h. El extracto libre de nitrógeno (NFE) se calculó por diferencia:

$$\text{NFE} = 100 - (\% \text{ Proteína cruda} + \% \text{ Grasa cruda} + \% \text{ Cenizas})$$

Extracción de lípidos y cuantificación de colesterol

Se utilizaron muestras de hígado y músculo para extraer y cuantificar el colesterol presente de acuerdo con los métodos de la AOAC (1990). Muestras secas de tejido (secadas a 100 °C durante 24 h) fueron pulverizadas con un mortero de porcelana. El polvo resultante fue sometido a una versión modificada del protocolo de Bligh & Dyer (1959), en donde se reemplazó cloroformo por diclorometano y se sustituye la filtración con papel por centrifugación. Se agregó a cada muestra una

alícuota de 5 α -colestano disuelto en metanol como estándar interno antes de realizar la extracción de lípidos. El extracto de lípidos totales fue saponificado con 1 mL de solución de KOH 1.0 N (90 % etanol, 10 % agua destilada) a 70 °C en viales de vidrio ámbar de 4 mL con tapa de rosca por un periodo de 30 min. Al enfriarse a temperatura ambiente se agregaron 1,000 μ L de agua destilada y 400 μ L de hexano, se tapó y agitó mecánicamente. Se dejó reposar hasta la separación de dos fases, se recuperó la fase superior (fracción no saponificable disuelta en hexano) y se almacenó en un vial limpio, la fase acuosa se lavó tres veces.

Se evaporó el hexano colocando los viales en un bloque térmico a 65 °C bajo un flujo de nitrógeno. Las muestras secas (fracción no saponificable) fueron derivatizadas agregando 700 μ L de HTP (Hexametildisilazano:Trimetilclorosilano:Piridina, 2:1:5, v:v:v) a cada muestra. Los viales fueron llenados con nitrógeno y tapados. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Se evaporó la piridina residual bajo un flujo de nitrógeno y las muestras derivatizadas y secas fueron disueltas en volúmenes conocidos de hexano para su posterior análisis por cromatografía de gases equipado con un detector de ionización de llama (GC-FID).

El análisis cromatográfico se realizó con el equipo 6850 Network GC System de Agilent Technologies (GC-FID) y una columna capilar Agilent Technologies HP-1 (100 % dimetil polisiloxano, 30 m, 0.320 mm diámetro interno, 0.25 μ m espesor de fase). Las condiciones del análisis fueron para el horno, temperatura inicial: 150 °C, mantenida durante 3 min, 25 °C min⁻¹ hasta 200 °C, 5 °C min⁻¹ hasta 280 °C, 1 °C min⁻¹ hasta 295 °C. Se utilizó hidrógeno como gas acarreador a una presión inicial de 20 psi, mantenida por 2 min; 40 psi min⁻¹ hasta 4 psi mantenidos por el resto del análisis. La temperatura

del inyector se fijó a 280 °C y el detector a 330 °C, con un flujo de 45 mL min⁻¹ de hidrógeno y 450 mL min⁻¹ de aire. El volumen de inyección fue 1 µL, las muestras fueron inyectadas manualmente en modo *splitless*.

Para identificar los esteroides en los tejidos analizados, se inyectaron cinco muestras representativas bajo condiciones similares en un sistema de cromatografía de gases y espectrómetro de masas (GC-MS) (Agilent Technologies 7890A GC System) con una columna DB-5 (5 % difenil, 95 % dimetil polisiloxano, 30 m, 0.250 mm diámetro interno, 0.25 µm espesor de fase) y utilizando el método de monitorización selectiva de iones (SIM). Los iones monitorizados fueron los reportados por Ahmida *et al.* (2006) para la identificación de esteroides: *m/z* 351 y 456 para desmosterol, *m/z* 443 y 458 para latosterol, *m/z* 382 y 472 para campesterol, *m/z* 129 y 486 para β-sitosterol. El volumen de inyección fue 1 µL, las muestras fueron inyectadas por un inyector automático.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el paquete de software SigmaPlot (versión 12.3). Los valores de peso ganado (WG), tasa específica de crecimiento (SGR), coeficiente térmico de crecimiento (TGC) y concentración de esteroides en tejidos fueron evaluados con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Se aplicó una prueba de Tukey para identificar las diferencias entre grupos.

RESULTADOS

Crecimiento y supervivencia

Al término de los 60 días de experimentación, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de supervivencia, aunque sólo en los grupos *Col0.05* y *Col0.12* el valor fue 100 % (Cuadro 2). El máximo crecimiento se alcanzó con la Dieta *Col0.05*. La WG de los peces alimentados con la Dieta *Col0.05* fue de 186.2 ± 8.8 g, significativamente más alta que la Dieta *Col0.0* (145.3 ± 16.7) y Dieta *Col0.19* (142.1 ± 16.5), pero no mayor que la Dieta *Col0.12* (162.8 ± 6.9). La SGR fue de 1.52 ± 0.04 para la Dieta *Col0.05*, que fue la más alta, mientras que la más baja fue la Dieta *Col0.19* (1.26 ± 0.11). La dieta *Col0.0* siguió con 1.28 ± 0.11 y la Dieta *Col0.12* con 1.39 ± 0.05 . El TGC fue significativamente mayor para la Dieta *Col0.05* (1.41 ± 0.05), por encima de Dieta *Col0.0* (1.16 ± 0.11) y Dieta *Col0.19* (1.14 ± 0.11), pero no fue diferente de la dieta *Col0.12* (1.27 ± 0.05). El valor de *I_{max}* calculado con el modelo cuadrático de requerimientos de nutrientes (Figura 3) fue de 3,179 mg de colesterol kg^{-1} de grasa cruda. Considerando el 95 % de este valor, se estimó el requerimiento como $3,020 \text{ mg kg}^{-1}$.

Colesterol en tejidos

La concentración de colesterol en el alimento no influyó sobre la concentración de colesterol en el hígado (Figura 4). No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de colesterol en las muestras de tejido de hígado y músculo entre ninguno de los grupos (Cuadro 2). Aunque es notable un valor menor para el tejido de músculo de la Dieta *Co/0.19* y una ligera relación inversa entre el colesterol en la dieta y el colesterol en el musculo (Figura 5). Los precursores de colesterol (desmosterol y latosterol) no fueron detectados en las muestras de hígado (Figura 6) ni en las muestras de músculo analizadas por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Los fitoesteroles β -sitosterol y campesterol fueron detectados por el método SIM en las muestras de hígado de todos los tratamientos experimentales, aunque por su baja concentración, los picos no pueden apreciarse a simple vista (Figura 6). Dichos fitoesteroles aunque fueron detectados e identificados no pudieron ser cuantificados debido a la carencia de estándares analíticos para cromatografía de gases. Los fitoesteroles β -sitosterol y campesterol no fueron detectados en las muestras de músculo por el análisis por método SIM (Figura 7).

