

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



ABSORCIÓN INTESTINAL DE AMINOÁCIDOS EN EL ÁTUN ALETA AZUL (*Thunnus orientalis*), CON EL USO DE LA TÉCNICA INTESTINO INVERTIDO



T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

OC. EMYR SAÚL PEÑA MARÍN

ENSENADA BAJA CALIFORNIA, MEXICO.

Junio 2010.

**ABSORCIÓN INTESTINAL DE AMINOÁCIDOS EN EL ÁTUN ALETA
AZUL (*Thunnus orientalis*), CON EL USO DE LA TECNICA INTESTINO
INVERTIDO**

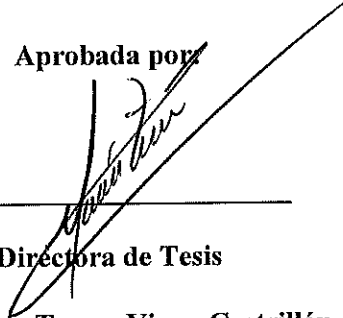
DEFENSA DE TESIS

QUE PRESENTA

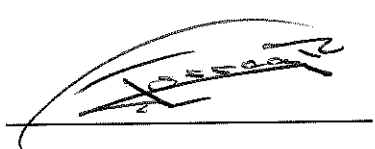
EMYR SAÚL PEÑA MARÍN

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

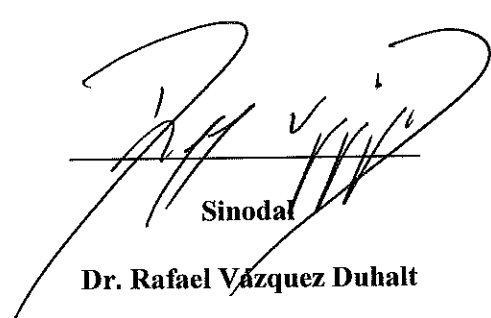
Aprobada por


Directora de Tesis

Dra. María Teresa Viana Castrillón


Sinodal

Dr. Juan Gabriel Correa Reyes


Sinodal

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Agradecimientos

A mis padres Gilberto Peña y Acela Marín, así como a mis hermanos Gilberto y Edgar por ser una familia con un apoyo total e incondicional.

Al Consejo nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de esta Maestría en Ciencias.

A la Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas, por haberme facilitado las instalaciones para llevar a cabo mis estudios.

A mi directora de tesis Dra. María Teresa Viana Castrillón, por ser mi profesora y guía dispuesta a otorgar mucho en Pro del aprendizaje de sus alumnos.

A mi sinodal Dr. Juan Gabriel Correa Reyes, por su amistad y apoyo otorgados tanto dentro como fuera de laboratorio.

A mi sinodal Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por su apoyo y tiempo dedicado durante las correcciones en la escritura de este trabajo.

Y a todas aquellas personas que me han otorgado apoyo y amistad durante este proceso.

III.7. RESULTADOS	38
III.8. DISCUSIÓN	41
IV. DISCUSIÓN GENERAL	47
V. REFERENCIAS	52

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Tasa de absorción ($\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) con desviación estándar y % de absorción total a 30 minutos, a partir de una solución de AAs (9 mg mL^{-1} BactoTM Tryptone) con lisina-HCl constante en concentración 10 mM , compitiendo con cuatro concentraciones de arginina-HCl en incremento ($3, 10, 20$ y 30 mM), usando la técnica intestino invertido en atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). 20

Cuadro 2. Tasa de absorción ($\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) con desviación estándar y % de absorción máxima a 30 minutos, a partir de una solución de AAs (9 mg mL^{-1} BactoTM Tryptone) con lisina-HCl constante en concentración 75 mM , compitiendo con cuatro concentraciones de arginina-HCl en incremento ($3, 10, 20$ and 30 mM), usando la técnica intestino invertido en atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). 21

Cuadro 3. Promedio de absorción total con desviación estándar y Porcentaje de absorción total obtenida a partir de una solución de AAs (20 mg mL^{-1} BactoTM Tryptone) con solución Ringer marina de 300 mOsm con tres niveles de taurina ($0, 24$ y 48 mOsmol), utilizando la técnica intestino invertido en el intestino proximal del atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). 40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Botella usada para método intestino invertido, donde el segmento de intestino proximal (PI) se ajusta a un tubo de vidrio (GT). El Gas carbógeno ($95\% \text{ O}_2$ y $5\% \text{ CO}_2$) es burbujeado a través de una entrada lateral (LE) y la toma de muestra es a través de la varilla central hueca. 16

I. INTRODUCCION GENERAL

I.1. ABSORCION DE NUTRIENTES

El proceso nutricional esta basado en la absorción celular, proceso por el cual una sustancia nutritiva debe atravesar la membrana apical (luminal), entrar a la célula del epitelio intestinal y de la célula pasar a la sangre atravesando la membrana basolateral. Este movimiento se realiza mayoritariamente a través de trasportadores, que son los encargados de los proceso de absorción tanto de iones como de moléculas orgánicas a través de la membrana y el cual representa un proceso básico de la función celular (Costanzo, 2000). La estructura de la mucosa intestinal es ideal para la absorción de grandes cantidades de nutrientes y en específico, la superficie del intestino delgado, la cual está dispuesta en pliegues longitudinales, de los cuales se proyectan vellosidades para aumentar dicha superficie de absorción. Estas vellosidades están cubiertas de células epiteliales (enterocitos), que se encargan de la absorción de nutrientes. Área llamada borde cepillo debido a su apariencia (Ferraris y Ahearn, 1984; Costanzo, 2000).

La absorción de nutrientes en células entéricas se lleva a cabo vía dos procesos: 1) la absorción de partículas o macromoléculas sin un proceso digestivo enzimático previo y 2) la absorción de pequeñas moléculas previamente digeridas, por procesos de simple difusión, difusión facilitada o transporte activo. Donde la absorción sin previa digestión (endocitosis), parece tener una contribución menor en la absorción proteica intestinal, con una porción entre el 1 y 6 %, del total proteico absorbido (Guillaume *et al.*, 2001).

La absorción por simple difusión a través de la membrana es directamente proporcional a la concentración del gradiente, y es la única forma de transporte no mediada por transportador, sin necesidad de energía y es descrita por una cinética no asintótica (lineal). La difusión facilitada, al igual que la difusión simple, actúa siguiendo un gradiente, pero a diferencia de la difusión simple, aquí se emplea un transportador de membrana que regula su paso. El transporte por difusión facilitada y transporte activo (primario y secundario) utiliza moléculas proteicas insertadas en la bicapa lipídica de membrana que funcionan como transportadores. En este tipo de transporte, las proteínas transportadoras tienen un número limitado de sitios de unión para el soluto y se requiere de ATP para poder transportar las moléculas. El transporte activo puede ser de dos tipos, el primario, que utiliza el ATP de manera directa y un ejemplo de este tipo de transporte es la Na^+/K^+ -ATP-asa que mantiene el gradiente de concentración de Na^+ y K^+ a través de la membrana y el secundario que no utiliza ATP de manera directa sino en donde un soluto se mueve a favor y el otro en contra del gradiente, utilizando por lo general Na^+ (Guillaume *et al.*, 2001, Costanzo, 2000).

I.2. ABSORCIÓN Y FUNCIÓN DE AMINOÁCIDOS

Durante la absorción intestinal, los aminoácidos libres (AAs) son transportados a través de la membrana vía Na^+ -independiente (transporte facilitado) o Na^+ -dependiente (transporte activo secundario), y sólo una pequeña porción del movimiento transmembrana es por mecanismos de difusión simple (Mailliard *et al.*, 1995). Los sistemas transportadores de AAs son agrupados en familias de acuerdo a su fuente de energía, cinética de absorción y/o especificidad de sustrato, por ejemplo transportadores

para AAs aniónicos, catiónicos, neutrales e imino (Matthews, 2000). El hecho que dos o más AAs puedan ser transportados por un mismo acarreador, puede generar la interacción o antagonismo entre los mismos. Esto debido a una interferencia en el metabolismo de un AAs, causado por la absorción de otro (Ball *et al.*, 2007).

Los AAs dietarios son necesarios para dos propósitos, primero para crecimiento, que consiste en la depositación de proteína y en segundo lugar para la subsistencia de un gran número de procesos que son descritos como manutención. Esto incluye la oxidación de los aminoácidos (como fuente energética), síntesis de otros compuestos nitrogenados principalmente a partir de AAs y para el recambio de proteína (Cowey, 1994).

I.3. TECNICA INTESTINO INVERTIDO

En los estudios sobre los requerimientos nutricionales de peces se recurre al uso de técnicas *in vitro*, que son de gran importancia para evaluar el grado de aprovechamiento de nutrientes. Entre éstas, está la técnica denominada intestino invertido que constituye una alternativa *in vitro* que permite la evaluación indirecta de la absorción de la proteína digestible. Ésta consiste en el uso de segmentos invertidos de diferentes partes del intestino fresco, para medir las moléculas que se transportan a través de la barrera intestinal, bajo distintas condiciones. El uso de esta técnica se remonta a más de 40 años, con estudios como los hechos por Smith (1969), donde se midió la absorción de glicina bajo varias condiciones en intestino de pez, así también, Pearson y Reich (1965) midieron el paso de hierro marcado en intestino de ratas albinas. Trabajos más recientes con el uso de la misma técnica, midieron la absorción de

fármacos utilizando ratas como modelo (Genty *et al.*, 2001; Strugala *et al.*, 2000) y la absorción de AAs en especies como cerdo (Buddington *et al.*, 2001) y peces (Berge *et al.*, 1999, 2004). En la mayoría de estos trabajos donde se mide la absorción de AAs, estos se utilizan de manera individual y/o marcados, hecho que puede influenciar en el efecto de absorción de algunos AAs, ya que se sabe que la presencia de AAs tanto en el medio de absorción como en medio intracelular, puede estimular el paso de otros AA (Mailliard *et al.*, 1995; Broer, 2008).

Recientemente, Rosas *et al.* (2008), dentro de un proyecto CONACYT en este mismo laboratorio, determinaron la cinética de absorción de diferentes peces carnívoros de agua marina y agua dulce, a partir de la técnica intestino invertido pero con una modalidad novedosa. A diferencia de otros trabajos, en éste se midió la cinética de absorción de cada uno de los AA sin marcarlos dentro de un perfil determinado. Es así que fue posible obtener la cinética de absorción de todo un pool de AA a partir de una solución de digerido pancreático de caseína (Tryptona). También, dentro de este mismo proyecto, Martínez-Montaña *et al.* (2010), realizaron la misma técnica con intestino invertido en atún aleta azul, pero variando la solución de AAs de absorción con la finalidad de simular un proceso de digestión-absorción completo. La solución consistió en un hidrolizado de músculo de sardina, obtenida a través de una digestión ácida (pepsina de cerdo a una actividad similar en unidades a la reportada por Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007), seguido por una digestión alcalina usando las enzimas obtenidas del homogenado de páncreas de atún aleta azul. En este estudio se realizaron 3 concentraciones diferentes del hidrolizado de músculo de sardina, con la finalidad de observar el efecto de éste en la absorción de los AAs. Con lo dicho anteriormente, la

técnica de intestino invertido es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de la absorción de diferentes moléculas, así como puede ser aplicado a una gama amplia de organismos.

El actual trabajo utilizó el método del intestino invertido para medir la absorción de un pool de AAs en segmentos de intestino proximal de atún aleta azul (*Thunnus orientalis*), para lo cual se realizaron dos experimentos con diferente enfoque, que conformaran dos diferentes capítulos. En el capítulo I, se investigó la posible interacción entre lisina-arginina al momento de su absorción. Es conocido en varias especies la existencia de un antagonismo o competencia entre arginina y lisina dietaria, ya que ambos AAs son catiónicos y comparten el mismo sistema transportador. Además, de formar parte de procesos fisiológicos importantes (Ball *et al.*, 2007). El capítulo II, se enfoca en investigar las características de absorción de taurina, y el efecto que pudiera presentar en la absorción de otros AAs. Taurina es un AA no formador de proteína estructural y tampoco se considera esencial, sin embargo se encuentra presente en su forma libre y en altas concentraciones en tejidos de organismos tanto terrestres como marinos. En algunas ocasiones la taurina se reporta como promotor de crecimiento (Matsunari *et al.*, 2005; Lunger *et al.*, 2007), además de estar relacionado con procesos fisiológicos de gran importancia (Huxtable, 1992). En estudios actuales realizados en este equipo de trabajo (no publicados), se ha encontrado altas cantidades de este AA en tejidos de intestino de atún aleta azul, razón que genera la inquietud de investigar sobre las características de absorción de este AA.

