



Utilización de sales biliares como aditivos zootécnicos: efecto sobre la digestión y el metabolismo

Trabajo Fin de Grado
Grado de Biotecnología
Curso 2019/2020

José Luna Ramos

Director: Manuel Díaz López
Codirectora: Isabel M^a Agredano Pila
Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento de Biología y Geología
Grupo de Investigación en Modelización Digestiva

Índice

Glosario de abreviaturas	3
Resumen	4
Abstract.....	4
1. Introducción	5
2. Objetivos.....	6
3. Plan de trabajo.....	6
4. Desarrollo del tema	7
4.1. Ácidos/sales biliares	7
4.2. Origen y destino de los ácidos biliares en el organismo.....	12
A) Síntesis hepática	12
B) Secreción intestinal	15
C) Transporte.....	15
D) Metabolismo por microbiota intestinal.....	16
E) Reabsorción	17
4.3. Funciones de las sales biliares	18
A) Digestión de lípidos emulsionados.	18
A.1) Lípidos.....	18
A.2) Lipasas digestivas	22
A.3) Emulgentes	23
A.4) Interacción entre sales biliares y emulgentes	25
A.5) Proceso de degradación a partir de emulsiones	26
A.6) Absorción de lípidos del alimento	28
B) Regulación del metabolismo.....	29
C) Inmunomodulación.....	29
D) Señalización hormonal	31
4.4. Sales biliares como aditivos zootécnicos	34
A) Utilización en animales terrestres	35
B) Utilización en acuicultura	38
5. Discusión general	43
6. Perspectivas futuras en el uso de sales biliares	44
7. Bibliografía	46

Glosario de abreviaturas

ADC: coeficiente de digestibilidad aparente

ASBT: transportadores activos dependientes de sodio.

BAC: ácidos biliares.

BAL: alcoholes biliares.

BAT: ácido biliar-CoA:aminoácido N-aciltransferasa

BS: sales biliares.

CA: ácido cólico.

CAR: receptor de andostano constitutivo.

CBS: sales biliares conjugadas.

CBAC: ácidos biliares conjugadas.

CCA: colil-CoA sintetasa de ácido biliar

CYP7A1: colesterol 7 α -hidroxilasa.

CYP27A1: colesterol 27 α -hidroxilasa.

CDCA: ácido quenodesoxicólico.

FA: ácidos grasos.

FXR: receptor farnesoide nuclear X.

PXR: receptor de pregnano X

LCA: ácido litocólico.

LXR: receptor del hígado X.

TCA: ácido taurocólico.

VDR: receptor de la vitamina D.

Resumen

En este trabajo se aborda en detalle las características de las sales biliares. Se describe cómo se lleva a cabo su síntesis y su secreción en el intestino, como la microbiota intestinal es capaz de modificar las sales y finalmente, como estas son capaces de ser reabsorbidas y llegar de nuevo al intestino.

Una vez explicado cuales son las características de las sales biliares en todos sus aspectos, se desarrolla las funciones que presentan estas en el organismo. Es por ello por lo que se explica en profundidad las características de los lípidos, el proceso de digestión de lípidos y cuáles son dichos mecanismos de degradación. Además, se desarrollan otras funciones que presentan las sales biliares como regulador del metabolismo, señalizador hormonal y agente antibacteriano e inmunológico.

A continuación, se describe con más detalle cuales son los beneficios de los ácidos biliares como suplemento en la dieta, con la ejemplificación, mediante experimentos actuales de distintas especies de peces, de pollos de engorde y de cerdos. Asimismo, se desarrolla un apartado de discusión en el que se aclara y se compara cuáles son las ventajas y los inconvenientes para los animales, la aplicación de las sales biliares como aditivos zootécnicos en la alimentación de los mismos.

Finalmente, se explican distintas líneas de investigación acerca de las sales biliares cuyo fines no son zootécnicos como son el diseño de nuevos materiales, reducción de la absorción de grasas en humanos y sistema de administración de fármacos.

Abstract

This work deals in detail with the characteristics of bile salts. It is explained how is synthesized and secreted in the intestine, how the intestinal microbiota can modify them and, finally, how these are reabsorbed to arrive to the intestine again.

Once explained what the characteristics of bile salts in all aspects are, the functions of them in organisms are clarified. Furthermore, the characteristics of lipids, the lipid digestion process and degradation mechanisms of lipids are explained in depth. In addition, other functions that bile salts present are explained such as a regulator of metabolism, a hormonal signalling agent, and an antibacterial and immunological agent.

In addition, benefits of bile acids as a dietary supplement are described in more detail by with current experiments on different species of fishes, broilers, and pigs. Moreover, a discussion is accomplished to clarified and compared the advantages and the disadvantages for using the bile acids as zootechnical additives in feeding them.

Finally, different lines of research related to bile acids are explained such as designing of new materials, reduction of the absorption of fats in humans, and administration system of drugs.

1. Introducción

Las sales biliares son moléculas anfipáticas producidas por los hepatocitos, células más abundantes que constituyen el hígado. Además, estas sustancias constituyen uno de los principales componentes de la bilis. Las sales biliares son producidas a partir de la molécula del colesterol, y es por ello, que todos los ácidos y alcoholes biliares presentan gran similitud estructural, diferenciándose en grupos funcionales que se agregan a la estructura principal (Romano, N. *et al.*, 2020). Es por ello, por lo que la composición de la bilis puede ser tan diversa entre especies.

Los ácidos y alcoholes biliares originados en el hígado son transportados a la vesícula biliar y es aquí, donde se almacena y se unen a iones de potasio o de sodio, formando las sales biliares. Por lo tanto, cuando el organismo realiza la digestión y el alimento llega al intestino, dichas sales son liberadas para que puedan cumplir con sus funciones.

Las sales biliares presentan numerosas funciones beneficiosas para el organismo. Por ejemplo, estas sustancias están relacionadas con la inmunomodulación, ya que regulan diversas inflamaciones sistémicas, alergias, síndromes metabólicos, enfermedades hepáticas alcohólicas y cáncer de colon (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014). Además, participan en la regulación del metabolismo, debido a sus capacidades de señalización hormonales. Sin embargo, sus principales funciones están relacionadas con el proceso de catabolismo lipídico (lipólisis). El primero consiste en retirar los compuestos generados por la acción de la lipasa, como los ácidos grasos libres. Mientras que el segundo corresponde al papel de ser un agente emulgente, es decir, reduce la tensión superficial de las grasas, convirtiendo los lípidos que se encuentran dispersos en emulsiones, y facilitando así, la degradación de las grasas por las lipasas (Sarkar, A. *et al.*, 2016).

Debido a los beneficios que presentan las sales biliares y a sus múltiples funciones, estas sustancias se están empleando de manera exógena en el alimento como aditivos zootécnicos, con el objetivo de potenciar o complementar las funciones de la bilis que es producida de manera endógena por el propio organismo. Además, numerosos estudios han demostrado que un suplemento de sales biliares en el alimento de los animales que se encuentran en su fase de desarrollo, permite que estos crezcan de manera más rápida, ya que los animales en sus fases de desarrollo no producen suficiente bilis, debido a la cantidad de alimento que ingieren para alcanzar las tasas de crecimiento, que han sido mejoradas en el proceso de selección (Siyal, F. A. *et al.*, 2017).

Una de las razones por las que permiten alcanzar la fase adulta en menos tiempo es que las sales biliares intervienen de manera positiva en el proceso de digestión y absorción de lípidos en el intestino proporcionando energía y ácidos grasos esenciales. Por lo tanto, si se emplea como un aditivo zootécnico, va a mejorar la digestibilidad de las grasas, obteniendo un mayor valor nutricional de los alimentos ingeridos y permitiendo así, aprovechar todo el potencial de los alimentos ya que, se incrementa la eficiencia de la digestión (Golding, M. & Wooster, T. J., 2010).

En consecuencia, va a aumentar la disponibilidad de los lípidos, que conlleva a la reducción de la concentración de grasas no digeridas en las heces, debido a que no han llegado a ser aprovechados. Por estas razones, van a permitir que los animales puedan obtener más beneficios en forma de energía de los alimentos ingeridos, ya que se van a liberar más ácidos grasos. Partiendo de estos hechos, las sales biliares como aditivos zootécnicos están relacionados con las industrias ganaderas y las piscifactorías, ya que puede reducir el costo de alimentación animal y por consiguiente su producción. Esto es debido a que la alimentación puede suponer hasta un 70% del coste total de producción (Naso, J. N. *et al.*, 2019).

2. Objetivos

Realizar una revisión bibliográfica sistemática sobre los ácidos biliares, cuáles son sus orígenes, sus destinos y sus funciones en el organismo. Asimismo, analizar, desde el punto de vista de aditivo zootécnico, cuáles son los efectos de las sales biliares tanto en la digestión como en el metabolismo de animales terrestres y de los peces utilizados en producción animal.

3. Plan de trabajo

En primer lugar, se realizó una búsqueda exhaustiva y detallada de artículos científicos recogidos en las bases de datos de Web of Science. Se comenzó fijando en el buscador, la pestaña de periodo de tiempo, seleccionando “personalizar rango de años” con el fin de establecer un periodo de 20 años, es decir desde 2000 hasta 2020. A continuación, en el buscador se establecieron términos claves relacionados con las sales biliares y su papel como aditivos zootécnicos y con la digestión de lípidos. Los términos anglosajones empleados fueron “cholic acid”, “bile salts”, “micelles”, “metabolism”, “emulsion”, “zootechnical additive” y “bile acids”. Dichos términos fueron combinados con el fin de obtener una búsqueda concreta, empleando distintos operadores booleanos como “OR” o “AND” según cada caso. Una vez obtenidos los artículos que cumplían con dichos requisitos, se seleccionaron más actuales, los que presentaron mayor índice de impacto y/o los que presentaban más afinidad con el tema de esta revisión bibliográfica para obtener finalmente una correcta documentación.

Además, se indagó en la página web de la revista de “The Journal of Lipid Research (JLR)”, que presenta numerosas publicaciones de interés para la realización de este documento. Asimismo, para conocer la situación legislativa de la Unión Europea (UE) sobre los ácidos biliares como aditivos zootécnicos se recurrió a la plataforma oficial de la UE para tener acceso a los Reglamentos de los Derechos de la Unión Europea.

Finalmente, se utilizó el programa de diseño Biorender que permitió crear las figuras 5, 12, 13 y 14 con el fin de poder facilitar la comprensión de los procesos. Igualmente, se empleó el programa Mendeley que sirvió como una herramienta de almacenamiento, clasificación y organización de los artículos científicos que se habían seleccionado.

4. Desarrollo del tema

4.1. Ácidos/sales biliares

Los ácidos biliares (BAC) se consideran ácidos débiles y son moléculas anfipáticas derivadas de la molécula del colesterol. Todas las reacciones de síntesis de los BAC son producidas en el hígado, específicamente, en los hepatocitos. Los BAC junto con alcoholes biliares (BAL), fosfolípidos, proteínas, minerales, hormonas, colesterol y agua constituyen la bilis (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014), líquido verde amarillento, que será liberado en el intestino. Este color es debido a dos moléculas que son la bilirrubina (aportando el color amarillo) y la biliverdina (color verde). Además, la bilis, en vertebrados, puede ser almacenada y concentrada en la vesícula biliar, ya que los invertebrados no poseen esta estructura de almacenamiento (Romano, N. *et al.*, 2020).

Respecto a la composición de la bilis, varían según la especie, ya que, pueden estar formadas por una gran variedad de ácidos y alcoholes biliares, y en proporciones muy distintas. Todas estas moléculas biliares presentan una estructura parecida, ya que derivan del colesterol y están formadas por dos unidades, una corresponde con un núcleo esteroide rígido, parte hidrofóbica (soluble en lípidos) y la otra, por una cadena lateral alifática corta terminada en un grupo carboxilo, que constituye la parte hidrofílica (polar). Esto le otorga el carácter de ser anfipático a las moléculas de BAC y BAL. El núcleo esteroide está constituido por un hidrocarburo perhidrociclopentanofenantreno tetracíclico saturado de 19 carbonos, que está formado por tres anillos de seis miembros (A, B y C) y un anillo de cinco miembros (D) (figura 1) (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004).

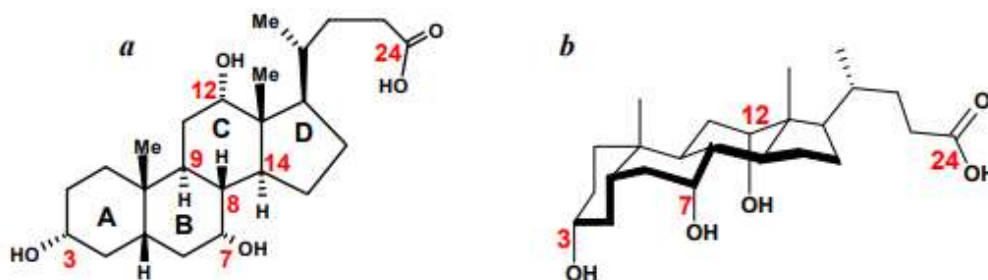


Figura 1. Estructura química del ácido cólico en distintas perspectivas (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004).

En los vertebrados inferiores, en los que se incluyen los peces, los BAC presentan una orientación plana y extendida, esto es debido a una fusión de los anillos A y B en forma trans, mientras que los vertebrados superiores, como los mamíferos, estos anillos están fusionados en forma cis, presentando, por tanto, una orientación “doblada” del anillo A con respecto a los otros anillos (Hagey, L. R. al. 2010).

Adicionalmente, estas moléculas en su gran mayoría presentan grupos metilos angulares en los carbonos C-18 y C-19. Mientras que la estructura de la cadena lateral es la unidad variante y por tanto, es la que determina el tipo de ácido y alcohol biliar. Además, todos los tipos de sales biliares (BS) derivan de la estructura del ácido cólico (CA) (figura 1) o de la estructura del ácido quenodesoxicólico (CDCA), ambos derivados del colesterol. El CA destaca por presentar en el carbono C-17 una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004).

Por consiguiente, la bilis está compuesta principalmente, por dos tipos de moléculas, BAC y BAL, caracterizados estos segundos por tener en el carbono 25 un grupo funcional de hidroxilo. Los BAC se caracterizan por presentar un grupo funcional de ácido carboxílico y se pueden dividir, a su vez, en dos grupos que dependen de la longitud de la cadena lateral (Romano, N. *et al.*, 2020). Por lo tanto, existen BAC de 24 carbonos o de 27 carbonos, que tras conjugarse con moléculas como la glicina o la taurina, se transforman en ácidos fuertes, denominados ácidos biliares conjugados (CBAC). La conjugación ocurre en el carbono terminal de la cadena lateral mediante una reacción de N-acilamidación catalizada por una aciltransferasa, generando las distintas variantes de ácidos biliares (figura 2) (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004). Además, los BAL también se pueden conjugar, pero en este caso la reacción consistiría en una esterificación con sulfato (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010). En conclusión, la bilis está compuesta por BAL de 27C, BAC de 27C y BAC de 24C (figura 3).

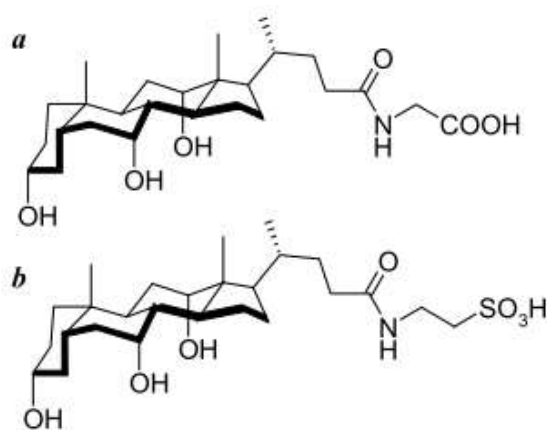


Figura 2. Estructura conjugada del ácido cólico con glicina, formando el ácido glicólico (GCA) (a) y del ácido cólico con taurina, generando el ácido taurocólico (TCA) (b), (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004).

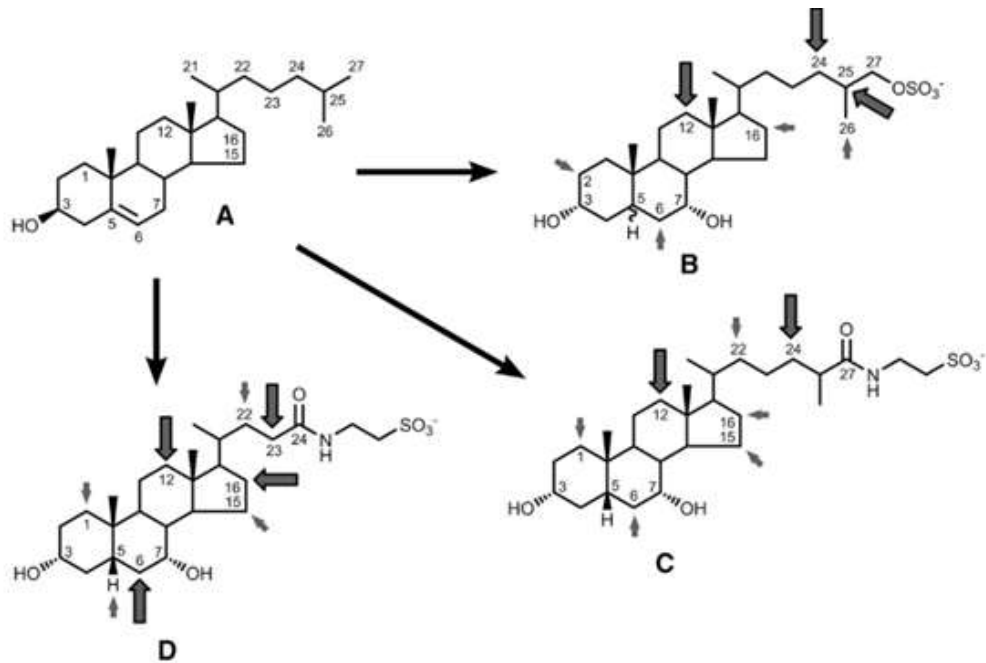


Figura 3. Representación de la estructura química del colesterol (A), junto con los tres tipos de moléculas que se pueden encontrar en las BS: BAL de 27C (B), BAC de 27C (C) y BAC de 24C (D). Estos se encuentran específicamente en su forma conjugada, en concreto con taurina y no con glicina. Las flechas grandes indican los sitios de hidroxilación que se pueden dar en la mayoría de las especies, mientras que las pequeñas indican los casos excepcionales. (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010).