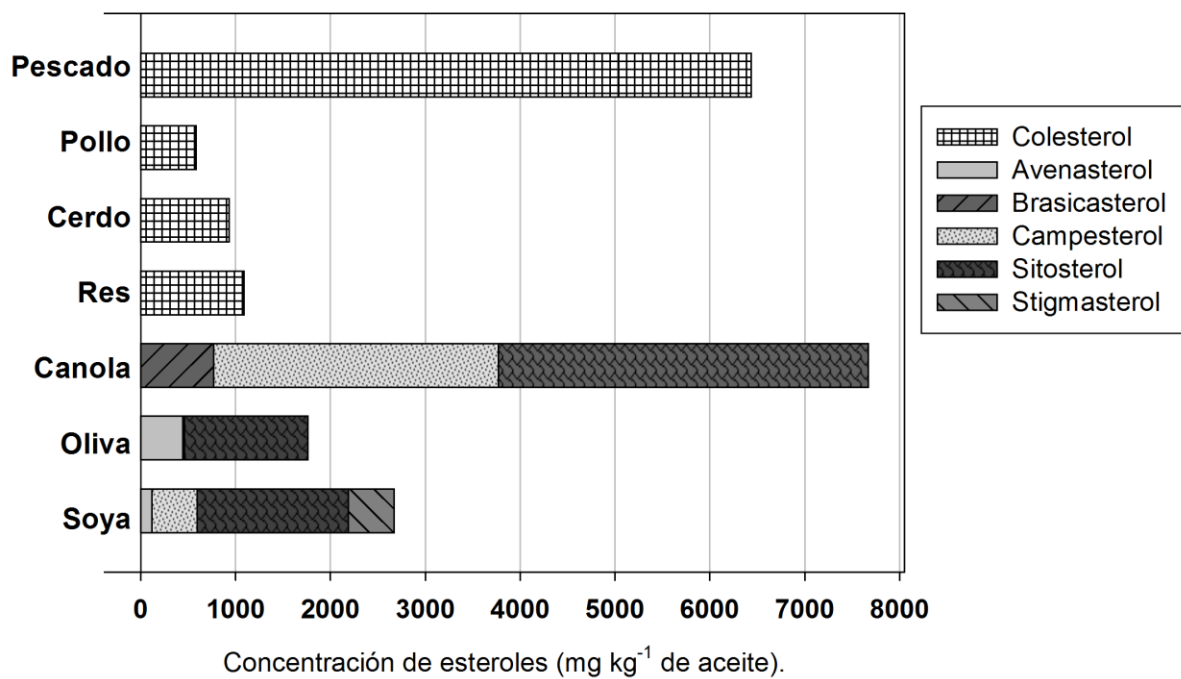


Figura 1. Concentración típica de esteroides en lípidos de origen animal y vegetal.

Gráfica generada con datos obtenidos de Higgs & Dong (2000), Piironen *et al.* (2000).

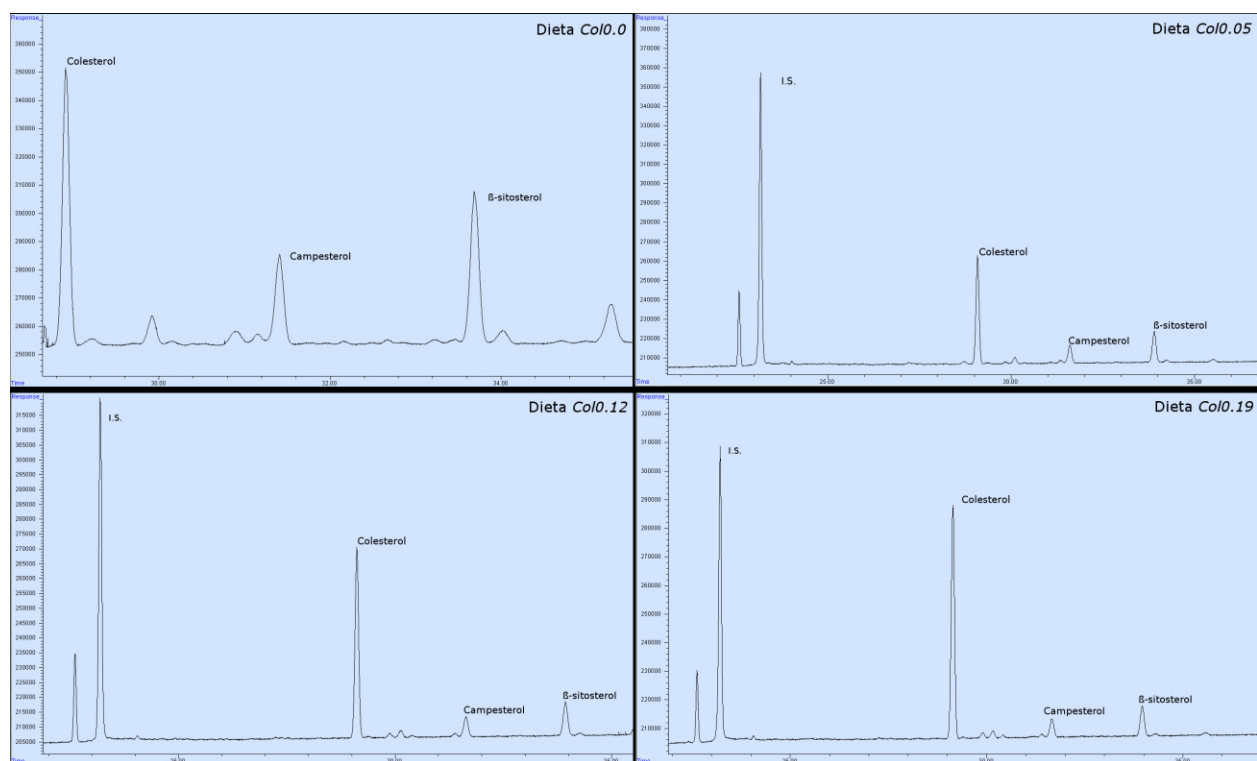


Figura 2. Cromatograma mostrando los esteroides identificados en las dietas experimentales con cuatro distintas concentraciones de colesterol (Dieta *Col0.0*: 530 mg kg⁻¹ de grasa cruda, *Col0.05*: 2,880 mg kg⁻¹, *Col0.12*: 4,120 mg kg⁻¹, *Col0.19*: 6,170 mg kg⁻¹).

