

Requerimientos de Fosfolípidos en Larvas y Poslarvas de Peces con Especial Énfasis en la Fosfatidilcolina y el Fosfatidilinositol

Inge Geurden¹, Pierre Bergot², Peter Coutteau¹, Stephanie Fontagné² and Patrick Sorgeloos¹

1 Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, University of Ghent, Rozier 44, B-9000 Ghent, Belgium;

2 Unité Mixte INRA-IFREMER de Nutrition des Poissons, Station d'Hydrobiologie, F-64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

Introducción

El crecimiento requiere de la formación de membranas lipídicas polares. La proporción de cada una de las clases de fosfolípidos (PL), como porcentaje del total de lípidos polares en el cuerpo de peces de una talla dada se encontró constante e independiente de la presencia o la composición en fosfolípidos de la dieta (Geurden *et al.*, 1998; Geurden *et al.*, 1999). Esto sugiere que las larvas de peces, como otros animales vertebrados (Gurr y Harwood, 1991; Sargent *et al.*, 1993; Tocher, 1995) son capaces de realizar la síntesis *de novo* de fosfolípidos y/o de interconvertirlos. Sin embargo, la necesidad de incluir fosfolípidos en la dieta para obtener un buen desarrollo de las larvas de peces ha sido documentada en varios estudios (Kanazawa *et al.*, 1981; Kanazawa *et al.*, 1983a; Kanazawa *et al.*, 1983b; Kanazawa *et al.*, 1985; Takeuchi *et al.*, 1992; Kanazawa, 1993; Koven *et al.*, 1993; Szlaminska *et al.*, 1993; Radunz-Neto *et al.*, 1994; Geurden, Radunz-Neto y Bergot, 1995; Cotteau *et al.*, 1997; Geurden *et al.*, 1997a; Geurden *et al.*, 1997b; Geurden *et al.*, 1997c; Fontagné *et al.*, 1998; Geurden *et al.*, 1998c; Geurden *et al.*, 1998d).

La ingestión de presas vivas ofrece a las larvas de peces una mezcla de fosfolípidos. También la lecitina de soya, fuente común de fosfolípidos en dietas balanceadas, contiene diferentes clases de fosfolípidos como la fosfatidilcolina (PC) y la fosfatidiletanolamina (PE), siendo estos los componentes mayores, de manera similar a lo encontrado en fosfolípidos de origen animal (Gurr y Harwood, 1991). El fosfatidilinositol (PI) y el ácido fosfatídico son clases de fosfolípidos que se encuentran en menores proporciones, mientras que la fosfatidilserina es casi ausente en los fosfolípidos de origen vegetal. Muy pocos estudios han investigado la calidad nutricional de las clases de fosfolípidos por separado. La fosfatidilcolina generalmente tiene el mayor efecto para promover el crecimiento (Geurden *et al.*, 1998; Kanazawa *et al.*, 1983b; Kanazawa *et al.*, 1985; Kanazawa, 1993; Takeuchi *et al.*, 1992; Geurden *et al.*, 1997a; Geurden *et al.*, 1998c) y la fosfatidiletanolamina el más bajo (Kanazawa *et al.*, 1983b; Takeuchi *et al.*, 1992), mientras que el efecto del fosfatidilinositol sobre el crecimiento ha sido reportado como de muy positivo (Kanazawa *et al.*, 1985; Geurden *et al.*, 1997a; Geurden *et al.*, 1998c) a completamente ausente (Kanazawa, 1993). En el presente trabajo se hace una revisión sobre las respuestas observadas en larvas de carpa común (*Cyprinus carpio*) y poslarvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) al ser alimentadas con fosfatidilcolina y fosfatidilinositol provenientes de soya.

Geurden, I. , P. Bergot, P. Coutteau, S. Fontagné y P. Sorgeloos. 2000. Requerimientos de fosfolípidos en larvas y poslarvas de peces con especial énfasis en la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol. pp 264-269 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

Los fosfolípidos dietarios son benéficos para las larvas y poslarvas de peces

La necesidad de emplear fosfolípidos en la dieta durante los estadios tempranos de vida en peces fueron primeramente mostrados por Kanazawa y colaboradores a principios de los ochentas (Kanazawa *et al.*, 1981; Kanazawa *et al.*, 1983a; Kanazawa *et al.* 1983b; Kanazawa *et al.*, 1985). Para el rodaballo recién destetado, una deficiencia de fosfolípidos en la dieta durante 40 días redujo el crecimiento en aproximadamente 20 %, sin afectar la sobrevivencia (Geurden *et al.*, 1997b). En larvas de peces el efecto de un suplemento de fosfolípidos fue más pronunciado. Nuestros estudios sobre el inicio de la alimentación de la carpa demostraron que el reemplazo de 4 % de aceite de cacahuete por 2 ó 4 % de fosfolípidos de yema de huevo incrementaron la biomasa al día 25 por un factor de 2.5 a 3 (Geurden *et al.*, 1995). Un muestreo intensivo reveló que el crecimiento de larvas de carpa, desprovistas de fosfolípidos en la dieta, se detuvo casi completamente entre el día 6 y el 12 después del primer día de alimentación (Geurden *et al.*, 1998c), mismo que estuvo generalmente asociado con el comienzo de importantes mortalidades (Geurden *et al.*, 1995; Geurden *et al.*, 1998; Geurden *et al.*, 1998c).