Las BS están clasificadas en tres grupos, dependiendo de su grado de conjugación con aminoácidos y de hidroxilación. En el primer grupo, se encuentran los trihidroxilados que corresponden con el taurocolato y el glicolato. El segundo grupo corresponde con los conjugados dihidroxílicos como el glicodesoxicolato, el glicoquenodesoxicolato, el tauroquenodesoxicolato y el taurodesoxicolato. Por último, el tercer grupo estaría constituido por las formas no conjugadas como el colato, el desoxicolato y el quenodeoxicolato (Moghimpour, E. *et al.*, 2015).

Respecto a la composición de las BS de los organismos, estas pueden presentar variaciones significativas entre distintos órdenes de los animales, pero no entre familias, géneros o especies. No obstante, cabe destacar que los BAL de 27C predominan en peces y anfibios, los BAC de 27C en reptiles y aves, y que los BAC de 24C están presentes en todos los vertebrados. Por lo tanto, existe una relación entre la filogenia de las especies y los distintos tipos de BS que poseen (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010).

En general, los peces con más impacto a nivel industrial tienen mayoritariamente ácidos biliares de 24 carbonos, excepto las especies del orden cipriniformes que presentan BAL. Además, cabe señalar que estos alcoholes biliares son tóxicos para los mamíferos, por lo que mayoritariamente presentan ácidos biliares (Romano, N. *et al.*, 2020).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que, en los peces, existe poca afinidad en la conjugación de los ácidos biliares con la glicina, por lo que mayoritariamente presenta conjugaciones con la taurina, e incluso se han descubierto especies de peces que sólo presentan conjugaciones con la taurina. Adicionalmente, es necesario mencionar que la conjugación de los ácidos y alcoholes biliares presentan dos ventajas muy importantes, la primera consiste en que, al estar estas moléculas ionizadas son más impermeables a las membranas, permitiendo permanecer más tiempo en el intestino. La segunda ventaja consiste en que las sales biliares conjugadas (CBS) presentan un pKa más bajo que si no estuviera conjugada, esto permite que se mantengan en la forma no protonada, aumentando su solubilidad en agua y su eficacia en la formación de emulsiones (Romano, N. *et al.*, 2020).

En conclusión, los ácidos y alcoholes biliares son moléculas sorprendentemente diversas desde el punto de vista estructural, ya que hay una enorme posibilidad de combinaciones, debido a que pueden diferir en la estereoquímica de la fusión del anillo A y B y a la distribución del número, posición y estereoquímica de los grupos hidroxilo en el núcleo esteroide (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004). Además, la cadena lateral puede generar a su vez, más variantes debido a que pueden cambiar en su longitud, la presencia y orientación de los grupos hidroxilos, la presencia de insaturaciones, la estereoquímica del carbono 25C y los sitios de unión del grupo carboxilo (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010). Respecto a la estructura, algunos ejemplos de BAC se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Representación de distintos tipos de ácidos biliares junto con los grupos funcionales que presentan en algunos carbonos de la estructura. Información obtenida de Moghimipour, E. *et al.*, 2015.

Ácido biliar	R1 (C-3)	R2 (C-6)	R3 (C-7)	R4 (C-12)	R5 (C-24)
Glicocolato	OH (α)	H	OH (α)	OH (α)	NHCH ₂ COO ⁻
Taurocolato	OH (α)	H	OH (α)	OH (α)	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Glicolitocolato	OH (α)	H	H	H	NHCH ₂ COO ⁻
Glicohiocolato	OH (α)	OH (α)	OH (α)	H	NHCH ₂ COO ⁻
Tauroursodesoxicolato	OH (α)	H	OH (β)	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Taurohiodesoxicolato	OH (α)	OH (α)	H	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Glicohiodesoxicolato	OH (α)	OH (α)	H	H	NHCH ₂ COO ⁻
Glicoquenodesoxicolato	OH (α)	H	OH (α)	H	NHCH ₂ COO ⁻
Glico-7-oxo-litocolato	OH (α)	H	=O	OH (α)	NHCH ₂ COO ⁻
Taurodesoxicolato	OH (α)	H	H	OH (α)	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Tauroquenodesoxicolato	OH (α)	H	OH (α)	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻
Glicodesoxicolato	OH (α)	H	H	OH (α)	NHCH ₂ COO ⁻









Glicoclorodesoxicolato	OH (α)	H	OH (β)	H	NHCH ₂ COO ⁻
Taurolitololato	OH (α)	H	H	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃
Taurohiocolato	OH (α)	OH (α)	OH (α)	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃
Glico-3 α -6-ceto-5 β -colato	OH (α)	=O	H	OH (α)	NHCH ₂ COO ⁻
Tauro- α -hiocolato	OH (α)	OH (α)	OH (α)	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃
Tauro- β -hiocolato	OH (α)	OH (α)	OH (β)	H	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃

Sin embargo, a pesar de todos los tipos de BAC que se pueden formar, los principales BAC que se emplean de manera exógena son el ácido cólico, el ácido taurocólico, el ácido glicocólico, el ácido glicodesoxicólico, el ácido taurodesoxicólico, el ácido hiodesoxicólico y el ácido desoxicólico (Vinarov, Z. *et al.*, 2012; Sarkar, A. *et al.*, 2016).

Los animales presentan distintas composiciones y proporciones de los distintos tipos de BAC, como he comentado anteriormente. Es por ello, que en el estudio de Hofman, A. F. *et al.*, 2010 se ha analizado la composición de los ácidos biliares de 677 vertebrados (103 peces, 130 reptiles, 271 aves, 173 mamíferos). En cambio, no se tuvo en cuenta a los anfibios debido a su gran variedad filogenética. Por consiguiente, se puede observar la composición de las BS de cada especie de vertebrados en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de las BS de cada uno de los grupos de vertebrados representado por barras de colores. Las barras muestran la proporción de animales de cada grupo que se encuentran clasificados en uno de los seis perfiles de BS que existen y que se encuentran. Existen 6 perfiles en total y están representados por un color. Negro: solo BAL de 27C; azul: BAL de 27C y BAC de 27C; verde: BAL de 27C y BAC de 24C; amarillo: solo BAC de 27C; naranja: BAC de 27C y BAC de 24C; rojo: solo BAC de 24C (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010).

Especie	Composición	Especie	Composición
Mixinos		Salamandras	
Lampreas		Ranas	
Chimaera		Tortugas	
Elasmobranquios		Esfenodontes	
Poliptéridos		Serpientes	
Esturiones		Lagartos	
Amiiformes		Cocodrilos	

Atractosteus		Aves	
Teleósteos		Monotremas	
Celacantos		Marsupiales	
Dipnoi		Placentarios	

4.2. Origen y destino de los ácidos biliares en el organismo

A) Síntesis hepática

Los ácidos biliares se forman a partir del colesterol, que corresponde con una molécula integrada en las membranas celulares y que se puede obtener de dos maneras distintas, la primera sería a partir de la dieta del individuo y la segunda correspondería con la síntesis *de novo*. Tanto un exceso como un déficit de colesterol es perjudicial para el organismo, debido a esto, existe una excelente vía de control de su concentración, que se basa en su transformación a ácidos biliares (Kortner, T. M. *et al.*, 2014).

El proceso de síntesis de los ácidos y alcoholes biliares a partir del colesterol puede seguir dos rutas (figura 5): la clásica o la alternativa. En la ruta clásica participan un total 14 enzimas diferentes, siendo la enzima citocromo monooxigenasa colesterol 7 α -hidroxilasa (CYP7A1), la que limita la velocidad de transformación (Long, S. L. *et al.*, 2017). El proceso de la modificación estructural del colesterol, junto con las moléculas intermedias que se van generando de la ruta clásica, se puede observar en la figura 4. Cabe destacar que la ruta clásica presenta un bifurcación ya que pueden actuar dos enzimas, la CYP8B1 que ocasiona una 12 α -hidroxilación del anillo esteroide, generando CA o la enzima CYP27A1 que genera CDCA, ambos ácidos corresponden con los ácidos biliares primarios (Romano, N. *et al.*, 2020).

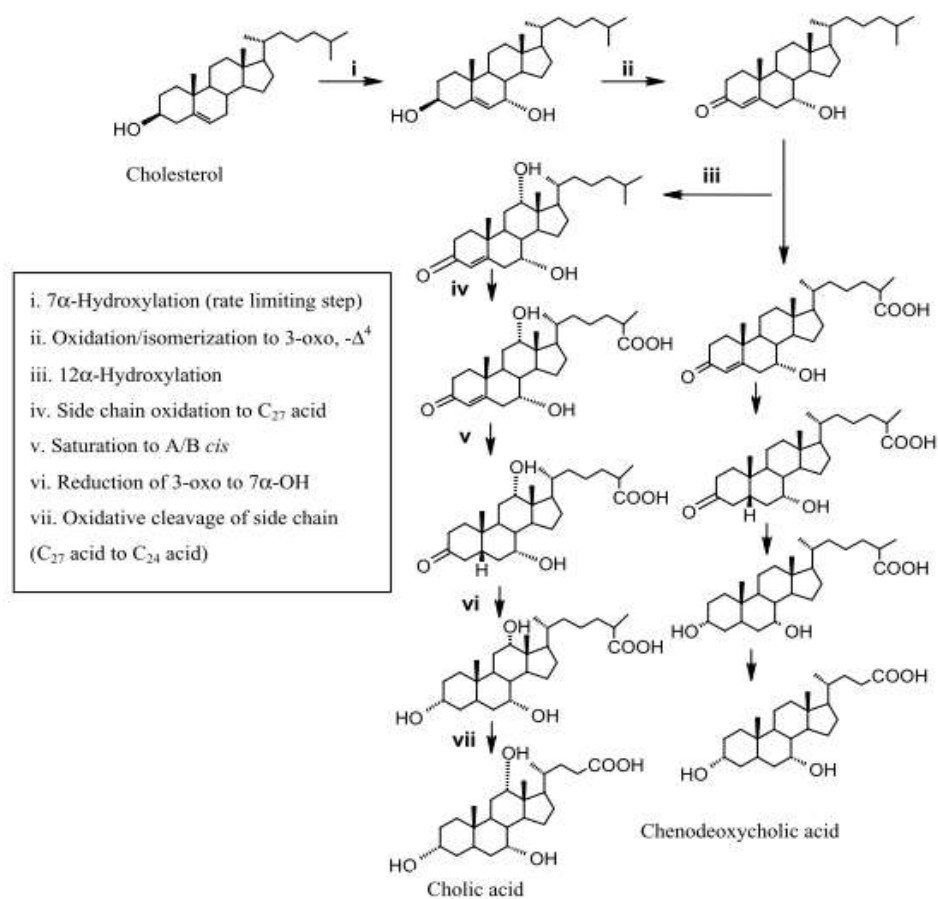


Figura 4. Proceso de formación del ácido cólico y ácido quenodesoxicólico a partir de la molécula de colesterol (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004).

Las distintas reacciones del proceso de transformación tienen lugar en distintos orgánulos de los hepatocitos comenzando en los retículos endoplasmáticos donde interviene la enzima CYP7A1, luego en las mitocondrias y, por último, en los peroxisomas. Sin embargo, en la ruta alternativa no interviene dicha enzima, sino que actúa la enzima colesterol 27 α -hidroxilasa (CYP27A1) que conlleva a la transformación del colesterol a la molécula del oxisterol, para que pueda servir como sustratos para las siguientes reacciones (Romano, N. *et al.*, 2020). Además, cabe destacar que es en las mitocondrias donde mediante la enzima CYP27A1 se produce la hidroxilación en el carbono 27 generando los alcoholes biliares 27C y la oxidación de un grupo carboxilo generando los ácidos biliares 27C. Mientras que en el caso de los ácidos biliares 24C tienen lugar en el peroxisoma mediante una reacción de β -oxidación (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010). Adicionalmente, existe una diferencia entre la ruta clásica y la ruta alternativa y es que la primera ocurre todo el proceso en los hepatocitos del hígado, mientras que la segunda ruta puede ocurrir en los hepatocitos del hígado, en los macrófagos y en el cerebro (figura 5) (Long, S. L. *et al.*, 2017).

Asimismo, como en todo proceso bioquímico, existe un modo de regulación y, en este caso, las concentraciones de ácidos biliares están controladas por niveles hepáticos gracias a una

retroalimentación positiva-negativa. Este control está mediado por dos receptores, el primero se denomina receptor del hígado X (LXR) que se encuentra en el hígado y el segundo corresponde con el receptor farnesoide nuclear X (FXR) localizado en el intestino e hígado. Este control permite mantener la homeostasis lipídica, ya que pueden activar o inhibir la síntesis de sales biliares, manteniendo, a su vez, un control del colesterol (Chiang, J. Y. L. 2009).

LXR actúa potenciando el proceso de degradación del colesterol al unirse con la molécula de oxisterol, formando un dímero y activando, por tanto, la transcripción de la enzima CYP7A1. Cabe destacar que en los mamíferos existe el factor nuclear hepatocitario 4 α (HNF4 α) que se encarga de activar los genes LXR, aumentando en consecuencia la expresión de los genes de la enzima CYP7A1. (Romano, N. *et al.*, 2020).

Por otro lado, FXR corresponde con un regulador negativo, ya que, activa un mecanismo en cascada que inhibe la enzima CYP7A1. Al indagar en el mecanismo, se observó que cuando FXR se une con los ácidos biliares reabsorbidos, se transcribe un pequeño heterodímero en el hígado, un receptor nuclear llamado SHP. En cambio, este no posee ningún dominio de unión con el ADN, ya que tiene como función ser es un represor transcripcional común de los receptores nucleares. Por tanto, SHP interacciona con los factores de transcripción como LRH-1 y HNF4 α , inhibiendo sus funciones, impidiendo finalmente que se pueda transcribir la enzima CYP7A1. Además, existe otra ruta de inhibición de la síntesis de ácidos biliares, en la que FXR induce la síntesis de la molécula de FGF19 en el intestino, para que esta active al receptor 4 FGF (FGFR4) en el hígado y finalmente, este receptor active la señalización de inhibición de la enzima CYP7A1 (Chiang, J. Y. L. 2009).

En el último paso antes de la secreción de los BAC y BAL al intestino, estos deben ser conjugados con glicina o taurina, permitiendo aumentar su solubilidad. Este proceso es llevado a cabo mediante la actividad de la colil-CoA sintetasa de ácido biliar (CCA) y la amidación en el carbono 24 a glicina o taurina por la enzima ácido biliar-CoA:aminoácido N-aciltransferasa (BAT). Estos procesos finalizan en la síntesis de las CBS que serán liberadas al intestino (figura 5) (Long, S. L. *et al.*, 2017).

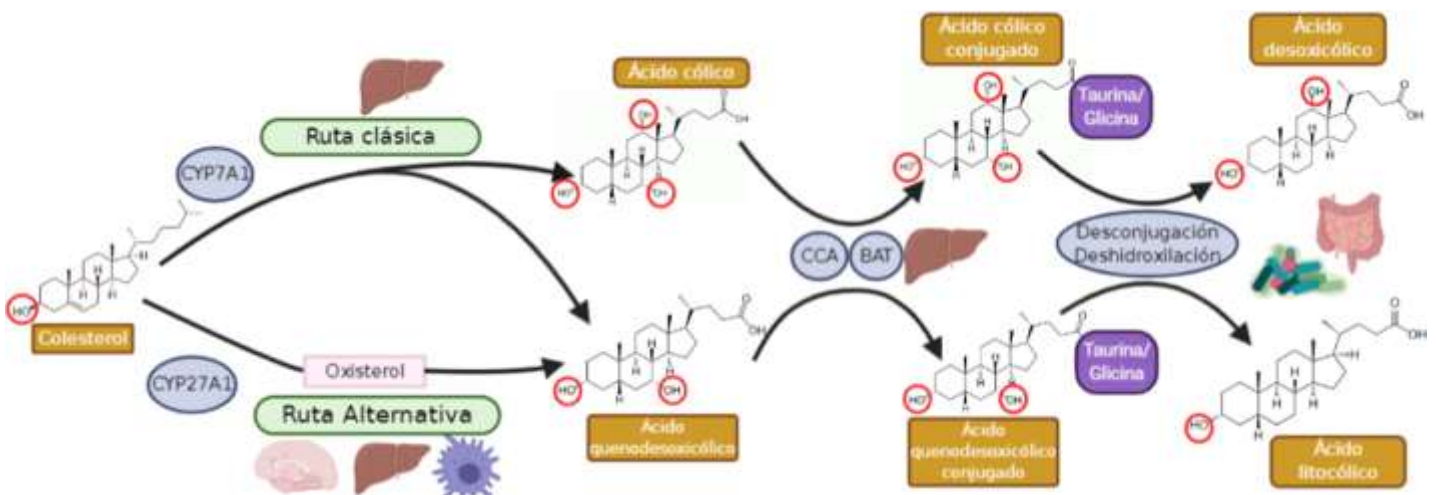


Figura 5. Representación en un esquema del proceso completo de síntesis de los ácidos biliares (elaboración propia).

B) Secreción intestinal

Una vez que se forman los ácidos biliares y alcoholes biliares en hepatocitos, estos son transportados a través de los canalículos biliares a la vesícula biliar de manera activa mediante una bomba exportadora de sales biliares (BSEP/ABCB11), un miembro de la superfamilia de casetes de unión ATP (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014). Entonces, es en la vesícula donde los iones de potasio o de sodio se unen a estas moléculas y, por tanto, se transforman en las BS. Por lo tanto, permite que durante la digestión esta pueda ser liberada en la parte proximal del intestino delgado, justo después del estómago. Los organismos que poseen vesícula biliar presentan además el conducto cístico que conecta dicho órgano con el conducto colédoco. Por consiguiente, la liberación de las sales biliares es llevada a cabo a través de los conductos císticos y los conductos hepáticos comunes, conductos que provienen directamente del hígado, conectándose finalmente en el conducto colédoco que desemboca en el intestino a través del esfínter de Oddi (Bruslé, J., & Anadon, G. G., 1996).