I. S. = Estándar interno (5 α -colestano).

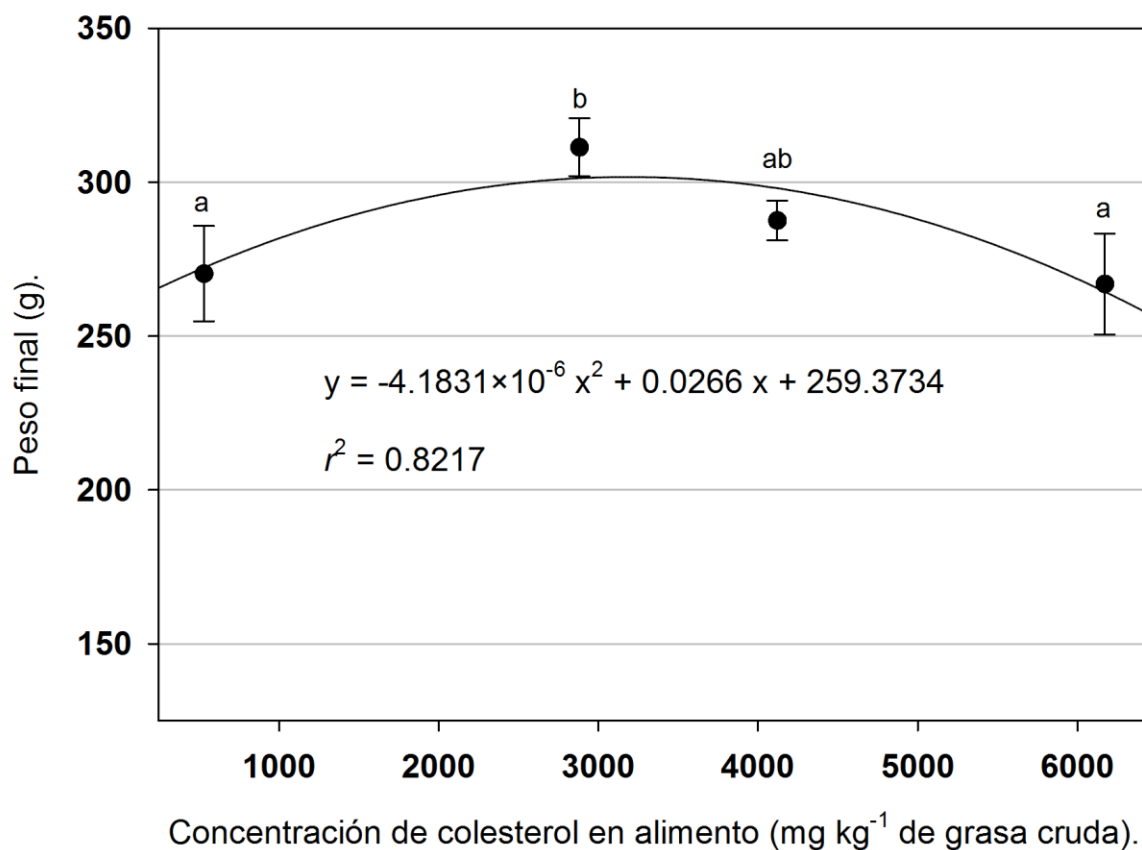


Figura 3. Regresión polinomial de segundo orden entre el peso final de juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) y cuatro concentraciones de colesterol en el alimento (Dieta Col0.0: 530 mg kg⁻¹ de grasa cruda, Col0.05: 2,880 mg kg⁻¹, Col0.12: 4,120 mg kg⁻¹, Col0.19: 6,170 mg kg⁻¹).

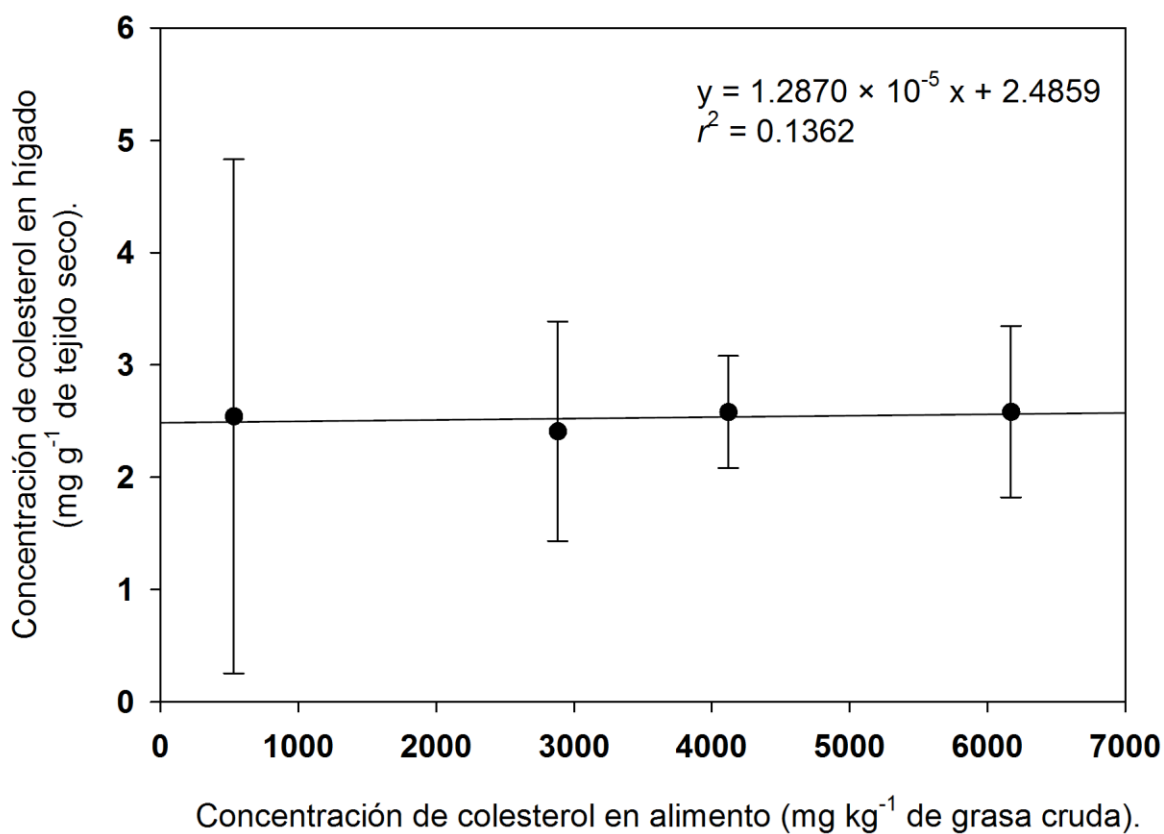


Figura 4. Concentraciones de colesterol en hígado de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) alimentado con cuatro distintas concentraciones de colesterol (Dieta *Col0.0*: 530 mg kg⁻¹ de grasa cruda, *Col0.05*: 2,880 mg kg⁻¹, *Col0.12*: 4,120 mg kg⁻¹, *Col0.19*: 6,170 mg kg⁻¹).

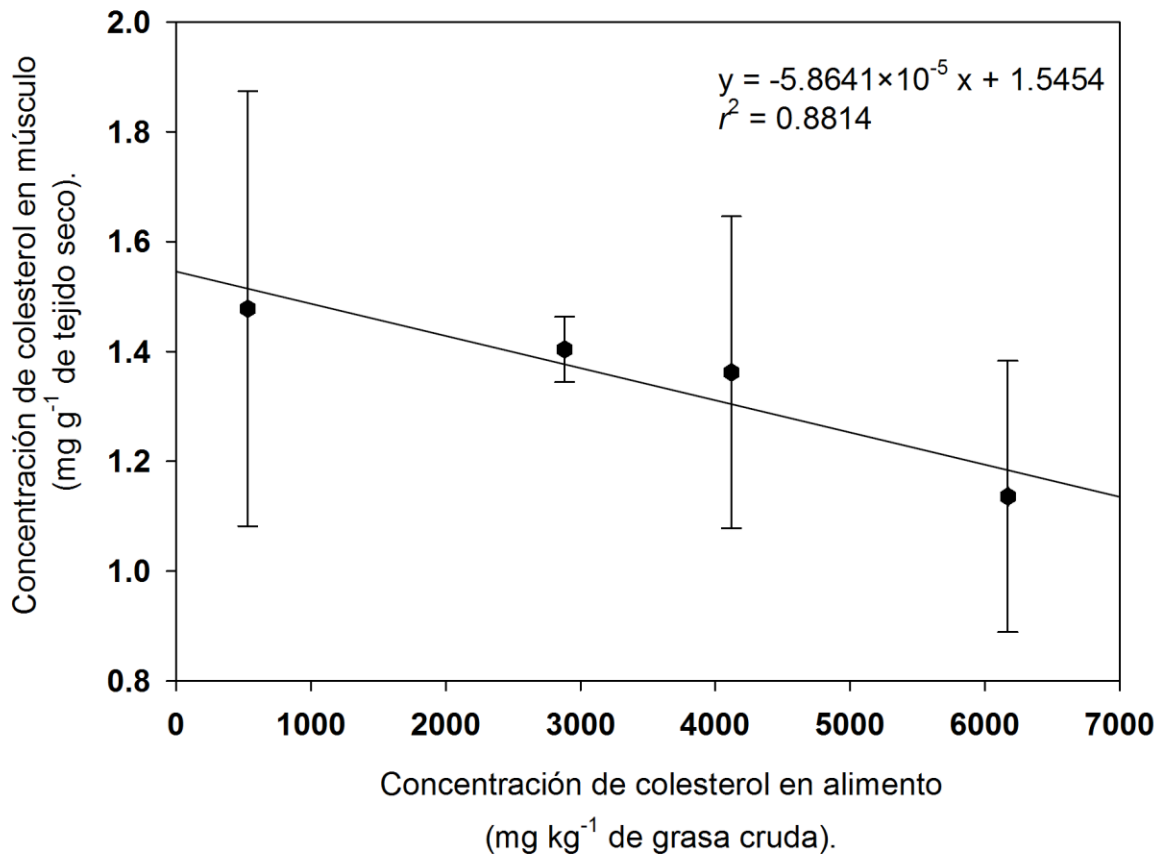


Figura 5. Concentraciones de colesterol en músculo de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) alimentado con cuatro distintas concentraciones de colesterol (Dieta Col0.0: 530 mg kg⁻¹ de grasa cruda, Col0.05: 2,880 mg kg⁻¹, Col0.12: 4,120 mg kg⁻¹, Col0.19: 6,170 mg kg⁻¹).