Es así que con estos estudios se continuó con la generación de conocimientos sobre la fisiología digestiva del atún aleta azul de engorda, así como se siguió con el desarrollo de un sistema gastro-intestinal *in vitro*.

II. CAPITULO I: INTERACCIÓN ENTRE LISINA-ARGININA

II.1. RESUMEN

Esta serie de experimentos fueron diseñados con la finalidad de estudiar el efecto de un posible desbalance entre los niveles de lisina y arginina al momento de su absorción en intestino proximal del atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Con esta finalidad, a un hidrolizado pancreático de caseína (9 mg mL^{-1}) se le agregaron diferentes niveles de lisina y/o arginina para medir la absorción del pool completo de aminoácidos (AAs) utilizando la técnica de intestino invertido. El diseño experimental se basó en un arreglo factorial (2×4) con dos niveles de lisina (10 y 75 mM), y cuatro concentraciones de arginina (3, 10, 20 y 30 mM) en muestras por triplicado. En los resultados se encontró una interacción entre la lisina y la arginina, donde la arginina parece actuar como estimulador para la absorción de la lisina, mientras que la lisina no presenta inhibición en la asimilación de la arginina. Los AAs no esenciales Glu, Gly y Ala presentaron una absorción preferente en comparación a los demás AAs del pool. Es así que los resultados obtenidos indican que el intestino de atún aleta azul presenta una interacción entre la lisina y la arginina, aunque no ejerciendo una competencia directa, lo cual sugiere un mecanismo que permite una absorción de AAs esenciales, aún en una situación de desbalance de los mismos.

II.2. INTRODUCCIÓN

La absorción intestinal de aminoácidos (AAs) en animales es compleja y envuelve un gran número de transportadores que se encuentran a lo largo del intestino en la membrana llamada borde en cepillo. Se le conoce así por la característica morfológica de estar comprendida por microvellosidades dando la apariencia de un borde en cepillo (Ferraris y Ahearn, 1984). Los transportadores son relativamente específicos para los diferentes AAs o clases de ellos (Mailliard *et al.*, 1995). Generalmente se considera que el transporte activo de AAs en el intestino delgado es dependiente de Na^+ , o está vinculado a un transportador (Nassar, 1989). Por ejemplo, la absorción celular de AAs catiónicos (AAC), es mediada por el mismo transportador en la mayoría de las células, con transporte independiente de Na^+ (Matthews, 2000; Closs y Mann, 1999). Sin embargo, existen evidencias que indican que las células apicales del intestino y tubos renales, poseen transporte dependiente de Na^+ , capaz de transportar AAs neutrales (AAN) y AAC (Closs y Mann, 1999; Mailliard *et al.*, 1995).

Los AAs de acuerdo a su biodisponibilidad y capacidad de síntesis en el organismo, se clasifican en esenciales y no esenciales. Tanto lisina como arginina son considerados AAs esenciales, es decir, se requiere su ingestión ya que el organismo no es capaz de sintetizarlo. La lisina limita la síntesis de proteína, además de ser precursor de la carnitina, que juega un papel importante en el transporte de largas cadenas de ácidos grasos hacia la mitocondria y que son necesarios para la beta-oxidación y por ende la generación de energía. De los AAs esenciales, los requerimientos de arginina, muestran un alto grado de variación entre especies, debido principalmente a su

capacidad de síntesis endógena (Alam *et al.*, 2002; Ball *et al.*, 2007), además de estar envuelta en varias rutas metabólicas, tales como la síntesis de proteína, la génesis de urea, el metabolismo del ácido glutámico, la síntesis de prolina, creatina, poliaminas y óxido nítrico entre otros (Fournier *et al.*, 2002). Por otro lado, en organismos acuáticos se utiliza arginina-fosfato como fosfógeno, lo que aumenta la capacidad energética durante ejercicio, para atender la llamada “energía de escape”, la cual puede llevarse a cabo bajo metabolismo aeróbico y anaeróbico (Hochachka y Somero, 2002).

El hecho de que lisina y arginina utilicen el mismo transportador sugiere que pudiera haber una competencia y/o interacción entre ellos al momento de ser transportados. Esto pudiera dar lugar a que el exceso de uno tuviera relación con la absorción de otro. De ser así se podrían generar diferencia de algunos de ellos, con una consecuente baja en la tasa de crecimiento, baja en consumo alimenticio e incluso la ocurrencia de lesiones patológicas y muerte (Alam *et al.*, 2002; Ball *et al.*, 2007). Estudios de competencia han confirmado que la mayoría de transportadores catalizan el transporte de diferentes AAs y esos diferentes transportadores pueden mostrar una especificidad de sustrato afín (Closs y Mann, 1999).

La domesticación de cualquier especie (en especial aquellas con valor comercial) requiere de estudios de los requerimientos nutricionales, que permitan un óptimo crecimiento con una alta eficiencia, traducida a una ganancia máxima en crecimiento con un costo mínimo. Actualmente, el requerimiento de proteína reportado para muchas especies, es definida como la ingesta de proteína con relación a la presencia de lisina. A partir de lo anterior se adopta el concepto de proteína ideal (Ball *et al.*, 2007). Este concepto es importante si se considera que la proteína es el componente más caro en

dietas para peces, ya que proporciona los AAs esenciales para crecimiento y reparación de tejidos. La optimización de la proteína dietaria, y un incremento en la retención por el pez, puede reducir los desechos nitrogenados e influir positivamente sobre los costos de producción (Ahmed and Khan, 2004). El requerimiento grueso de proteína está directamente influenciado por la composición de AAs en una dieta y por ende, el generar información sobre la interacción de AAs en peces es importante cuando se pretende usar fuentes proteicas alternativas y/o suplementación de AAs sintéticos en la composición de dietas (Berge *et al.*, 1999).

El atún aleta azul (*Thunnus orientalis*) es una especie que actualmente se explota comercialmente como parte de una actividad acuícola exclusivamente como engorda en ranchos atuneros que dependen de su captura y aún sin contemplar el ciclo completo del organismo (acuicultura basada en captura). Esta actividad se ha vuelto popular en muchos países, especialmente Australia, México y España, en donde muchas instalaciones de engorda en mar han proliferado. Para este tipo de cultivo, se usa como alimento a la sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caerulea*) de captura local. Estudios recientes sugieren que el stock de sardina del Pacífico aún no muestra un efecto adverso a su pesquería, sin embargo, se piensa que para que esta actividad sea sostenible, habrá que recurrir a la formulación de dietas balanceadas (Zertuche-González *et al.*, 2008). Para lograr esto, es necesario una serie de estudios sobre los requerimientos nutricionales de esta especie u otras especies factibles de ser cultivadas de la misma manera, siendo necesario su estudio directo (*in vivo*), situación que resulta difícil por el tamaño y comportamiento pelágico de esta especie en particular. Sin embargo, el

estudio *in vitro* nos podría permitir el conocer de manera indirecta sus requerimientos, siempre y cuando estos sean representativos.

La evaluación de los requerimientos de AAs ha sido determinada principalmente por el método de dosis-respuesta (*in vivo*), utilizando un grupo control alimentado con una dieta cuyo valor nutricional sea conocido, donde la mayor respuesta medida es el peso ganado. De esta manera, se ha determinado el requerimiento de lisina y/o arginina con dietas balanceadas en especies como *Salmo salar*, *Rhamdia quelen*, *Epinephelus coioides* y *Paralichthys olivaceus* (Berge *et al.*, 1997, 1998, 2002; Alam *et al.*, 2002; Abboudi *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006; Montes-Girao y Fracalossi DM., 2006). Algunos resultados indican que los niveles de AAs en plasma, son afectados por la cantidad relativa de arginina y lisina en las dietas, y que está directamente asociado a la capacidad digestiva que dará lugar a la disponibilidad e interacción entre AAs al momento de su absorción (Berge *et al.*, 1997, 1998).

La técnica denominada intestino invertido es una alternativa *in vitro* que permite la evaluación indirecta de la absorción de la proteína digestible. Consiste en el uso de segmentos invertidos de diferentes partes del intestino fresco, para medir las moléculas que se transportan a través de la barrera intestinal, bajo distintas condiciones. Este método ha sido usado como modelo en el estudio de absorción de fármacos para humanos utilizando ratas como modelo (Genty *et al.*, 2001; Strugala *et al.*, 2000) y para el estudio de absorción de AAs en especies como cerdo (Buddington *et al.*, 2001). En especies acuícolas varios estudios se han reportado tanto para especies agua dulce como marinas (Berge *et al.*, 1999, 2004; Rosas *et al.*, 2008; Martínez-Montañón *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos se ha medido la absorción de una sola molécula, marcada

radiactivamente. Es así como Berge *et al.* (1999), midieron la cinética de absorción y la interacción entre lisina y arginina (AAs marcados) con el método intestino invertido en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), donde se confirmó al igual que en otras especies, que la arginina y la lisina comparten el mismo sistema transportador. De igual manera concluyen que la arginina presenta una mayor afinidad que la lisina por un acarreador en común, considerándolo como un inhibidor más potente cuando se encuentra en altas concentraciones. De esta manera concluyeron que una mayor concentración de lisina en la dieta es requerida en comparación a la arginina, para obtener un balance en la absorción entre los dos AAs.

Rosas *et al.* (2008), en un estudio dentro de este mismo proyecto, determinaron la cinética de absorción de diferentes peces carnívoros de agua marina y agua dulce, a partir del uso del método intestino invertido pero con una modalidad novedosa. A diferencia de otros trabajos, consistió en medir la cinética de absorción de cada uno de los AAs dentro de un perfil determinado. Es así que en ese estudio fue posible obtener la cinética de absorción de todo un pool de AAs a partir de una solución de digerido pancreático de caseína (triptona), en donde se encontró que la absorción de AAs esenciales fue mayor que la de los no esenciales. Así también, dentro de este proyecto, Martínez-Montaña *et al.* (2010), utilizaron la misma técnica de intestino invertido pero variando la concentración del pool de AAs, para medir la velocidad de absorción de cada uno de ellos. Esta consistió en un hidrolizado de músculo de sardina, obtenida a través de una digestión ácida (pepsina de cerdo a una actividad-unidades/ml-similar a la reportada por Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007) para el atún y seguido por una digestión alcalina usando las enzimas obtenidas del homogenado de páncreas de atún aleta azul.

En virtud de formular dietas para peces con un perfil de AAs necesario para su óptimo crecimiento y mínimo desperdicio, el presente trabajo pretende continuar con estos estudios, ahora evaluando la posible competencia entre lisina y arginina, usando la técnica intestino invertido. Ésto con la finalidad de llegar al desarrollo del sistema gastrointestinal dinámico *in vitro*.

II.3. HIPÓTESIS

Si hay competencia de absorción entre lisina y arginina, entonces el aumento de uno perjudicará la absorción del otro y tendrá influencia en la absorción de los otros AAs.

II.4. OBJETIVO

Evaluar el efecto de un desbalance de amino ácidos en la absorción intestinal de atún aleta azul, focalizando en la competencia entre lisina-arginina, usando un pool completo de AAs con el método de intestino invertido en la porción proximal.

II.5. MATERIALES Y MÉTODOS

II.5.1. Obtención de Muestras

Vísceras de atún aleta azul (10-20 kilos) fueron obtenidas en una granja comercial de engorda durante el periodo de cosecha. Los intestinos fueron disectados y la sección intestinal después del ciego pilórico (denominado intestino proximal) fue separada, tomando una longitud aproximada de 10 cm. Los segmentos fueron puestos en solución fisiológica Ringer marina (117 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O y 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4 con 150 mM de NaCl adicional a la solución; Berge *et al.*, 2004) con burbujeo constante de gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y transportados cerca de 15 Km para su procesamiento en laboratorio.

II.5.2. Procedimiento Experimental

La experimentación consistió en un diseño factorial con dos niveles de lisina (10 y 75 mM) con cuatro concentraciones de arginina (3, 10, 20 y 3 mM), esto sobre una solución base de hidrolizado de caseína. Las soluciones se encontraban disueltas en solución Ringer marina (Berge *et al.*, 2004), con la finalidad de compensar la concentración osmótica. La solución base de hidrolizado consistió en un digerido pancreático de caseína (Tryptona; 9 mg mL⁻¹) de Becton, Dickinson and Company (DIFCO cat. no. 211705, Laurence, KS, USA). El nivel bajo de lisina (10 mM) provino en su totalidad de la triptona, mientras que sólo 2 mM de arginina provenía de triptona,

el resto fue suplementado. Es así que para los tratamientos elaborados de lisina 75 mM, 10 mM provenía de triptona y 65 mM de L-lisina-HCl (98.5% feed grade) de Archer Daniels Midland Company. De la misma manera, L-arginina-HCl (98.5-100% assay grade) de Sigma Aldrich (A-6969) fue usada para obtener las 4 concentraciones.