A pesar de que la bilis esté almacenada en la vesícula biliar y lista para que se lleve a cabo su excreción, es necesario que sea detectado en el intestino la presencia de ácidos grasos (FA), ya que su presencia activa en la mucosa intestinal un mecanismo de secreción de una hormona peptídica denominada colecistoquinina o pancreozima. Esta hormona presenta muchas funciones relacionadas con la digestión como la inhibición de la tasa de vaciado gástrico y la secreción gástrica, o la estimulación de las contracciones del intestino y la secreción de lipasa pancreática (Le, H. T. M. D. *et al.*, 2019). En cambio, el papel más relevante que tiene la colecistoquinina corresponde con la estimulación de la contracción de las células del músculo liso de la vesícula biliar, permitiendo así, la relajación del esfínter de Oddi y, por tanto, la liberación de las BS al intestino proximal (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014).

C) Transporte

Las sales biliares presentan una propiedad muy importante para el metabolismo de los lípidos, ya que mediante la solubilización son capaces de transportar los lípidos y otros compuestos químicos como las vitaminas liposolubles o, incluso, medicamentos a través de barreras hidrofóbicas tales como la barrera hematoencefálica, la piel, las mucosas, la córnea y las membranas bucales, nasales, pulmonares e intestinales. El mecanismo que permite dicho transporte a través de las membranas hidrofóbicas se basa en que las BS son capaces de aumentar la solubilidad de los compuestos, de la fluidez de las membranas y de la estabilidad enzimáticas de los compuestos. Por tanto, el aumento de la solubilidad permite, a su vez, acelerar la absorción de todos estos compuestos (Moghimpour, E. *et al.*, 2015).

Por consiguiente, las BS mejoran la absorción de los nutrientes facilitando su transporte gracias a sus propiedades fisicoquímicas de formar micelas. Además, las BS son capaces de extraer proteínas o lípidos de la membrana, fluidizar la membrana, generar micelas inversas en la membrana e incluso, crear canales acuosos. Entonces, una vez que las BS llegan al intestino pueden sufrir una

transformación en sales biliares secundarias por la microbiota intestinal. Entonces, sobre un 95% de dichas sales son reabsorbidas y transportadas hasta el hígado que desencadena una respuesta de inhibición del proceso de síntesis de BAC y BAL (Moghimpour, E. *et al.*, 2015).

D) Metabolismo por microbiota intestinal

Una vez que las sales biliares primarias llegan al intestino, estas pueden ser convertidas en ácidos biliares secundarios, mediante la modificación de los grupos hidroxilos, gracias a la intervención de las bacterias anaeróbicas provenientes de la microbiota intestinal del propio organismo. Esto conlleva a que la diversidad estructural de los BAC aumente aún más. Además, los cambios estructurales que generan las bacterias sobre dichas sales ocasionan que estos sean más hidrofóbicos, y por tanto, aumente su eficiencia en la formación de emulsiones y en el transporte de lípidos (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010).

Los ácidos biliares primarios están constituidos, por ejemplo, por los CA y los CDCA conjugados con los grupos glicina y taurina. Sin embargo, en el intestino estos son desconjugados y deshidroxilados pasando a ser ácidos biliares secundarios (figura 5). Este proceso se lleva a cabo gracias a la actividad de la microbiota intestinal que son capaces de producir grandes cantidades de hidrolasas de sales biliares (BSH), permitiendo así, la desconjugación de los grupos de taurina o glicina de la estructura de las sales biliares y luego, la deshidroxilación por la enzima 7 α -deshidroxilasa. Según estudios de la metagenómica han demostrado que las enzimas BSH se encuentran en la mayoría de los filum bacteriano, en cambio los géneros que destacan son *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Bacteroides* (Romano, N. *et al.*, 2020).

El proceso de deshidroxilación es llevado principalmente a cabo por la enzima 7- α deshidroxilasa que elimina el grupo hidroxilo del carbono 7. Esto conlleva a la formación del ácido litocólico (LCA), proveniente del CDCA desconjugado, y del ácido desoxicólico, proveniente del CA desconjugado (figura 5) (Chiang, J. Y. L. 2009).

Además de la deshidroxilación de los ácidos biliares primarios, estos pueden sufrir reacciones de deshidrogenación (oxidación) de los grupos hidroxilos que posee la estructura, con el fin de poder formar ácidos hidroxi-oxo biliares o incluso, reacciones de isomerización llevadas a cabo por las hidroxiesteroideas deshidrogenasas estereoespecíficas bacterianas (figura 5) (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010). Por tanto, son la microbiota propia del organismo quienes intervienen en este proceso de biotransformación, destacando las siguientes familias: Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (Romano, N. *et al.*, 2020). Existen incluso bacterias que son capaces de realizar reacciones de desaturación de la cadena lateral de los ácidos biliares de 24 carbonos, siendo capaces de generar ácidos biliares de dobles enlaces entre los carbonos 22 o 23 (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010).

En el caso de los alcoholes biliares sulfatados, las bacterias poseen enzimas hidrolíticas como las sulfatasas bacterianas que rompen los enlaces de éster eliminando el grupo sulfuro y, por tanto,

generando BAL secundarios. Sin embargo, hasta la fecha este proceso es desconocido. Adicionalmente, cabe destacar que el 5 α -ciprinol, que es el alcohol biliar principal de los peces cipriniformes, presenta un porcentaje muy bajo de reabsorción. Esto es debido a que posee un gran número de grupos hidroxilos y a que es muy poco soluble por no ser transformado a un alcohol biliar secundario. Además, actualmente tampoco se sabe si los alcoholes biliares de 27 carbonos se someten a reacciones de 7- α deshidroxilación (Hofmann, A. F. *et al.*, 2010).

E) Reabsorción

Una vez que se produce la digestión de los alimentos, las sales biliares ya han cumplido con su función, sin embargo, son demasiado valiosas para ser desperdiciadas y eliminadas en forma de heces. Por lo tanto, existe un sistema de recirculación de dichas sales hacia el hígado para una reutilización, aunque siempre hay un pequeño porcentaje (alrededor del 5%) que no son reabsorbidas. Dicha recuperación se lleva a cabo mediante la denominada circulación enterohepática (figura 6) (Romano, N. *et al.*, 2020).

Las sales biliares que se encuentran en el lumen del intestino tienen que ser recuperadas y para ello, estas deben atravesar las membranas apicales de las células epiteliales que corresponden con los enterocitos distales. Este mecanismo se logra a través de transportadores activos dependientes de sodio (ASBT), permitiendo así, recuperar hasta el 95% de las sales biliares. Luego, los BAC se unen a la proteína citoplasmática de unión al ácido biliar ileal (I-BABP) y se transportan desde la cara apical a la membrana baso-lateral de los enterocitos, saliendo de estas células gracias a transportadores de solutos orgánicos α/β (OST α/β) (Martinot, E. *et al.*, 2017).

A continuación, todos los ácidos biliares primarios y secundarios que han sido reabsorbido del intestino llegan al órgano del hígado a través del torrente sanguíneo, exactamente por la vena porta. Una vez en el hígado, los BAC entran en los hepatocitos por el transportador del polipéptido de co-transporte de taurocolato de NA⁺ (NTCP) o por sistemas independientes de sodio como péptidos orgánicos transportadores de aniones (OATPS), logrando finalmente llegar al punto de partida de su síntesis (Romano, N. *et al.*, 2020).

Después de la reabsorción, en los hepatocitos es necesario procesos de reconjugación de los BAC. Una vez completado este proceso, estos son transportados al polo canalicular de los hepatocitos para ser secretados a través de la bomba de exportación de sales biliares (BSEP) que, además, es el transportador de sal biliar hepatocanalicular responsable de la concentración de BS en la bilis. Por consiguiente, estas BS reabsorbidas son mezclados con los ácidos biliares neo-sintetizados, logrando su ciclo enterohepático (Pellicoro, A. & Faber, K. N., 2007).

Los transportadores ASBT también se encuentran en el túbulo proximal de los riñones, ya que se tiene que mantener la circulación renal-hepática de las sales biliares, con el fin de facilitar la reabsorción y que no se excreten las sales biliares a través de la orina (Lionarons, D. A. *et al.*, 2012)

Además, cabe destacar que el proceso de reabsorción de las sales biliares conlleva a la inhibición de la síntesis de nuevos BS, ya que se reprime la acción de la enzima CYP7A1, mediante mecanismos de retroalimentación negativa mediada por acción de la proteína FXR. Asimismo, los LCA que se han generado en el intestino por las bacterias suelen ser excretados en las heces, aunque hay un pequeño porcentaje que sí se reabsorbe. A continuación, al llegar al hígado este se conjuga con un ión sulfuro en la posición 3-hidroxi gracias a la enzima sulfotransferasa (SULT2A1), por lo que, al ser secretado de nuevo en la bilis, permite la desintoxicación de un exceso de azufre (Chiang, J. Y. L. 2009).

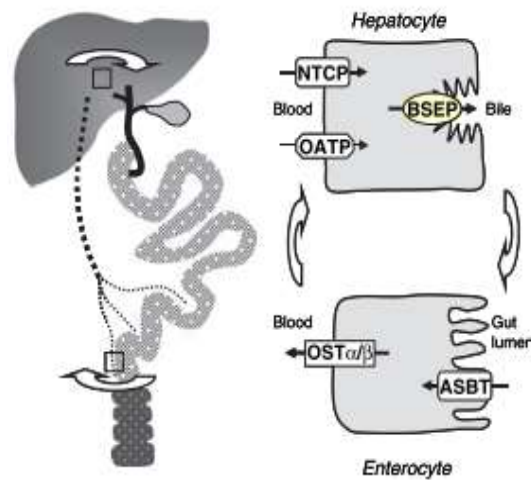


Figura 6. Circulación enterohepática de las sales biliares junto con los transportadores de membrana que intervienen. Figura obtenida de Pellicoro, A. & Faber, K. N., 2007.

4.3. Funciones de las sales biliares

A) Digestión de lípidos emulsionados.

A.1) Lípidos

Los lípidos son moléculas biológicas muy heterogénea. Además, presentan una gran cantidad de funciones imprescindibles para que la vida se pueda llevar a cabo, como, por ejemplo: constituyen la principal fuente de energía para los organismos, aportan ácidos grasos esenciales que permiten la formación de eicosanoides y otros derivados bioactivos, constituyen vehículos de vitaminas liposolubles, funcionan como aislante térmico o forman membranas celulares, que constituyen barreras permeables en forma de bicapa (Valenzuela, A *et al.*, 2002). Asimismo, los lípidos son moléculas orgánicas solubles en compuestos apolares como el cloroformo o el tolueno, pero son insolubles en agua debido a la polaridad que esta presenta. Además, las grasas en medios polares se pueden organizar espontáneamente en distintas estructuras, como emulsiones de aceite en agua, bicapas, vesículas o micelas (Delorme, V. *et al.*, 2011).

Los lípidos pueden ser agrupados según el sistema de clasificación basado en sus propiedades bioquímicas, tal y como establece el “International Lipid Classification and Nomenclature Committee” (ILCNC) (Fahy, E. *et al.*, 2009). Los grupos en los que se clasifican los lípidos se encuentran en la tabla 3, donde, además, se puede apreciar el número de estructuras de lípidos que se encuentran almacenados en las bases de datos hasta el año 2009.

Tabla 3. Clasificación de los lípidos junto con sus abreviaturas y número de estructuras registradas en las bases de datos. Tabla obtenida del comité internacional de la clasificación y nomenclatura de lípidos (Fahy, E. *et al.*, 2009).

Categorías	Abreviación	Estructuras en las bases de datos
Acilos grasos	FA	2678
Glicerolípidos	GL	3009
Glicerofosfolípidos	GP	1970
Esfingolípidos	SP	620
Lípidos esteroides	ST	1744
Lípidos prenoides	PR	610
Sacarolípidos	SL	11
Policétidos	PK	132

Asimismo, los lípidos pueden ser clasificados como saponificables o insaponificables. Son de nuestro interés los primeros, ya que son los que poseen al menos un ácido graso en su estructura y, por tanto, son capaces de formar jabones, mientras que los insaponificables no poseen ninguno. Dentro de los saponificables se pueden clasificar, a su vez, en lípidos simples (neutros) o complejos (polares). Algunos ejemplos de los lípidos saponificables se pueden observar en la figura 7.A. Los lípidos simples se caracterizan por no poseer carga, ya que están constituidos por FA unidos a un glicerol (glicéridos) o a un alcohol de cadena más larga llamados céridos. Sin embargo, los lípidos complejos sí que poseen cargas y es debido a que los FA están unidos a un glicerol más alguna molécula como un grupo fosfato (fosfoglicéridos) o FA unidos a una esfingosina más alguna estructura molecular. La clasificación de los esfingolípidos está representada en la figura 7.B., donde se puede apreciar las distintas estructuras moleculares que se le pueden unir a la esfingosina.

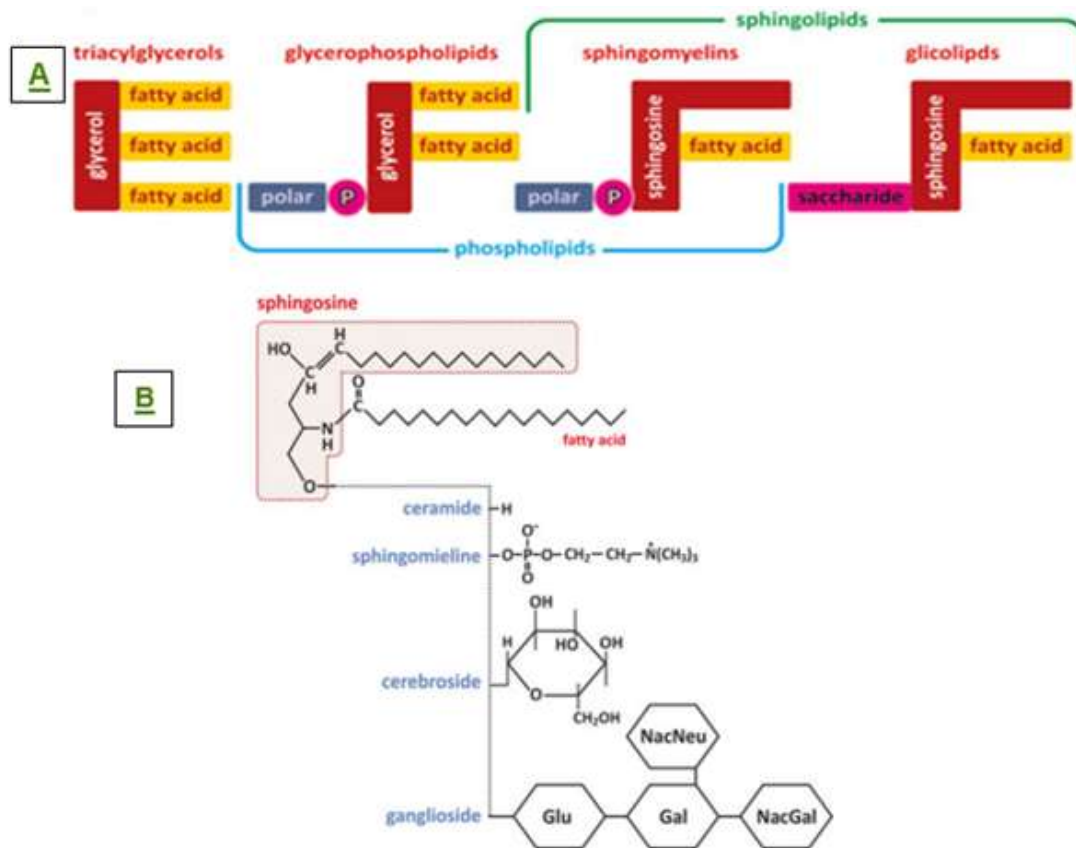


Figura 7. Arriba (A), representación esquemática de la composición de lípidos saponificables. Abajo (B), estructuras de los distintos tipos de esfingolípidos (da Poian, A. T. & Castanho, M. A. R. B., 2015).

Los FA son considerados la base de todos los ácidos saponificables. Están constituidos por largas cadenas alifáticas formadas por átomos de carbono e hidrógeno presentando en un extremo un grupo carboxilo (polar) y un extremo con un grupo metilo (apolar) (figura 8) siendo, por tanto, moléculas anfipáticas. Asimismo, estas moléculas pueden ser saturadas, es decir, todos los enlaces entre carbonos son simples, o pueden ser ácidos grasos insaturados, por lo que presentan uno o más doble enlaces. Por consiguiente, los FA se diferencian entre ellos, en el número de carbonos y en el número y posición de los doble enlaces. La importancia biológica de los FA es que son moléculas imprescindibles en el metabolismo energético de los organismos. Sin embargo, estas han de encontrarse de manera libre, es decir, no pueden estar unidas a ninguna otra estructura molecular (da Poian, A. T. & Castanho, M. A. R. B., 2015).

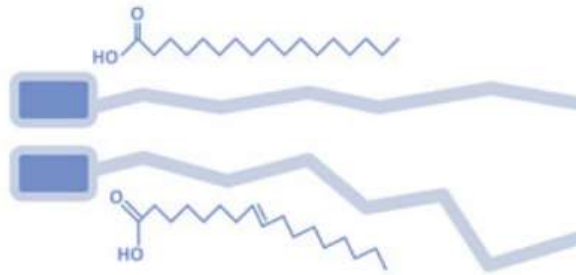


Figura 8. Representación de la estructura de dos FA. El de arriba es saturado, mientras que el de abajo es insaturado, presentando un solo doble enlace (da Poian, A. T. & Castanho, M. A. R. B., 2015).

Asimismo, los lípidos que están en la categoría de los glicéridos son los más relevantes en este documento, ya que constituyen las grasas y aceites que formarán las emulsiones, debido a que presentan estructuras de FA. Además, los glicéridos se pueden subdividir en triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos, todo depende del número de estructuras de FA que poseen, por lo tanto, se les asigna con tres FA, dos FA y un solo FA, respectivamente. Además, se les pueden clasificar en aceites, líquidos a temperatura ambiente, o en grasas, sólidos a temperatura ambiente, todo depende de la presencia de dobles enlaces y de la longitud de la cadena.

Por lo tanto, los triglicéridos se forman a partir de la esterificación del polialcohol glicerol con tres FA, tal y como se observa en la figura 9. Estas moléculas se caracterizan por ser los que mayor energía aportan, ya que presentan tres estructuras de FA. La reacción de esterificación consiste en la unión de un ácido graso a un alcohol del glicerol mediante un enlace covalente, llamado enlace éster, liberándose así, una molécula de agua. Por lo tanto, los FA están unidos al glicerol por tres enlaces ésteres denominados sn-1, sn-2 y sn-3. Asimismo, cada uno de estos FA pueden ser iguales o diferentes, tanto en el tamaño de la cadena, el grado de insaturaciones o la isomería (Valenzuela, A. *et al.*, 2002).