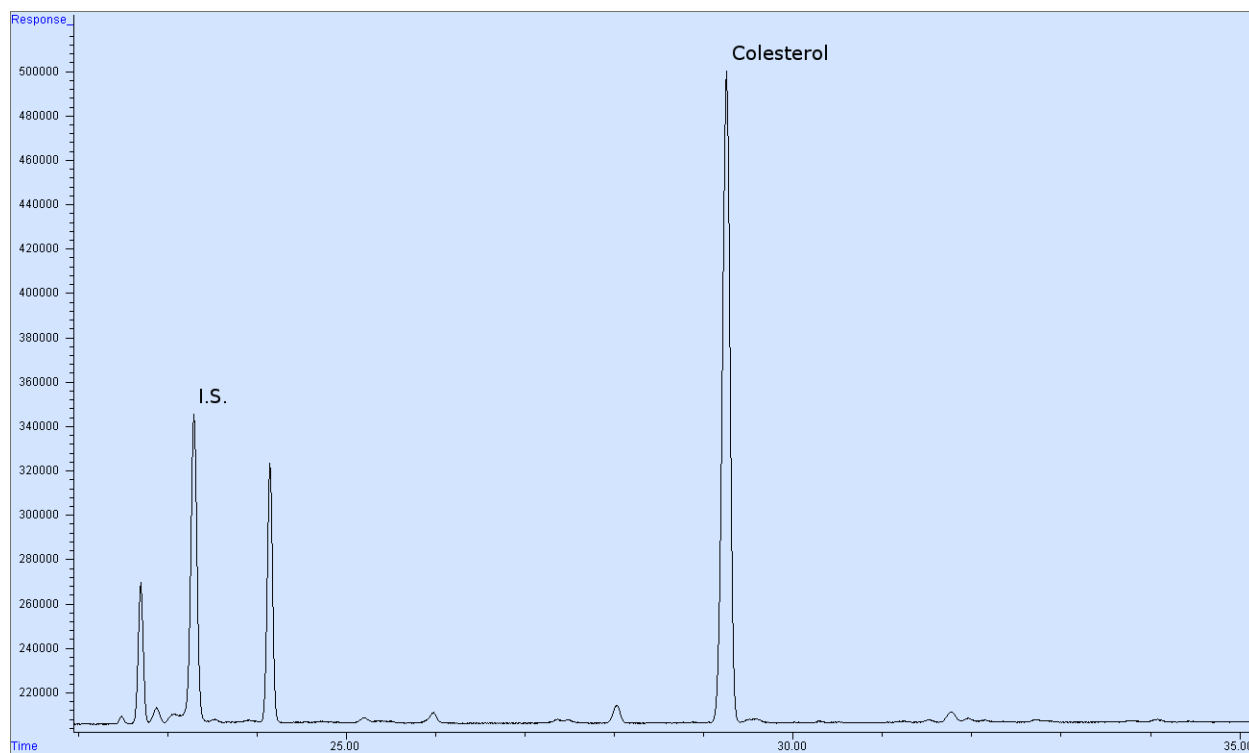


Figura 6. Cromatograma de tejido de hígado de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*). Muestra obtenida de un pez alimentado con la Dieta *Col0.19* (colesterol en dieta: 6,170 mg kg⁻¹ de grasa cruda).

I. S. = Estándar interno (5 α -colestano).

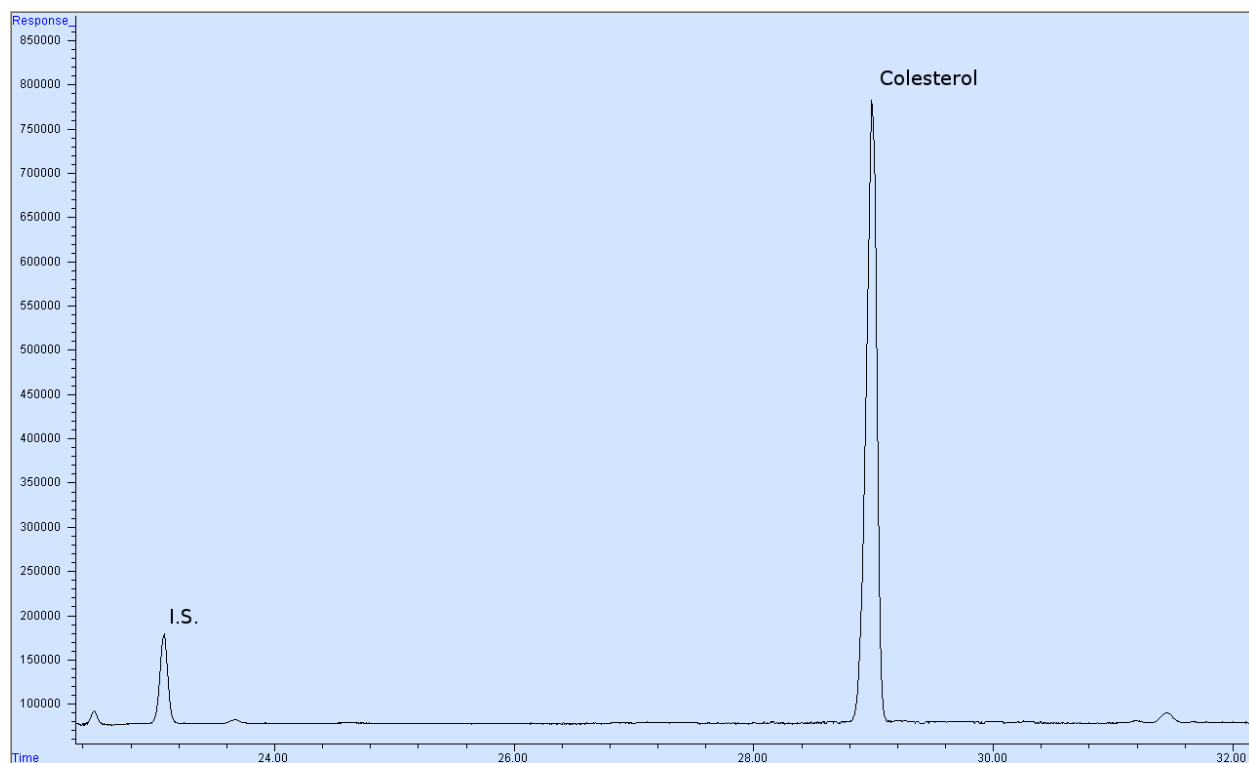


Figura 7. Cromatograma de tejido muscular de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*). Muestra obtenida de un pez alimentado con la Dieta *Col0.12* (colesterol en dieta: 4,120 mg kg⁻¹ de grasa cruda).

I. S. = Estándar interno (5 α -colestano).

Cuadro 1. Ingredientes (g por cada 100 g), composición proximal con base en materia seca (%) de cuatro dietas experimentales con diferentes concentraciones de colesterol.