Cada segmento de intestino proximal de un pez fue considerado como una unidad experimental. Toda prueba fue basada en muestras por triplicado (de tres intestinos independientes), incluyendo un grupo control.

Los segmentos de 10 cm de intestino, fueron trabajados de manera rápida (no más de 15 minutos por intestino). El tejido seroso fue lavado con solución Ringer y después se voltearon cada uno de los segmentos con la ayuda de aguja e hilo. La parte distal del segmento se cerró con el hilo y la aguja se introdujo a través del lumen y se dirigió hasta el final del segmento. Esto con el fin de jalar y voltear el intestino sin maltratarlo. Cada segmento se lavó con solución Ringer, la parte distal del segmento invertido se cerró y la parte anterior se sujetó a un tubo de vidrio abierto de la tapa, para dar entrada libre a la micropipeta hacia el interior del intestino para tomar la muestra (Figura 1). Gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) fue burbujeadado a través del un tubo de vidrio delgado localizado a un lado (Figura 1).

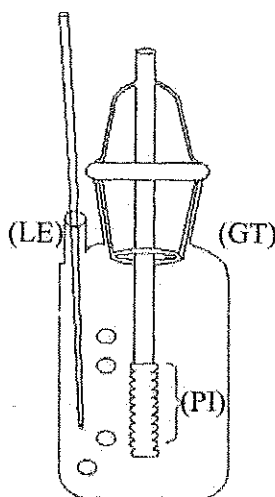
A cada segmento se le agregó por dentro una cantidad conocida de la solución Ringer marina y se sumergieron en una solución exterior (solución de AAs de los tratamientos en estudio).

A través de la varilla de vidrio (abierto) en donde se insertó el intestino invertido, se tomo una alícuota a diferentes tiempos (0, 10, 20 y 30 min). Las muestras fueron entonces congeladas a -80 °C hasta su análisis. Como control se utilizó solución Ringer

marina sin aminoácidos en la parte externa, con la finalidad de corregir la concentración de AA procedentes de los intestinos.

La tasa de absorción de AAs es reportada como $\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, mientras que el % total de paso a los 30 minutos, fue obtenido de la concentración total absorbida, reportada como pmol cm^{-2} .

Para calcular la tasa de absorción a partir de los 10, 20 y 30 minutos de muestreo, se utilizó una pendiente obtenida por el tiempo, compensando la concentración de la muestra extraída previamente.



Tomado de Rosas *et al.*, 2008

Figura 1.- Botella usada para método intestino invertido, donde el segmento de intestino proximal (PI) se ajusta a un tubo de vidrio (GT). El Gas carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) es burbujeadado a través de una entrada lateral (LE) y la toma de muestra es a través de la varilla central hueca.

II.5.3. Análisis de aminoácidos

La identificación de AAs se utilizó por HPLC utilizando el sistema de Waters AccQ•Tag™, equipado con un detector de fluorescencia. Se realizó la cromatografía de las muestras con una columna Waters de fase reversa (3.9 x 150 mm) AccQ•Tag™ y usando un gradiente agua-acetonitrilo recomendado por Waters AccQ•Tag™. El detector de fluorescencia Waters 474, fue configurado para una excitación a 250 nm y una emisión a una longitud de onda de 350 nm. Las muestras se analizaron a una temperatura constante de 40°C. La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución estándar de AAs que contenía de 12.5 a 300 pmol de cada aminoácido.

II.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para cada tratamiento de lisina (10 y 75 mM), se analizó la tasa de absorción de cada AA a las diferentes concentraciones de arginina (3, 10, 20 y 30 mM) y la absorción entre los AAs de un mismo pool fueron analizados por un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). En los casos donde se encontraron diferencias significativas entre tratamientos se realizó un análisis a posteriori de Tukey. Las diferencias significativas son reportadas para un nivel de $P < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el programa SIGMA STAT (Arlington, VA, USA).

II.7. RESULTADOS

La duración de los ensayos experimentales fue de 30 minutos, sin embargo la cinética de absorción mostró una fase lineal variable entre los minutos 20 y 30. Esta fase fue usada para los cálculos.

Los resultados obtenidos en el tratamiento con lisina a 10 mM, cuando la lisina es igual o menor a arginina (Cuadro 1), tanto lisina como arginina mostraron un aumento en la tasa de absorción conforme aumenta la arginina (0.42 ± 0.24 a 8.41 ± 1.60 y 3.33 ± 0.18 a 5.53 ± 0.67 $\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, lisina y arginina respectivamente). Sin embargo los valores de tasa de absorción cuando lisina esta en mayor concentración que la arginina (10 mM y 3 mM respectivamente), la lisina se absorbió con mayor velocidad que la arginina y ambas se absorbieron a mayor velocidad que el resto de las otras combinaciones. Aunado a esto, el aumento de la concentración de arginina (de 10 a 30 mM; Cuadro 1) incrementó la absorción de la lisina con respecto a los otros AAs.

Para el experimento cuando la lisina se suministro a 75 mM, se observó un aumento en la tasa de absorción de la lisina de 3.47 ± 0.15 a 8.31 ± 0.16 $\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, conforme se aumentaba la arginina. Aunado a esto, la tasa de absorción de lisina aumentó con respecto a los demás AAs de la solución cuando la concentración de arginina fue de 30 mM, siendo el AA con la mayor tasa de absorción. La arginina no mostró cambios significativos en su tasa de absorción aun cuando se encontraba 25 veces en menor concentración que lisina (Cuadro 2: con una relación 75:3 mM lisina:arginina).

En cuanto a la contribución que cada AA tuvo con respecto al total de AAs absorbidos (expresados como porcentaje de asimilación total (%)) a los 30 minutos en el tratamiento con lisina a 10 mM) se observó un aumento en la lisina conforme la concentración de arginina aumenta, variando de 6.4% a 9.0% del paso total, mientras que el porcentaje total de absorción de arginina mostró una tendencia a disminuir, variando entre 5.7% a 5.3% del paso total (Cuadro 1).

Del porcentaje de absorción en el tratamiento con lisina a 75 mM, se observó un aumento en la lisina cuando arginina aumentó de concentración, variando de 6.0% a 10.0 % del total. Sin embargo, durante este ensayo el valor de porcentaje de absorción total obtenido en la competencia lisina:arginina con concentración 75:20 mM respectivamente, no siguió el comportamiento antes mencionada. El porcentaje total de absorción de arginina se mantuvo constante durante el ensayo, variando entre 4.9 y 6.6% (Cuadro 2).

En ambos experimentos, el porcentaje de absorción total a los 30 minutos de los AAs no esenciales Glu, Gly y Ala fueron los más altos. En el tratamiento con lisina a 10 mM, el porcentaje de absorción de Glu, Gly y Ala fueron de 9.1-12.3, 9.2-11.5 y 10.1-11.6 % del total, respectivamente (Cuadro 1), mientras que en el tratamiento con lisina 75 mM, el paso fueron de 8.9-14.7, 9.1-10.8 y 10.2-12.9 % respectivamente (Cuadro 2).

En ambos tratamientos de lisina (10 y 75 mM), Glu, Gly y Ala, mostraron las mayores tasas de absorción del total de todos los AAs.

Sin tomar en cuenta la absorción de lisina-arginina, de los AAs esenciales se observó la mayor tasa de absorción y mayor porcentaje de absorción total para Thr, Val y Leu (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Tasa de absorción ($\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) con desviación estándar y % de absorción total a 30 minutos, a partir de una solución de AA (9 mg ml^{-1} Bacto™ Tryptone) con lisina-HCl constante en concentración 10 mM , compitiendo con cuatro concentraciones de arginina-HCl en incremento ($3, 10, 20$ y 30 mM), usando la técnica intestino invertido en atún aleta azul (*Thunnus orientalis*).

Amino ácidos	Tasa de absorción $\pm \text{DE}^1$ (Lys:Arg $10:3 \text{ mM}$)	Porcentaje de absorción total ² (%)	Tasa de absorción $\pm \text{DE}^1$ (Lys:Arg $10:10 \text{ mM}$)	Porcentaje de absorción total ² (%)	Tasa de absorción $\pm \text{DE}^1$ (Lys:Arg $10:20 \text{ mM}$)	Porcentaje de absorción total ² (%)	Tasa de absorción $\pm \text{DE}^1$ (Lys:Arg $10:30 \text{ mM}$)	Porcentaje de absorción total ² (%)
AA Catiónicos								
Arg	$9.04 \pm 0.72^{\text{ef}, \text{A}}$	6.7	$3.33 \pm 0.18^{\text{abc}, \text{B}}$	5.7	$5.36 \pm 0.29^{\text{abc}, \text{AB}}$	5.4	$5.53 \pm 0.67^{\text{abcde}, \text{AB}}$	5.3
Lys	$15.80 \pm 6.63^{\text{cd}, \text{A}}$	3.5	$0.42 \pm 0.24^{\text{cd}, \text{D}}$	6.4	$4.65 \pm 3.94^{\text{abcd}, \text{C}}$	5.8	$8.41 \pm 1.60^{\text{abc}, \text{B}}$	9.0
His	$16.78 \pm 0.74^{\text{bc}, \text{A}}$	5.6	$3.94 \pm 0.79^{\text{abc}, \text{B}}$	6.9	$4.54 \pm 0.63^{\text{abcd}, \text{B}}$	6.1	$6.20 \pm 0.68^{\text{abcd}, \text{B}}$	5.4
AA Aniónicos								
Asp	$26.62 \pm 0.90^{\text{a}, \text{A}}$	9.1	$4.25 \pm 0.16^{\text{abc}, \text{B}}$	7.3	$7.46 \pm 1.57^{\text{ab}, \text{B}}$	8.0	$7.90 \pm 1.81^{\text{abc}, \text{B}}$	7.8
Glu	$22.06 \pm 0.80^{\text{ab}, \text{A}}$	10.5	$8.0 \pm 1.84^{\text{a}, \text{B}}$	12.3	$8.81 \pm 2.40^{\text{a}, \text{B}}$	12.0	$9.36 \pm 2.20^{\text{ab}, \text{B}}$	9.1
AA								
Zwitteriónicos								
Thr	$7.71 \pm 1.74^{\text{ef}}$	8.5	$4.6 \pm 0.003^{\text{abc}}$	8.0	$5.84 \pm 0.53^{\text{abc}}$	7.8	$7.73 \pm 1.27^{\text{abc}}$	7.4
Val	$5.54 \pm 1.40^{\text{efgh}}$	6.6	$3.09 \pm 0.13^{\text{abc}}$	5.3	$6.70 \pm 1.33^{\text{abc}}$	5.9	$6.75 \pm 2.19^{\text{abcd}}$	6.8
Met	$0.33 \pm 0.05^{\text{h}}$	0.6	$0.44 \pm 0.41^{\text{c}}$	1.6	$0.78 \pm 0.29^{\text{de}}$	0.9	$1.74 \pm 0.50^{\text{de}}$	1.3
Ile	$10.77 \pm 4.69^{\text{de}, \text{A}}$	4.0	$1.83 \pm 0.26^{\text{bc}, \text{B}}$	3.1	$4.0 \pm 0.89^{\text{abcde}, \text{B}}$	3.5	$4.42 \pm 1.44^{\text{bcde}, \text{B}}$	4.3
Leu	$5.85 \pm 1.64^{\text{efg}, \text{AB}}$	7.4	$3.28 \pm 0.12^{\text{abc}, \text{B}}$	5.6	$4.85 \pm 1.29^{\text{abcd}, \text{AB}}$	6.4	$8.12 \pm 2.89^{\text{abc}, \text{A}}$	8.0
Phe	$0.12 \pm 0.06^{\text{h}}$	0.04	$0.02 \pm 0.00^{\text{c}}$	0.04	$0.04 \pm 0.02^{\text{c}}$	0.04	$0.05 \pm 0.02^{\text{e}}$	0.1
Ser	$26.35 \pm 1.05^{\text{A}}$	8.5	$4.66 \pm 0.00^{\text{abc}, \text{B}}$	8.1	$6.40 \pm 0.67^{\text{abc}, \text{B}}$	8.6	$8.09 \pm 1.46^{\text{abc}, \text{B}}$	8.8
Gly	$26.37 \pm 1.0^{\text{a}, \text{A}}$	9.6	$6.2 \pm 0.35^{\text{ab}, \text{B}}$	11.5	$7.65 \pm 0.32^{\text{ab}, \text{B}}$	10.4	$8.08 \pm 0.86^{\text{abc}, \text{B}}$	9.2
Ala	$9.87 \pm 1.81^{\text{ef}, \text{AB}}$	11.6	$6.10 \pm 0.47^{\text{ab}, \text{B}}$	10.6	$8.55 \pm 1.0^{\text{a}, \text{AB}}$	11.5	$10.45 \pm 2.37^{\text{a}, \text{A}}$	10.1
Tyr	$2.13 \pm 0.42^{\text{gh}}$	2.49	$1.46 \pm 0.03^{\text{bc}}$	2.4	$2.54 \pm 0.76^{\text{cde}}$	2.6	$3.16 \pm 1.06^{\text{ode}}$	2.9
Imino AA								
Pro	$4.46 \pm 1.03^{\text{fgh}}$	5.19	$3.03 \pm 0.41^{\text{abc}}$	5.2	$3.80 \pm 0.35^{\text{bcde}}$	5.2	$4.13 \pm 1.21^{\text{bcde}}$	4.4

¹ Velocidad de absorción de cada amino ácido, usando la fase logarítmica de su cinética.

