

Uso de la técnica del intestino invertido como un modelo de estudio de digestión y absorción en el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*)

María Teresa Viana*, Antonio Rosas, Emmanuel Martínez; Emyr Peña; Armando Shimada; Rafael Vázquez y Louis D' Abramo

*Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California. Km 107 Carretera Tijuana Ensenada, 22860 Ensenada Baja California, México.

Resumen

El cultivo de atún aleta azul en México está creciendo a un ritmo muy acelerado. Pero su desarrollo está llegando al límite ya que la sardina fresca su alimento natural es escasa, por lo que urge el desarrollo de dietas balanceadas. El medir la digestibilidad aparente es un instrumento útil para conocer los requerimientos de una especie, y esencial para formular alimentos balanceados. Información que no existe para peces como el atún, o para cualquier pelágico de gran tamaño, además que de poderse llevar a cabo el confinamiento de estos organismos resulta difícil tanto por lo económico como por lo accesible. Es entonces necesario desarrollar mecanismos alternos *in vitro*, que además de ser poder realizarse sean confiables. Es así que el presente trabajo muestra los adelantos hechos hasta ahora sobre el potencial digestivo del atún (perfil enzimático y caracterización) y asimilación de aminoácidos (intestino invertido). Este último se realizó en tres especies carnívoras con el fin de hacer comparaciones, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldii*) y el atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). El perfil de enzimas digestivas se llevó a cabo en el atún alimentado con sardina fresca, mientras que la asimilación fue estudiada en las tres especies.

Introducción

El cultivo de peces marinos, y en particular la del atún es una actividad que esta cobrando importancia en México ya que al desarrollarse en el mar permite su engorda en encierros marinos a partir de juveniles capturados del medio natural, denominándolos ranchos atuneros, actividad que está creciendo a un ritmo muy acelerado. Sin embargo, su desarrollo puede llegar a su límite en un futuro cercano, ya que la sardina fresca su alimento natural es un recurso limitante, por lo que urge el desarrollo de dietas balanceadas. Si bien se establece (Zertuche et al., 2008) que la pesquería de la sardina no ha sufrido cambios desde el inicio del cultivo del atún en Baja California. Este será sin lugar a dudas “el talón de Aquiles” para el desarrollo de esta actividad en un futuro, ya que para abastecer la demanda de este recurso se podría crecer aún mucho más sin saturar los mercados con el atún.

Hoy en día existen 18 ranchos atuneros registradas de las cuales sólo 10 están en operación con una producción entre 3 y 3500 toneladas al año. La engorda de atún tarda 4 meses, tiempo en el que cada pieza alcanza los 900 dólares por pieza (entre 20 y 26 US\$ por kg, precio al mayoreo). Cada encierro de atún consiste en una jaula flotante de 50 m de diámetro y 20 m de profundidad, con una capacidad de 100 ton de atún por encierro. Esta forma de engorda hace sumamente difícil el poder realizar experimentación *in situ* para hacer las pruebas pertinentes para el desarrollo de alimento balanceado. Otra manera ideal sería contar con la infraestructura necesaria para realizar investigación en nutrición para conocer, no sólo los requerimientos nutricionales de la especie sino también estudiar el aprovechamiento de los nutrientes (asimilación) con respecto al alimento ingerido (digestibilidad) por lo que sería necesario contar con estanques de gran magnitud dedicados exclusivamente para la investigación de ésta especie. Entonces resulta necesario recurrir a técnicas indirectas que nos permita medir la utilización y aprovechamiento de los nutrientes.

La digestibilidad aparente al permitirnos medir los nutrientes aprovechados por el organismo es una herramienta clave, pero requiere de ser practicada de manera directa. El estudio de sistemas *in vitro* para especies domésticas terrestres a pesar de haber sido exhaustivo (Boisen y Eggum, 1991, Van Soest, 1994), por lo general solo consideran el potencial de hidrólisis de la mezcla

enzimática que se utiliza sobre el alimento en cuestión sin resolver la absorción de nutrientes, donde generalmente la información es interpretada como la calidad proteica de un ingrediente para un organismo determinado (Tanaka, 1973, Ezquerra et al., 1997; Ezquerra et al., 1998). De esta manera nos da una idea del potencial de digestión de una determinada especie hacia un grupo de ingredientes determinado y no a lo que realmente podrá ser aprovechado por el organismo en cuestión.