Ingredientes	TRATAMIENTOS			
	Col0.0	Col0.05	Col0.12	Col0.19
Concentrado de proteína de soya	19	19	19	19
Harina de pescado desengrasada	40	40	40	40
Aceite de oliva	4	4	4	4
Aceite de canola	9	9	9	9
Aceite de pescado	7	7	7	7
Almidón de maíz	12.9	12.85	12.80	12.70
Grenetina	4	4	4	4
Rovimix ^a	3.0	3.0	3.0	3.0
Stay C ^b	0.25	0.25	0.25	0.25
Taurina	0.5	0.5	0.5	0.5
Benzoato de sodio	0.25	0.25	0.25	0.25
Cloruro de colina	0.09	0.09	0.09	0.09
α -Tocoferol	0.01	0.01	0.01	0.01
Colesterol	0	0.0580	0.1258	0.1939
Composición proximal (% de materia seca)				
Humedad (%)	1.82	1.82	1.85	1.76
Proteína cruda (%)	45.89	45.25	45.25	45.74
Grasa cruda (%)	21.05	21.31	20.49	20.93
Cenizas (%)	10.63	10.76	11.04	11.47
ELN ^c	22.43	22.68	23.22	21.86
Colesterol (% de grasa cruda)	0.053	0.288	0.412	0.617

^aRovimix[®]

^bStay-C donado por DSM, Guadalajara, México.

^cExtracto libre de nitrógeno: calculado por diferencia. ELN = 100 – Proteína cruda – Grasa cruda – Cenizas.

Cuadro 2. Índices biológicos, tasa de supervivencia y concentraciones de colesterol en hígado y músculo. Juveniles de jurel de Castilla (*Seriola lalandi*) alimentados con cuatro concentraciones de colesterol por 60 días (media $\pm$ desviación estándar). Valores en la misma fila con superíndice distinto fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$).

	TRATAMIENTOS			
	Col0.0	Col0.05	Col0.12	Col0.19
<i>Índices biológicos</i>				
Peso inicial (g)	125.0 $\pm$ 0.8	125.3 $\pm$ 0.5	124.9 $\pm$ 1.1	124.9 $\pm$ 0.9
Peso final (g)	270.3 $\pm$ 15.5 ^a	311.4 $\pm$ 9.4 ^b	287.6 $\pm$ 6.4 ^{ab}	267.0 $\pm$ 16.4 ^a
SGR (% día ⁻¹)	1.28 $\pm$ 0.10 ^a	1.52 $\pm$ 0.04 ^b	1.39 $\pm$ 0.05 ^{ab}	1.26 $\pm$ 0.11 ^a
TGC	1.16 $\pm$ 0.11 ^a	1.41 $\pm$ 0.05 ^b	1.27 $\pm$ 0.05 ^{ab}	1.14 $\pm$ 0.11 ^a
Ganancia de peso (g)	145.3 $\pm$ 16.7 ^a	186.2 $\pm$ 8.8 ^b	162.8 $\pm$ 6.9 ^{ab}	142.1 $\pm$ 16.5 ^a
Ganancia de peso (%)	116.3 $\pm$ 14.7 ^a	148.6 $\pm$ 6.5 ^b	130.4 $\pm$ 6.5 ^{ab}	113.8 $\pm$ 13.3 ^a
Supervivencia (%)	95.2 $\pm$ 8.25	100	100	90.5 $\pm$ 8.25
<i>Concentración de colesterol en tejidos</i>				
Hígado (mg g ⁻¹)	2.543 $\pm$ 2.288	2.410 $\pm$ 0.978	2.582 $\pm$ 0.500	2.585 $\pm$ 0.764
Músculo (mg g ⁻¹)	1.478 $\pm$ 0.396	1.404 $\pm$ 0.0594	1.362 $\pm$ 0.284	1.136 $\pm$ 0.247

DISCUSIÓN

La SGR que se registró en este trabajo se encuentra dentro de un rango similar al encontrado en el trabajo de Orellana *et al.* (2013), esto es, comparando el rango de tallas correspondiente. En dicho estudio se utilizaron distintas dietas comerciales con altos contenidos de proteína cruda ($> 50\%$) y cantidades moderadas de lípidos (entre 15 y 20 % de grasa cruda). El experimento se realizó a una temperatura ($22.6 \pm 1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$) similar a la del presente trabajo. Se ha reportado que un incremento de temperatura de 21 a $26.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ puede aumentar el peso final de juveniles de YTK hasta en un 54 % en sistemas controlados, indicando un óptimo crecimiento para esta especie a esta temperatura (Abbink *et al.*, 2012). Al calcular los valores de TGC para los datos de Orellana *et al.* (2013), y tomando en cuenta los rangos de tallas, se calcularon valores que oscilan entre 1.09 y 1.22, son similares a los calculados para los peces alimentados con las dietas *Co10.0* (1.16 ± 0.11), *Co10.12* (1.27 ± 0.05) y *Co10.19* (1.14 ± 0.11).

La adición de colesterol a las dietas acuícolas presenta diferentes efectos sobre el crecimiento y el desempeño de los peces. En algunos estudios, particularmente aquellos en donde se ha utilizado proteína de origen vegetal, el colesterol suplementario ha aumentado el crecimiento y consumo de alimento (FI) de los peces. Por ejemplo, Twibell & Wilson (2004) reportaron aumentos significativos en la WG cuando se agregó 1 % de colesterol en dietas de SBM para el bagre americano (*Ictalurus punctatus*). En el mismo experimento, cuando se agregó colesterol a una dieta con inclusión de SPI, también aumentó la WG, además del FI y SGR. En un

estudio con *Scophthalmus maximus*, la adición de 1 % de colesterol a una dieta con alto contenido de proteína vegetal (SBM y WGM) incrementó FI, WG y las concentraciones de colesterol en hígado y plasma sanguíneo, al compararlo con una dieta similar a la que no se le agregó colesterol. Sin embargo, cuando se agregó el 1.5 % de colesterol, el FI y WG disminuyeron respecto a los peces alimentados con la dieta con inclusión de 1 % de colesterol (Yun *et al.*, 2011).

Deng *et al.* (2010) encontraron que la tasa específica de crecimiento del lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), disminuye cuando se agrega colesterol a dietas basadas en ingredientes derivados del pescado. Los autores agregaron 1 % de colesterol a una dieta basada en FM y encontraron una ligera disminución (no significativa) en el crecimiento. En ese mismo estudio, al agregar 1 % de colesterol a una dieta de concentrado de proteína de pescado (FPC) sin grasa, el crecimiento registrado fue menos de la mitad que para la misma dieta pero sin inclusión de colesterol. Por su parte, el FI fue solamente una cuarta parte del consumido por los peces con la dieta de FPC sin colesterol (Deng *et al.*, 2010). En un experimento con lobina rayada híbrida (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*), la adición de 1 % de colesterol a una dieta de FM disminuyó la WG y el factor de eficiencia alimenticia aunque no significativamente (Sealey *et al.*, 2001). En un trabajo con *Salmo salar*, el suplemento de 1 % de colesterol a una dieta de FM no tuvo influencia sobre la SGR ni la mortalidad, pero sí provocó una acumulación de colesterol en el hígado, además de una mayor concentración de colesterol en las heces, reflejada por una digestibilidad aparente de colesterol significativamente menor que la del grupo control (dieta de FM sin colesterol adicional) (Bjerkeng *et al.*, 1999). En un estudio en donde se utilizó FM

desengrasada no mejoró el FI pero sí mejoró la WG en juveniles de *Scophthalmus maximus* (Zhu *et al.*, 2014).

Deng *et al.* (2012) encontraron en un bioensayo con *Oncorhynchus mykiss*, que las dietas formuladas sin colesterol o con bajas concentraciones, afectaban negativamente la respuesta inmunológica de los peces. Concluyeron que el suplemento de entre 0.6 y 1.2 % de colesterol en una dieta basada en SBM, mejoraba la resistencia a infecciones por *Aeromonas hydrophila* y la respuesta inmunológica no específica. Las actividades de catalasa, superóxido dismutasa, lisozima, fagocitosis, estallido respiratorio y del sistema del complemento, todas se vieron positivamente influenciadas. Sin embargo, cantidades de colesterol superiores a 1.2 % afectaron el desempeño de los peces y las respuestas decayeron.