² Porcentaje de absorción de cada amino ácido a 30 minutos.

Cuadro 2. Tasa de absorción ($\text{pmol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) con desviación estándar y % de absorción máxima a 30 minutos, a partir de una solución de AA (9 mg ml^{-1} Bacto™ Tryptone) con lisina-HCl constante en concentración 75 mM, compitiendo con cuatro concentraciones de arginina-HCl en incremento (3, 10, 20 and 30 mM), usando la técnica intestino invertido en atún aleta azul (*Thunnus orientalis*).

Amino ácidos	Tasa de absorción $\pm$ DE ¹ (Lys:Arg 75:3 mM)	Porcentaje de absorción total ² (%)	Tasa de absorción $\pm$ DE ¹ (Lys:Arg 75:10 mM)	Porcentaje de absorción total ² (%)	Tasa de absorción $\pm$ DE ¹ (Lys:Arg 75:20 mM)	Porcentaje de absorción total ² (%)	Tasa de absorción $\pm$ DE ¹ (Lys:Arg 75:30 mM)	Porcentaje de absorción total ² (%)
AA Cationicos								
Arg	4.99 $\pm$ 1.92 ^{bcd}	5.1	4.23 $\pm$ 1.27 ^{ab}	6.1	5.16 $\pm$ 0.90 ^{abcd}	6.6	3.46 $\pm$ 0.71 ^{ab}	4.9
Lys	3.47 $\pm$ 0.15 ^{bcd, B}	6.0	3.57 $\pm$ 0.26 ^{ab, B}	7.0	3.73 $\pm$ 0.53 ^{bcd, B}	1.9	8.31 $\pm$ 0.16 ^{a, A}	10.0
His	3.53 $\pm$ 0.06 ^{bcd}	6.7	4.66 $\pm$ 2.70 ^{ab}	6.2	5.29 $\pm$ 3.32 ^{abcd}	6.1	4.49 $\pm$ 1.97 ^{ab}	5.9
AA Aniónicos								
Asp	6.28 $\pm$ 3.96 ^{abcd}	8.2	3.33 $\pm$ 0.00 ^{ab}	7.0	8.10 $\pm$ 1.36 ^{abc}	7.7	6.21 $\pm$ 3.35 ^a	8.0
Glu	11.74 $\pm$ 1.00 ^a	12.9	9.94 $\pm$ 2.15 ^a	14.7	10.32 $\pm$ 2.73 ^a	13.1	8.0 $\pm$ 1.31 ^a	8.9
AA								
Zwitteriónicos								
Thr	7.18 $\pm$ 2.02 ^{abc}	7.7	5.89 $\pm$ 2.09 ^{ab}	8.3	8.30 $\pm$ 3.31 ^{abc}	8.4	5.51 $\pm$ 1.91 ^{ab}	7.4
Val	2.61 $\pm$ 0.63 ^{bcd}	5.7	2.56 $\pm$ 0.08 ^b	5.5	5.51 $\pm$ 3.0 ^{abcd}	6.4	4.48 $\pm$ 2.09 ^{ab}	5.9
Met	1.12 $\pm$ 0.67 ^d	1.7	1.00 $\pm$ 0.27 ^b	1.5	1.09 $\pm$ 0.02 ^{cd}	0.5	1.42 $\pm$ 1.03 ^{ab}	2.2
Ile	1.67 $\pm$ 0.12 ^{bcd}	3.9	1.54 $\pm$ 0.01 ^b	3.4	3.43 $\pm$ 1.96 ^{bcd}	4.1	2.94 $\pm$ 1.68 ^{a, b}	3.8
Leu	2.71 $\pm$ 0.20 ^{bcd, B}	6.3	2.53 $\pm$ 0.05 ^{b, B}	5.8	8.09 $\pm$ 6.23 ^{abc, A}	7.2	4.68 $\pm$ 2.38 ^{a, b, AB}	6.1
Phe	0.02 $\pm$ 0.00 ^d	0.04	0.02 $\pm$ 0.00 ^b	0.04	0.03 $\pm$ 0.01 ^d	0.05	0.03 $\pm$ 0.01 ^b	0.04
Ser	6.28 $\pm$ 3.96 ^{abcd}	8.8	4.28 $\pm$ 0.06 ^{ab}	8.0	7.74 $\pm$ 0.23 ^{abc}	8.3	6.67 $\pm$ 2.74 ^a	8.7
Gly	8.91 $\pm$ 1.88 ^{ab}	10.2	5.28 $\pm$ 0.29 ^{ab}	9.7	8.46 $\pm$ 0.18 ^{abc}	9.1	8.05 $\pm$ 3.13 ^a	10.8
Ala	7.72 $\pm$ 3.15 ^{abc}	10.7	5.70 $\pm$ 0.15 ^{ab}	10.2	8.64 $\pm$ 2.56 ^{ab}	12.9	7.91 $\pm$ 2.56 ^a	10.7
Tyr	1.19 $\pm$ 0.20 ^{cd}	2.1	1.56 $\pm$ 0.70 ^b	2.2	1.96 $\pm$ 1.24 ^{cd}	2.4	1.60 $\pm$ 0.75 ^{ab}	2.1
AA Imino								
Pro	2.78 $\pm$ 1.40 ^{bcd}	4.0	3.19 $\pm$ 1.26 ^b	4.5	5.02 $\pm$ 0.24 ^{abcd}	5.4	3.42 $\pm$ 1.20 ^{ab}	4.6

¹ Velocidad de absorción de cada amino ácido, usando la fase logarítmica de su cinética.

² Porcentaje de absorción de cada amino ácido a 30 minutos.

II.8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en ambos tratamientos, indican la existencia de una interacción entre lisina y arginina al momento de su absorción en el intestino de atún aleta azul, aunque no ejerciendo una competencia directa. Esto corrobora el hecho que ambos posean un transportador en común, al igual como se reporta en otros organismos (Berge *et al.*, 1999, Mailliard *et al.*, 1995).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos del tratamiento con lisina 10 mM se puede inferir que la arginina presenta un efecto estimulador en la absorción de la lisina. Cuando la lisina se encuentra de 2 a 3 veces en menor concentración que la arginina, tanto su tasa de absorción como el porcentaje de absorción total aumentaron. En el experimento con lisina a 10 mM, la arginina aumentó su tasa de absorción cuando se encontraba de 2 o 3 veces a mayor concentración de la lisina. Sin embargo no es posible el precisar si este aumento se debe a un efecto estimulador de la lisina, o simplemente a que al encontrarse la arginina en mayor concentración hubiera pasado por difusión simple. La membrana borde en cepillo en el intestino de muchos peces, muestran dos mecanismos de transporte por lo menos, uno dependiente de Na^+ , sistema por medio de un acarreador saturable, y un sistema con acarreador no saturable, que puede ser considerado como difusión simple (Ferraris y Ahearn, 1984). Berge *et al.* (1999), además de encontrar una interacción entre arginina y lisina al momento de su absorción por medio de acarreadores saturables, también caracterizaron una difusión aparente de lisina y arginina en la absorción intestinal en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), donde se encontró que, la difusión aparente de arginina superó la absorción por medio de un

acarreador saturable, cuando altas concentraciones de arginina se encontraban en el medio de absorción (mayor a 12 mM).

Los resultados obtenidos en el tratamiento con lisina a 75 mM, corroboran el efecto de arginina de estimular la absorción de lisina, lo que se observa por el aumento tanto en porcentaje de absorción total como en la tasa de absorción, cuando la arginina aumenta su concentración (30 mM; Cuadro 2). En este mismo tratamiento, se observa que la lisina no genera una inhibición a la tasa de absorción de arginina.

De todos los tratamientos para ambos experimentos, sólo dos casos no siguen las tendencias antes mencionadas, el primer caso son las tasas de absorción obtenidas para la lisina y arginina en el tratamiento 10:3 mM lisina:arginina. Esto, seguramente debido a que el punto inicial para esta serie fue considerado cuando lisina y arginina se encontraban en concentraciones iguales (10 mM; Cuadro 1). El segundo caso es cuando la relación lisina:arginina está en concentración 75:20 mM respectivamente. En donde el porcentaje total de absorción tampoco siguió el mismo comportamiento encontrado (Cuadro 2) y no puede ser explicado.

Es aceptado que el transporte de la lisina y arginina es mediado principalmente por un sistema independiente de Na^+ (sistema y^+). Sin embargo también se ha reportado la existencia de otros sistemas capaces de transportar tanto AA catiónicos como neutrales con independencia (sistema $b^{0,+}$) y dependencia de Na^+ ($B^{0,+}$) (Mailliard *et al.*, 1995). Es así que bajo condiciones de alta concentración de algún AA, se genera un mayor paso por difusión, efecto que se asume afecta la competencia que se pudiera generar entre lisina y la arginina. En el presente trabajo se observa que si bien ambos pasan a través del transportador específico para ellos, generando algún tipo de

competencia, en los casos en los que alguno de ellos se encuentre en concentración alta, el otro también pueda ser absorbido e incluso su paso pueda ser estimulado. Si bien esto podría sonar contradictorio al pensar en una competencia directa entre dos AAs que usan el mismo transportador, es una condición lógica de que suceda para asegurar el suministro de ambos AAs, como lo es en el caso de recuperación después de haber sufrido un periodo de inanición.

Martínez-Montaña *et al.* (2010), observaron que la concentración de la solución de hidrolizado de músculo de sardina afecta la velocidad de absorción de la arginina y de la lisina, aumentando cuanto más concentrada era la solución y presentando un paso similar en ambos AAs. La absorción máxima de ambos AAs también presentó un paso similar (1:1) bajo las tres concentraciones. Estos resultados apoyan lo encontrado en el actual estudio, ya que al aumentar la concentración de la solución de hidrolizado, se aumenta la disponibilidad de la arginina, promoviendo una mayor absorción de la lisina. En el mismo experimento, la concentración inicial en el hidrolizado de sardina tanto de la lisina y arginina difería, hecho que pudiera indicar la existencia de un mecanismo que permite una absorción de AAs esenciales, aún en situación de desbalance de los mismos, como lo encontrado en el actual estudio.

El efecto estimulador de arginina sobre lisina encontrado en este trabajo, difiere con lo encontrado por Berge *et al.* (1999) en Salmón del Atlántico, donde se concluyó que la lisina posee un efecto estimulador e inhibitorio en la absorción de la arginina, mientras que esta última genera inhibición en el paso de lisina. En dicho trabajo se utilizaron estos dos AAs como moléculas solas y marcadas. A diferencia en el actual trabajo se midió la tasa de absorción de la arginina y la lisina interactuando con todo el

pool de AAs. Hecho que pudiera estar influenciando los resultados obtenidos. Mailliard *et al.* (1995) mencionan que los aminoácidos que interactúan en la parte interna y externa celular pueden cambiar la actividad de la cinética de algunos transportadores, donde las tasas de absorción pueden disminuir o acelerarse. Es reportado que la tasa de absorción de AAs catiónicos está influenciada por la presencia de otros AAs. Es así que se define la llamada trans-estimulación, la cual ya ha sido caracterizada, através de leucina intracelular hacia arginina y lisina (Broer, 2008; Mailliard *et al.*, 1995; Ferruzza *et al.*, 1997). También otra trans-estimulación generada por AAs catiónicos hacia AAs catiónicos intracelulares ha sido reportada (Broer, 2008). A un pH intracelular de entre 6 y 8, la lisina se encuentra cargada positivamente, entonces su flujo hacia afuera de la célula (vía membrana basolateral) es desfavorable, debido a la diferencia del potencial intracelular. Sin embargo, en presencia de una concentración alta de lisina (0.2 – 10 mM) que genere un gradiente interno, aunado a la entrada de un gradiente de sodio, favorecería el transporte de lisina hacia afuera de la membrana basolateral (Ferruzza *et al.*, 1997)

En el tratamiento con lisina 10 mM, se observa un efecto estimulador por parte de arginina cuando se encuentra hasta 3 veces en mayor concentración que lisina. Berge *et al.* (2002), encontraron en un trabajo *in vivo* en el salmón del atlántico, que una dieta con alta cantidad de arginina y baja de lisina (relación 2:1), generaban un crecimiento mayor que con otras dietas. Este resultado fue atribuido a los procesos relacionados con precursores de arginina, tales como el efecto estimulador de la insulina (IGF-I) y como precursor de poliaminas. En el presente trabajo, un efecto estimulador de arginina sobre la asimilación de lisina fue observado (Cuadro1).