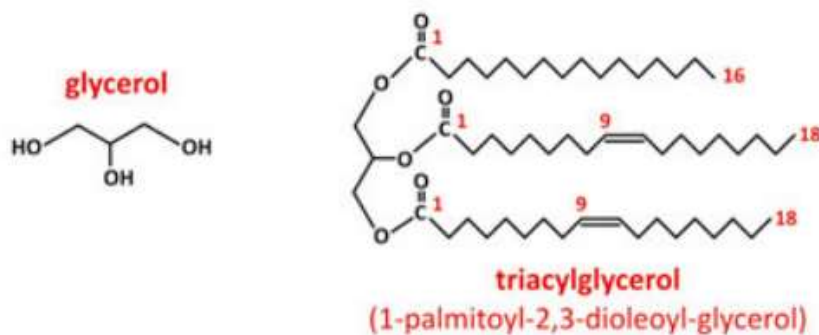


Figura 9. Representación de una molécula de un glicerol y de un triacilglicérido, específicamente el 1-palmitoil-2,3-dioleil-glicerol (da Poian, A. T. & Castanho, M. A. R. B., 2015).

A.2) Lipasas digestivas

La digestión de los lípidos comienza desde que el alimento entra en la boca, aunque las zonas donde tiene más relevancia son en la cavidad gástrica e intestinal, ya que, este proceso es llevado a cabo por las lipasas gástricas y las lipasas pancreáticas, respectivamente (Vinarov, Z. *et al.*, 2012). Sin embargo, las segundas son el tipo de lipasa de interés en este trabajo debido a que esta interacciona con emulsiones generadas gracias a la acción de las sales biliares. Este tipo de lipasas se caracterizan por ser producidas en el páncreas, en cambio, cabe destacar que los mamíferos presentan un páncreas compacto, mientras que los peces, su páncreas está organizado de manera difusa (Gjellesvik, D. R. *et al.*, 1992).

Los lípidos son degradados por lipasas que constituyen enzimas con función lipolítica, es decir, se encargan de hidrolizar los enlaces ésteres de los glicéridos, por lo que se le denomina como acil-éster-hidrolasas (Valenzuela, A. *et al.*, 2002). Las lipasas se caracterizan por ser enzimas solubles en agua, en cambio, las grasas que son las moléculas objetivos de estas enzimas, son hidrofóbicas, es decir, insolubles al agua. Por lo tanto, esto significa que la única forma por la cual las lipasas pueden actuar es que estas se sitúen en la interfase de lípido-agua (Chahinian, H. *et al.*, 2002). Esta interfase se define como una superficie imaginaria que separa la fase acuosa de la fase lipídica.

Además, la degradación de los lípidos puede llevarse a cabo por las lipasas o por las estererasas. Sin embargo, la acción de las estererasas no depende de la interfase, por lo que no es de nuestro interés en este estudio. Asimismo, las lipasas son una clase de α/β hidrolasas y, por tanto, se encargan de romper los enlaces éster de los FA presentes en los triacilglicéridos, exactamente en las posiciones sn-1 y sn-3, conllevando, por tanto, a la liberación de un sn-2 monoglicéridos y de ácidos grasos libre provenientes de los enlaces ésteres que estaban en las posiciones sn-1 y sn-3 (Valenzuela, A. *et al.*, 2002; Vinarov, Z. *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista de la actividad catalítica de las lipasas, estas presentan una dependencia en gran parte del estado agregado de los sustratos y de la estructura de la enzima. Se ha demostrado que estas enzimas bajo determinadas condiciones son capaces de catalizar numerosas reacciones químicas, entre las que destacan, la hidrólisis, la esterificación, la interestificación, la acidólisis, la alcoholisis y la aminólisis (Vakhlu, J. & Kour, A., 2006). Asimismo, las lipasas pueden considerarse selectivas por la clase de lípido y por la posición y el tipo de ácido graso, e incluso se consideran estereoselectivas, alcanzando a distinguir entre enantiómeros (González-bacero, J. *et al.*, 2020). En conclusión, las lipasas pueden ser consideradas como enzimas muy específicas, por lo que, para cada tipo de sustrato, debe existir una clase especial de enzima.

Estudios sobre la cinética enzimática de las lipasas han concluido que su actividad catalítica es dependiente de la concentración de sustrato, lo quiere decir que la actividad hidrolítica es muy baja cuando la concentración de lípidos es pequeña y que va aumentando a medida que incrementa la concentración. Sin embargo, existe una concentración que cambia por completo la actividad catalítica de la lipasa, ya que, aunque sigue siendo dependiente, al exceder este límite de solubilidad, aumenta la degradación hidrolítica de manera casi exponencial. Esta concentración de sustrato corresponde con

la concentración micelar crítica (CMC) que es la concentración específica a la cual comienza a formarse las estructuras esféricas llamadas micelas. Finalmente, como ocurre siempre en las enzimas existe una concentración máxima de sustrato a la cual, las enzimas se encuentran saturadas, manteniéndose, por tanto, la actividad catalítica de manera constante (figura 10) (Chahinian, H. *et al.*, 2002).

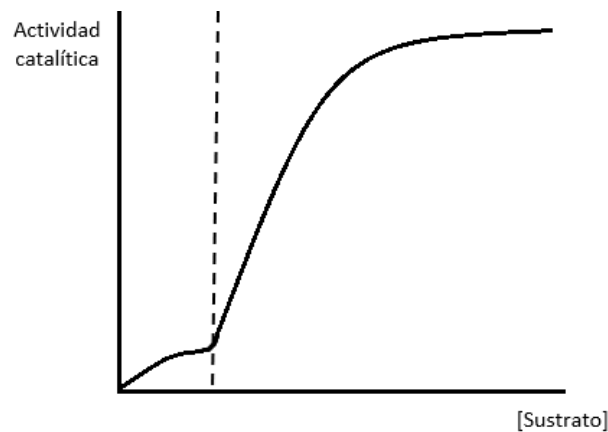


Figura 10. Representación de la actividad catalítica de la lipasa frente a la concentración de sustrato. La línea discontinua corresponde con la concentración crítica micelar (elaboración propia).

A.3) Emulgentes

Un agente emulgente o también llamados agentes tensioactivos, se puede definir como una sustancia química que es capaz de estabilizar una emulsión y prevenir la coalescencia de los glóbulos de la fase dispersa. Con otras palabras, se podría describir a los agentes emulgentes como sustancias que permiten que dos líquidos se mezclen, cuando naturalmente no es posible. Por tanto, una emulsión corresponde con una mezcla de dos productos, en este caso agua y aceite, que normalmente no se pueden mezclar, ya que, son sustancias inmiscibles. Por consiguiente, al añadir un agente emulgente a la mezcla, va a conllevar que el aceite se descomponga en pequeñas gotas que si son capaces de dispersarse y mezclarse en el agua. Asimismo, se pueden encontrar muchos tipos de agentes tensioactivos según sean las sustancias a mezclar, sin embargo, nos vamos a centrar solamente en aquellos que actúan en medios de agua/lípidos. Algunos agentes emulsionantes de uso común pueden ser el sodio dioctil sulfosuccinato, el laurilsulfato de sodio, el tragacanto y otros polímeros conocidos como Spans y Tweens. Además, los agentes tensioactivos se pueden clasificar en dos grupos, los naturales y los sintéticos. El primer grupo, se corresponde con los producidos naturalmente por los animales como son los fosfolípidos. Mientras que el segundo grupo son agentes emulsionantes modificados estructuralmente en laboratorios y se incluyen a la lisolecitina o la lisofosfatidilcolina (Siyal, F. A. *et al.*, 2017).

Por todo lo anteriormente comentado, las sales biliares se pueden considerar como un agente emulgente, ya que, presenta un fuerte impacto en la fisicoquímica de la interfase, disminuyendo la tensión interfacial del sistema y, asimismo, potenciar la formación de emulsiones de grasas o micelas mixtas en medios como el agua (figura 11). Esto es así, debido a que son capaces de estabilizar estas estructuras y, por tanto, permite potenciar la eficiencia del proceso de degradación de lípidos (Delorme, V. *et al.*, 2011).

Las emulsiones de grasas se caracterizan por presentar una estructura esférica compuesta por lípidos saponificables, como lecitinas o triglicéridos, y agentes emulgentes que potencien su formación, como las sales biliares. En cambio, puede haber otros componentes como moléculas de colesterol. Dicha estructura se organiza de la siguiente manera, la parte polar se posiciona hacia el exterior, mientras que la parte apolar hacia el interior, evitando así, las repulsiones de cargas (figura 11) (Almgren, M. 2000). La ventaja principal de que estas estructuras se generen es que permiten la degradación de los lípidos de una manera óptima, eficiente y rápida.

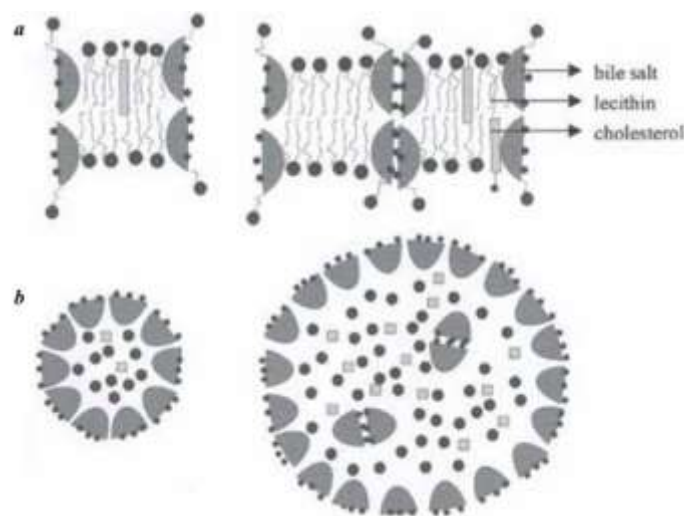


Figura 11. Representación estructural de emulsiones desde un punto de vista longitudinal (a) y transversal (b). (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004).

Por otro lado, se ha comprobado que los agentes emulgentes compiten por el área disponible y la naturaleza de la estructura interfacial de la emulsión, debido a su función de estabilizar las superficies, sin embargo, esto puede entorpecer la acción de las lipasas si el número de agentes emulgentes es demasiado alto (Torcello-Gómez, A. *et al.*, 2011). Además, cabe destacar que las emulsiones pueden estar cubiertas por una sola capa o por una fase multilaminar de lípidos, fosfolípidos, ácidos grasos polares y un pequeño porcentaje de colesterol y triglicéridos (Lowet, M. E. 2002). Por lo tanto, la composición de la interfase, junto con el tamaño de las emulsiones son factores clave en el proceso de la degradación de los lípidos.

A.4) Interacción entre sales biliares y emulgentes

Las sales biliares, en relación con la degradación de los lípidos (lipólisis), pueden presentar dos papeles fundamentales. El primero consiste en que dichas sales retiran los compuestos generados como los ácidos grasos libres o los sn-2 monoglicéridos mediante el proceso de lipólisis gracias a la acción de las lipasas, mientras que el segundo papel sería como agente emulgentes generando emulsiones, es decir, permite disminuir la tensión superficial de las grasas, conllevando a la formación de estructuras esféricas de lípidos, por lo tanto, transforma los lípidos dispersos que se encuentran el medio acuoso, en diminutas gotas para facilitar su degradación. El hecho de generar emulsiones permite aumentar los sitios de unión de las enzimas de lipasas (Romano, N. et a. 2020).

En conclusión, los ácidos biliares se consideran biosurfactantes aniónicos naturales presentes en el tracto intestinal con funciones relacionadas, tanto en la adsorción como digestión de lípidos, sin afectar a las enzimas degradativas (Delorme, V. *et al.*, 2011). Asimismo, se ha comprobado que si están adsorbidas dichas sales mejoran considerablemente la digestión lipídica, pudiendo mejorar la retirada de los productos liberados tras la lipólisis, ya que, estas nuevas moléculas liberadas por las lipasas pueden dificultar proceso de digestión (Sarkar, A. *et al.*, 2016). Por lo tanto, se pueden considerar a los ácidos biliares como agentes potenciadores de la digestión de los lípidos.

El tamaño de las emulsiones junto con las propiedades interfaciales de estas estructuras, como composición de la capa superior de las gotas de lípidos, son los principales factores que afecta considerablemente a la tasa y al alcance de la degradación de lípidos facilitando o interfiriendo en la acción de las lipasas (Torcello-Gómez, A. *et al.*, 2011). Es por ello, que para que este proceso se pueda llevar a cabo de manera correcta y efectiva, debe haber una relación correcta en concentraciones de lipasas, sales biliares y grasas, ya que se puede potenciar o ralentizar la liberación de los FA y, por tanto, la digestión de los lípidos (Naso, J. N. *et al.*, 2019).

A partir de numerosos estudios, se ha comprobado que una concentración óptima de las sales biliares es fundamental, ya que, teniendo en cuenta las funciones de las sales biliares, estas pueden ayudar o inhibir el proceso de la degradación de lípidos. Esto es debido a que una concentración alta conlleva a la formación de numerosas emulsiones, dificultando que las enzimas puedan acceder a todas ellas y además, restringe la adsorción de la lipasa pancreática en la interfaces de la emulsión, impidiendo por tanto, la degradación de las grasas. No obstante, una concentración baja en sales biliares va a dificultar la degradación de los lípidos, ya que no se van a formar emulsiones y, por tanto, no se van a poder adherir las enzimas degradativas. Asimismo, una concentración insuficiente de sales biliares no va a permitir una retirada eficiente de los productos liberados por las lipasas, como los FA. Mientras que una relación óptima entre las sales biliares y las grasas va a permitir que el proceso de degradación de lípidos se desarrolle de manera óptima y efectiva (Golding, M. & Wooster, T. J., 2010; Vinarov, Z. *et al.*, 2012). Estas tres situaciones con respecto a la concentración de sales biliares se pueden observar en la figura 12.

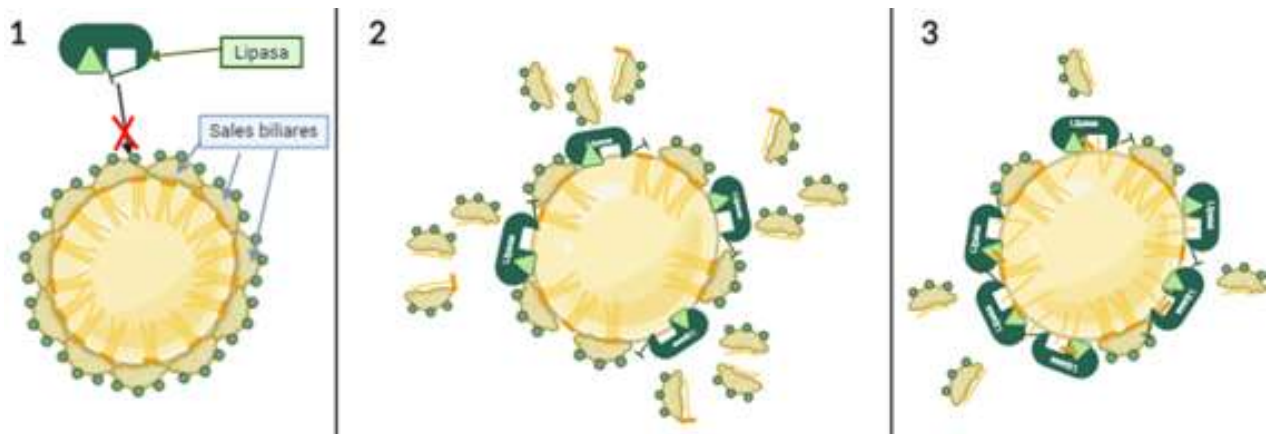


Figura 12. Corresponde con una ilustración que compara tres situaciones con distintas concentraciones de sales biliares. La primera se asocia cuando la concentración de sales biliares es muy alta, la segunda corresponde con una concentración óptima y la tercera se relaciona con concentraciones de sales biliares demasiado bajas (elaboración propia).

A.5) Proceso de degradación a partir de emulsiones

El proceso de degradación de los lípidos en forma de emulsiones se puede dividir en cuatro pasos clave y que, además, se puede observar en el esquema de la figura 13:

1. El primero consiste en la preparación de la enzima, y para ello, se debe unir la co-lipasa a la lipasa, entre dominios específicos. La co-lipasa se puede considerar como un cofactor proteico necesario para la actividad óptima de la lipasa. Partiendo de estos hechos, una vez dada la unión, la enzima se encuentra lista para unirse a los lípidos. Las lipasas digestivas de los peces no son dependientes de co-lipasas para realizar su función (a excepción de trucha donde se ha descrito una co-lipasa) aunque si requieren sales biliares para facilitar la hidrólisis en la interfase lípido-agua (Kurtovic, I. *et al.*, 2009).
2. El segundo paso se basa en desenmascarar el sitio activo de la enzima, ya que, en medios acuosos este se encuentra normalmente protegido por una cadena polipeptídica, llamada tapadera o "lid", por lo que se encuentra en conformación inactiva. Todas las lipasas presentan en su centro activo un aminoácido de serina que tras la enzima situarse en la interfase de lípidos/agua se produce un cambio conformacional de la estructura de la enzima, conllevando a la liberación y activación del sitio activo (conformación activa). Esto permite que un grupo de residuos hidrofóbicos se sitúe alrededor de la serina catalítica constituyendo una región electrofílica, llamada cavidad oxianiónica. Además, aparece una zona apolar alrededor de la entrada del centro activo que se denomina zona de contacto lipídico, que será el lugar de unión de la enzima y el sustrato (González-Bacerio, J. *et al.*, 2020).

- El siguiente paso clave consiste en la hidrólisis de los lípidos que se encuentran en la superficie de la emulsión gracias a la acción de las lipasas, liberándose por cada triglicérido un sn-2 monoglicérido y dos ácidos grasos libres. Este proceso es debido a la peculiaridad de las lipasas pancreáticas, que son capaces de cortar los enlaces éster de las posiciones de sn-1 y sn-3 del triglicérido. Aunque en general, las lipasas también son capaces de hidrolizar tri-, di- y monoglicéridos, siendo los primeros los más rápidos de degradar y los terceros, los más lentos en ser degradados (Torcello-Gómez, A. *et al.*, 2011).
- Por último y cuarto paso, intervienen las sales biliares que se encuentran adheridas a la superficie de las emulsiones. Estas son las encargadas de facilitar la degradación de los lípidos mediante la retirada de los compuestos liberados, que dificultan la degradación del resto de triglicéridos de la superficie de la micela a través de un mecanismo de desplazamiento orogénico (Golding, M. & Wooster, T. J., 2010).