En el presente trabajo se observó una disminución en el crecimiento con la concentración de colesterol más baja (Dieta *Co/0.0*, 530 mg kg⁻¹ de grasa cruda) y con la más alta (Dieta *Co/0.19*, 6,170 mg kg⁻¹ de grasa cruda), respecto a la dieta *Co/0.05*. Este resultado no era esperado, pues la concentración de colesterol de *Cho/0.19* es la que comúnmente presenta el FO. Es importante mencionar que el balance de colesterol en el organismo es el resultado del colesterol ingerido más el colesterol sintetizado endógenamente, menos el colesterol expulsado en las heces (Jones, 1997; van der Wulp *et al.*, 2013). El colesterol excretado lo compone el colesterol no absorbido en la digestión, el secretado por el hígado (colesterol libre) así como el que se encuentra en forma de sales biliares. En YTK la conjugación de sales biliares es exclusivamente con taurina, y se sabe que la síntesis de sales biliares es la única vía de eliminación de colesterol con la que dispone *Seriola quinqueradiata* (Khaoian *et al.*,

2014). También se sabe que el colesterol tiene la particularidad de ser un lípido que no es oxidado para la obtención de energía, ni siquiera durante eventos de inanición (Haines, 2001).

Se ha apreciado en varios estudios que el aumento en las concentraciones de colesterol y taurina en el alimento promueven la expresión del gen CYP7A1 (Yun *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014) que sintetiza la proteína colesterol-7 α -hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de sales biliares a partir de colesterol (Matsumoto *et al.*, 2005). En juveniles de *Seriola quinqueradiata*, con la finalidad de evaluar el efecto de la fortificación del alimento con taurina, se reemplazó una porción de FM por SBM y en una dieta se agregó taurina como suplemento y en otra no se agregó nada. Los peces alimentados con la dieta sin suplemento de taurina, presentaron una acumulación significativa de colesterol en el hígado, a pesar de que el alimento que ingirieron tenía una menor concentración de este nutriente que la dieta control, elaborada con FM. También encontraron disminución en la síntesis de sales biliares, así como crecimiento reducido. Con el suplemento de taurina mejoró el crecimiento y no se manifestó la acumulación de colesterol en el hígado, de igual manera aumentó la síntesis y excreción de sales biliares (Khaoian *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta los ejemplos anteriores y contrastándolos con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone que la concentración de colesterol de la dieta *Col0.19* promovió la síntesis de sales biliares en los juveniles de YTK, proceso que consume colesterol así como taurina y podría reducir la disponibilidad de ambos nutrientes. Como se sabe, la taurina es un nutriente esencial para el desarrollo óptimo de YTK (Takagi *et al.*, 2008), y al encontrarse en cantidades limitadas, estaría

afectando el crecimiento de los peces alimentados con la dieta *Co/0.19*. Esta hipótesis se apoya en el hallazgo de una correlación negativa entre la concentración de colesterol en el alimento y la presente en el músculo de los organismos, aunque no fue estadísticamente significativa. Esto podría deberse al transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, proceso conocido como transporte reverso de colesterol, que se realiza mediante su conjugación con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Chen *et al.*, 2003). Las HDL transportan el colesterol hasta el hígado, donde es absorbido y posteriormente secretado en la bilis, tanto en su forma libre como en forma de sales biliares. La bilis es transportada al lumen intestinal y finalmente es expulsada en las heces (van der Wulp *et al.*, 2013). Mediante este proceso el colesterol en el músculo estaría siendo movilizado hacia el hígado, en donde las concentraciones no presentaron cambios y se estaría realizando la síntesis de sales biliares.

Se desconoce cuáles son los mecanismos por los que el colesterol puede tener efectos tanto positivos como negativos en el crecimiento y fisiología de los peces. Los resultados obtenidos por diversos estudios en ocasiones son contradictorios y varían dependiendo de la especie y de la composición de ingredientes de las dietas utilizadas. El colesterol interviene en muchas funciones metabólicas, que incluyen la síntesis de sales biliares (Goto *et al.*, 1996), facilitar la digestión de lípidos (Iijima *et al.*, 1998) y regular la diferenciación celular (Porter *et al.*, 1996; Jeong & McMahon, 2002). También modifica la permeabilidad de las membranas celulares a los iones Na^+ y K^+ , lo que disminuye la actividad de la ATPasa de sodio y potasio y ahorra energía a las células (Haines, 2001).

La biosíntesis de colesterol es un proceso que consume mucha energía metabólica (Haines, 2001; Norambuena *et al.*, 2013). En un estudio reciente con *Oncorhynchus mykiss*, una dieta adicionada con 0.1 % de colesterol no produjo diferencias en el crecimiento de los peces respecto a una dieta sin el suplemento, pero sí alteró su metabolismo y composición bioquímica. Los peces que fueron alimentados con una baja cantidad de colesterol realizaron un mayor gasto energético, que los autores atribuyen al requerido para la biosíntesis de colesterol, y que fue detectado mediante la estimación *in vivo* de la tasa de β -oxidación de ácidos grasos. Las concentraciones de colesterol en el músculo y cuerpo completo de los peces no presentaron diferencias, lo que sugiere que existe la capacidad de biosíntesis. Las diferencias en las tasas de β -oxidación entre los grupos se manifestaron en el perfil de ácidos grasos del cuerpo completo, y presentaron una mayor acumulación corporal de ácidos grasos esenciales 20:4(n-3) y 22:6(n-3) en el grupo alimentado con colesterol alto (Norambuena *et al.*, 2013). Otra diferencia apreciable fue que los peces alimentados con la concentración alta de colesterol, presentaron una mayor tasa de digestibilidad aparente de este nutriente.

En el presente trabajo, los peces alimentados con la dieta *Co/0.0* presentaron concentraciones hepáticas de colesterol similares a los alimentados con las demás dietas, y las concentraciones en músculo fueron ligeramente superiores aunque no significativamente. Comparando con los resultados obtenidos por Norambuena *et al.* (2013) se plantea que el crecimiento reducido en los peces alimentados con la dieta *Co/0.0* se debe al gasto energético necesario para sintetizar colesterol y mantener los niveles hepáticos estables. La biosíntesis de una molécula de colesterol requiere de 18

unidades de acetil coenzima A, 18 ATP, 16 NADPH y 4 moléculas de O₂ (van der Wulp *et al.*, 2013; Norambuena *et al.*, 2013). Por lo que el esfuerzo metabólico para compensar la deficiencia alimenticia de colesterol podría ser la explicación del bajo crecimiento del grupo *Co/0.0*.

Al evaluar el efecto del colesterol en dietas de FM desengrasada sobre el crecimiento de *Scophthalmus maximus*, Zhu *et al.* (2014) concluyeron que esa especie es capaz de sintetizar colesterol pero no todo el necesario para un óptimo crecimiento y que por lo tanto hay que agregarlo al alimento. También mencionan que cantidades excesivas de colesterol pueden ser dañinas para los peces, a pesar de presentar una mayor ganancia de peso. Esto debido a que el colesterol ingerido con el alimento presentó una correlación directa con la concentración de colesterol en el hígado, en plasma sanguíneo y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL son el mecanismo de transporte de colesterol desde el hígado hacia los tejidos periféricos para su uso o almacenamiento. Al comparar las interacciones entre el colesterol en el alimento y distintas fuentes de proteína (FM, FPC, SBM y SPI), Deng *et al.* (2010) también encontraron acumulación de colesterol en el hígado, en plasma sanguíneo y LDL. Concentraciones elevadas de colesterol-LDL constituyen un factor de riesgo para la formación de lesiones ateroscleróticas (Deng *et al.*, 2010). En varios estudios incluso, se ha encontrado que agregar cantidades excesivas de colesterol a los alimentos provocan que en las heces se expulsen altas concentraciones de éste (Bjerkeng *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014). En este trabajo no se encontró acumulación de colesterol en el hígado y tampoco en el músculo de los peces y no hubo diferencias entre los grupos a pesar de

las diferentes cantidades suministradas con el alimento, aunque no se analizaron las heces.