En el presente trabajo se observa que de alguna manera el intestino de atún aleta azul, posee estrategias de regulación en la absorción ante la presencia de un desbalance entre AAs. El hecho que arginina no disminuya su tasa de absorción cuando lisina se mantuvo en concentración fija de 75 mM, soporta la existencia de esta regulación.

El intestino no solo es responsable de la digestión terminal y absorción de nutrientes, también juega un papel importante en catabolismo de muchos AAs. Estos son considerados como la fuente principal de energía de la mucosa intestinal y precursores para la síntesis de varias moléculas que son necesarias para la manutención e integridad de la mucosa. Se ha reportado que cantidades sustanciales de arginina en la dieta no está disponible para tejidos externos después de la absorción. En ratas adultas, el 40% de la arginina luminal absorbida por la mucosa intestinal es catabolizada en un solo paso y el 60% restante entra a torrente sanguíneo para su distribución (Wu, 1998). Resultados como éste sugieren que la mucosa del intestino juega un papel importante en la degradación de AAs esenciales, además que, los resultados obtenidos pueden estar altamente influenciados por los requerimientos metabólicos dentro del tejido intestinal.

En los dos experimentos realizados, los mismos AAs no esenciales Glu, Gly y Ala, los tres considerados como glucogénicos, presentan el paso más abundante de todos los AAs, sumando ~30% del paso total de todos los ellos. Martínez-Montañó *et al.* (2010) encontraron también en su estudio que los AAs no esenciales Glu, Gly y Ala presentaron las absorciones específicas más altas, sumando más del 40% del total de los AAs del hidrolizado: efecto independiente a la concentración de la solución de hidrolizado usado. La concentración o velocidad de absorción encontradas para éstos AAs podrían indicar la necesidad energética de los organismos (Wu, 1998). La Alanina

poseen gran importancia en la producción de energía en peces (Tseng y Hwang, 2008), relacionado al catabolismo de AAs glucogénicos como glutamato y aspartato (Wu, 1998). Rosas *et al.* (2008), encontraron una mayor absorción de AAs como Glu y Gly bajo condiciones de estrés (ausencia de oxígeno), utilizando éste mismo sistema de intestino invertido. Efecto que podría indicar la necesidad de energía por parte de las células. Es importante recordar que el atún es un pez pelágico, por lo que sus requerimientos de energía deben ser altos y constantes. En peces los AAs, más que los carbohidratos, son utilizados preferentemente como fuente de energía, además de su utilización para la formación de tejidos (Guillaume *et al.*, 2001). Hochachka y Somero (2002) mencionan que la oxidación de AAs como Ala, Glu y Pro genera 15, 27 y 30 ATP/AA respectivamente, energía similar a la generada por la oxidación de carbohidratos como piruvato (15 ATP/piruvato) y glucosa (36 ATP/glucosa).

Cowey (1994), menciona que la variación en el requerimiento de AAs esenciales en peces, puede ser atribuido a un gran número de factores, tales como diferencias en la composición de una dieta basal, tamaño, edad, diferencias genéticas, tasa de alimentación y condiciones de cultivo. Los intestinos utilizados en este trabajo se presume se encontraban en buen estado y con calidad relativamente homogénea. Esto debido a que se trataba de organismos para venta comercial, contando con las características deseables para cosecha, después de haberlos sometido a una alimentación constante (con sardina) durante un periodo entre 4 a 5 meses. Esto puede ser un indicador de que el organismo no se encontraba en un periodo de desbalance o estrés fisiológico que pudiera causarle cambios en el requerimiento metabólico de AAs

esenciales, sino más bien, los peces se encontraban en un período con una digestión y absorción con variación baja.

El atún aleta azul es una especie carnívora que posee un estómago bien definido, un sistema de ciegos pilóricos y un intestino muy corto, lo que indica que el sistema digestivo de esta especie es altamente eficiente, además de presentar una alta actividad de enzimas digestivas (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007). Los ciegos pilóricos son estructuras con función tanto de digestión enzimática como de absorción (Buddington y Diamond, 1987), siendo en el atún de tamaño pequeño y se encuentran fusionados con el tejido pancreático (Matus-de-la-Parra *et al.*, 2007).

La técnica del intestino invertido es una herramienta eficaz para el estudio de los procesos fisiológicos relacionados a la absorción de nutrientes, método que permitió en este estudio medir la tasa de absorción de un pool de AAs para conocer la interacción entre dos AA esenciales (lisina-arginina) al momento de su absorción. Esta técnica mide el paso de nutrientes a través de la membrana sin distinguir los procesos de paso entre las membranas (apical y basolateral), así como tampoco los procesos intracelulares que se llevan a cabo. Aun tomando en cuenta estas limitantes, la técnica de intestino invertido arroja datos reales y que puede ser aplicado a varias especies.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio indican que el intestino de atún aleta azul, presenta una interacción entre la lisina y la arginina, aunque no ejerciendo una competencia directa, lo cual sugiere mecanismos que permiten una absorción de AAs esenciales como la lisina y la arginina, aún en una situación de desbalance de los mismos. Dentro de esta interacción encontrada, la arginina parece ser

un estimulador al paso de lisina, mientras que la lisina no presenta inhibición en la absorción de arginina.

III. CAPITULO II: EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TAURINA

III.1. RESUMEN

El presente experimento fue diseñado con la finalidad de estudiar el efecto de la concentración de taurina al momento de la absorción de un pool completo de aminoácidos (AA) en intestino proximal del atún aleta azul (*Thunnus orientalis*). Con esta finalidad, a un hidrolizado pancreático de caseína (20 mg mL^{-1}) se le agregó diferentes niveles de taurina utilizando la técnica de intestino invertido para medir la absorción de AAs. El diseño experimental se basó en tres niveles de taurina (0, 24 y 48 mM ó mOsmol) en muestras por triplicado. Los resultados obtenidos indican una gran capacidad para la absorción de taurina, siendo el AA con mayor absorción. Aunado a esto, se encontraron grandes reservas de este AA en tejido intestinal de atún ($\sim 70 \text{ mM}$). Del resto de los AAs, los AAs no esenciales Glu, Gly y Ala y Ser presentaron una absorción preferente en los tres niveles de taurina, esto en comparación a los demás AAs del total. Es así que las altas tasas de absorción y las grandes reservas intracelulares de taurina en el intestino de atún aleta azul, posiblemente indiquen la gran importancia de este AA en múltiples funciones fisiológicas.

III.2. INTRODUCCIÓN

Muchos estudios sobre los requerimientos de aminoácidos (AA) han sido realizados con la finalidad de sustituir el uso de proteína de pescado por proteínas vegetales, esto con relación a los aminoácidos (AAs) esenciales. Esto porque las proteínas vegetales presentan en la mayoría de los casos, un perfil inadecuado o deficiencia de AAs esenciales, lo que puede generar problemas fisiológicos, principalmente en especies de peces carnívoros (Takagi *et al.*, 2006a, 2006b). A pesar de que la taurina es un AA no esencial para los peces, debido a su capacidad de síntesis, además de que no forma parte de proteínas estructurales, se encuentra presente en altas concentraciones en su forma libre (50 a 200 mM) (Huxtable, 1992; Hosoi *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2009) por lo que es importante para el desempeño de varias funciones en organismos. Se sugiere que la taurina está implicada en procesos fisiológicos importantes, tales como osmoregulación, conjugación con ácidos biliares, estabilización de membrana, entre otros (Une *et al.*, 1991; Huxtable, 1992; Barada *et al.*, 1997; Pasantes-Morales *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2006a; Anderson *et al.*, 2009).

Entre los peces, la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), es capaz de sintetizar taurina a través de la cisteína, por medio de un proceso parecido al de los mamíferos (Yokoyama *et al.*, 2001). Sin embargo, en especies tales como jurel *Seriola quinqueradiata*, lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* y dorada japonesa *Pargus major* se reporta la necesidad de suplementar taurina en dietas con proteína vegetal en sustitución a la harina de pescado, (Kim *et al.*, 2005; Takagi *et al.*, 2006a, 2006b), con la finalidad de mantener el crecimiento y las condiciones fisiológicas normales de los

organismos en cultivo. Lo que parece indicar que peces marinos no son capaces de sintetizar suficiente cantidad de taurina (Goto *et al.*, 2001b).

La principal ruta de síntesis de taurina en mamíferos, es a partir de cisteína y envuelve la oxidación de cisteína para generar cisteína sulfinato, seguido por una descarboxilación para generar hipotaurina y luego otra oxidación para generar taurina, donde la enzima L-cisteína-sulfinato descarboxilasa (CSD) juega un papel clave (Yokoyama *et al.*, 2001). En peces se ha reportado que la actividad de la CSD difiere entre especies (Yokoyama *et al.*, 2001; Goto *et al.*, 2001a). Otra ruta de síntesis de taurina es vía oxidación de cisteamina a través de la enzima cisteamina dioxigenasa (CAD), la cual se encuentra presente en el hígado de algunos peces. La cisteamina es suplementada durante la degradación de 4-fosfopantetina, precursor de la coenzima A (Goto *et al.*, 2001b).

Sin embargo, Yokoyama *et al.* (2001) en estudios *in vitro*, no encontraron actividad hepática de la CSD en peces como atún aleta azul, jurel y barrilete. Por lo que la capacidad y vía de síntesis de taurina en peces depende de la especie.

En peces de cultivo de gran tamaño como el atún aleta azul, existe la dificultad de realizar evaluaciones de los requerimientos nutricionales *in vivo*, lo que hace necesario el recurrir a técnicas *in vitro* para determinar la capacidad de absorción de AAs.

Para medir el paso de moléculas a través de la barrera intestinal de alguna especie en estudio, existe una técnica *in vitro* denominada intestino invertido. Esta técnica consiste en utilizar segmentos de diferentes partes del intestino en fresco, bajo distintas condiciones preestablecidas. Varios estudios han sido reportados para especies

tanto de dulceacuícolas como marinas utilizando este sistema (Berge *et al.*, 1999, 2004; Rosas *et al.*, 2008; Martínez-Montaña *et al.*, 2010). Rosas *et al.* (2008) utilizaron la técnica de intestino invertido para comparar las tasas de absorción en 3 diferentes peces carnívoros, utilizando un complejo de AAs. Así también, Martínez-Montaña *et al.* (2010) compararon las tasas de absorción de un hidrolizado de sardina fresca generado a partir de una digestión ácida (pepsina de cerdo a unidades equivalentes al atún aleta azul) y una digestión alcalina (enzimas pancreáticas propias del atún). Es así que siguiendo en la misma dirección y con fin de realizar más estudios que validen y fortalezcan esta técnica, es importante continuar con este tipo de estudios.

La absorción de nutrientes del lumen intestinal al citosol de las células entéricas para su paso al torrente sanguíneo ocurre a través dos procesos: 1) la absorción de partículas o macromoléculas sin degradación enzimática y 2) la absorción de pequeñas moléculas por procesos relacionados a simple difusión, difusión facilitada o transporte activo (Tseng y Hwang, 2008; Matthews, 2000). Este último se lleva a cabo a través de la membrana celular a través de un sistema transportador compuesto por proteínas, que son capaces de reconocer y transferir un grupo selecto de moléculas (Matthews, 2000). De esta manera los transportadores de membrana se agrupan en familias de acuerdo a su especificidad por los sustratos, ya sea acarreadores para AAs aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos e imino (Matthews, 2000). El contenido celular de taurina también es mediado por un transportador específico denominado como TAUT, identificado en vertebrados y bivalvos (Hosoi *et al.*, 2007; Zarate y Bradley, 2007; Kozlowski *et al.*, 2008). Dicho transportador específico a parte de transportar taurina, presenta afinidad

por la beta-alanina, gama-aminobutírico (GABA) e hipotaurina, transporte que usa un gradiente Na^+ y Cl^- como fuerza conductora (Hosoi *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2008).