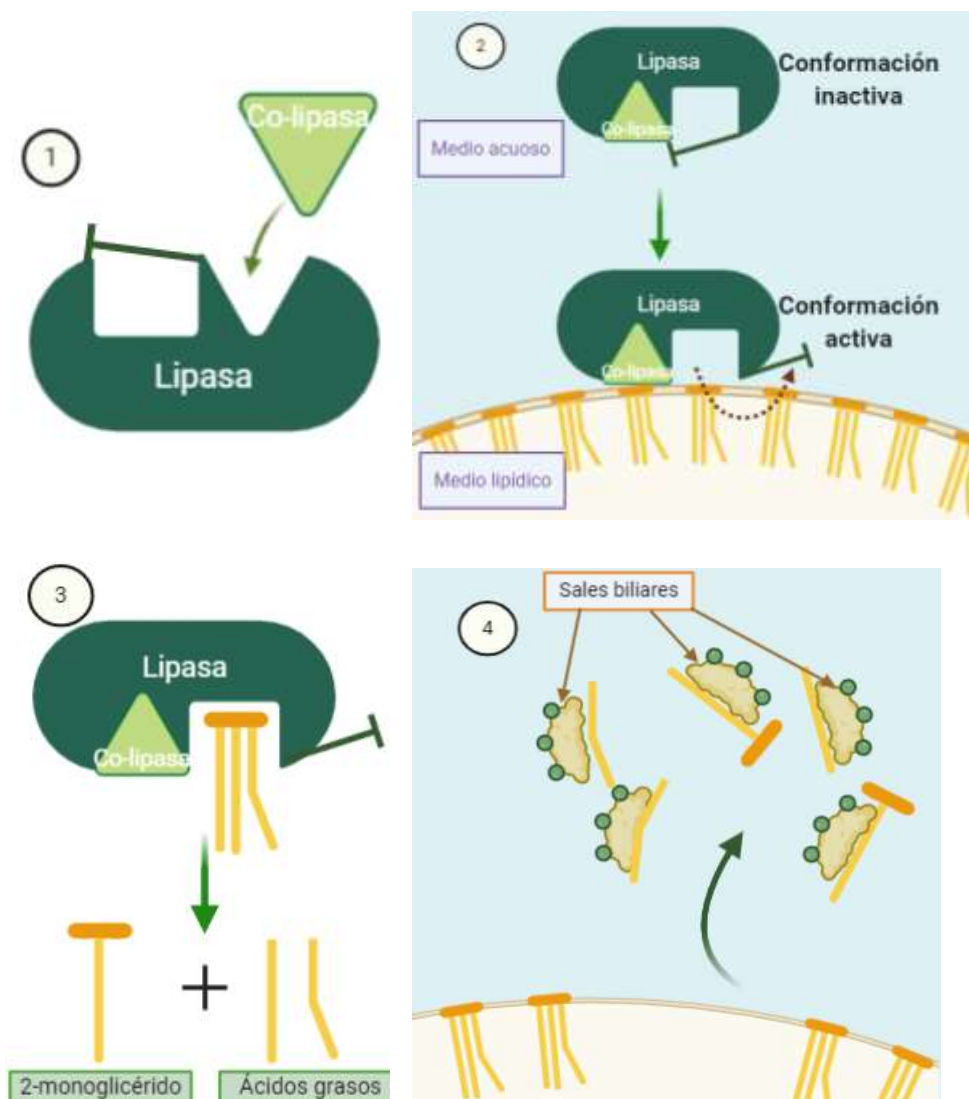


Figura 13. Representación de la degradación lipídica en forma de emulsiones por parte de las lipasas. Cada paso clave está representado por una viñeta (elaboración propia).

Desde un punto de vista más general, el proceso de degradación se puede explicar de la siguiente manera: a partir de los triglicéridos que se encuentran dispersos en el medio acuoso, junto con agentes emulgentes como las sales biliares, permiten la formación de emulsiones. En consecuencia, las lipasas se pueden adherir a la superficie dichas estructuras esféricas, para que mediante la hidrólisis se generen ácidos grasos libres y sn-2 monoglicéridos. Finalmente, estos productos de la reacción van a ser retirados por las sales biliares. Este resumen se puede visualizar claramente en la figura 14.

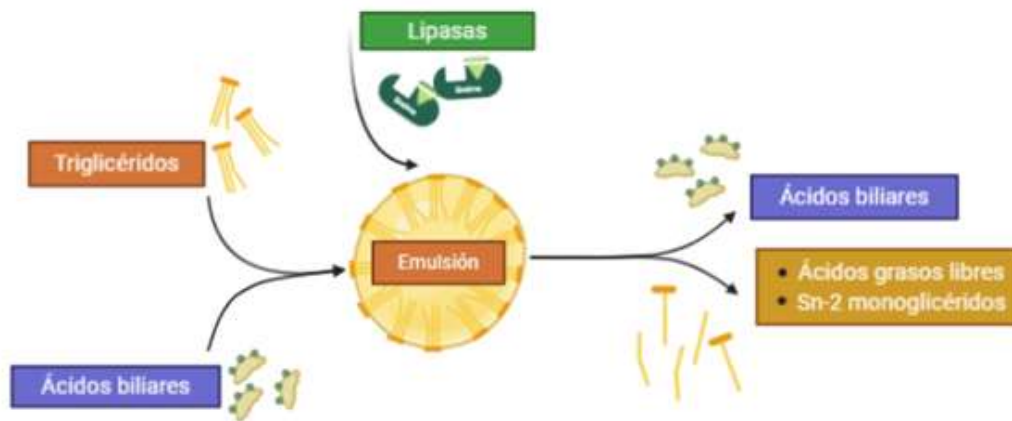


Figura 14. Esquema completo del proceso de degradación (elaboración propia).

A.6) Absorción de lípidos del alimento

Los lípidos son absorbidos desde el medio acuoso del lumen del intestino hacia el sistema sanguíneo o linfático, a través las células de la mucosa intestinal. Sin embargo, para que los lípidos sean absorbidos, estos han de ser transformados en ácidos grasos libre, tal y como se explicó en los apartados anteriores. Por tanto, la digestión y la absorción de los triglicéridos son procesos dinámicos, complejos y muy eficientes, que van a permitir la liberación de los FA. Cabe destacar que los productos lipolíticos generados son absorbidos en la parte media del intestino delgado, mientras que los BS son absorbidos en la parte final del intestino (Ros, E. 2000).

Los lípidos que se encuentran solubilizados en forma de micelas gracias a las BS deben disociarse de estas estructuras para poder ser absorbidas. Este proceso tiene lugar en una capa delgada de agua que se encuentra adyacente a la superficie luminal de los enterocitos. Esta capa tiene un espesor comprendido entre 50-500 nm y se le denomina como capa de agua no agitada. Gracias a las propiedades hidrofóbicas de la micela permiten que los lípidos puedan atravesar dicha capa y poder transportar a la membrana microvellosa la mayor concentración de FA. Asimismo, se ha demostrado que existe un microclima ácido en esta capa de agua, presentando un pH de 5,3 a 6 que conlleva a la disociación de la micela y a la protonación de los FA, permitiendo así, una difusión pasiva de los FA a través de la membrana lipídica celular. Además de este transporte pasivo, existen unas proteínas de

unión de ácidos grasos de membrana (FABP) que facilitan un transporte activo, con gasto de energía, al citosol (Ros, E. 2000).

B) Regulación del metabolismo

Además de las funciones relacionadas con la digestión de los lípidos y sus propiedades emulsionantes. Los BAC son capaces de actuar como hormonas activando una serie de receptores que finalmente regulan el metabolismo del organismo. La activación de estos receptores conlleva a la expresión o inhibición de ciertos genes de múltiples rutas metabólicas de distintos tejidos que desencadenan respuestas tanto en el metabolismo de los BAC como en la homeostasis de la glucosa, en el metabolismo de los lípidos y de las lipoproteínas, en el gasto energético, en la motilidad intestinal, en el crecimiento bacteriano, en la inflamación y en el eje intestino delgado. La relación entre los BAC y los distintos receptores se desarrollarán en el apartado de señalización hormonal (Sipka, S. y Bruckner, G. 2014).

Asimismo, ciertos estudios han demostrado que los ácidos biliares desempeñan también funciones homeostáticas clave en el metabolismo de la glucosa, ya que potencia su absorción y su transporte. Incluso las BS intervienen en el metabolismo del colesterol, debido a que su síntesis se basa en la molécula del colesterol. Además, presentan un papel clave en la desintoxicación de toxinas xenobiótica en el hígado (Moghimpour, E. *et al.*, 2015).

Además, la síntesis de ácidos biliares presenta un efecto beneficioso para los organismos, ya que regula la concentración de la molécula de colesterol. Igualmente, la bilis facilita la absorción de nutrientes lipofílicos como vitaminas A, D, E, K, astaxantina y carotenoides y permite la excreción de metabolitos que si se acumulan en exceso pueden llegar a ser tóxicos, como la bilirrubina o el colesterol. Varios estudios han demostrado que el empleo de sales biliares de manera exógena ayuda a reducir las interrupciones de la digestión de lípidos provenientes de vegetales (Romano, N. *et al.*, 2020).

Los organismos que ingieren sales biliares como aditivo alimentario presentan un crecimiento más rápido del tamaño en comparación con aquellos que no los ingieren. Esto es debido a un aumento de la digestión de lípidos, y, por tanto, mayor cantidad de energía. Asimismo, Los ácidos biliares conjugados (CBAC) afectan a la digestión y asimilación de las proteínas, ya que aceleran la hidrólisis por parte de las proteasas pancreática. Por tanto, los CBAC potencian considerablemente los niveles de proteólisis de ciertas proteínas ingeridas en la dieta como son las lactoglobulinas, la albúmina sérica bovina, la mioglobina, etc. (Gass, J. *et al.*, 2007).

C) Inmunomodulación

Las sales biliares desempeñan numerosas funciones respecto a la regulación de la inmunidad innata del organismo, diversas inflamaciones sistémicas, alergias, síndromes metabólicos,

enfermedades hepáticas alcohólicas y cáncer de colon. Por lo que un fallo en el metabolismo y regulación de las sales biliares puede conllevar a enfermedades como colestasis, cálculos biliares, inflamación, absorción inadecuada de lípidos y vitaminas liposolubles, sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, aterosclerosis y enfermedades neurológicas, entre otras (Sipka, S. y Bruckner, G. 2014).

Por otro lado, las sales biliares presentan funciones de bactericidas, ya que eliminan directamente el crecimiento de la microbiota sensible a los BA que han sido introducida junto con el alimento y que han resistido a las condiciones de pH muy bajos del estómago. La acción bactericida de las sales biliares se caracteriza por alterar las membranas celulares de las bacterias, dañando sus ADN y modificando las conformaciones proteicas. Por lo tanto, estas sustancias regulan el microbioma intestinal, controlando así, que no haya un sobrecrecimiento bacteriano o que entren bacterias patógenas al organismo. Adicionalmente, esta función permite mantener la esterilidad en toda la estructura de la vesícula y conductos biliares (Romano N. *et al.*, 2020).

La razón por la que a las sales biliares se les consideran como inmunomoduladores, es que son capaces actuar como moléculas señalizadoras, ya que ante un estímulo se va a desencadenar una respuesta. Esto es debido a que son capaces de activar rápidamente receptores nucleares, conllevando a la activación de rutas de señalización celulares que regulan los niveles de lípidos y de glucosa y, por tanto, controlan el metabolismo energético (Chiang, J. Y. L. 2009).

Además, se les consideran como agentes inflamatorios, ya que las sales biliares en los hepatocitos son capaces de interactuar con agentes pro-inflamatorios que, a su vez, activan a ciertos genes, que finalmente desencadenará la respuesta inflamatoria (Jin, M. *et al.*, 2019). Siendo así, se pueden considerar a los BA como agentes potenciadores de las capacidades inmunológicas del organismo.

Varios estudios han demostrado que los BAC pueden alterar las membranas celulares de los hepatocitos, causando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), conllevando, a su vez, la modificación oxidativa de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y, finalmente, desencadena reacciones apoptóticas y necróticas. Además, se ha comprobado que también pueden afectar a tejidos endoteliales de los riñones y de los pulmones, e incluso en las células gastrointestinales las sales biliares se pueden comportar como promotores del cáncer (Perez, M. J. & Britz, O., 2009).

Asimismo, ciertos estudios sobre enfermedades hepatobiliares han demostrado que los BA son capaces de inhibir la inmunidad celular y activar la acción de los macrófagos. En otras enfermedades como la ictericia obstructiva, las células de Kupffer no presentan ninguna actividad y, además, los ácidos desoxicólicos y CDCA inhiben la producción de las interleucinas-1, las interleucinas-6 (IL-1 y IL-6, respectivamente) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en los macrófagos estimulados por los lipopolisacáridos de bacterias (LPS). En la tabla 4 se puede observar los distintos tipos de receptores que pueden ser activados por las sales biliares, junto con los tipos de células del sistema inmune humano (monocitos, macrófagos, CD4, CD19, CD8 y células dendríticas) y la información de si hay interrelación entre dichos receptores y las células inmunológicas (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014).

Por ejemplo, la activación del receptor FXR reprime la expresión de genes regulados por el receptor 4 tipo Toll (TLR4), incluidas las citoquinas proinflamatorias, las quimiocinas y sus receptores. En cambio, el interferón- γ es un potente inhibidor de la expresión de FXR en macrófagos que requieren transductores de señal y activadores de la transcripción 1. Además, existe una regulación recíproca entre la expresión FXR y TLR (TLR2, TLR4, TLR5, TLR6), mientras que la activación intracelular de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 regula la expresión de FXR. Por otro lado, otro ejemplo sería el receptor TGR5, que al aumentar su activación en las células inmunes innatas conlleva a la regulación negativa de las citoquinas inflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 y, además, induce un cambio de concentraciones de IL-10 / IL-12 y reduce la capacidad proinflamatoria de los macrófagos humanos (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014).

Otro ejemplo de inmuno regulación corresponde con el receptor TGR5, ya que su activación por sales biliares en las células de monocitos y macrófagos reduce la inflamación y protege contra la aterosclerosis, así como la obesidad y la resistencia a la insulina. Además, afecta a la diferenciación de células dendríticas a través de la vía TGR5-AMPC que induce un fenotipo de células dendríticas antiinflamatorio, previniendo así trastornos inflamatorios crónicos como la enfermedad de Crohn y la psoriasis. Igualmente, el TGR5 media en los procesos de producción de citocinas proinflamatorias inducidas por BAC en las células RAW264.7 y Kupffer (Perino, A. & Schoonjans, K., 2015).

Tabla 4. Expresión de los receptores de los ácidos biliares en las células del sistema inmune humano. Tabla obtenida de Sipka, S. & Bruckner, G., 2014

Receptores	Monocitos/ macrófagos	CD4+células	CD19+células	CD8+células	Células dendríticas
FXR	Sí	Sí	Sí	Sí	No se sabe
PXR	Sí	Sí	Sí	Sí	No se sabe
CAR	Sí	Sí	Sí	Sí	No se sabe
VDR	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
GP-BAR1/ M- BAR/TGR5	Sí	No	No	No	No se sabe

D) Señalización hormonal

Las sales biliares presentan una característica muy curiosa y es que pueden actuar como feromona en algunas especies de peces, permitiendo así, comunicaciones inter e intraespecífica. Esto es gracias a que presentan un sistema olfativo muy desarrollado y altamente sensible a la detección de estas moléculas en el agua. Un ejemplo de esta capacidad es el caso de las lampreas y de los peces teleósteos (Hagey, L. R. al. 2010).

Sin embargo, el principal papel de las sales biliares como hormonas señalizadoras está relacionado con la activación de 5 tipos de receptores, por los cuales van a modular distintas respuestas metabólicas. Esto es debido a que la activación de dichos receptores va a alterar la expresión génica de diversos tejidos, conllevando a cambios tanto al metabolismo de la síntesis de los ácidos y alcoholes biliares como a la regulación de la glucosa, de los lípidos, de las lipoproteínas, del metabolismo energético y de las respuestas inflamatorias. Por consiguiente, dentro de dichos receptores, 4 de ellos corresponden con receptores nucleares, como FXR, receptor de pregnano X (PXR), receptor de androstano constitutivo (CAR) y receptor de la vitamina D (VDR), mientras que el quinto corresponde con un receptor acoplado a la proteína G (TGR5). En la figura 15 se pueden observar estos 5 receptores con sus ligandos principales (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014). Asimismo, ciertos estudios han demostrado que el ácido desoxicólico, BAC secundario, es capaz de activar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Zhou, H. & Hylemon, P. B., 2014).

El receptor PXR destaca por inhibir la expresión de genes diana como el factor nuclear κ B (NF- κ B), afectando, por tanto, a la síntesis de las moléculas de TNF- α , de prostaglandina-endoperoxidasa sintasa 2, de moléculas de adhesión intercelular 1, de interleucinas y quimiocinas. En cambio, el receptor CAR se suele expresar en los tejidos del hígado y del intestino, ya que actúa como un biosensor de compuestos endobióticos y xenobióticos, entre los que se incluyen las moléculas de las sales biliares. Por tanto, este receptor tiene como función inducir la expresión de enzimas desintoxicantes al ser activado (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014).

En cuanto al receptor VDR corresponde con un factor de transcripción dependiente del ligando de la vitamina D₃, perteneciente a la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas/tiroideas. Además, se encuentra asociado a las actividades del calcio y a la homeostasis del fósforo, por lo que va a estar influenciado con el mantenimiento de la densidad ósea. Este receptor tiene también como característica reaccionar con los ácidos biliares secundarios, y no con los primarios. Cuando ocurre colestasis, detención del flujo de la bilis hacia el intestino, se induce la liberación de citoquinas proinflamatorias y la expresión de transportadores de BA. Por consiguiente, esta inducción puede ser reprimida directamente por la vitamina D (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014).