El sistemáticamente pobre rendimiento en la crianza de larvas de peces sin fosfolípidos exógenos insinúa que la capacidad de síntesis *de novo* es demasiado limitada como para satisfacer la alta demanda de formación de membranas durante los estadios tempranos de desarrollo.

Efectos específicos de la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol sobre el crecimiento, sobrevivencia y deformidades

Respecto al potencial que tienen las clases específicas de fosfolípidos para cubrir los requerimientos en fosfolípidos de los peces, la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol han sido reportados como más efectivos que la fosfatidiletanolamina en larvas de "ayu" (*Plecoglossus altivelis*) con 70-días de vida (Kanazawa *et al.*, 1985). Por otra parte, Kanazawa (1993) encontró que la ganancia en peso de la larva del lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) no fue mejorada por la fosfatidilcolina de soya, en comparación con el fosfatidilinositol de soya. La inclusión de 1% de fosfatidilcolina de soya para la dieta de destete de rodaballo también dio un mejor crecimiento que el 1% de fosfatidilinositol purificado de soya, el cual fue sin embargo mejor que el alimento que no tenía fosfolípidos (Geurden *et al.*, 1998). En el caso de las larvas de carpa la situación fue más compleja. Con fosfatidilcolina de soya, en una primer etapa se obtuvo un mejor crecimiento larvario que con el fosfatidilinositol extraído de soya, pero también indujo la aparición de deformidades y subsecuentes mortalidades, las cuales en una segunda etapa, reducen o anulan la ventaja inicial lograda por la fosfatidilcolina (Geurden *et al.*, 1997a; Geurden *et al.*, 1998c). Cuando se usó el crecimiento inicial como único criterio, la fosfatidilcolina fue superior al fosfatidilinositol, mientras que al tomar la sobrevivencia final como criterio, el fosfatidilinositol fue muy superior. Las respuestas específicas de las larvas a las dietas con fosfatidilcolina o fosfatidilinositol también fueron discriminadas por el criterio histológico, como se discute mas adelante.

En resumen, parece que las larvas de peces tienen requerimientos distintos de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol. Además, las diferencias en los resultados de cultivo, producidos por diferencias en la composición de clases de fosfolípidos, postulan que la conversión de una cierta clase de fosfolípidos de la dieta a otra clase de fosfolípidos puede constituir una limitante para el óptimo desarrollo. Al mismo tiempo, la superioridad de cualquier clase de fosfolípidos sobre la ausencia de estos en la dieta indica que la bioconversión es, por mucho, la más fácilmente llevada a cabo o que demanda menos energía, que la síntesis completa *de novo*.

Los efectos específicos de la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol no son explicados por los constituyentes dietéticos

Un requerimiento nutricional para un componente específico implica que los efectos observados no son debidos a que se este satisfaciendo otro requerimiento nutricional "clásico".

Una primera hipótesis fue que la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol pueden operar como fuentes de nutrientes hidrofílicos esenciales. De esta manera, el presumible efecto promotor de crecimiento de la lecitina de soya en juveniles del esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) (Hung *et al.*, 1987) fue criticado dado que la mezcla de vitaminas en la dieta no contenía colina y que subsecuentes experimentos en esturión negaron los efectos benéficos de la fosfatidilcolina en presencia de colina en la dieta (Hung y Lutes, 1998). Para la larva de la carpa, fue claramente demostrado que la sustitución de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol en las dietas por colina o inositol, respectivamente, no reproducen los efectos de observados con fosfolípidos (Geurden, I., 1995; Geurden, I., 1997a).