Un modelo novedoso para medir la digestibilidad *in vitro* es mediante el desarrollo de modelos dinámicos gastrointestinales *in vitro*, modelos que fueron creados en el campo de la farmacología humana y que han permitido evaluar la permanencia y absorción de fármacos dentro del organismo evitando así la investigación directa con humanos. Este combinaría los métodos para medir la digestibilidad *in vitro*, junto con un sistema para medir la absorción (asimilación) de los nutrientes a través del uso del intestino fresco invertido del organismo y medir la cantidad de nutrientes que son absorbidos (Berge *et al.*, 2004).

Lo innovador de este trabajo radica en el generar conocimiento básico sobre la absorción de nutrientes (aminoácidos), información necesaria para poder implementar este modelo gastrointestinal dinámico *in vitro* para el atún.

Materiales y Métodos

Uso de vísceras frescas y homogenizados enzimáticos

La absorción o asimilación de nutrientes se realiza principalmente en la sección proximal del intestino. Ahí se encuentran numerosos paquetes proteicos dedicados al transporte de los mismos que mediante diversas maneras permiten el ingreso de aminoácidos libres y pequeños péptidos a través de la membrana cerosa del intestino. El transporte se lleva a cabo de distintas maneras siendo más efectivo a través del transporte activo. Es decir, se requiere de la presencia de ATP y oxígeno para que se lleve a cabo.

Para que los segmentos del intestino puedan ser utilizados *in vitro* es necesario que se encuentren frescos y su función celular no haya sido afectada. Para esto, es importante medir la viabilidad celular, prueba que se remite a medir la actividad de enzimas mitocondriales de la respiración.

El uso de intestino invertido se ha utilizado desde hace mucho tiempo, técnica desarrollada para la farmacología humana en donde intestinos de rata eran utilizados debido a su gran semejanza con su equivalente en el humano (Daniel, 2004; Fearn and Hirst, 2005). También artículos anteriores demuestran su utilidad en el estudio de la asimilación de monogástricos como en el cerdo y pollo (Kushak y Basova, 1988).

En el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California estamos trabajando desde hace 4 años con el uso de intestino invertido para medir la asimilación de aminoácidos en distintas especies de peces. La finalidad, aparte de estudiarlo en el caso del atún, es el poder desarrollar un como modelo para medir la asimilación en varias especies acuáticas de manera dinámica (cinética de asimilación) así como el potencial de absorción de nutrientes.

En peces desde hace muchos años se han reportado estudios sobre asimilación en intestino invertido (Buddington et al., 1987) sólo que a diferencia de nuestra investigación, dichos trabajos se concentran a una asimilación estática de uno o entre dos aminoácidos. Trabajos que de manera similar se han reportado para varias especies como el salmón entre otras (Berge et al., 2004).

La asimilación de aminoácidos a través de una serie de transportadores debe darse dependiendo de una serie de condiciones que dependa del estado general de salud, dinámica e interacción de nutrientes presentes. Es por esto, que pensamos que el estudio de asimilación *in vitro* con la técnica del intestino invertido sea de gran importancia para comprender y estimar el proceso de una manera global. Por esto, nosotros estudiamos la asimilación en conjunto mediante el uso de homogenizados enzimáticos en condiciones lo más reales posibles y así estudiar una posible interacción entre nutrientes y su efecto integral en el aprovechamiento de los nutrientes, como lo es el medir la cinética de absorción.

Nuestro trabajo consiste en obtener aparatos digestivos de atún directamente del sacrificio en los ranchos atuneros o de distintas producciones acuícolas. Y con estos se obtienen dos cosas distintas: el extracto enzimático para su caracterización e hidrólisis de las posibles fuentes de nutrientes (naturales o balanceados) y el estudio de asimilación.