Adicionalmente, el receptor TGR5 es un miembro de la rodopsina dentro de la subfamilia de los receptores acoplados a la proteína G de la membrana plasmática, en cambio, estos en particular, se encuentran internos en la cara citoplasmática a la espera de ser activados. Asimismo, se expresan sobre todo en los tejidos de la vesícula biliar y en el intestino (Pols, T. W. H. *et al.*, 2011). Por consiguiente, cuando este receptor es activado por los ácidos biliares, se desencadena una reacción de producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que, a su vez, activa a la proteína quinasa A (PKA), permitiendo así, fosforilar el elemento de unión a la respuesta de AMPC en las células diana. En conclusión, este elemento de unión tiene la capacidad de activar varios genes (Sipka, S. & Bruckner, G., 2014). TGR5 se expresa en numerosos tejidos incluyendo en las células neuroendocrinas intestinales, en la vesícula biliar, en el bazo, en el tejido adiposo marrón, en los macrófagos y en los colangiocitos. Es importante destacar que no se expresa en los hepatocitos. Este receptor presenta un papel importante en la regulación del metabolismo energético, ya que se ha demostrado que cuando

los BAC activan a este receptor en el tejido adiposo marrón, se induce la yodotiroxina desiodinasa tipo 2, lo que conlleva a niveles altos de la hormona tiroidea y a la estimulación del metabolismo energético (Zhou, H. & Hylemon, P. B., 2014).

Finalmente, tal y como se ha explicado en el apartado 7.2. del origen y destino de los ácidos biliares en el organismo, concretamente, en la sección A de síntesis hepática, el receptor FXR corresponde con un sensor de sales biliares en los tejidos enterohepáticos, regulando el metabolismo del ácido y alcohol biliar, el transporte y la circulación enterohepática. Además, los ligando FXR presentan actividades antiinflamatorias, esto es debido a que son capaces de interactuar con otros factores de transcripción e inhibir otras rutas de señalización proinflamatorias. Asimismo, la activación de FXR por los ácidos biliares tiene un papel protector en las células epiteliales intestinales, ya que controla el sobrecrecimiento bacteriano y la lesión de la mucosa y disminuye la producción de proteína C reactiva. Ciertos estudios con ratones han demostrado que este receptor presenta un papel fundamental como supresor tumoral (Zhou, H. & Hylemon, P. B., 2014; Sipka, S. & Bruckner, G., 2014).

Algunas relaciones que se han concluido entre los distintos receptores son que el ácido biliar LCA es el mejor activador de PXR y VDR que se correlaciona con su hidrofobia y su toxicidad, ya que la activación de estos receptores induce genes que codifican enzimas que metabolizan el LCA en un metabolito más hidrófilo y menos tóxico (Zhou, H. & Hylemon, P. B., 2014).

Adicionalmente, existe otro tipo de receptor de membrana activado por los ácidos biliares conjugados con taurina, a estos se le denominan receptores muscarínicos. Existen cinco receptores diferente de este tipo (M1, M2, M3, M4 y M5) que se expresan en diversos tejidos del cuerpo. Estos receptores presentan un papel importante en el cáncer de colon, ya que se ha observado que su concentración en las membranas se aumenta ante la presencia de este cáncer (Zhou, H. & Hylemon, P. B., 2014).

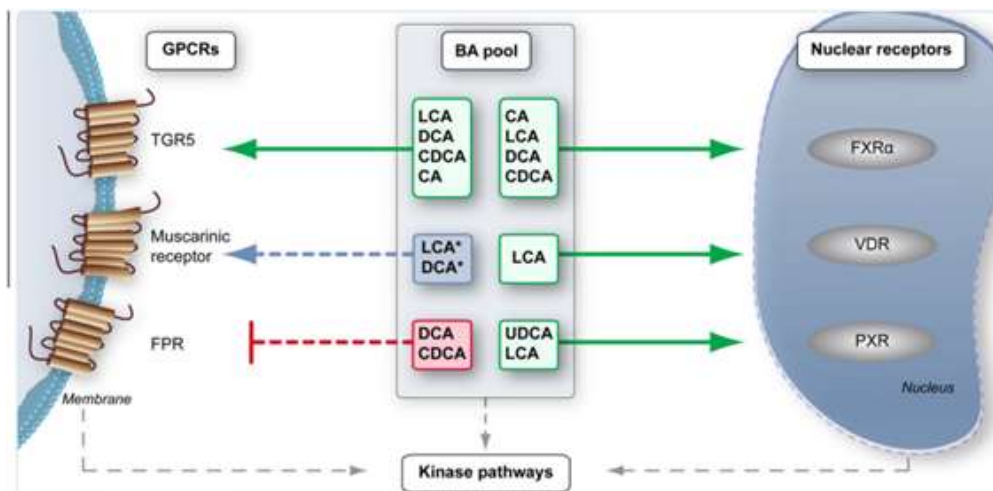


Figura 15. Representación de las vías de señalización moduladas por ácidos biliares. Cada uno de los receptores es modulado por una serie de ácidos biliares. Las flechas en verde corresponden a acciones de activación, la roja de inhibición y la azul de modulación, pueden activar o inhibir. Sólo las formas conjugadas de LCA y DCA activan los receptores muscarínicos (Pols, T. W. H. et al., 2011).

4.4. Sales biliares como aditivos zootécnicos

Según el Reglamento (CE) Nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal, a partir de ahora denominado como Reglamento CE 1831/2003, define a los aditivos zootécnicos en el artículo 6.1 como “cualquier aditivo utilizado para influir positivamente en la productividad de los animales sanos o en el medio ambiente”.

Dentro de los aditivos zootécnicos se pueden encontrar distintos grupos en el Anexo I del RE 1831/2003 como:

- a) **Digestivos:** sustancias que, suministrados a los animales, facilitan la digestión de los alimentos ingeridos, actuando sobre determinadas materias primas para piensos.
- b) **Estabilizadores de la flora intestinal:** microorganismos u otras sustancias definidas químicamente que, suministradas a los animales, tienen un efecto positivo para la flora intestinal.
- c) **Sustancias que influyen positivamente en el medio ambiente.**
- d) **Otros grupos** de aditivos zootécnicos.

La regulación a nivel europeo tiene como objetivo poder lograr una libre circulación de los aditivos zootécnicos de manera segura, es por ello, que hay evaluaciones de su seguridad mediante un procedimiento comunitario, con el fin de proteger la salud humana, la sanidad de los animales y el medio ambiente. Por consiguiente, dicha regulación queda establecida en el artículo 12.1 del Reglamento CE 1831/2003 que recoge el modo de supervisión de los aditivos comercializados. Además, se han establecido un registro de los aditivos con información de los productos y métodos de detección, por lo que toda información no confidencial debe estar escrita en el etiquetado para estar disponible al público. De tal forma que en el artículo 16 del Reglamento CE 1831/2003 se definen las pautas del etiquetado y envasado de aditivos para alimentación animal y de premezcla. Asimismo, se han impuesto sanciones ante las infracciones, que han de ser eficaces, proporcionadas y disuasorias y, así pues, dichas sanciones quedan recogidas en el artículo 24 de este reglamento.

Para que un aditivo zootécnico sea admitido este ha de pasar un proceso de aprobación reglamentario en el que los productores tienen que certificar pruebas de calidad, de eficacia y de seguridad del producto antes de su comercialización. Es por ello, que cualquier producto que quiera ser comercializado en Europa ha de cumplir el Reglamento CE 1831/2003 y ser revisado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). El proceso completo de aprobación en la UE dura alrededor de 2 años. Entonces, este control permite garantizar que las sales biliares como aditivo zootécnico comercializadas, sean seguras para el animal que lo consume, para las personas que lo manipulan y para el consumidor final (Bedford, M. R., & Partridge, G. G., 2010). Además, cada una de las sales biliares empleadas debe pasar pruebas de seguridad y presentar datos que demuestran su eficacia y utilidad en los animales.

A) Utilización en animales terrestres

Tal y como se ha explicado anteriormente, las sales biliares presentan numerosas funciones ventajosas en los animales. Un ejemplo de ello sería su empleo como aditivo zootécnico que permite mejorar la eficiencia energética y el rendimiento de la digestión de los alimentos, especialmente el de las grasas, gracias a su capacidad de ser un agente emulgente. La bilis puede emulsionar eficazmente los lípidos para formar pequeñas partículas en el intestino, que pueden expandir la superficie de contacto entre los lípidos y la lipasa (interfase) para acelerar el metabolismo de los lípidos *in vivo* (Russell, D.W., 2009). Por tanto, en producción animal se diseñan dietas con menor valor energético, pero manteniendo el máximo rendimiento del animal, permitiendo así, reducir los costes de alimentación y presentar una producción ganadera más económica y sostenible.

Las aves de corral en los primeros días de edad consumen una dieta rica en grasas animales y aceites vegetales, ya que se requieren altos niveles de energía para que tengan un crecimiento rápido. En cambio, desde que salen del huevo hasta los 10-14 días de edad presentan dificultades en la digestión y asimilación de las grasas de la dieta, consecuencia de que tienen una capacidad limitada en la producción y secreción de sales biliares y de enzimas como la lipasa. Es el caso de la situación que se produce en la avicultura clásica del pollo de carne, donde se han seleccionado estirpe de crecimiento rápido (ganancia de 2,4 kg de peso vivo en los primeros 42 días de vida) que tiene un desarrollo de ciertas funciones del digestivo que no les permite digerir el alimento necesario (69 g/d) para una ganancia media diaria de 51 g, con 14 días de edad (Broiler Ross 308). Debido a esta inmadurez digestiva, la asimilación de los lípidos es ineficiente y, por tanto, la obtención de energía es pequeña. Por consiguiente, un aporte exógeno de sales biliares a los polluelos, les permiten procesar toda las grasas ingeridas y presentar un crecimiento y desarrollo rápido, gracias a una alta eficiencia energética del alimento (Siyal, F. A. *et al.*, 2017). Por tanto, se puede observar en la tabla 5, las razones por las que es de gran utilidad el empleo de las sales biliares como aditivo zootécnico.

Tabla 5. Razones por las que se debe utilizar los ácidos biliares como aditivos zootécnicos en animales terrestres.

Razones	Referencia bibliográfica
Los pollos de carne y los cerdos han sido seleccionados para que presenten un crecimiento muy rápido, sin embargo, presentan un déficit digestivo en su primera etapa de vida, ya que no son capaces de producir la suficiente cantidad de sales biliares. Las grasas son los nutrientes con mayor valor energético, utilizándose para cubrir las necesidades en momentos de gran demanda. Es por ello, que se les suministran sales biliares de manera exógena, con el fin de cubrir esa necesidad y presentar un rendimiento máximo en la asimilación de las grasas.	(Siyal, F. A. <i>et al.</i> , 2017)

Además, se ha establecido que la composición de los lípidos es fundamental para la digestibilidad de las grasas. Ya que una proporción alta de ácidos grasos insaturados y/o fosfolípidos mejorará su absorción, mientras que una adición excesiva de altas cantidades de grasas saturadas puede desencadenar un acumulo en exceso de grasa visceral y en el cuerpo, conllevando a que la producción de su carne sea de mala calidad (Siyal, F. A. *et al.*, 2017).

Siendo así, se han analizado tres experimentos actuales relacionados con los beneficios que presentan las sales biliares en la dieta para el crecimiento de los pollos de engorde (*Arbor Acres*). Todos ellos, emplearon sales biliares obtenidas a partir de la bilis de los cerdos, mediante técnicas de desaponificación, decolorización, acidificación, purificación y descationación, y finalmente liofilización para su correcta conservación. Además, todos ellos partieron de pollos de un solo día de vida para el comienzo del experimento con un peso aproximadamente de 44 g. Asimismo, se analizó un artículo en el que se empleó cerdos como animal de experimentación. Todas las ventajas e inconvenientes de estos experimentos se pueden ver resumidos en la tabla 6.

En el experimento 1 (Lammasak, K. *et al.*, 2019) se alimentaron a 1110 pollos de engorde con una dieta basal de harina de maíz y soja con una formulación inicial hasta el día 14, seguida de otra formulación hasta el día 21. Estos pollos se separaron en 6 grupos distintos, en el grupo 1, la dieta basal contenía 30 g/kg de aceite de palma crudo, mientras que la dieta utilizada en el grupo 2 tenía 60 g/kg de aceite de palma crudo. Los pollos del grupo 3 se alimentaron igual que el grupo 2 pero suplementada con 5,0 g/kg de lecitina de soja como control positivo. Los pollitos en los grupos 4, 5 y 6 recibieron las mismas dietas que el grupo 2, en cambio, fueron suplementadas con 1,25, 2,5 y 5,0 g/kg de polvo de bilis de cerdo, respectivamente. En conclusión, los resultados esperados que se concluyeron fueron que no había diferencia significativa entre el peso corporal y la ingesta de alimento. Los grupos 4 y 5 fueron los que presentaron mayor actividad lipasa pancreática. El grupo 2 presentó mayor cantidad significativamente de ácidos biliares en la vesícula biliar que el grupo 4. Además, los grupos 3 y 4 presentaron mayor digestibilidad de proteínas y grasas que el resto de los grupos. Finalmente, se demostró que el aumento del contenido de grasa en la dieta no incrementó la concentración de FA en el plasma. En conclusión, la adición de 2,5 g/Kg de bilis es la cantidad perfecta, ya que aumentó la actividad de la lipasa pancreática y las concentraciones totales de ácidos biliares en la vesícula biliar y mayor digestibilidad de grasas y proteínas.

En el experimento 2 (Ge, X. K. *et al.*, 2019), se emplearon 480 pollos con un diseño experimental factorial de 2×2 con dos niveles de energía (ME) y dos niveles de BAC. Por consiguiente, realizaron 4 grupos de 8 repeticiones con 15 pollos por cada. El experimento duró 42 días, donde había dos períodos: período de inicio (PI) (1–21 d) y período de finalización (PF) (22–42 d). Los grupos fueron los siguientes: Grupo 1 (PI: ME=2,940 kcal/kg; PF: ME=3,110 kcal/kg), Grupo 2 (PI: ME=3,030 kcal/kg; PF: ME=3,200 kcal/kg), Grupo 3 (PI: ME=2,940 kcal/kg + 60 g/t BAC; PF: ME=3,110 kcal/kg + 80 g/t BAC), y Grupo 4 (PI: ME=3,030 kcal/kg + 60 g/t BAC; PF: ME=3,200 kcal/kg + 80 g/t BAC). Por tanto, los resultados del experimento 2 fueron que los grupos 2 y 4 de dietas de alta energía disminuyeron la relación alimentación/ganancia (F/G), pero aumentaron el índice hepático y el porcentaje de grasa abdominal. Los grupos 3 y 4 que presentaron una suplementación de sales biliares en la dieta,

aumentaron su peso corporal y su masa muscular, en cambio, disminuyó la relación F/G y la grasa corporal. Además, las dietas de alta energía aumentaron la expresión del factor 1 de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides, de la acetil-CoA carboxilasa y del ácido graso sintasa, mientras que las dietas con BAC disminuyeron la expresión de estos genes. Finalmente, en los grupos 2 y 4 aumentó los niveles de triglicéridos en suero y de colesterol de lipoproteínas de alta densidad, mientras que disminuyó la actividad de la lipasa lipoproteica hepática.

El experimento 3 (Lai, W. *et al.*, 2018) que duró 42 días en total, se basó en el empleo de un total de 432 pollos, en el que el día 1 de su vida, se separaron aleatoriamente en 4 grupos con distintos tratamientos cada uno. Las dietas del tratamiento consistieron en una dieta de maíz y soja con la adición de 0, 40, 60 o 80 mg/kg de ácidos biliares, respectivamente en cada grupo. Además, se agregó manteca de cerdo a la alimentación como fuente de grasa. Entonces, los resultados obtenidos fueron que en los grupos donde se empleó sales biliares presentaron mayor ganancia de peso, pero disminuyeron la relación alimentación/ganancia. Asimismo, los pollos alimentados con un extra de 60 y 80 mg/Kg de ácidos biliares presentaron mayor cantidad de músculos en los muslos y menor cantidad de grasa abdominal. No se mostraron resultados significativos con respecto a las concentraciones de triglicéridos séricos, lipoproteínas de alta densidad y lipoproteínas de baja densidad. En cambio, con la adición de 60 y 80 mg/Kg, sí que se mostró un aumento en la actividad de la lipasa intestinal y la lipasa lipoproteica.

Finalmente, presenta gran importancia la explicación de un experimento en el que se emplean cerdos (*Sus scrofa domestica*) como animal de experimentación. Este se basaba en alimentar los lechones con una dieta a base de cereales, pero, suplementada con el ácido biliar CDCA con el fin de observar si se mejoran la integridad intestinal y el rendimiento del crecimiento. Por ello, se emplearon 36 lechones destetados a los 20 días de edad y con un peso corporal de $6,2 \pm 0,34$ kg. Por tanto, a partir del día 20, 18 cerdos fueron alimentados con 60 mg de CDCA por kg del peso inicial corporal hasta pasados 14 días. A continuación, todos los cerdos presentaron la misma dieta durante 21 días más. Como conclusiones del experimento, se obtuvo que los cerdos con una suplementación con CDCA presentaron un aumento de la proteína GLP-2 y una mayor profundidad de cripta del íleon. Destacó que no se vio afectada la ganancia del peso corporal, pero sí que debido a la suplementación aumentó las concentraciones en sangre de TFN- α , IL-6 e IL-10. Por lo que se concluyó que el empleo de CDCA en la dieta mejora la mucosa intestinal (de Diego-Cabero, N. *et al.*, 2015).

Sin embargo, el uso de BAC como aditivos zootécnicos no son siempre ventajas, sino que también pueden presentar inconvenientes. Por ejemplo, el estudio que realizaron Piekarski, A. *et al.*, 2016, demostraron que una dieta con un suplemento de BAC, mostraron los pollos de engorde niveles más bajos de glucosa en el plasma. Además, disminuyeron los niveles de ARNm de genes lipogénicos hepáticos clave (FAS, ACC α , ME, ATPcl y SCD-1) y sus factores de transcripción relacionados SREBP-1/2 y PPAR α , e incluso, disminuyeron la expresión hepática de FXR y los genes de adipocina, visfatina y adiponectina.

Tabla 6. Ejemplificación de distintos experimentos de los efectos positivos y negativos que presenta el empleo de los ácidos biliares como aditivos zootécnicos en animales terrestres.