Una segunda posibilidad a ser verificada fue que los ácidos grasos esterificados en los fosfolípidos no corrigieron una deficiencia específica de ácidos grasos esenciales. En contraste con las fuentes de fosfolípidos de origen animal, los fosfolípidos vegetales, incluyendo el fosfatidilinositol, no contienen ácidos grasos insaturados con una longitud de cadena de más de 18 carbonos. Por lo tanto, en peces marinos con requerimientos en ácidos grasos altamente insaturados C20 y C22, los distintos efectos del fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina de soya no deben ser atribuidos al valor de ácidos grasos esenciales de sus acil constituyentes *per se* como ya se enfatizó antes (Sargent *et al.*, 1993; Kanazawa *et al.*, 1985). También, la fosfatidilcolina hidrogenada, sin valor de ácidos grasos esenciales mejoró el crecimiento tanto de la carpa y como de poslarvas de rodaballo (Geurden *et al.*, 1998c; Geurden *et al.*, 1998d).

La hipótesis de una deficiencia en fósforo, corregida por las clases de fosfolípidos no fue probada porque parece poco probable, tratándose de dietas suplementadas con minerales y que contenían caseína o harina de pescado como principal fuente de proteína (N.R.C., 1993).

Distintos papeles fisiológicos de la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol

En carpas de 1-semana, así como en el rodaballo de 6-12 semanas, se ha demostrado que la fosfatidilcolina aumenta la absorción de lípidos neutros de la dieta. Los métodos experimentales usados para llegar a esta conclusión fueron muy diferentes. Por análisis histológico de la región anterior del intestino de larvas de carpa, se demostró que la acumulación de lípidos en los enterocitos de peces alimentados con dietas sin fosfolípidos y

también dietas ricas en fosfatidilinositol, fue prevenida por la inclusión de fosfatidilcolina a la dieta.

El mayor volumen de hígado y de los hepatocitos en peces alimentados con fosfatidilcolina confirman una mayor exportación de lípidos provenientes del intestino (Fontagné *et al.*, 1998). En analogía, rodaballos alimentados con dietas ricas en fosfatidilcolina resultaron tener niveles más altos de ácido docosahexaenoico (DHA) en sus clases de lípidos, comparado con peces con bajo contenido de fosfatidilcolina o dietas deficientes en fosfolípidos, con la misma cantidad de ésteres etílicos de ácidos grasos altamente insaturados (Geurden *et al.*, 1998; Geurden *et al.*, 1997b; Geurden *et al.*, 1997c; Geurden *et al.*, 1998d). El uso del DHA como un indicador de la absorción de ácidos grasos se fundamentó en datos de la literatura, evidenciando cuantitativamente la baja degradación o síntesis de estos ácidos grasos en peces marinos (Sargent *et al.*, 1993). Además de un alto contenido en DHA, los lípidos de rodaballo y lobina (sea bass) alimentados con fosfatidilcolina, también contienen cantidades significativamente más altas de triglicéridos, lo que concuerda con una mayor incorporación de lípidos neutros (Geurden *et al.*, 1998; Geurden *et al.*, 1997b; Geurden. *et al.*, 1997c).

Los resultados arriba mencionados resumen y confirman un papel específico para la fosfatidilcolina, mismo que fue mostrado anteriormente en un estudio *in vitro* en intestino de rata, el cual indicó que la fosfatidilcolina estimuló la síntesis y secreción de apoB lipoproteína de lipoproteínas ricas en triacilglicerol producidas en el intestino (Field y Mathur, 1995).

Los efectos promotores del crecimiento observados con la fosfatidilcolina pueden sin embargo ser explicados, al menos parcialmente, por un incremento en el flujo de energía desde la mucosa intestinal hacia la sangre.

Sin excluir explicaciones adicionales, las deformidades del esqueleto de larvas de carpa inducidas por la fosfatidilcolina, pudieran estar relacionadas con la carencia de fosfatidilinositol en la dieta. A excepción de un experimento donde se observó la aparición de infección branquial, el fosfatidilinositol de soya garantizó la mejor sobrevivencia en las larvas de carpa y casi evitó completamente al aparición de las deformidades vistas en las carpas alimentadas con fosfatidilcolina de soya y yema de huevo (Geurden, *et al.*, 1997a; Geurden *et al.*, 1998c).

También, el hecho que el lyso-fosfatidilinositol indujo efectos idénticos al fosfatidilinositol no hidrolizado (Geurden *et al.*, 1998c), es una característica que lo distingue cuando se compara con la diferencia observada entre larvas alimentadas con fosfolípidos de soya hidrolizada y no hidrolizada (Geurden, I. *et al* 1995). Un papel específico del fosfatidilinositol en el desarrollo puede ser sospechado, sabiendo que se trata de un precursor del 1-4-5 trifosfato, el cual es un mensajero metabólico intracelular activo (Berridge e Irvine, 1989).