Homogenizado enzimático

Los aparatos digestivos se transportan en hielo al laboratorio donde se diseccionan separando las diferentes zonas (estómago, intestino proximal, medio y distal, páncreas e hígado). Cada sección se homogeniza 1:3 (v/v) en una solución salina (1% NaCl). El extracto se centrifuga (10,000 rpm) durante 15 min y el sobrenadante se dializa contra una solución amortiguadora (0.08M citrato fosfatos pH 8.0 y 0.1M glicina-HCl pH 3 para el extracto del estómago) durante 5 horas a 4°C con recambios continuos de amortiguador. La proteína se cuantifica mediante el método de Bradford utilizando un kit de Biorad.

Las actividades a medir son las siguientes: Proteasas totales alcalinas: Método de azocaseína (Sarath et al., 1989). Proteasas totales ácidas (pepsina): Método de Sarath et al. (1989), utilizando hemoglobina al 2% como sustrato. Tripsina: Método de Worthington, (1979) utilizando TAME como sustrato midiendo el cambio de absorción por el tiempo. Quimiotripsina: método de Hummel (1959) modificado por Applebaum et al. (2001), utilizando BTEE como sustrato, midiendo el cambio en la absorbancia en el tiempo. Aminopeptidasa: Método descrito por Appel (1974). Lipasas: Método propuesto por Gjellesvik *et al.* (1992) y amilasas: Utilizando almidón como sustrato (Worthington, 1979). La caracterización se basó en obtener pHs óptimos y temperaturas (resultados no mostrados por falta de espacio).

Tasa de absorción o asimilación. Intestino invertido

El intestino completo se remueve del pez inmediatamente después del sacrificio y así es llevado al laboratorio en un tiempo no mayor a 1 hora. Los intestinos se lavan con solución Ringer fría (145 mM NaCl, extra de NaCl para las especies marinas), consistente en 2.5 mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 2.5mM KH₂PO₄ y 10 mM HEPES a un pH de 7.4. Los pedazos a medir se cortan en segmentos de 10 cm para el atún y 5 para trucha y totoaba, calculando la proporción

de pez con la longitud del segmento proximal. Los intestinos se voltean con ayuda de una aguja e hilo y empujando con una varilla de vidrio. Se montan en un vaso diseñado especialmente para este experimento como se muestra en la figura 1, sujetándolo a la varilla (hueca), para de ahí tomar directamente las muestras a través del tiempo.

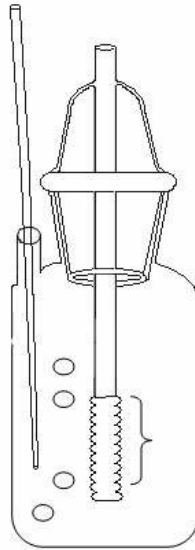


Fig. 1. Vaso diseñado para medir la asimilación mediante el intestino invertido en peces

Los frascos deben contener 80mL de una solución de hidrolizado proteico que en esta ocasión, con el fin de estandarizar la metodología se utilizó una mezcla con triptona a 50mg / mL (digerido pancreático de la caseína) y adentro del intestino se utiliza la solución Ringer compensando con NaCl la concentración de triptona. Para las especies marinas, se debe compensar la concentración del agua de mar de acuerdo a lo reportado por Berge et al., (2004). Con el fin de medir la cinética de absorción se toman alícuotas de 60 μ L a diferentes tiempos. Por el tubo lateral del frasco una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ se burbujea de manera continua para asegurar la presencia de oxígeno. Con el fin de medir si la absorción es afectada por el grado de frescura, intestinos de trucha arco iris fueron utilizados en fresco, a las 8 h postmortem y en presencia de CO₂.

La cinética de absorción y absorción máxima es entonces comparada con el fin de que se requiera, ya sea entre especies, diferentes secciones del organismo o diferentes soluciones

conteniendo hidrolizados proteicos. Todas las alícuotas generadas en estos estudios son congeladas a -80C para su posterior análisis en el HPLC.

Diseño experimental

Cada segmento proximal del intestino se mide entre 3 a 6 tiempos diferentes y con un mínimo de triplicado, ya sea al mismo tiempo, o en un bloqueo aleatorio por el tiempo.

Caracterización de las fracciones de péptidos y aminoácidos mediante HPLC.