El colesterol es absorbido en el intestino proximal gracias a la actividad de un transportador de membrana, Niemann-Pick C1 Tipo 1 (NPC1L1), que se localiza en la región apical de los enterocitos y se considera crítico para el mecanismo de absorción de esteroides (Altmann *et al.*, 2004). Este transportador también tiene actividad sobre fitoesteroides (Davis *et al.*, 2004; Davis & Altmann, 2009) y no ha sido detectado en la porción distal del intestino delgado. Los enterocitos, además de absorber, también tienen la capacidad de secretar colesterol de regreso al lumen intestinal. Esto se realiza por los transportadores de membrana casetes de unión a ATP G5 y G8 (ABCG5 y ABCG8). Cuando estos transportadores fueron sobre expresados en hígado e intestino de ratones, la absorción de colesterol disminuyó en 50 % y el colesterol biliar aumentó cinco veces (Yu *et al.*, 2002b). Estos transportadores también liberan fitoesteroides en el intestino para su excreción así como colesterol biliar cuando se expresa en los hepatocitos (Berge *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002a).

Se cree que los peces eliminan rápidamente los fitoesteroides (Turchini *et al.*, 2009) y éstos no son abundantes en los tejidos de los peces. Por ejemplo, en un estudio con *Gadus morhua* se evaluaron las diferencias en la calidad del filete al ser alimentado con FO o con aceite de soya en donde se consideraron distintas propiedades entre las que se incluyó el contenido de esteroides. En dicho estudio, el grupo de peces alimentados con aceite de soya solamente se detectaron trazas de β -sitosterol, mientras que otros fitoesteroides como stigmasterol y campesterol no fueron detectados (Mørkøre *et al.*, 2007). En otra investigación, se analizó el contenido de

esteroles de las vísceras de macarela (*Scomber scombrus*) y de arenque del Atlántico (*Clupea harengus*) y su variación estacional. En ambas especies se analizaron ejemplares silvestres, capturados cerca de la costa oriental de Quebec, Canadá. No se detectaron fitoesteroles en las vísceras de ninguna de las dos especies (Souchet & Laplante, 2007).

En el presente trabajo sí se detectaron los fitoesteroles β -sitosterol y campesterol en las muestras de hígado de todos los grupos experimentales mediante el método SIM de GC-MS. No obstante, fueron identificados en bajas concentraciones y no pudieron ser cuantificados. En las muestras de músculo, los fitoesteroles no fueron detectados en ninguno de los grupos experimentales por GC-MS-SIM. Estos resultados indican que los esteroides están siendo metabolizados pues la presencia de fitoesteroides en el hígado sólo puede deberse a su ingesta ya que los animales no los sintetizan. Los esteroides que no son excretados por los transportadores ABCG5 y ABCG8 de los enterocitos se dirigen al retículo endoplasmático, en donde son esterificados por la enzima acil-coenzima A:colesterol O-acil-transferasa (ACAT2) (Lee *et al.*, 2000), lo que facilita su integración en los quilomicrones. Esta proteína es la principal enzima responsable de la esterificación de esteroides en enterocitos y tiene actividad 7.2 veces más alta sobre colesterol que sobre β -sitosterol (Temel *et al.*, 2003), lo que disminuye su absorción al permanecer en su forma no esterificada.

Esta diferencia de actividades sobre esteroides no ocurre en la misma medida en las proteínas responsables de excreción de esteroides al lumen intestinal. Estudios *in vitro* han demostrado que ABCG5 y ABCG8 tienen actividad similar sobre fitoesteroides y colesterol (Wang *et al.*, 2006). Por su parte, Yu *et al.* (2002a) determinaron que la

actividad de ABCG5 y ABCG8 es de mayor importancia para la excreción de fitoesteroles que de colesterol; a ratones en los que se inhibió la expresión de ABCG5 y ABCG8, se ocasionó una acumulación significativa de fitoesteroles en plasma sanguíneo, pero no de colesterol.

Latosterol y desmosterol, los precursores de colesterol, no fueron detectados por el método SIM en las muestras de músculo y tampoco en las muestras de hígado de ninguno de los tratamientos. Las cantidades relativas de fitoesteroles y precursores de colesterol han sido utilizadas como indicadores de absorción de colesterol en humanos, por lo que la presencia de fitoesteroles y la ausencia de precursores de colesterol indican que la absorción de colesterol no está obstaculizada, ya que de ser así, aumenta la proporción de precursores relativa a fitoesteroles (Matthan & Lichtenstein, 2004).

Sharpe *et al.* (2006) estudiaron la capacidad de biosíntesis *de novo* de colesterol en las gónadas del pez dorado (*Carassius auratus*) de ambos sexos al ser expuestos a β -sitosterol. Se encontró una elevación significativa de la concentración plasmática de colesterol en los peces expuestos a β -sitosterol. También se encontró que la capacidad de biosíntesis *de novo* de colesterol en gónadas no se ve afectada por la presencia de β -sitosterol y se mantuvieron concentraciones sin cambios respecto al grupo control. Los autores sugieren que las interacciones del β -sitosterol con las concentraciones de colesterol en las gónadas de *Carassius auratus* están más ligadas a los mecanismos intracelulares de transporte de esteroides y esteroides que a los de su biosíntesis.

Los efectos del colesterol sobre el crecimiento, desempeño y metabolismo de los peces de diferentes especies han demostrado ser muy variados, y en ocasiones,

opuestos. Más allá, es también evidente que la concentración de este nutriente tan versátil no es el único factor que determina su influencia sobre la fisiología animal. Sus interacciones con otros componentes del alimento, particularmente otros esteroides y taurina, así como las distintas respuestas inter-específicas de los organismos, dan lugar a múltiples interrogantes que aún no han sido dilucidados.

CONCLUSIONES

- La concentración de colesterol en el alimento para *Seriola lalandi* no tuvo efecto sobre la supervivencia de los peces. La concentración de colesterol de 2,880 mg kg⁻¹ de grasa cruda provocó el mayor crecimiento.
- La concentración de colesterol en las dietas no influyó significativamente sobre la concentración de este nutriente en los tejidos de musculo e hígado del jurel.
- Los fitoesteroles β -sitosterol y campesterol fueron identificados en los hígados de los peces de los cuatro grupos experimentales. No se detectaron fitoesteroles en el músculo de los peces de ningún grupo experimental.

REFERENCIAS

- Abbink W, Blanco Garcia A, Roques JAC, Partridge GJ, Kloet K, Schneider O (2011)
The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of
juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems.
Aquaculture 330-333:130-135.
- Abidi SL (2001) Review. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and
vegetable oils. J Chromatogr A 935:173–201.
- Ahmida HSM, Bertucci P, Franzo L, Massoud R, Cortese C, Lala A, Federici G (2006)
Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors
using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion
monitoring (SIM). J Chromatogr B 842:43–47.
- Altmann SW, Davis Jr HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M,
Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP (2004) Niemann-Pick C1
Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. Science 303:1201–
1204.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990) Cholesterol in
multicomponent foods. Gas chromatographic method. In: Helrich K (ed) Official
Methods of Analysis of the AOCS, 15th edn. AOAC, Arlington, Va., pp 1103-
1105.