En estudios previos realizados en este equipo de trabajo (no publicados), altas concentraciones de taurina han sido detectadas a través de HPLC durante ensayos de intestino invertido aún cuando ésta no se agregue al experimento, lo cual genera el interés de investigar sobre las características de absorción intestinal de taurina.

III.3. HIPÓTESIS

La absorción total de taurina aumentará de manera proporcional a la concentración de ésta en el medio.

III.4. OBJETIVO

Cuantificar la absorción de una serie de amino ácidos en la región proximal del intestino de atún aleta azul (*Tunnus orientalis*), añadiendo tres diferentes concentraciones de taurina con la finalidad de ver posibles cambios en la dinámica de absorción de taurina con respecto al total de AAs.

III.5. MATERIALES Y MÉTODOS

III.5.1. Obtención de Muestras

Vísceras de atún aleta azul (*Tunnus orientalis*) (10-20 Kilos) fueron obtenidas en una granja comercial de engorda durante el periodo de cosecha. Los intestinos fueron disectados tomando la sección intestinal después del ciego pilórico (denominado intestino proximal). Cada segmento con una longitud total aproximada de 10 cm se pusieron en solución fisiológica Ringer marina (117 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O y 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4 con 150 mM de NaCl adicional a la solución; Berge *et al.*, 2004) con burbujeo de gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) y se transportaron al laboratorio para su procesamiento (15 Km).

III.5.2. Procedimiento Experimental

La experimentación consistió en una solución de AAs libres que se obtuvo de un digerido pancreático de caseína (Tryptona; 20 mg/ml) obtenida de Becton, Dickinson and Company (DIFCO cat. no. 211705, Laurence, KS, USA), donde se realizaron 3 tratamientos, variando la concentración de taurina (0, 24 y 48 mM), utilizando taurina obtenida de Spectrum Chemical Mfg. Corp. (Lot No. PK1364, Gardena, CA, USA.). Las soluciones experimentales fueron diluidas en la solución Ringer adicionada con 300 mOsmol de NaCl (Ringer marina), con el fin de compensar el estrés osmótica (Berge *et al.*, 2004)

Cada segmento de intestino provino de un pez diferente, considerado como la unidad experimental. Toda prueba fue basada en muestras por triplicado (de tres intestinos independientes).

Los segmentos de 10 cm de intestino, fueron montados en un sistema de manera rápida (no más de 15 minutos por intestino) En resumen, los segmentos fueron lavados, separando el tejido seroso y después se voltearon utilizando aguja e hilo. La parte distal del segmento se cerró con el hilo con ayuda de una aguja la cual se introdujo a través del lumen con el fin de jalar y voltear el intestino sin maltratarlo. La parte distal del segmento invertido se cerró, enjuagó nuevamente con solución Ringer marina y la parte anterior se sujetó a un tubo de vidrio abierto de la tapa para que quedaran expuestos como se ve en la fotografía (Figura 1). El gas carbógeno fue burbujeadado a través de un tubo de vidrio delgado localizado a un lado durante todo el procedimiento experimental (Figura 1; Capítulo I, Tomado de Rosas *et al.*, 2008).

A través de la varilla de vidrio (abierta) en donde se insertó el intestino invertido, se introdujo 1 ml de solución Ringer marina y se tomaron dos alícuotas al inicio y al final del experimento (0 y 45 min). Las muestras fueron guardadas de manera individual y se congelaron (-80 °C) hasta su análisis. Como control se utilizó solución Ringer marina sin AAs, con la finalidad de corregir la concentración de aminoácidos procedentes del tejido del intestino.

La absorción total es reportada como pmol cm^{-2} , de donde fue obtenido el porcentaje total de absorción a los 45 minutos.

III.5.3. Cuantificación de taurina celular

El contenido de taurina intracelular del tejido intestinal se determinó. Con este fin, tejido intestinal de atún en muestras por triplicado, se secaron durante 24 horas a 60°C. El tejido seco se homogenizó y la grasa se extrajo de acuerdo a Folch *et al.* (1957) con diclorometano-metanol. Muestras de tejido (50 mg) se hidrolizaron con 200 μ L con una solución 6N HCl con 0.06% fenol en un vial cerrado y calentado a 110 °C durante 24 horas. La muestra hidrolizada se secó y rehidrató con 1 mL de agua. Después la muestra fue filtrada (0.45 μ m) y se refrigeró hasta su análisis.

III.5.4. Análisis de amino ácidos

Para identificar los amino ácidos se utilizó un HPLC siguiendo el método Waters AccQ•Tag™. El HPLC estaba equipado con un detector de fluorescencia y una columna Waters C₁₈ de fase reversa (3.9 x 150 mm) AccQ•Tag™. La elución se realizó con el gradiente recomendado agua-acetonitrilo. Las muestras pasaron por un detector de fluorescencia Waters 474 con una longitud de onda de excitación de 250 nm y una emisión de 350 nm. La temperatura se mantuvo constante a 40°C. La curva de calibración se obtuvo a partir de una solución estándar de amino ácidos que contenía de 12.5 a 300 pmol de cada amino ácido.

III.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La absorción total de cada AA a diferentes concentraciones de taurina (0, 24 y 28 mM) y la comparación entre los AAs del pool, esto sin tomar en cuenta taurina, fueron analizados por un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Para aquellos tratamientos en donde se observaron diferencias se le realizó un análisis *a posteriori* de Tukey. La absorción total de taurina se analizó por medio de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y un análisis de rangos múltiples de Tukey. Las diferencias son reportadas con diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $P < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el programa SIGMA STAT (Arlington, VA, USA) (3.1).

III.7. RESULTADOS

La taurina registró los valores más altos de absorción (entre 3932.75 ± 1038.05 y 2232.82 ± 139.09 pmol cm^{-2}) (Cuadro 1), con relación a lo absorbido por cualquiera de los AAs presentes. Un porcentaje total de absorción entre 64.3 y 73.1 % del total del pool de AAs fue obtenido siendo significativamente diferentes entre ambas cantidades.

De los demás AAs absorbidos, la Ser, Gly, Ala y Glu fueron los AAs que alcanzaron mayores concentraciones para los tres niveles de taurina utilizados.

La concentración de taurina mostró efecto sobre 4 AAs, en donde His, Gly y Ala mostraron una tendencia a disminuir conforme la concentración de taurina aumentó. La

Ser aunque mostró cambios significativos, no mostró tendencia con respecto a los niveles de taurina (Cuadro1).

La lisina mostró ser el AA con menor absorción total y porcentaje de absorción, efecto encontrado con las tres concentraciones de taurina.

La concentración de taurina intracelular determinada fue de 72.59 ± 3.74 mM.

Cuadro 3. Promedio de absorción total con desviación estándar y porcentaje de absorción total obtenida a partir de una solución de amino ácidos (20 mg mL⁻¹ Bacto™ Tryptone) con solución Ringer marina de 300 mOsm con tres niveles de taurina (0, 24 y 48 mOsmol), utilizando la técnica intestino invertido en el intestino proximal del atún aleta azul (*Thunnus orientalis*).

Amino ácidos	Prom. Absorción Total (pmol cm ⁻²) (0 mOsm Tau)	Porcentaje de absorción total (%)	Prom. Absorción Total (pmol cm ⁻²) (24 mOsm Tau)	Porcentaje de absorción total (%)	Prom. Absorción Total (pmol cm ⁻²) (48 mOsm Tau)	Porcentaje de absorción total (%)
AA Catiónicos						
Arg	47.37±7.43 ^{ef}	0.9	40.34±3.77 ^{efg}	1.2	40.03±7.52 ^d	1.0
His	124.23±1.40 ^{cd,A}	2.3	92.67±0.80 ^{cde,AB}	2.7	56.48±8.53 ^{cd,B}	1.5
Lys	22.10±3.98 ^f	0.4	19.02±4.29 ^g	0.6	22.09±7.18 ^d	0.5
AA Ácidos						
Asp	59.18±19.67 ^{ef}	1.1	43.91±8.07 ^{efg}	1.3	45.98±10.65 ^{cd}	1.2
Glu	148.13±28.60 ^c	2.8	118.04±16.70 ^{bcd}	3.4	126.73±11.02 ^{ab}	3.3
AA Zwitteriónicos						
Thr	32.99±21.65 ^{ef}	0.6	61.55±8.11 ^{defg}	1.8	28.64±3.68 ^d	0.7
Val	59.41±10.21 ^{ef}	1.1	53.77±6.51 ^{efg}	1.6	47.28±6.24 ^{cd}	1.0
Met	38.73±7.99 ^{ef}	0.7	34.69±3.74 ^{fg}	1.0	31.36±6.49 ^d	0.8
Ile	76.64±13.29 ^{de}	1.4	72.90±8.47 ^{def}	2.1	65.73±2.37 ^{cd}	1.8
Leu	65.07±13.25 ^{ef}	1.2	63.32±9.89 ^{defg}	1.9	69.18±15.27 ^{bcd}	1.4
Phe	24.79±5.19 ^f	0.5	21.13±4.77 ^g	0.6	25.13±4.66 ^d	0.6
Ser	225.47±74.76 ^{a,A}	4.3	132.18±18.51 ^{abc,C}	3.9	174.61±3.61 ^{a,B}	4.5
Gly	185.55±33.57 ^{ab,A}	3.5	169.44±4.88 ^{ab,AB}	5.0	105.45±7.17 ^{bc,B}	2.7
Ala	162.51±37.61 ^{bc,A}	3.1	184.38±15.57 ^{a,A}	5.1	78.02±20.63 ^{bcd,B}	2.0
Tyr	42.72±6.57 ^{ef}	0.8	33.62±3.13 ^{fg}	1.0	41.48±3.75 ^d	1.0
AA Imino						
Pro	58.33±19.12 ^{ef}	1.1	59.39±10.69 ^{efg}	1.7	71.70±9.13 ^{bcd}	1.8
Otros						
Tau*	3932.75±1038.05^A	74.1	2232.82±139.09^B	65.2	2879.14±348.54^{AB}	74.1

III.8. DISCUSIÓN

En este trabajo se corrobora que la absorción total de taurina a través del intestino de atún aleta azul es muy superior con respecto a los demás AAs del pool experimental a cualquiera de los tres niveles de taurina, representando hasta un 70% del total de los pool de AAs. Como se mencionó antes, la capacidad de síntesis de taurina depende de la especie, además de esto, experimentos de absorción con taurina marcada en intestinos de ratones (Barada *et al.*, 1997), indican que la única ruta de entrada de taurina al cuerpo es vía absorción por medio de células del intestino. La taurina que es absorbida, es dirigida al hígado por medio de la vena porta para su redistribución hacia otros tejidos. Las altas tasas de absorción de taurina encontradas en éste experimento, aunado a que la única vía de paso intracelular es por absorción, se asume que al igual que otras especies (Hosoi *et al.*, 2007; Zarate y Bradley., 2007; Kozłowski *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2009), el transportador de taurina (TAUT) se encuentra presente en el intestino proximal del atún aleta azul.

El hecho que taurina representa cerca del 70% del total de AAs absorbidos, aunado a que la concentración intracelular encontrada en el intestino de atún aleta azul fue de ~70 mM (70×10^9 pM ó 70 mOsmol), sugieren la gran importancia de este AA en varias funciones fisiológicas del atún aleta azul. Si bien la concentración de taurina en el medio de absorción si mostró efecto significativo en la absorción de esta misma, el efecto no mostró una clara tendencia. Además, la mayor absorción total de taurina se presentó en el tratamiento sin adición de éste AA. Hecho que indica la alta reserva de taurina en la célula, así como su posible almacenamiento en la mucosa intestinal. Aunado a esto, cabe la posibilidad de una inhibición en la

absorción por parte de la taurina sintética utilizada en el trabajo, ya que ambos resultados con adición de éste AA presentaron menor absorción que donde no fue añadido.