Se utiliza el sistema de Waters AccQ•Tag™, (Waters, 1993) para la cuantificación de los aminoácidos. En la fase estacionaria se usa una columna AccQ•Tag “Amino Acid Analysis Column” de fase inversa 4 µm Nova Pak™ C₋₁₈ de 3.9 mm x 150 mm embebida en acetonitrilo / agua (50% / 50%), con detector de fluorescencia.

Resultados preliminares

La actividad enzimática en las distintas regiones del atún se mostró una elevada actividad de pepsina en el estómago y la actividad de tripsina, quimiotripsina y lipasa que disminuyó del intestino proximal al distal. La amilasa también estuvo presente a lo largo del aparato digestivo. La actividad proteásica fue mayor entre los pH 7 y 9 aunque la del tipo de pepsina a 3, mientras que la actividad de la amilasa fue desde 5 a 9 (Cuadro 1).

La cinética de absorción mostró una curva sigmoide en donde a los 20 min se llegó a la velocidad máxima en las tres especies (resultados no mostrados). En el experimento con trucha es evidente la necesidad de la presencia de oxígeno, ya que sin oxígeno y bajo la presencia de CO₂, la absorción fue significativamente diferente siendo 10 veces menor que la observada bajo condiciones normales. Por otro lado, a las 8 horas después de haber llegado al laboratorio la absorción mostró tendencias especiales, como la preferencia de absorción hacia los aminoácidos glucogénicos (glu y ala) (Figura 2 y 3).

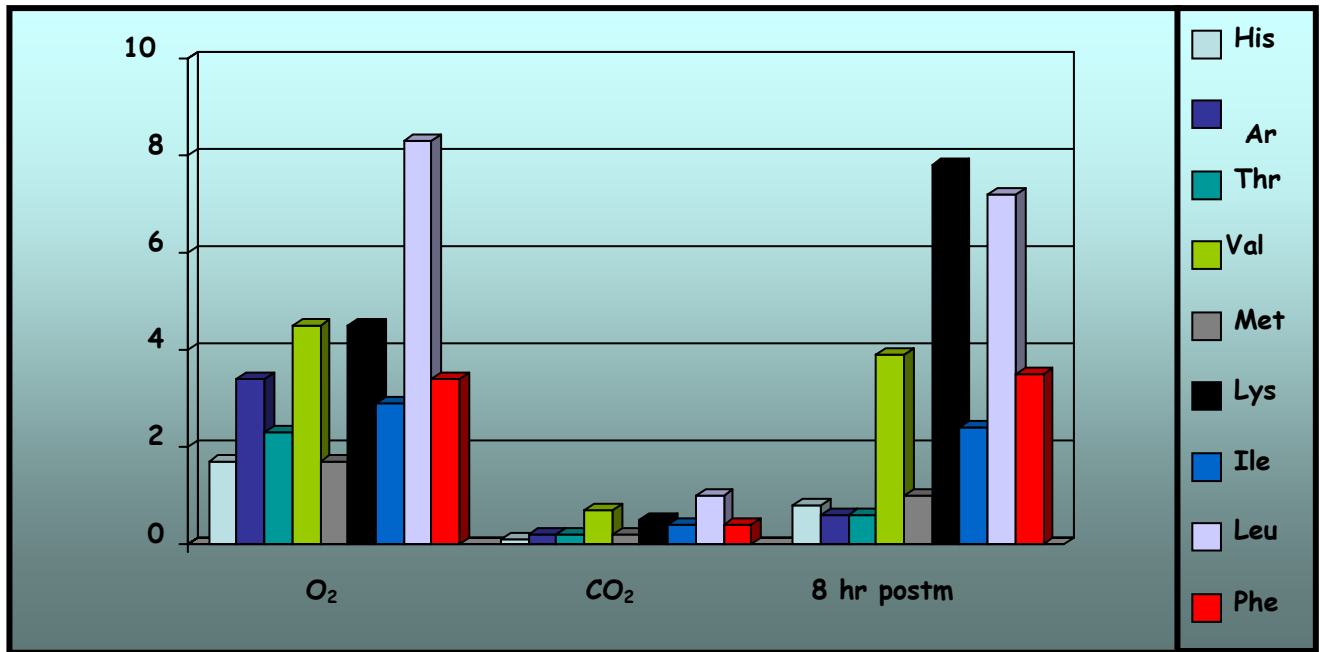
Se observó en general que un 69.2% de los aa absorbidos correspondieron a los esenciales y 30.8% no esenciales. Los aminoácidos se absorben de manera independiente a la concentración en la que se encuentran en solución, donde los dos aa esenciales con menor concentración en la solución inicial y mayor absorción fueron la thr y ser.