Referencias:

- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. 1989. Inositol phosphate and cell signaling. *Nature* 341: 197-205.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P. and Sorgeloos, P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture* 155: 149-164.
- Field, F.G. and Mathur, S.N. 1995. Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Prog. Lipid Res.* 34: 185-198.
- Fontagné, S., Geurden, I., Escaffre, A.M. and Bergot, P. 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp larvae. *Aquaculture* 161: 213-223.
- Geurden, I., Radünz-Neto, J. and Bergot, P. 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 131: 303-314.
- Geurden, I., Charlon, N., Marion, D. and Bergot P. 1997a. Influence of purified soybean phospholipids on early development of common carp. *Aquac. Int.* 5: 137-149.
- Geurden, I., Coutteau, P. and Sorgeloos, P. 1997b. Effect of a dietary phospholipid supplementation on growth and fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles from weaning onwards. *Fish Physiol. Biochem.* 16: 259-272.
- Geurden, I., Coutteau, P. and Sorgeloos, P. 1997c. Increased docosahexaenic acid (DHA) levels in total and polar lipid of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) postlarvae fed vegetable or animal phospholipids. *Mar. Biol.* 129: 689-698.
- Geurden, I., Bergot, P., Schwarz, L. and Sorgeloos, P. 1998. Incorporation of fatty acids from dietary neutral lipid in post-larval turbot (*Scophthalmus maximus*) fed different phospholipid classes. *Fish Physiol. Biochem.* 19 (3): 217-228.
- Geurden, I., Bergot, P., Van Ryckeghem, K. and Sorgeloos, P. 1999. Phospholipid composition of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae starved or fed different phospholipid classes. *Aquaculture.* 171(1,2): 93-107.
- Geurden, I., Marion D., Charlon, N., Coutteau, P. and Bergot, P. 1998c. Comparison of different soybean phospholipidic fractions as dietary supplements for common carp larvae. *Aquaculture* 161: 225-235.
- Geurden, I., Reyes, O., Bergot, P., Coutteau, P. and Sorgeloos, P. 1998d. Incorporation of fatty acids from dietary neutral lipid in eye, brain and muscle of postlarval turbot fed diets supplemented with different types of phosphatidylcholine. *Fish Physiol. Biochem.* 19 (4): 365-375.
- Gurr, M.I. and Harwood, J.L. 1991. *Lipid biochemistry. An Introduction.* 4th ed, Chapman and Hall, London, 406 pp.
- Hung, S.S.O., Moore, B.J., Bordner, C.E. and Conte, F.S. 1987. Growth of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fed different purified diets. *J. Nutr.* 117: 328-334.
- Hung, S.S.O. and Lutes, P.B. 1988. A preliminary study on the nonessentiality of lecithin for hatchery produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture* 68: 353-360.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Iwashita, T. and Nagao, A. 1981. Effects of phospholipids on growth, survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 30: 301-309
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S. and Matsubara, H. 1983a. Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 32: 109-114.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Kobayashi, T., Takae, M., Iwashita, T. and Uehara, R. 1983b. Necessity of dietary phospholipids for growth of the larval ayu. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 32: 115-120.
- Kanazawa, A., Teshima, S. and Sakamoto, M. 1985. Effects of dietary bonito-egg phospholipids and some phospholipids on growth and survival of the larval Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Z. Angew. Ichthyol.* 4: 165-170.
- Kanazawa, A. 1993. Essential phospholipids of fish and crustaceans. *In: Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (France), pp 519-530. Edited by S.J.Kaushik and P.Luquet. Les Colloques 61, Ed INRA, Paris.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.Wm. and Sklan, D. 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10: 357-364.
- N.R.C. 1993. *Nutritional requirements of fish.* National Academy Press, Washington D.C.
- Radünz-Neto, J., Corraze, G., Charlon, N. and Bergot, P. 1994. Lipid supplementation of casein-based purified diets for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 128: 153-161.

- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V. Henderson, R.J. and Tocher, D.R.** 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. *In: Aquaculture: Fundamental and Applied Research. Coastal and Estuarine Studies 43*, pp 103-124. Edited by Lahlou, B. and Vitiello, P. American Geophysical Union, Washington D.C.
- Szlaminska, M., Escaffre, A.M. and Bergot, P.** 1993. Preliminary data on semisynthetic diets for goldfish (*Carassius auratus* L.) larvae. *In: Fish Nutrition in Practice, Biarritz (France)*, pp 607-612. Edited by S.J.Kaushik and P.Luquet. Les Colloques 61, Ed. INRA, Paris.
- Tocher, D.R.** 1995. Glycerophospholipid metabolism. *In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4, pp 120-157. Edited by P.W. Hochachka and T.P. Mommsen. Elsevier, Amsterdam.
- Takeuchi, T., Arakawa, T., Satoh, S. and Watanabe, T.** 1992. Supplemental effect of phospholipids and requirement of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid of juvenile striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 707-713.