Animal	Inconvenientes	Ventajas	Referencia bibliográfica
Pollos de carne (de engorde) (<i>Arbor Acres</i>)	<ul style="list-style-type: none"> No había diferencia significativa entre el peso corporal y la ingesta de alimentos. Disminuyó el contenido de ácidos biliares en la vesícula biliar. 	<ul style="list-style-type: none"> Aumentó la actividad de la lipasa pancreática. Mayor digestibilidad de proteínas. 	(Lammasak, K. <i>et al.</i> , 2019)
Pollos de carne (de engorde) (<i>Arbor Acres</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Se redujo la grasa corporal y la relación alimentación /ganancia. Disminuyó la expresión del factor 1 de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides, de la acetil-CoA carboxilasa y del ácido graso sintasa. Decreció los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad. 	<ul style="list-style-type: none"> Incrementó su peso corporal y su masa muscular. Mejóro el rendimiento del crecimiento. Aumentó la calidad de la carne. 	(Ge, X. K. <i>et al.</i> , 2019)
Pollos de carne (de engorde) (<i>Arbor Acres</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Se redujo la relación alimentación /ganancia. 	<ul style="list-style-type: none"> Aumentó la ganancia de peso. Presentó mayor cantidad de músculos en los muslos y menor cantidad de grasa abdominal. Potenció la actividad de la lipasa intestinal y la lipasa lipoproteica. 	(Lai, W. <i>et al.</i> , 2018)
Cerdo (<i>Sus scrofa domestica</i>)	<ul style="list-style-type: none"> No hubo una ganancia de peso corporal significativa. 	<ul style="list-style-type: none"> Aumentó la concentración de la proteína GLP-2 y la profundidad de la cresta del íleon. Disminuyó las concentraciones en sangre de TFN-α, IL-6 e IL-10. Mejóro la mucosa intestinal. 	(de Diego-Cabero, N. <i>et al.</i> , 2015)

B) Utilización en acuicultura

Los lípidos en la alimentación de los peces presentan un papel fundamental, ya que constituyen la principal fuente de energía y de ácidos grasos esenciales. Es por ello, que en la acuicultura se ha potenciado las dietas altas en lípidos, que cubran las necesidades energéticas en sustitución de proteínas, para que tengan un crecimiento rápido. En cambio, estudios han demostrado que dietas con altos porcentajes de lípidos presenta efectos perjudiciales a largo plazo en el pez, adipogénesis (almacenamiento preferencial de lípidos como grasa perivisceral, grasa subcutánea, en el músculo y en el hígado) lo que compromete, tanto el bienestar animal como la calidad final del producto (Samerón, C., 2018). La adición de ácidos biliares en el pienso permite reducir la deposición

anormal de lípidos y promover un crecimiento saludable, al mejorar el metabolismo de los lípidos (Ding, T. *et al.*, 2020).

El origen de estos lípidos, así como el de las proteínas de la dieta, inicialmente eran de pescado (subproductos de la industria pesquera). Actualmente, la industria piscícola está en aumento, esto es debido a que la demanda de alimento cada vez es mayor, por lo que ha conllevado a un aumento de presión sobre los recursos pesqueros. Es por ello, que se pretende desarrollar métodos de crecimientos óptimos en peces para poder lidiar con la demanda existente. Las harinas y aceites de pescado (fuentes de proteína y lípidos, respectivamente) están siendo reemplazadas por aceites y proteínas de origen vegetal. El aceite de soja ha sido considerado un buen candidato como fuente de grasas en la alimentación de los peces, ya que es la mayor fuente de aceite vegetal y, además, presenta un precio asequible. No obstante, un alto contenido de aceite de soja en la alimentación causa una reducción en el crecimiento y en la supervivencia del pez, ya que posee un alto contenido de ácido linoleico, pero bajo contenido de ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. Por tanto, el empleo de sales biliares en la dieta es fundamental, ya que va a permitir potenciar el crecimiento, mejorar el metabolismo, prevenir enfermedades y ayudar a la digestión (Du, J. *et al.*, 2017).

Por otra parte, los lípidos provenientes de los alimentos marinos que obtienen los peces contienen un alto porcentaje de ácidos grasos poli-insaturados y además, están constituidos por triglicéridos de cadena larga, por lo que no pueden ser hidrolizados directamente por las lipasas pancreáticas (Gjellesvik, D. R. *et al.*, 1992). Por lo tanto, en esta situación, la presencia de sales biliares es fundamental, ya que, sin estos, la actividad hidrolítica por parte de las lipasas sería muy poco eficiente.

Asimismo, se ha demostrado que el consumo de sales biliares exógena reduce el contenido de grasa en todo el cuerpo como en el hígado y en los músculos, pero en cambio, aumenta el contenido de proteína en el organismo. Además, mejora la actividad de la lipasa y, por tanto, el metabolismo de los lípidos y contribuyen a reducir la necesidad de sintetizar *de novo* el colesterol. Asimismo, disminuye la síntesis de esteroides cuando las dietas están suplementadas con tauroursodeoxicolato o taurodesoxicolato (Kortner *et al.*, 2016).

Igualmente, ciertos estudios han asociado que la presencia de sales biliares exógena en el alimento reduce significativamente los ácidos grasos poliinsaturados musculares (PUFA) y, por tanto, aumenta considerablemente los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y los ácidos grasos saturados. Asimismo, está también relacionado con la disminución de la elongación de los FA (Romano, N. *et al.*, 2020). Las razones por las que se están utilizando sales biliares como aditivos zootécnicos en piensos para acuicultura se pueden resumir en la tabla 7.

Tabla 7. Razones por las que se debe utilizar los ácidos biliares como aditivos zootécnicos en peces.

Razones	Referencia bibliográfica
Promover el catabolismo de las grasas del pienso, evitando la adipogénesis, en dietas con un alto porcentaje de lípidos, mejorando la digestión y absorción	(Ding, T. <i>et al.</i> , 2020)
Los peces carnívoros en las piscifactorías son alimentados con proteínas vegetales, por lo que presentan problemas digestivos y de crecimiento debido a ciertos componentes de las plantas que intervienen en la salud y en el bienestar de los peces. Es por ello, que, con el empleo de sales biliares en el alimento, va a permitir disminuir estos efectos negativos y poder así, obtener una digestión óptima.	(Gu, M. <i>et al.</i> , 2017)
Los piensos de acuicultura contienen harinas vegetales como fuente de proteínas, que a su vez contienen polisacáridos no amiláceos (NSP) que no pueden ser hidrolizados por los peces. Estos compuestos causan un aumento de viscosidad del digestato, por lo que conlleva a una disminución de digestibilidad aparente de nutrientes (ADC). La reducción de la ADC de la grasa se produce, además, por la capacidad de los NSP para secuestrar sales biliares, incrementando la pérdida de ácidos biliares en heces. Además, las dietas basadas en plantas (ej. harinas de leguminosas como soja) no contienen ácidos biliares, ni el colesterol precursor del ácido biliar ni la taurina necesaria para la conjugación del ácido biliar en los peces. La suplementación con bilis de la dieta puede compensar esta pérdida y sus efectos negativos.	(Staessen, T. W. O. <i>et al.</i> , 2020)
Los ácidos biliares aumentan la hidrólisis de proteínas y modulan la secreción de moco por las células del epitelio intestinal, así como la absorción de fluidos digestivos y electrolitos. Además, tienen importantes efectos antiinflamatorios en el intestino y pueden preservar la barrera intestinal de enfermedades inflamatorias, principalmente pueden prevenir la inflamación intestinal distal inducida por harinas de soja o antinutrientes vegetales.	(Kortner <i>et al.</i> , 2016)

En este apartado, se han analizado 5 experimentos relevantes y actuales que han demostrado lo imprescindible que son los ácidos biliares en la dieta de los peces para la industria piscícola. En cada uno de los experimentos se han empleado distintas especies de peces que resultan ser destacados en la acuicultura. Además, todas las ventajas e inconvenientes de estos experimentos se pueden ver resumidos en la tabla 8.

En el experimento 1 (Du, J. *et al.*, 2017) investigaron con corvina amarilla grande (*Larimichthys crocea*) con un peso medio inicial de $10,03 \pm 0,02$ g. El tipo de ácido biliar que emplearon fue CDCA. 60 peces fueron separados en distintas jaulas flotantes, para aplicarles los distintos tratamientos (3 réplicas por tratamiento) durante 10 semanas. Se realizaron tres tratamientos en total, por lo que había 4 grupos: grupo 1 se alimentó con aceite de pescado, el grupo 2 con aceite de soja, el grupo 3 se alimentó con aceite de soja y 300 mg/Kg de CDCA y el grupo 4 con aceite de soja y 900 mg/Kg de CDCA. Finalmente, los resultados mostraron que la tasa de supervivencia no fue significativamente diferente

entre cada tratamiento. El grupo 1 presentó menor peso final y menor tasa de aumento de peso que los otros tres grupos y, además, los grupos 3 y 4 mostraron un rendimiento de crecimiento mucho mayor que el grupo 1 y 2. En los grupos con un suplemento de CDCA disminuyó el contenido de lípidos en el hígado y aumentó la actividad de la lipoproteína lipasa.

En el segundo experimento (Gu, M. *et al.*, 2017) emplearon como especie el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) con un peso promedio inicial de 8,5 g. Por tanto, para la ejecución del experimento se formuló una dieta con únicamente harina de pescado para el grupo 1 (grupo control), otra dieta con harina de proteína vegetal (grupo 2) y la última con harina de proteína vegetal y 0,5 % de taurocolato (grupo 3). Por tanto, 180 peces fueron distribuidos en cada uno de los grupos separados por tanques durante 56 días que duró el experimento. Teniendo en cuenta que los rodaballos son peces carnívoros, las conclusiones que se obtuvieron fueron que el grupo 2 presentó un rendimiento de crecimiento, utilización de alimento e índice hepatosomático menor que el grupo 1. Además, el grupo 3 presentó los parámetros del contenido de lípidos en el cuerpo, de la digestibilidad de los lípidos, de la actividad pancreática y de los niveles de colesterol y ácidos biliares totales más altos que los otros dos grupos. En conclusión, la suplementación dietética con taurocolato atenuó los efectos negativos inducidos por la harina de proteína vegetal en el rendimiento del crecimiento, la utilización de los alimentos y la digestión y el metabolismo de los lípidos.

En el experimento 3 (Peng, X. R. *et al.*, 2019) se basó en el empleo de la especie carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) con un peso inicial de $179,85 \pm 1,34$ g. Para ello, 540 peces fueron separados aleatoriamente en 18 jaulas, de las cuales se dividieron en 6 tratamientos con tres repeticiones cada uno. Por lo tanto, cada grupo perteneció a un tratamiento. Los peces del grupo 1 (grupo control) se alimentaron con una dieta normal de proteínas (29%) y lípidos (5%), mientras que los otros 5 grupos fueron alimentados con niveles bajos de proteína (26%) y altos de lípidos (6%) con niveles graduales de ácidos biliares, grupo 2: 0 mg/Kg, grupo 3: 80 mg/Kg, grupo 4: 160 mg/Kg, grupo 5: 240 mg/kg y grupo 6: 320 mg/kg. Por tanto, los resultados que obtuvieron fueron que el grupo 2 presentó una reducción del rendimiento del crecimiento, desarrollo intestinal y capacidad de resistencia a la enteritis en comparación con el grupo 1. Sin embargo, los otros grupos con un suplemento de ácidos biliares (grupos 3,4,5 y 6) mejoraron significativamente el rendimiento del crecimiento de los peces (porcentaje de ganancia de peso, tasa de crecimiento específica, consumo de alimento y eficiencia alimenticia) y la función intestinal (peso del intestino, longitud del intestino e índice intestosomático). Además, se concretó que la suplementación óptima (240 mg/Kg) de ácidos biliares en la dieta disminuyó el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferón γ 2 (IFN- γ 2), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15, IL-17D, IL -12p35, IL-12p40, cRel, I κ B quinasa β (IKK β), IKK γ , niveles de ARNm de proteínas de unión a eIF4E (4E-BP) 1 y 4E-BP2.

En el experimento 4 (Ding, T. *et al.*, 2020) emplearon como especie la corvina amarilla grande (*Larimichthys crocea*). Para ello, separaron 60 peces con un peso inicial de $12,00 \pm 0,20$ g en 15 jaulas marinas, ya que se realizó un tratamiento cada 3 jaulas, siendo 5 tratamientos en total. Dichos tratamientos duraron un total de 10 semanas. Cada tratamiento correspondió a un grupo de peces, por lo que el grupo 1 (control positivo) se alimentó con una dieta lipídica óptima con 4.0% de aceite

de pescado y 4.0% de aceite de soja, el grupo 2 (control negativo) presentó una dieta alta en lípidos formulada con 6.5% de aceite de pescado y 6.5% de aceite de soja. Los otros tres grupos presentaron una dieta alta en lípidos, pero con una suplementación de ácidos biliares de 150 mg/kg (grupo 3), de 300 mg/kg (grupo 4) y de 450 mg/kg (grupo 5). Los resultados de este experimento mostraron que la tasa de supervivencia no fue significativamente diferente entre los distintos grupos. Además, los grupos alimentados con una suplementación de las sales biliares aumentaron gradualmente el peso corporal final y la tasa de ganancia de peso. El grupo 3 presentó las mejores cualidades fisiológicas de los peces, por lo que concluyeron que 300 mg/kg es la suplementación de ácidos biliares óptima. El contenido de lípidos hepáticos y el contenido de malondialdehído hepático disminuyeron significativamente con el aumento de ácidos biliares en la dieta. Finalmente, cabe destacar que los grupos 4 y 5 presentaron los niveles más altos de actividad de la lipasa lipoproteica y la lipasa hepática.

En el experimento 5 (Staessen, T. W. O. *et al.*, 2020) utilizaron la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) como especie de investigación. Su peso inicial fue de 73 ± 0.4 g. El diseño experimental presentó dos etapas, en la que la primera se alimentó cada grupo de peces con uno de los tratamientos durante 4 semanas y la segunda etapa consistió en un periodo de saciedad durante 3 semanas. Los tratamientos tuvieron en cuenta el nivel de polisacáridos no amiláceos (NSP) y los suplementos de ácidos biliares de taurocolato de sodio. Por tanto, el grupo 1 presentó baja concentración de NSP y 0 g/Kg de taurocolato de sodio, el grupo 2 baja concentración de NSP y 2 g/Kg de taurocolato de sodio, el grupo 3 presentó 160g/Kg extra de NSP y 0 g/Kg de taurocolato de sodio y el grupo 4 presentó 160 g/Kg extra de NSP y 2 g/Kg de taurocolato de sodio. Finalmente, los resultados que lograron fueron que el coeficiente de digestibilidad aparente (ADC) se vio afectado por el primer periodo del experimento, en cambio, se agravó en los grupos 3 y 4. Además, el ADC de todos los macronutrientes disminuyó considerablemente para la grasa en comparación con el almidón y las proteínas, especialmente durante la alimentación de saciedad (segunda parte del experimento). Asimismo, esta caída en el ADC graso coincidió con la caída de ácido biliar fecal, por lo que se correlacionó con un balance negativo de ácido biliar. Además, se demostró que el ADC graso, el ADC de la proteína y el ADC del almidón fueron independientes a la suplementación con ácidos biliares. Por tanto, se concluyó que la suplementación dietética de ácidos biliares es una forma efectiva de remediar la disminución de ADC de grasa relacionada con una mayor pérdida de ácido biliar fecal en la trucha arcoiris, pero no es efectiva para mejorar el ADC de proteína y el ADC de almidón.

Tabla 8. Ejemplificación de distintos experimentos de los efectos positivos y negativos que presenta el empleo de los ácidos biliares como aditivos zootécnicos en peces.

Animal	Inconvenientes	Ventajas	Referencia bibliográfica
Corvina amarilla grande (<i>Larimichthys crocea</i>)	<ul style="list-style-type: none"> Disminuyó la expresión de SREBP-1, reduciendo la actividad de FXR 	<ul style="list-style-type: none"> Otorgó mayor rendimiento de crecimiento. Disminuyó el contenido de lípidos en el hígado. Aumentó la actividad de la lipoproteína lipasa y la expresión de PPAR α. 	(Du, J. <i>et al.</i> , 2017)

Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentó las concentraciones de colesterol. 	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementó el contenido de lípidos en el cuerpo, la digestibilidad de los lípidos, la actividad pancreática y ácidos biliares en el cuerpo. • Atenuó los efectos negativos inducidos por la harina de proteína vegetal en el rendimiento del crecimiento. 	(Gu, M. <i>et al.</i> , 2017)
Carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)		<ul style="list-style-type: none"> • Mejoró el rendimiento del crecimiento (porcentaje de ganancia de peso, tasa de crecimiento específica, consumo de alimento y eficiencia alimenticia) y la función intestinal (peso del intestino, longitud del intestino e índice intestosomático) • Potenció las capacidades inmunológicas del intestino, ya que disminuyeron las concentraciones de TNF-α, IFN-γ2, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17D, IL -12p35, IL-12p40, cRel, IKKβ, IKKγ y niveles de ARNm de proteínas de unión a 4E-BP 1 y 4E-BP2. 	(Peng, X. R. <i>et al.</i> , 2019).
Corvina amarilla grande (<i>Larimichthys crocea</i>)		<ul style="list-style-type: none"> • Aumentó el peso corporal final y la tasa de ganancia de peso. • Se redujo el contenido de lípidos hepáticos y el contenido de malondialdehído hepático. • Incrementó la actividad de lipasa lipoproteica y de lipasa hepática, del metabolismo de los lípidos y de las enzimas antioxidantes. 	(Ding, T. <i>et al.</i> , 2020).
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)		<ul style="list-style-type: none"> • Palió las pérdidas de BAC en forma de heces, remediando el ADC de las grasas. 	(Staessen, T. W. O. <i>et al.</i> , 2020)

5. Discusión general

Los ácidos biliares como aditivo zootécnico pueden ser una gran ventaja para el organismo, aunque también, pueden presentar inconvenientes que perjudiquen al mismo. Es por ello, que se va a comparar las consecuencias de su empleo como aditivo en el alimento de los animales desde ambos puntos de vista.