La velocidad de absorción (Figura 3) y absorción máxima a los 20 minutos fue 10 veces menor para las especies de agua de mar que lo que se observó en la trucha arco iris (Cuadro 4 y 5).

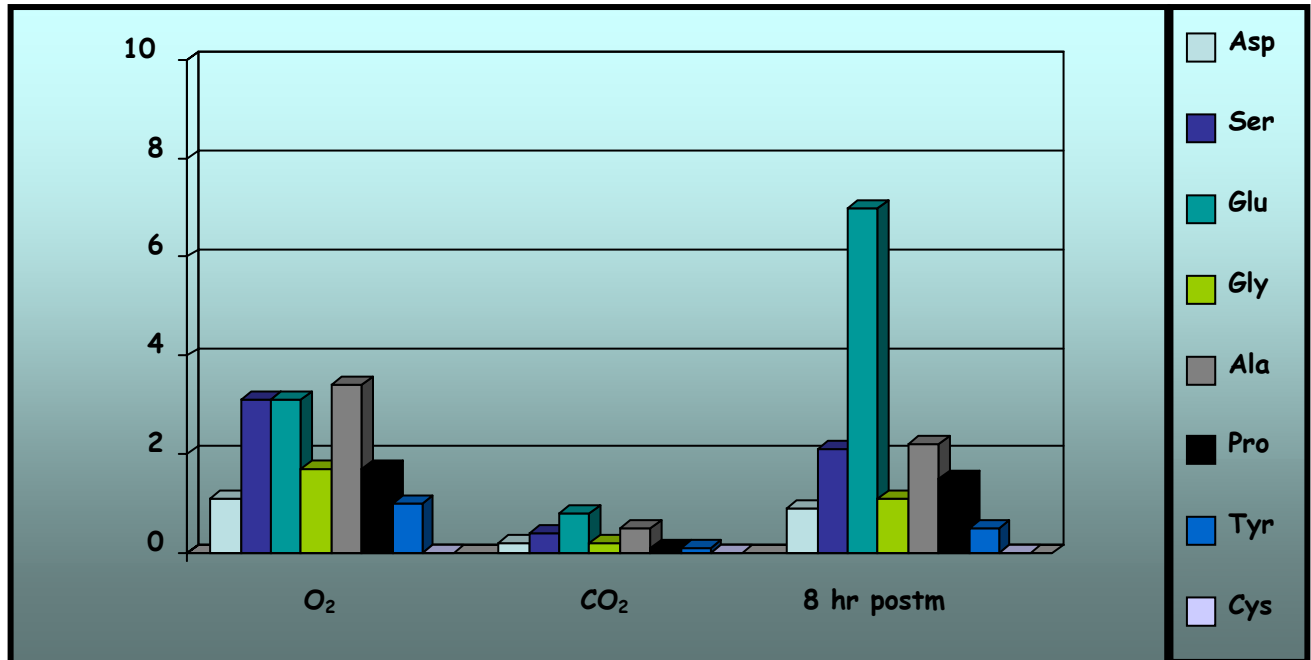
Cuadro 1. Actividad específica de las diferentes enzimas presentes a través del tracto digestivo del atún aleta azul *Thunnus orientalis*.