Takagi *et al.* (2006a), en un experimento de dosis respuesta con jurel (*Seriola quinqueradiata*), con dietas suplementadas con y sin taurina, se demostró que la taurina juega un papel importante en la presión osmótica sanguínea, relacionada a supresión hemolítica y estabilización de membrana. Por otro lado, en la dorada japonesa (*Pargus major*) se encontró la aparición del hígado verde en peces asociado a una alimentación sin harina de pescado y sin suplementación de taurina (Takagi *et al.*, 2006b). Esta enfermedad es causada por la biliverdina, un metabolito de la degradación del hemo y pigmento biliar acumulado en el hígado. Los pigmentos biliares son excretados del hígado en forma de bilis en conjugados con AAs. En dicho trabajo se llegó a la conclusión de que la taurina es necesaria para mantener el crecimiento y las condiciones fisiológicas normales. Este mismo síndrome fue reportado por Takagi *et al.* (2008), en el jurel (*Seriola quinqueradiata*) después de una alimentación con dietas carentes de taurina, concluyendo que para ésta especie es esencial la ingesta de taurina a través de la dieta. En el lenguado (*Paralichthys olivaceus*), se reportó el requerimiento de taurina en dietas (Park *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005) ya que se conoce que existe baja actividad de las enzimas cisteína sulfinato descarboxilasa (CSD) (Goto *et al.*, 2001a; Yokoyama *et al.*, 2001) y la cisteamina dioxigenasa (CAD), encargadas de la síntesis de taurina en algunas especies de peces (Goto *et al.*, 2001b). En alevines de robalo *Dicentrarchus labrax*, se encontró que dietas suplementadas con taurina presentaron un efecto positivo en el

crecimiento, efecto atribuido al aumento de consumo de alimento por la función de taurina como atrayente (Brotons-Martínez *et al.*, 2004).

Yokoyama *et al.* (2001), reporta que no existe la presencia de la enzima CSD en atún aleta azul, principal vía responsable de la síntesis de taurina en mamíferos. Sin embargo Goto *et al.* (2001b), demostraron la presencia de la enzima CAD responsable también de la síntesis de taurina en el hígado de algunos peces. Los peces carnívoros puede que sean menos efectivos en sintetizar taurina debido a que son organismos que consumen otras especies marinas que contienen grandes cantidades de taurina. En este caso el atún aleta azul ingiere pelágicos menores y algunas otras especies (sardina, anchoveta, calamar, etc.). Y aún cuando el atún pudiera poseer una vía de síntesis de taurina, contrario a lo reportado por Yokoyama *et al.* (2001), la tasa de absorción de taurina en comparación a los demás AA del pool, indican lo especializado que está el intestino de atún para la absorción de este AA

En la mayoría de los teleósteos y muchos vertebrados, las sales biliares son fabricadas por el hígado a partir de colesterol y la taurina formando un conjugado con sodio, a través de la generación del taurocolato y tauroquenodexicolato como principales constituyentes de las sales biliares (Une *et al.*, 1991; Eckert *et al.*, 1998; Rust, 2002). Las sales biliares tienen como función principal la emulsificación de grasas. Debido a su naturaleza antipática puede dispersar las grasas, rompiéndolas en miscelas creando una mayor superficie para la digestión de las grasas. Además, su elevada alcalinidad disminuye la acidez. A parte de emulsificar se encarga de excretar o digerir productos de desecho acarreados en las sales biliares, tales como pigmentos hemínicos, colesterol, esteroides y fármacos (Eckert *et al.*, 1998; Rust,

2002). Se sabe que estas sales biliares ya en el intestino son eficientemente reincorporadas para ser recicladas llegando de nueva cuenta al hígado. Los atunes consumen por lo general peces con alto contenido de grasa por lo que las sales biliares deben jugar un papel importante en la digestión (García-Franco *et al.*, 1999; Fitzgibbon, 2007). En el intestino de diferentes especies existen adaptaciones para maximizar la absorción de la taurina dietaria y para asegurar la eficiencia de reabsorción de taurina desconjugada de ácidos biliares (Anderson *et al.*, 2009). Es así que el intestino del atún deberá estar altamente especializado para la reabsorción de la taurina y por tanto, la alta concentración presentada se debe a un ciclo normal de taurina en donde altas concentraciones de reservas intracelulares son liberadas a parte de la absorción de taurina adicionada proveniente de las soluciones experimental. Rust (2002), menciona que las sales biliares son reabsorbidas de un 60% hasta 90% de lo secretado, para luego ser enviada de nuevo al hígado para su redistribución a otros órganos y formación de sales biliares nuevamente. Esta absorción tan alta, también indica la necesidad de esta especie de mantener una alta concentración corporal de taurina (Spitze *et al.*, 2003). Es probable que al igual que lo encontrado en jurel (*Seriola quinqueradiata*) (Takagi *et al.*, 2006a, 2006b), la taurina sea un aminoácido esencial para el atún aleta azul, cumpliendo varias funciones fisiológicas importantes. Esto esta soportado por su alto nivel de absorción encontrado en el intestino de atún en el actual trabajo.

De los AAs que mostraron efecto sobre la concentración de taurina, la Gly y la Ala mostraron una tendencia a disminuir cuando la concentración de taurina aumentó en el medio. Estos dos AAs fueron además de los AAs que mayor absorción mostraron de todos los AAs en los 3 tratamientos de taurina. Los peces oxidan gran

cantidad de AAs para la generación de energía metabólica, donde AAs glucogénicos son preferentemente usados (Guillaume *et al.*, 2001). La alanina se considera un AA importante en el catabolismo intestinal de otros AAs (Wu, 1998). Así también, algunos AAs como la taurina, glicina, alanina y glutamato pueden ser movilizados para funcionar como solutos intracelulares para la osmoregulación (Pasantes-Morales *et al.*, 2006). En el proceso de osmoregulación, los osmolitos son compuestos orgánicos que le confieren presión osmótica a la célula. Algunos teleósteos presentan sofisticados y complicados mecanismos de osmoregulación para mantener la presión osmótica interna y homeostasis iónica, lo que permite un funcionamiento fisiológico correcto de la célula (Tseng y Hwang, 2008). Es probable que la taurina posea función en la osmoregulación entre muchos otros procesos fisiológicos importantes en el atún aleta azul.

Algo que llama la atención es la baja concentración de lisina absorbida en este trabajo. La lisina es un AA esencial el cual se considera limita la síntesis de proteína, además de ser precursor de la carnitina, que juega un papel importante en el transporte de largas cadenas de ácidos grasos hacia la mitocondria necesarios para la beta-oxidación y por ende la generación de energía. Si bien, la lisina fue el AA con menor absorción, esta absorción se mostró constante bajo las 3 concentraciones de taurina. Así también el paso total de lisina se mantuvo cercano al de arginina, con una relación 2:1 arginina:lisina, en para todos los experimentos. La absorción de AA catiónico como lisina y arginina, es mediada por el mismo transportador en la mayoría de las células, con transporte independiente de Na^+ (Closs y Mann, 1999), además del transporte dependiente de Na^+ , capaz de transportar AA neutrales y catiónicos (Mailliard *et al.*, 1995). Es así que la aceleración o disminución de las

tasas de absorción depende de cada sistema transportador, además de estar influenciado (estimulado) por la presencia de otros AAs intracelulares (trans-estimulación) (Mailliard *et al.*, 1995)

En conclusión, los resultados obtenidos indican que el intestino de atún aleta azul posee gran capacidad para la absorción de taurina, siendo el AA con mayor absorción. Así también se observó que el intestino de atún posee grandes reservas de este AA, siendo este un posible indicador de la gran importancia de este AA en funciones fisiológicas en esta especie.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

En Baja California, así como en otras partes del mundo, la engorda del atún basada en captura, representa una industria con potencial de crecimiento, debido a la demanda del ya establecido mercado japonés, así como el creciente mercado en USA e incluso en México. En la mayoría de los casos su engorda está basada en una mezcla de sardina y macarela fresca con un índice de conversión de 17 a 1 lo cual pone en peligro la sustentabilidad de su cultivo (Sylvia, 2007). Por lo tanto, varios aspectos de la especie deben ser estudiados, con la finalidad de incrementar el crecimiento y salud de los organismos, entre estos los requerimientos nutricionales. Sin embargo las dificultades para llevar a cabo una experimentación convencional (experimentos *in vivo* dosis-respuesta con estudios de digestibilidad), implica que en muchas especies marinas y sobre todo aquellas pelágicas de grandes dimensiones, sea necesario recurrir a técnicas *in vitro* que ayuden a conocer indirectamente los procesos digestivos y requerimientos nutricionales. Así se podrá contar con información para formular dietas balanceadas que ayuden a la sustitución del alimento actual (sardina del Pacífico) y con un mínimo de desechos al medio ambiente.

En el presente trabajo, se corrobora que la técnica de intestino invertido es una herramienta útil para determinar la absorción de AAs de una manera dinámica e interactiva (dentro de una mezcla de AAs). Y en el caso particular de la interacción entre lisina y arginina, dos AAs esenciales que compiten por el mismo transportador. Si bien la técnica es compleja por el hecho del tiempo que se lleva en análisis de cada una de las muestras de AAs a través de un equipo de cromatografía (HPLC), es una

buena alternativa para generar conocimiento. Entre éstos, se puede mencionar el efecto del estrés fisiológico y los AAs vulnerables a compensarlo, o la posible interacción de éstos y el efecto del balanceo de los AAs en la dieta, entre otros.

Dentro de la técnica aquí presentada existen factores que no fueron del todo controlados. Un caso es la distinción entre los procesos de absorción entre la membrana epitelial y basolateral. Esto debido a que la absorción de los AAs se lleva a cabo a través de la célula, funcionando como una caja negra, sin conocer los procesos internos. Se sabe que el metabolismo de los AAs al interior de los enterocitos juega un papel importante en la mucosa intestinal, tanto para la generación de energía y la síntesis de moléculas necesarias para la manutención e integridad de la misma, así como en la modulación de la entrada de los AAs dietarios absorbidos hacia el torrente sanguíneo (Wu, 1998).

Aún así, ésta técnica es capaz de generar información valiosa y representativa sobre procesos digestivos en muchas especies

En el presente trabajo con intestinos frescos de atún aleta azul, se observaron resultados consistentes entre el capítulo I y II, que pueden representar procesos metabólicos característico en esta especie. En el capítulo I, en ambos tratamientos de lisina (10 y 75 mM), se observó que la absorción mayor de AAs no esenciales fue para Glu, Gly y Ala, representando aprox. el 30% del total de la mezcla. Así también en el capítulo II, donde se midió el efecto de tres concentraciones de taurina (0, 24 y 48 mM) sobre la absorción, los mismos tres AAs no esenciales (Glu, Gly y Ala), además de serina mostraron las mayores absorciones en comparación a los otros AAs de la mezcla, sin tomar en cuenta taurina.

Por lo general Ala, Glu y Gly son los AAs que presentan mayor absorción a través del intestino. De esta manera, Martínez-Montañó *et al.* (2010), utilizando la misma técnica en atún aleta azul coincidió con los mismos resultados pero utilizando un hidrolizado de sardina. En el presente trabajo se utilizó un hidrolizado que provenía de un digerido pancreático de caseína (Bacto Triptona), con un perfil distinto en cuanto a las concentraciones de cada AA.

Los peces oxidan gran cantidad de AA para proveer energía metabólica (Guillaume *et al.*, 2001), donde en algunos carnívoros puede contribuir hasta con más del 90% de sus requerimientos energéticos (Nelson y Cox, 2004), lo que puede ocasionar variación en el requerimiento de AAs. Es así que durante la absorción de AAs, varios de estos y en especial los no esenciales, pueden ser utilizados como fuente de energía o para la síntesis de otros AAs, a través del proceso denominado transaminación, donde los AAs son transformados por desaminación en alfa-cetoácidos con su concomitante síntesis de glutamato a partir de alfa-cetoglutarato. Después el glutamato es retransformado en alfa-cetoglutarato y amonio por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa, donde el amonio removido de los AA es excretado (Guillaume *et al.*, 2001). Otro AA interesante es la alanina, un AA importante en el catabolismo intestinal de glutamina, glutamato y aspartato (Wu, 1998). Este AA es producido a partir de la transaminación del piruvato a partir de cualquier otro AA (Nelson y Cox, 2004). En términos cuantitativos, las aminotransferasas más importantes son la alanina y aspartato aminotransferasas (Guillaume *et al.*, 2001). Hochachka y Somero (2002) mencionan que la oxidación de AAs como Ala, Glu y Pro generan 15, 27 y 30 ATP/AA respectivamente, energía

similar a la generada por la oxidación de carbohidratos como piruvato (15 ATP/piruvato) y glucosa (36 ATP/glucosa).

Dentro de los aspectos importantes descritos en este trabajo y con relación a la fisiología digestiva del atún aleta azul son: 1) existe una interacción entre la lisina y la arginina, aunque no ejerciendo una competencia directa, lo cual sugiere mecanismos que permiten la absorción de AA esenciales bajo una situación de desbalance de los mismos. La arginina parece ser un estimulador al paso de lisina, mientras que la lisina no presenta inhibición en la absorción de arginina y 2) el intestino de atún aleta azul posee gran capacidad para la absorción de taurina, siendo el aminoácido con mayor absorción. Sin embargo, ésta absorción no está asociada a un incremento en la presencia de este AA de la mezcla de AAs presentes en el hidrolizado. Por otro lado, la taurina se encuentra en grandes cantidades dentro de células del intestino, lo cual indica la importancia que este AA pueda tener en varios procesos fisiológicos.