Como se analizó a lo largo de todo el trabajo, los ácidos biliares intervienen en numerosos procesos, aunque principalmente están relacionados con el aumento de la eficiencia del metabolismo y de la digestión de los lípidos. Por consiguiente, un empleo de ácidos biliares de manera exógena va a suponer un crecimiento más rápido, ya que se va a aprovechar más eficientemente los lípidos ingeridos, obteniéndose más energía y además, va a permitir facilitar la absorción del lípidos y de nutrientes lipofílicos como son las vitaminas A, D, E y K, las astaxantinas y los carotenoides. Asimismo, se comprobó en los distintos experimentos analizados, que aquellos animales que presentaron ácidos

biliares en sus dietas presentaron mayor cantidad de músculos y menor cantidad de grasa corporal. Esto puede ser debido a que una concentración adecuada de los ácidos biliares de la dieta aumenta las actividades lipoproteinlipasa (LPL) y lipasa hepática (HL). Por otro lado, disminuyen los niveles de expresión de ARNm de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1) en el hígado y mejora significativamente los niveles de expresión de ARNm del receptor α activado por proliferador de peroxisomas (PPAR α), carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) y acil-CoA oxidasa (ACO) en el hígado (Ding, T. *et al.*, 2020).

Los ácidos biliares también juegan un papel importante en otros procesos como en el crecimiento bacteriano intestinal, en la inmunomodulación, en la señalización hormonal y en la regulación del metabolismo. Es por ello, que cuando estas moléculas son añadidas a la dieta de los animales, van a mejorar la inmunidad innata del organismo, las inflamaciones sistémicas, los síndromes metabólicos, las funciones bactericidas, las actividades de los macrófagos, la eliminación de toxinas y grasas en el hígado, la digestión de proteínas y la homeostasis de la glucosa entre otras muchas funciones.

El aporte exógeno de las sales biliares como aditivos alimentarios puede presentar diversos inconvenientes, ya que de todas las sales biliares ingeridas y la producida por el propio organismo, gran parte van a ser reabsorbidas, conllevando a que el animal presente concentraciones demasiado altas. Es por ello, que va a conllevar a una disminución de la expresión de los genes lipogénicos hepáticos y a una sobreexpresión de los factores de transcripción como FXR, SREBP-1/2 y PPAR α (Piekarski, A. *et al.*, 2016). Por consiguiente, se va a desencadenar procesos de inhibición de la síntesis de ácidos biliares, con el fin de mantener una concentración específica en el organismo. Sin embargo, no se han demostrado efectos significativamente negativos cuando existe un exceso de sales biliares.

En conclusión, el empleo de las sales biliares como aditivos zootécnicos sólo conlleva a beneficios, potenciando principalmente al crecimiento y desarrollo del animal, aunque también favorece en los aspectos inmunológicos, metabólicos y hormonales. El único inconveniente sería que los animales presentan una concentración máxima óptima, por lo que un exceso de sales biliares conllevaría a que sean desaprovechadas.

6. Perspectivas futuras en el uso de sales biliares

La investigación de las sales biliares desde el punto de vista del aditivo alimentario está teniendo actualmente mucha importancia, ya que, podría solventar una gran variedad de problemas y preocupaciones que existen en la actualidad, tanto en alimentación de animales domésticos como en humana, por diferentes razones.

Los niveles de obesidad y de sobrepeso de la población mundial están llegando a ser muy preocupante, ya que, según la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2016 más de 1900 millones

de los adultos tenían sobrepeso, de los cuales más de 650 millones eran obesos. El problema radica en que este exceso de grasas está relacionado con enfermedades como diabetes, trastornos del aparato locomotor, algunos cánceres y enfermedades cardiovasculares que, según la OMS, esta última, fue la causa principal de muertes en 2012.

Por esta razón, existe la necesidad de desarrollar estrategias de reducción de la digestión y absorción de los lípidos, disminuyendo así, la ingesta excesiva de calorías. Para ello, una de las estrategias que se puede llevar a cabo es la reducción de la concentración de las sales biliares endógenas mediante la inhibición de su síntesis o de los procesos de reabsorción. Esto permite que, al reducir la concentración de sales biliares, se reducirá la formación de emulsiones y, por tanto, disminuirá la digestión y absorción de los lípidos (Sarkar, A. *et al.*, 2016). Sin embargo, otro enfoque que puede presentar es la reducción de la degradación de lípidos, mediante la inhibición de las lipasas digestivas (con inhibidores enzimáticos específicos como el orlistat) o la inactivación parcial con NSPs, reduciendo la interacción lipasa-lípido y secuestrando sales biliares en el tracto intestinal de los humanos, permitiendo disminuir la digestión y absorción de las grasas, ya que, al reducir la absorción de grasas, va a facilitar que la persona pierda peso, siempre y cuando, siga una dieta hipocalórica y realice ejercicios físicos (Delorme, V. *et al.*, 2011).

Por otra parte, hay una profunda investigación en el empleo de los lípidos en forma de micelas mixtas gracias a la acción de las sales biliares. Esto permite generar sistemas de administración de fármacos. Esto mejoraría la biodisponibilidad de los mismos, aumentando, por tanto, su eficiencia de actuación, ya que se podría controlar el lugar exacto de actuación del fármaco (Brogård, M. *et al.*, 2007). Por lo tanto, las sales biliares pueden ser consideradas como una herramienta importante en las industrias cosméticas y farmacológicas, debido a su función de formación de liposomas que permitirán distribuir fármacos y otras moléculas biológicamente activas. Estas estructuras lipídicas son sistemas versátiles, donde las moléculas hidrofóbicas se sitúan en las áreas interiores y las hidrofílicas se localizan en la parte externa e interna de la estructura, con el fin de encapsular parte del medio acuoso junto con las moléculas de interés. En cuanto a las aplicaciones cosméticas, los liposomas se aplican directamente a la piel, entonces debido a sus propiedades hidrofóbicas, una aplicación de la molécula de interés de manera más efectiva y directa, ya que le es más fácil atravesar las distintas capas (Da Poian, A. T., & Castanho, M. A. R. B., 2015).

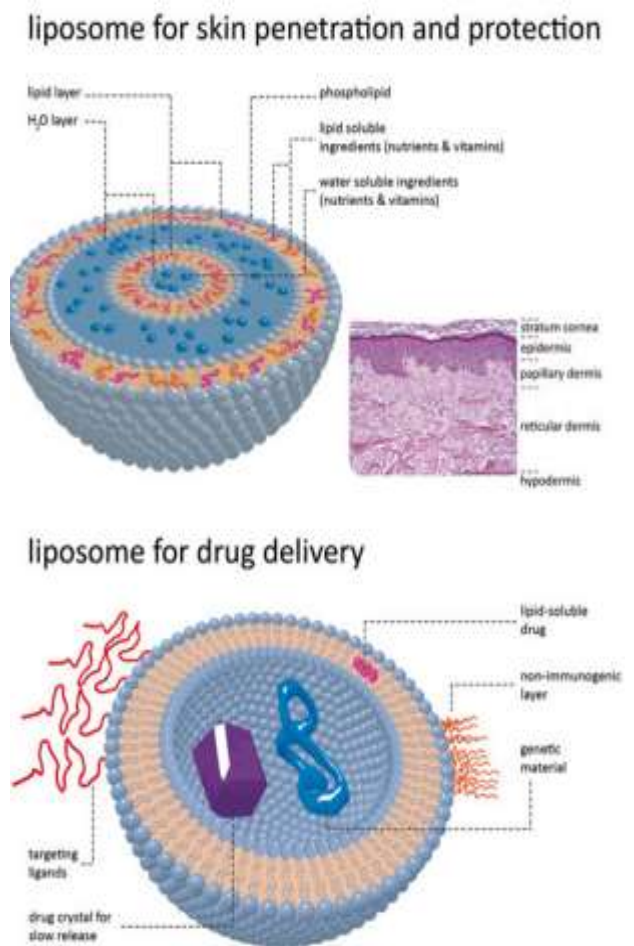


Figura 16. Estructuras de liposomas para la administración de fármacos (Da Poian, A. T., & Castanho, M. A. R. B., 2015)

Finalmente, los ácidos biliares pueden ser empleados en el diseño de nuevos materiales, ya que algunos de estos son capaces de actuar como agentes gelificantes (formadores de geles) en medios orgánicos o acuosos. Por consiguiente, estos biomateriales futuristas podrían ser de gran utilidad, debido a que poseen como característica ser capaces de retener grandes cantidades de agua y además, poder ser solubles en colorantes. Hoy en día, se encuentra bajo mucha investigación ya que es una forma de producir materiales biológicos muy útiles. Por ejemplo, existen geles de nanoestructuras inorgánicas como nanotúbulos o geles de ácidos fosfatados en pH ácidos. (Mukhopadhyay, S. & Maitra, U., 2004).

7. Bibliografía

- Almgren, M. (2000). Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1508(1–2), 146–163. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00309-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00309-6)
- Alzawqari, M., Moghaddam, H. N., Kermanshahi, H., & Raji, A. R. (2011). The effect of desiccated ox bile supplementation on performance, fat digestibility, gut morphology and blood chemistry of broiler chickens fed tallow diets. *Journal of Applied Animal Research*, 39(2), 169-174. <https://doi.org/10.1080/09712119.2011.580999>
- Bedford, M. R., & Partridge, G. G. (2010). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. (2nd ed.). Oxfordshire, UK: CABI Publishing.
- Brogård, M., Troedsson, E., Thuresson, K., & Ljusberg-Wahren, H. (2007). A new standardized lipolysis approach for characterization of emulsions and dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308(2), 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.015>
- Bruslé, J., & Anadon, G. G. (1996). The structure and function of fish liver. In J. S. Datta-Munshi & H. M. Dutta (Eds.), *Fish morphology: Horizon of new research* (pp. 77-94). London, UK: CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: Regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955–1966. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900010-JLR200>
- Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J. P., Comeau, L. C., & Sarda, L. (2002). Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids*, 37(7), 653–662. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0946-7>
- da Poian, A. T., & Castanho, M. A. R. B. (2015). Integrative Human Biochemistry. In *Integrative Human Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3058-6>

- de Diego-Cabero, N., Mereu, A., Menoyo, D., Holst, J. J., & Ipharraguerre, I. R. (2015). Bile acid mediated effects on gut integrity and performance of early-weaned piglets. *BMC Veterinary Research*, *11*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0425-6>
- Delorme, V., Dhouib, R., Canaan, S., Fotiadu, F., Carrière, F., & Cavalier, J. F. (2011). Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. *Pharmaceutical Research*, *28*(8), 1831–1842. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0362-9>
- Ding, T., Xu, N., Liu, Y., Du, J., Xiang, X., Xu, D., . . . Ai, Q. (2020). Effect of dietary bile acid (BA) on the growth performance, body composition, antioxidant responses and expression of lipid metabolism-related genes of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed high-lipid diets. *Aquaculture*, *518*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734768>
- Du, J., Xu, H., Li, S., Cai, Z., Mai, K., & Ai, Q. (2017). Effects of dietary chenodeoxycholic acid on growth performance, body composition and related gene expression in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed diets with high replacement of fish oil with soybean oil. *Aquaculture*, *479*, 584-590. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.023>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., Van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *50*(SUPPL.), 9–14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Gass, J., Vora, H., Hofmann, A. F., Gray, G. M., & Khosla, C. (2007). Enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids. *Gastroenterology*, *133*(1), 16-23. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.008>
- Ge, X. K., Wang, A. A., Ying, Z. X., Zhang, L. G., Su, W. P., Cheng, K., . . . Wang, T. (2019). Effects of diets with different energy and bile acids levels on growth performance and lipid metabolism in broilers. *Poultry Science*, *98*(2), 887-895. <https://doi.org/10.3382/ps/pey434>
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D., & B.T., W. (1992). Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): Purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, *1124*(2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90088-D](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90088-D)
- Golding, M., & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *15*(1–2), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.006>
- González-Bacerio, J., Moreno-Medina, V. R., & Martínez, M. (2020). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 12, Núm. 1 (2010). *12*(2010), 1–12.

- Gu, M., Bai, N., & Kortner, T. M. (2017). Taurocholate supplementation attenuates the changes in growth performance, feed utilization, lipid digestion, liver abnormality and sterol metabolism in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed high level of plant protein. *Aquaculture*, 468, 597-604. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.022>
- Hofmann, A. F., Hagey, L. R., & Krasowski, M. D. (2010). Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. 51. <https://doi.org/10.1194/jlr.R000042>
- Jin, M., Pan, T., Cheng, X., Zhu, T. T., Sun, P., Zhou, F., Ding, X., & Zhou, Q. C. (2019). Effects of supplemental dietary L-carnitine and bile acids on growth performance, antioxidant and immune ability, histopathological changes and inflammatory response in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) fed high-fat diet. *Aquaculture*, 504(January), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.063>
- Kortner, T. M., Björkhem, I., Krasnov, A., Timmerhaus, G., & Krogdahl, Å. (2014). Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 111(12), 2089–2103. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000373>
- Kurtovic, I., Marshall, S., Zhao, X., & Simpson, B. (2009). Lipases from Mammals and Fishes. *Reviews in Fisheries Science*, 17(1), 18-40. <https://doi.org/10.1080/10641260802031322>
- Lai, W., Cao, A., Li, J., Zhang, W., & Zhang, L. (2018). Effect of high dose of bile acids supplementation in broiler feed on growth performance, clinical blood metabolites and organ development. *Journal of Applied Poultry Research*, 27(4), 532-539. <https://doi.org/10.3382/japr/pfy040>
- Lammasak, K., Kijparkorn, S., & Angkanaporn, K. (2019). Porcine bile powder supplementation of a high fat broiler diet in relation to growth performance and nutrient digestion (vol 59, pg 1310, 2018). *Animal Production Science*, 59(7), 1399-1317. https://doi.org/10.1071/an18190_co
- Le, H. T. M. D., Lie, K. K., Giroud-Argoud, J., Rønnestad, I., & Sæle, O. (2019). Effects of cholecystokinin (cck) on gut motility in the stomachless fish ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00553>
- Lionarons, D. A., Boyer, J. L., & Cai, S. Y. (2012). Evolution of substrate specificity for the bile salt transporter ASBT (SLC10A2). *Journal of Lipid Research*, 53(8), 1535–1542. <https://doi.org/10.1194/jlr.M025726>
- Long, S. L., Gahan, C. G. M., & Joyce, S. A. (2017). Interactions between gut bacteria and bile in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 56, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.002>

- Lowet, M. E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research*, 43(12), 2007–2016. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200012-JLR200>
- Martinot, E., Sèdes, L., Baptissart, M., Lobaccaro, J. M., Caira, F., Beaudoin, C., & Volle, D. H. (2017). Bile acids and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine*, 56, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.006>
- Moghimpour, E., Ameri, A., & Handali, S. (2015). Absorption-Enhancing Effects of Bile Salts. *Molecules*, 20(8), 14451–14473. <https://doi.org/10.3390/molecules200814451>
- Mukhopadhyay, S., & Maitra, U. (2004). Chemistry and biology of bile acids. *Current Science*, 87(12), 1666–1683.
- Naso, J. N., Bellesi, F. A., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., & Pilosof, A. M. R. (2019). Studies on the interactions between bile salts and food emulsifiers under in vitro duodenal digestion conditions to evaluate their bile salt binding potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174(November 2018), 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.024>
- Pellicoro, A., & Faber, K. N. (2007). Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(SUPPL. 2), 149–160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03522.x>
- Peng, X. R., Feng, L., Jiang, W. D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., . . . Zhou, X. Q. (2019). Supplementation exogenous bile acid improved growth and intestinal immune function associated with NF-kappaB and TOR signalling pathways in on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Enhancement the effect of protein-sparing by dietary lipid. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 552-569. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.047>
- Perez, M. J., & Britz, O. (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World Journal of Gastroenterology*, 15(14), 1677–1689. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1677>
- Perino, A., & Schoonjans, K. (2015). TGR5 and Immunometabolism: Insights from Physiology and Pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(12), 847–857. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.08.002>
- Piekarski, A., Decuypere, E., Buyse, J., & Dridi, S. (2016). Chenodeoxycholic acid reduces feed intake and modulates the expression of hypothalamic neuropeptides and hepatic lipogenic genes in broiler chickens. *General and Comparative Endocrinology*, 229, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.03.007>
- Pols, T. W. H., Noriega, L. G., Nomura, M., Auwerx, J., & Schoonjans, K. (2011). The bile acid membrane receptor TGR5: A valuable metabolic target. *Digestive Diseases*, 29(1), 37–44. <https://doi.org/10.1159/000324126>

- Romano, N., Kumar, V., Yang, G., Kajbaf, K., Rubio, M. B., Overturf, K., Brezas, A., & Hardy, R. (2020). Bile acid metabolism in fish: disturbances caused by fishmeal alternatives and some mitigating effects from dietary bile inclusions. *Reviews in Aquaculture*, 1–26. <https://doi.org/10.1111/raq.12410>
- Ros, E. (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 151(2), 357–379. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00456-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00456-1)
- Sarkar, A., Ye, A., & Singh, H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*, 60, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.018>
- Siyal, F. A., Babazadeh, D., Wang, C., Arain, M. A., Saeed, M., Ayasan, T., . . . Wang, T. (2017). Emulsifiers in the poultry industry. *World's Poultry Science Journal*, 73(3), 611–620. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000502>
- Sipka, S., & Bruckner, G. (2014). The immunomodulatory role of bile acids. *International Archives of Allergy and Immunology*, 165(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000366100>
- Staessen, T. W. O., Verdegem, M. C. J., Weththasinghe, P., & Schrama, J. W. (2020). The effect of dietary non-starch polysaccharide level and bile acid supplementation on fat digestibility and the bile acid balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 523. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735174>
- Torcello-Gómez, A., Maldonado-Valderrama, J., de Vicente, J., Cabrerizo-Vílchez, M. A., Gálvez-Ruiz, M. J., & Martín-Rodríguez, A. (2011). Investigating the effect of surfactants on lipase interfacial behaviour in the presence of bile salts. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 809–816. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.007>
- Vakhlu, J., & Kour, A. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–85. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue1-fulltext-9>
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Nieto, S. (2002). El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Revista chilena de nutrición*, 29(2), 106–115. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182002000200005>
- Vinarov, Z., Petkova, Y., Tcholakova, S., Denkov, N., Stoyanov, S., Pelan, E., & Lips, A. (2012). Effects of emulsifier charge and concentration on pancreatic lipolysis. 1. In the absence of bile salts. *Langmuir*, 28(21), 8127–8139. <https://doi.org/10.1021/la300366m>
- Zhou, H., & Hylemon, P. B. (2014). Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids*, 86(May), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.04.016>