Enzimas	pH	Actividad específica (U/mg proteína) de extractos crudos				
		Estómago	Cecae	Intestino proximal	Intestino medio	Intestino distal
Tripsina	8.2	-	13.95±8.0 ^a	0.26±0.1 ^b	0.25±0.1 ^b	0.12±0.0 ^b
Quimiotripsina	8.1	-	265.7±42.3 ^a	317.1±84.2 ^a	204.6±60.4 ^{ab}	114.2±29.1 ^b
Proteasas alcalinas	8.1	-	16.9±5.8 ^a	9.6±2.8 ^a	4.4±2.0 ^a	0.7±0.3 ^b
Pepsina	2.0	41.3±15.3	-	-	-	-
α-Amilasa	6.9	-	37.6±5.9 ^a	23.8±6.8 ^{ab}	16.1±3.8 ^{bc}	9.7±2.9 ^c
Lipasa	7.4	-	27.5±4.6 ^a	3.9±1.1 ^b	2.1±0.2 ^c	1.5±0.5 ^c
Aminopeptidasa	8.0	-	-	0.01±0.0	0.01±0.0	0.01±0.0

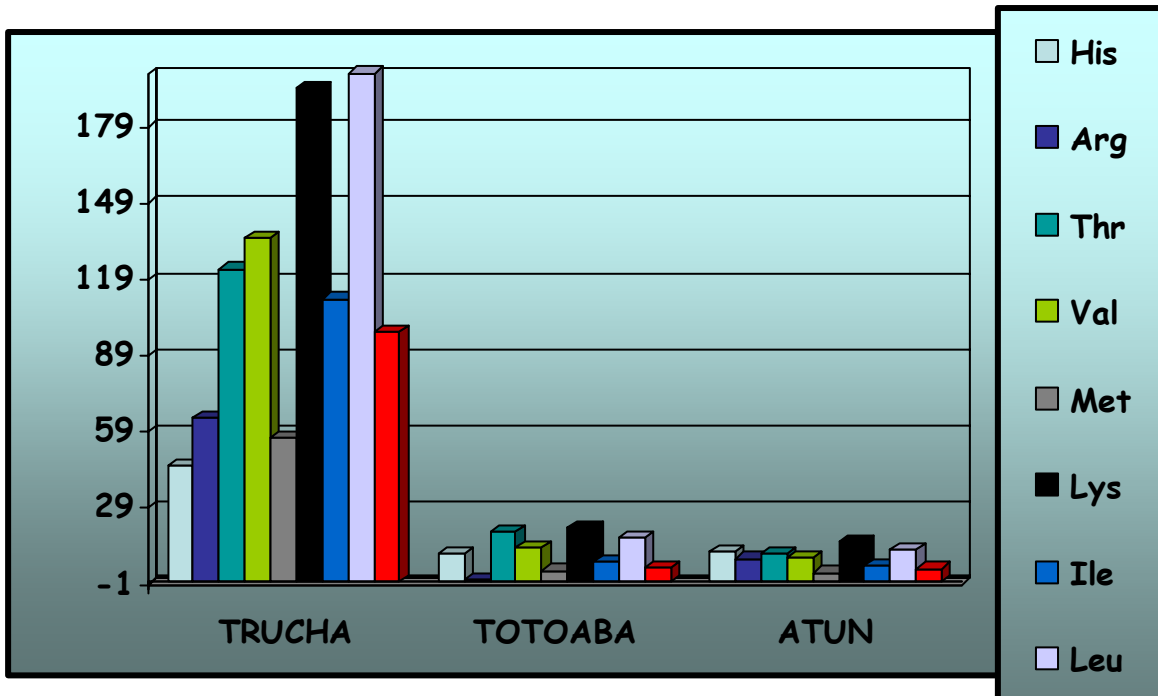
Los valores están dados en promedio y errores estándar de 6 individuos. Las letras diferentes como superíndices indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