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995) Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290:1771–1775.
- Bjerkeng B, Storebakken T, Wathne E (1999) Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. *Aquacult Nutr* 5: 181-191.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917.
- Bowyer JN, Qin JG, Smullen RP, Stone DAJ (2012) Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture* 356-357:211–222.
- Bowyer JN, Qin JG, Smullen RP, Adams LR, Thomson MJS, Stone DAJ (2013) The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 1. Solvent extracted soybean meal. *Aquaculture* 384-387:35–45.
- Chen JY, Chen JC, Wu JL (2003) Molecular cloning and functional analysis of zebrafish high-density lipoprotein-binding protein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136:117–130.

- Davis Jr HR, Altmann SW (2009) Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1791:679–683.
- Davis Jr HR, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 279:33586–92. doi:10.1074/jbc.M405817200.
- Deng J, Mai K, Ai Q, Zhang W, Wang X, Tan B, Xu W, Liufu Z, Ma H (2010) Interactive effects of dietary cholesterol and protein sources on growth performance and cholesterol metabolism of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquacult Nutr* 16:419–429.
- Deng J, Kang B, Tao L, Rong H, Zhang X (2012) Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. *Fish Shellfish Immun* 34:324–31.
- Fernandes M, Tanner J (2008) Modelling of nitrogen loads from the farming of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquac Res* 39:1328–1338.
- Goto T, Ui T, Une M, Kuramoto T, Kihira K, Hoshita T (1996) Bile salt composition and distribution of the D-cysteinolic acid conjugated bile salts in fish. *Fisheries Sci* 62:606–609.

- Haines TH (2001) Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? Prog Lipid Res 40:299-324.
- Hansen AC, Rosenlund G, Karlsen Ø, Koppe W, Hemre GI (2007) Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I — Effects on growth and protein retention. Aquaculture 272:599–611. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.08.034.
- Hardy RW (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. Aquac Res 41:770–776.
- Higgs DA, Dong FM (2000) Lipids and fatty acids. In: Stickney RR (ed.) Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley & Sons, New York, pp 476–496.
- Jeong J, McMahon AP (2002) Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. J Clin Invest 110:591–596.
- Jones PJ (1997) Regulation of cholesterol biosynthesis by diet in humans. Am J Clin Nutr 66:438–446.
- Jordal AEO, Lie Ø, Torstensen BE (2007) Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquacult Nutr 13:114–130. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00455.x.

- Kaushik SJ, Coves D, Dutto G, Blanc D (2004) Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230:391-404.
- Kempen HJM, Leuven JAG, Voort VD, Katant MB (1988) Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res* 29:1149–1155.
- Ketomaki A, Gylling H, Miettinen TA (2005) Non-cholesterol sterols in serum, lipoproteins, and red cells in statin-treated FH subjects off and on plant stanol and sterol ester spreads. *Clin Chim Acta* 353:75–86.
- Khaoian P, Nguyen HP, Ogita Y, Fukada H, Masumoto T (2014) Taurine supplementation and palm oil substitution in low-fish meal diets for Young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture* 420-421:219-224.
- Leaver MJ, Villeneuve LA, Obach A, Jensen L, Bron JE, Tocher DR, Taggart JB (2008) Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9:299. doi:10.1186/1471-2164-9-299.
- Lee RG, Willingham MC, Davis MA, Skinner KA, Rudel LL (2000) Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates. *J Lipid Res* 41:1991–2001.

- Maita M, Maekawa J, Satoh KI, Futami K, Satoh S (2006) Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fisheries Sci* 72:513–519.
- Matsumoto J, Erami K, Ogawa H, Doi M, Kishida T, Ebihara K, (2005) The protease-resistant fraction of smoked, dried bonito lowers serum cholesterol in ovariectomized rats fed cholesterol-free diets. *J Food Sci* 70:467–474.
- Matthan NR, Lichtenstein AH (2004) Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 174:197–205.
- Moran D, Pether SJ, Lee PS (2009) Growth, feed conversion and fecal discharge of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) fed three commercial diets. *New Zeal J Mar Fresh* 43:917–927.
- Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 41:457-500.
- Mørkøre T, Netteberg C, Johnsson L, Pickova J (2007) Impact of dietary oil source on product quality of farmed Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 267:236–247. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.01.033.
- Nasopoulou C, Zabetakis I (2012) Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review. *Food Sci Technol-Leb* 47:217–224.

- Norambuena F, Lewis M, Khalidah N, Hamid A, Hermon K, Donald JA, Turchini GM (2013) Fish Oil Replacement in Current Aquaculture Feed : Is Cholesterol a Hidden Treasure for Fish Nutrition?, 8(12). doi:10.1371/journal.pone.0081705.
- Normen L, Dutta P, Lia A, Andersson H (2000) Soy sterol esters and b-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. Am J Clin Nutr 71: 908–913.
- Orellana J, Waller U, Wecker B (2013) Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. Aquacult Eng 58:20-28.
- Ostlund RE (2004) Phytosterols and cholesterol metabolism. Curr Opin Lipidol 15:37–41. doi:10.1097/01.mol.0000113209.97033.1d.
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM (2000) Review Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J Sci Food Agric 80:939-966.
- Pirozzi I, Booth MA (2009) The routine metabolic rate of mullet (*Argyrosomus japonicus*: *Sciaenidae*) and yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*: *Carangidae*) acclimated to six different temperatures. Comp Biochem Phys A 152:586–592. doi:10.1016/j.cbpa.2009.01.008.
- Porter JA, Young KE, Beachy, PA (1996) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. Science 274:255-259.

- Richard N, Mourente G, Kaushik S, Corraze G (2006) Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261:1077–1087. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.07.021.
- Sealey WM, Craig SR, Iii DMG (2001) Dietary cholesterol and lecithin have limited effects on growth and body composition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquacult Nutr* 7:25–31.
- Sharpe RL, Drolet M, MacLatchy DL (2006) Investigation of de novo cholesterol synthetic capacity in the gonads of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to the phytosterol beta-sitosterol. *Reprod Biol Endocrin* 4:60. doi:10.1186/1477-7827-4-60.
- Sitjà-Bobadilla A, Peña-Llopis S, Gómez-Requeni P, Médale F, Kaushik S, Pérez-Sánchez J (2005) Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249:387–400.
- Souchet N, Laplante S (2007) Seasonal and geographical variations of sterol composition in snow crab hepatopancreas and pelagic fish viscera from Eastern Quebec. *Comp Biochem Physiol, B* 147: 378–386.
- Tacon AGJ, Metian M (2009) Fishing for Aquaculture: Non-Food Use of Small Pelagic Forage Fish—A Global Perspective. *Rev Fish Sci* 17:305–317. doi:10.1080/10641260802677074.

- Takagi S, Murata H, Goto T, Endo M, Yamashita H, Ukawa M (2008) Taurine is an essential nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture* 280:198–205. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.05.012.
- Temel RE, Gebre AK, Parks JS, Rudel LL (2003) Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem* 278:47594–601. doi:10.1074/jbc.M308235200.
- Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK (2009) Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev Aquacult* 1:10–57. doi:10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x.
- Twibell RG, Wilson RP (2004) Preliminary evidence that cholesterol improves growth and feed intake of soybean meal-based diets in aquaria studies with juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 236:539–546.
- Van der Wulp MYM, Verkade HJ, Groen AK (2013) Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 368:1–16. doi:10.1016/j.mce.2012.06.007.
- Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH (2002) Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16237–42. doi:10.1073/pnas.252582399.

- Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH (2002) Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 110:671–680.
- Yun B, Mai K, Zhang W, Xu W (2011) Effects of dietary cholesterol on growth performance, feed intake and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture* 319:105–110. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.06.028.
- Yun B, Ai Q, Mai K, Xu W, Qi G, Luo Y (2012) Synergistic effects of dietary cholesterol and taurine on growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed high plant protein diets. *Aquaculture* 324-325:85–91. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.10.012.
- Zhu T, Ai Q, Mai K, Xu W, Zhou H, Liufu Z (2014) Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. *Aquaculture* 428-429:290–296. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.03.027.