La técnica de intestino invertido es una herramienta útil para el conocimiento de los procesos de absorción intestinal tanto de nutrientes como en agentes xenobióticos. En el caso del atún aleta azul, estudios sobre el efecto de la temperatura, el cambio osmótico, absorción de diferentes fuentes proteicas e interacción entre AAs (inhibición o estimulación), son necesarios para que fortalezcan y validen los resultados obtenidos en esta técnica. También el ampliar el estudio de absorción hacia otros nutrientes como lo son ácidos grasos, es una buena opción para la generación de más conocimientos. Un enfoque innovador es utilizar esta técnica en conjunto con otras técnicas de digestión *in vitro* como lo realizado por Martínez-Montaña *et al.* (2010), además que puede ser aplicado a diferentes fuentes

proteicas de origen tanto animal como vegetal que ayuden a conocer más el potencial digestivo de ésta especie, con un enfoque en la generación de alimentos balanceados. También el posible uso de AA marcados dentro de esta misma modalidad dinámica del uso de un pool de nutrientes, podría explicar algunos procesos metabólicos durante el paso de estos por la barrera intestinal.

V. REFERENCIAS

- Abboudi T, Mambrini M, Ooghe W, Larondelle Y y Rollin X (2006). Protein and lysine requirements for maintenance and for tissue accretion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*. 261:369-383.
- Ahmed I y Khan MA (2004). Dietary lysine requirement of fingerling India major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture*, 235: 499-511.
- Alam MD, Teshima SI, Ishikawa M y Koshio S (2002). Effect of dietary arginine and lysine levels on growth performance and biochemical parameters of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 68: 509-516.
- Anderson CMH, Howard A, Walters JRF, Ganapathy V y Thwaites D (2009). Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺-and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol* 587.4: 731-744.
- Ball RO, Urschel KL y Pecharz PB (2007). Nutritional Consequences of Interspecies Differences in Arginine and Lysine Metabolism. *The journal of Nutrition*. 137: 1626S-1641S.
- Barada KA, Atallah JB y Nassar C (1997). Age influence on intestinal taurine transport in mice. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 118A, No. 1; 159-163.
- Berge GE, Lied E y Sveier H (1997). Nutrition of Atlantic Salmon (*Salmo salar*): The Requirement and Metabolism of Arginine. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A:501-509.

- Berge GE, Sveier H y Lied E (1998). Nutrition of Atlantic salmon (*Salmo salar*); The requirement and metabolic effect of lysine. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A 120: 477-485.
- Berge GE, Bakke-McKellep AM y Lied E (1999). In vitro uptake and interaction between arginine and lysine in the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 179:181-193.
- Berge GE, Sveier H y Lied E (2002). Effects of feeding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) imbalanced levels of lysine and arginine. Aquaculture Nutrition. 8:239-248.
- Berge GE, Goodman M, Espe M y Lied E (2004). Intestinal absorption of amino acids in fish: Kinetics and interaction of the in vitro uptake of L-methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. 229:265-273.
- Broer S (2008). Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. Physiol. Rev. 88: 249-286.
- Brotons-Martínez J, Chatzifotis S, Divanach P y Takeuchi T (2004). Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and feed selection of sea bass *Dicentrarchus labrax* fry fed with demand-feeders. Fisheries Science. 70; 74-79.
- Buddington RK y Diamond JM (1987). Pyloric ceca of fish: a new absorptive organ. Am. J Physiol. 252:G65-G76.
- Buddington RK, Elnif J, Puchal-Gardiner AA y Sangild PT (2001). Intestinal apical amino acid absorption during development of the pig. Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol. 280:R241-R247.

- Closs EI y Mann GE (1999). Identification of carrier systems in plasma membranes of mammalian cells involved in transport of L-arginine in: Methods in enzymology. Academic Press. Vol. 301.
- Costanzo LS (2000). Fisiología. México. McGraw-Hill Interamericana, 468 p.
- Cowey CB (1994). Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. Aquaculture. 124: 1-11.
- Eckert R, Randall D, Burggren W y French K (1998). Fisiología Animal: Mecanismos y adaptación. 4ta edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana, España, p
- Ferraris RP y Ahearn GA (1984). Sugar and amino acid transport in fish intestine. Comp. Biochem. Physiol. 77A, No 3: 397-413.
- Ferruzza S, Ranaldi G, Di Girolamo M y Sambbuy Y (1997). The Efflux of Lysine from the Basolateral membrane of Human Cultured Intestinal Cells (Caco-2) Occurs by Different mechanisms depending on the Extracellular Availability of Amino Acids. J. Nutr. 127: 1183-1190.
- Fitzgibbon QP (2007). Metabolic physiology of southern bluefin tuna (*Tunnus macoyii*) and mullet (*Argyrosomus japonicus*). Thesis (Ph.D.). University of Adelaide, School of earth and Environmental Sciences. 137 pp.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- Fournier V, Gouillou-Coustans MF, Metailler R, Vachot C, Guedes MJ, Tulli F, Oliva-Teles A, Tibaldi E y Kaushik SJ (2002). Protein and arginine requirements for maintenance and nitrogen gain in four teleosts. British Journal of Nutrition. 87: 459-469.

- García-Franco W, Vidal-Talamantes R, Cota-Villavicencio A, Ramón-Corrales J y Prieto-Montalvo I (1999). Northern Anchovy Fat Content in Baja California. CalCOFI Rep., Vol. 40.
- Genty M, Gonzalez G, Clere C, Desangle-Gouty V y Legendre J-Y (2001). Determination of passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 12: 223-229.
- Goto T, Tiba k; Sakurada Y y Takagi S (2001a). Determination of hepatic cysteinesulfinatase decarboxylase activity in fish by means of OPA-prelabeling and reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation. Fish. Sci. 67; 553-555.
- Goto T, Matsumoto T y Takagi S (2001b). Distribution of hepatic cysteamine dioxigenase activities in fish. Fish. Sci. 67; 1187-1189.
- Guillaume J, Kaushik S, Bergot P y Métailler R (2001). Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Springer Verlag, Praxis publishing, Chichester, 407 p.
- Hochachka PW y Somero GN. 2002. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution, 1ra edition. Oxford University Press, New York. 466 pp.
- Hosoi M, Shinzato C, Takagi M, Hosoi-Tanabe S, Sawada H, Terasawa Eri y Toyohara H (2007). Taurine transporter from the giant Pacific oyster *Crassostrea gigas*: function and expresion in response to hyper-and hypo-osmotic stress. Fisheries Science. 73; 385-394.
- Huxtable RJ (1992). Physiological actions of taurine. Physiol. Rev. 72(1): 101-162

- Inoue K, Tsukuda K, Koito T, Miyazaki Y, Hosoi M, Kado R, Miyazaki N y Toyohara H (2008). Possible role of taurine in the deep-sea mussel *Bathymodiolus septemdierum* in adaptation to hydrothermal vent. *FEBS Letters*. 582; 1542-1546.
- Kim S, Takeuchi T, Yokoyama M, Murata Y, Kaneniwa M y Yoshitaka S (2005). Effect of dietary taurine on growth and feeding behavior of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 250; 765-774.
- Kozlowski DJ, Chen Z, Zhuang L, Fei Y, Navarre S y Ganapathy (2008). Molecular characterization and expression pattern of taurine transporter in zebrafish during embryogenesis. *Life Science*. 82; 1004-1011.
- Lunger AN, McLean E, Gaylord TG, Kuhn D y Craig SR (2007). Taurine supplementation to alternative dietary protein used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 271: 401-410.
- Luo Z, Liu YJ, Mai KS, Tian LX, Tan XY, Yang HJ, Liang GY y Liu DH (2006). Quantitative L-lysine requirement of juvenile grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition*. 12: 165-172.
- Mailliard ME, Stevens BR y Mann GE (1995). Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia. *Gastroenterology* 108: 888-910.
- Martínez-Montañó E, Peña E, Focken U y Viana MT (2010). Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): In Vitro uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture* 299: 134-139.

- Matsunari H, Takeuchi T, Takahashi M y Mushiake K (2005). Effect of dietary taurine supplementation on growth performance of yellowtail juvenile *Seriola quinqueradiata*. Fish Sci, 71:1131-1135.
- Matthews JC (2000). Amino acid and peptide transport systems. In: D'Mello JPF (Ed.). Farm Animal Metabolism and Nutrition. CAB International Wallingford, UK. 438 pp.
- Matus-de-la-Parra A, Rosas A, Lazo JP y Viana MT (2007). Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. Fish Physiol. Biochem. 33: 223-231.
- Montes-Girao PJ y Fracalossi DM (2006). Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for Jundia, *Rhamdia quelen*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 37, N°4.
- Nelson DL y Cox MM (2004). Lehninger Principles of Biochemistry; W.H. Freeman, 4th edition. USA.
- Nassar CF (1989). Enzymatic influences on amino acid transport across the small intestine. Comp. Biochem. Physiol. A, 92: 153-157.
- Park G, Takeuchi T, Yokoyama M y Seikai T (2002). Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science. 68; 824-829.
- Pasantes-Morales H, Lezama RA, Ramos-Mandujano G y Tuz KL (2006) Mechanisms of cell volumen regulation in hypo-osmolality. The American journal of medicine. Vol 119 (7A); S4-S11.
- Pearson WN y Reich M (1965). In vitro Studies of Fe Absortion by Everted Intestinal Sacs of the Rat. J Nutrition. 87: 117-124.

- Rosas A, Vazquez-Duhalt R, Tinoco R, Shimada A, Dabramo L.R y Viana M.T (2008). Comparative intestinal absorption of amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture Nutrition*. 14: 481-489.
- Rust BM (2002). Nutrition Physiology. In: Halver JE and Hardy RW. *Fish Nutrition* (Chapter 7), 3rd edn. Academic press, California CA. USA.
- Smith RL (1969). Intestinal amino-acid transport in the marine teleost, *Haemulon plumieri*. *Comp.Biochem. Physiol.* Vol 30: 1115-1123.
- Spitze AR, Wong DL, Rogers QR y Fascetti AJ (2003). Taurine concentrations in animal feed ingredients; cooking influences taurine content. *J. Anim: Physiol: a: Anim. Nutr.* 87; 251-262.
- Strugala GJ, Elsenhans B y Forth W (2000). Active Transport Inhibition in Rat Intestine by Amphiphilic Amines: An *In Vitro* Study with Various Local Anaesthetics. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 59: 907-913.
- Sylvia P (2007). Current Status of Bluefin Tuna Farming in North America. *World Aquaculture Society*.
- Takagi S, Murata H, Goto T, Hayashi M, Hatate H, Endo M, Yamashita H y Ukawa M (2006a). Hemolytic suppression roles of taurine in yellotail *Seriola quinqueradiata* fed non-fishmeal diet based on soybean protein. *Fisheries Science*. 72; 546-555.
- Takagi S, Murata H, Goto T, Hayashi M, Hatate H, Hatate H, Endo M, Yamashita H y Ukawa M (2006b). Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving Growth performance in yearling reared sea bream *Pargus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Science*. 72; 1191-1199.

- Takagi S, Murata H, Goto T, Endo M, Yamashita H y Ukawa M (2008). Taurine is an Essentials nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture*. 280; 198-205.
- Tseng Y y Hwang P (2008). Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 148:419-429.
- Une M, Goto T, Kihira K, Kuramoto T, Hagiwara K, Nakajima T y Hoshita T (1991). Isolation and identification of bile salts conjugated with cysteinolic acid from bile of the red seabream, *Pargosomus major*. *Journal of Lipid Research*. Vol. 32: 1619-1623.
- Wu G (1998). Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr*. 128. 1249-1252.
- Yokoyama M, Takeuchi T, Park GS y Nakazoe J (2001). Hepatic cysteinesulphinate decarboxylase activity in fish. *Aquaculture research*. 32; 216-220.
- Zarate JM y Bradley TM (2007). Molecular cloning and characterization of the taurine transporter of Atlantic salmon. *Aquaculture*. 273; 209-217.
- Zertuche-González JA, Sosa-Nishizaki O, Vaca JG, del Moral Simanek R, Yarish C, Costa-Pierce BA (2008). Marine Science assessment of Capture-Based Tuna (*Thunnus orientalis*) Aquaculture in the Ensenada Region of Northern Baja California, Mexico, Final Report of the Binational Scientific Team to the Packard Foundation, Los Altos, CA.