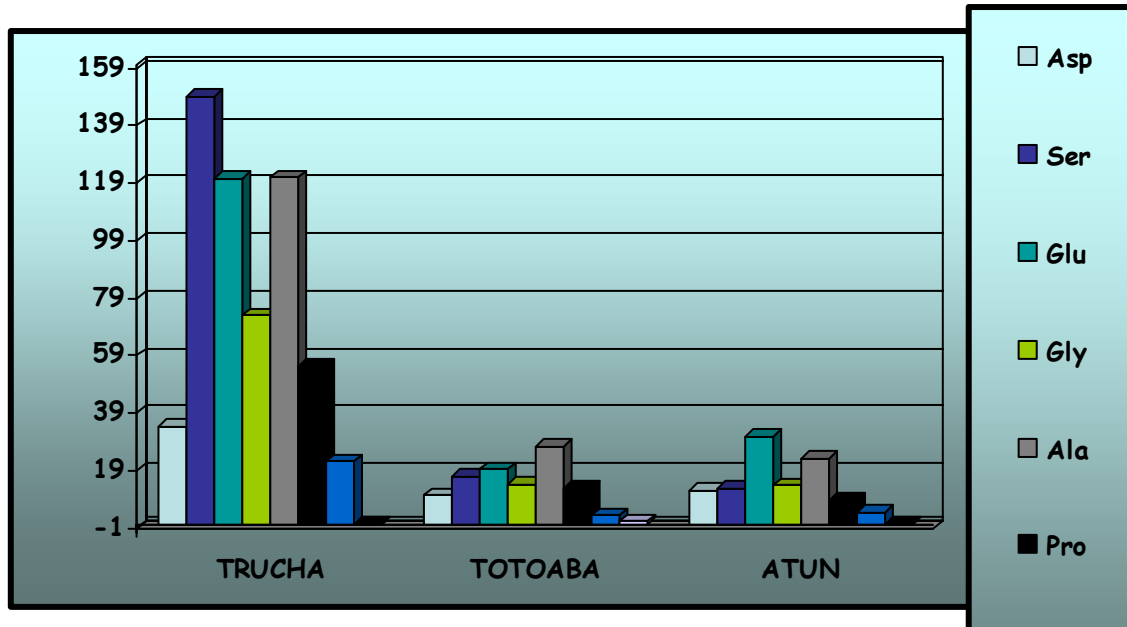
Cuadro 2. Absorción de aminoácidos esenciales en una prueba de viabilidad de tejido utilizando intestinos invertidos de Trucha bajo condiciones normales de oxígeno (O₂), en presencia de CO₂ y después de 8 horas postmortem.



Cuadro 3. Absorción de aminoácidos no esenciales en una prueba de viabilidad de tejido utilizando intestinos invertidos de Trucha bajo condiciones normales de oxígeno (O₂), en presencia de CO₂ y después de 8 horas postmortem.



Cuadro 4. Comparación en la velocidad de absorción de aminoácidos esenciales entre diferentes especies utilizando la técnica de intestino invertido. Secciones de intestino proximal fueron evaluadas durante 30 min. Velocidad dada como $\text{nmol cm}^2 \text{min}^{-1}$



Cuadro 5. Comparación en la velocidad de absorción de aminoácidos no esenciales entre diferentes especies utilizando la técnica de intestino invertido. Secciones de intestino proximal fueron evaluadas durante 30 min. Velocidad dada como $\text{nmol cm}^2 \text{min}$

Conclusiones y Recomendaciones

Este es el primer trabajo que describe la cinética de absorción de un pool de aminoácidos en peces, resultando de mucha utilidad para predecir el aprovechamiento de la proteína en especies acuáticas. El potencial digestivo del atún a través de la caracterización enzimática demuestra una alta actividad de proteasas y lipasas. Es importante notar elevada cantidad de actividad de amilasa la cual será importante para la digestión de almidón utilizado en dietas balanceadas. Esta información será útil para desarrollar los homogenizados enzimáticos para la digestibilidad, necesarios para la evaluación de la asimilación con el intestino invertido.

Ya que urge el desarrollo de alimentos balanceados para la industria acuícola del atún y otras especies susceptibles a desarrollarse en maricultivos, este trabajo podrá ser la base para estudiar los requerimientos nutricionales con el fin de balancear alimentos a proteína ideal con una reducida cantidad de desechos nitrogenados (amigables con el medio ambiente) y un máximo de eficiencia proteica.

Este método requiere de la utilización de intestinos frescos de cada especie ya que se muestran diferencias de absorción en la velocidad de absorción así como su absorción máxima. Se detectaron algunas diferencias entre la preferencia de absorción de los aminoácidos entre especies. Es un método económico y accesible que podrá ser implementado fácilmente, sin embargo, aún se requiere hacer más estudios que determinen el porque la trucha presenta una absorción mayor que las especies de agua de mar y su relación con la conversión alimenticia, así como estudiar la absorción en otros segmentos del intestino.

Este proyecto podrá dar un nuevo giro a las evaluaciones de digestibilidad *in vitro* con asimilación, para organismos acuáticos para evaluar el aprovechamiento proteico que es uno de los parámetros más difíciles de evaluar en un ambiente acuático, sobre todo cuando se trata de peces marinos de gran tamaño, como son los túnidos, donde su manejo en el laboratorio es difícil y costoso. El sistema aquí propuesto, será de gran utilidad no sólo para determinar el grado de digestibilidad, sino también para estudiar los productos digestibles y su capacidad de ser absorbidos en un tiempo determinado.

Referencias

- Applebaum, S. L., R. Perez, J.P. Lazo, and G. J. Holt. 2001. Characterization of chymotrypsin Activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiol. Fish Physiol. Biochem.* 25:291-300.
- Berge G.E., Goodman, M., Espe, M., Lied, E. 2004. Intestinal absorption of aminoacids in fish: kinetics and interaction of the in vitro uptake of L-methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture* 229, 265-273.
- Boisen, S., Eggum, BO. 1991. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple stomach animals. *Nutrition Research Reviews.* 4, 141-162.
- Buddington RK, Chen JW, Diamond J (1987) Genetic and phenotypic adaptation of intestinal transport to diet in fish. *J Physiol* 393: 261-281
- Daniel, H. 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 2004. 66:361–84
- De Silva, S. S. and Anderson, T. A. 1995. *Fish Nutrition in Aquaculture*. Chapman Hall. 319 pp.
- Ezquerro, JM. García-Carreño FL. Y Carrillo, O. 1998. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*) • *Aquaculture*, 163, 1-2:123-136
- Ezquerro, JM. García-Carreño FL., Civera, R. y Haard, NF. 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*) • *Aquaculture*, 157, 3-4, 51-262
- Fearn R.A. Hirst B.H. 2005. Predicting oral drug absorption and hepatobiliary clearance: Human intestinal and hepatic in vitro cell models. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21 (2006) 168–178
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D., Walther, B.T., 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochim. Biosphys. Acta*, 1124:123-134.
- Hummel, B. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can J.Biochem. Physiol.* Vol. 37: 1394-1398.
- Kushak R. y Basova N. 1988. The Absorption of Free and “Peptide” Amino Acids in the Small Intestine of Chicks. *Camp. Biochem. Physiol.* Vol. 89A, No. 3, pp. 317-322, 1988
- Montaño-Vargas, J., Shimada, A., Vásquez, P. C. and Viana, M. T. 2002. Methods of measuring feed digestibility in the green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture*, 213: 339-346.
- Sarath, G., La Motte S., Wagner FW. Protease assay methods. In: BEYNON RJ., BOND JS. Ed. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford: IRL, 1989: 25-55.
- Scopes, R. K. (1988) *Protein purification. Principles and practice*. Second edition, Springer-Verlag. Australia.
- Stoll, V.S. y Blanchard, J.S. 1999. Buffers: Principles and Practices. In: Deutscher, M.P. (Ed), *Protein Purification. Methods in Enzymology*. Pp 24-38.
- Tanaka, M., 1973. Studies in the structure and function of the digestive system of teleost larvae. D. Agric. Thesis, Kyoto University, Japan.

- Vandepeer, M. E., Hone, P. W., Van Barneveld, R. J. and Havenhand, J. N. 1999. The utility of apparent digestibility coefficients for predicting comparative diet growth performance in juvenile greenlip abalone *Haliotis laevis*. *Journal of Shellfish Research*, 18 (1):235-241.
- Van Soest, P.V. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ed. Cornell Univ. Press. USA.
- Wee, K.L, Maguire, G.B. and Hindrum, S.M. 1992. Methodology for digestibility studies with abalone. II. Comparison of markers in an artificial diet for blacklip abalone (*Haliotis rubra*) and greenlip abalone (*H. laevis*). In: Paper Delivered at the Third Asian Fisheries Forum, Singapore.
- Worthington, (1979) *Enzymes and related biochemicals*. Millipore Corporation Bedford, Ma 01730. USA 210p.