

## Expresión y actividad de enzimas digestivas en juveniles de liseta (*Chelon labrosus*) sometidos a diferentes salinidades ambientales

I.M. Pujante<sup>1</sup>, J.A. Martos-Sitcha<sup>1,2</sup>, J.M. Mancera<sup>1</sup>, F.J. Moyano<sup>3</sup> y G. Martínez-Rodríguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz, España. e-mail: isabel.pujante@uca.es

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC), 11510 Puerto Real, Cádiz, España

<sup>3</sup> Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica, Universidad de Almería, 04120 La Cañada de San Urbano, Almería, España

### Summary

The aim of this study was to evaluate the influence of environmental salinity on the mRNA expression and protein activity of the main digestive enzymes of thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*). Specimens of thick-lipped grey mullet were acclimated to different environmental salinities (0, 12, 40 and 55 ppt) during 21 days. Samples of complete digestive system were obtained for mRNA expression analysis and for determining enzymatic activities. Results showed a clear effect of environmental salinity on digestive activity as well as on gene expression of these enzymes. Low salinities had a positive influence on digestive acid proteases, which showed a higher activity and expression in 12 ppt-acclimated specimens salinity, whereas higher mRNA expression levels of alkaline proteases were found in fish maintained at 40 ppt.

### Justificación

La liseta (*Chelon labrosus*, Risso 1827) es una de las especies más representativas del cultivo en estero de la Bahía de Cádiz. Los esteros son zonas sujetas a grandes cambios ambientales, cuyas fluctuaciones dependen directamente de las condiciones climatológicas. Estas alteraciones pueden influir en el estado fisiológico y nutricional del animal. En este sentido, un aumento de la salinidad ambiental origina que el intestino del organismo también actúe como órgano osmorregulador (Bucking y Wood, 2006; Gregorio et al., 2013). El efecto de la salinidad sobre la actividad enzimática-digestiva ha sido estudiado en diversas especies de mugílidos, incluido *Chelon labrosus* (Nikolopoulou et al., 2011; Pujante et al., 2012). Sin embargo, no existe información sobre el efecto de la salinidad en la expresión de enzimas digestivas en esta especie. Por ello, el principal objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la salinidad ambiental sobre la expresión génica y la actividad de las enzimas digestivas más representativas en la liseta, profundizando en la interacción entre el proceso de osmorregulación y asimilación de nutrientes.

### Material y Métodos

Se utilizaron 48 juveniles de *C. labrosus* (peso medio inicial de  $44 \pm 2$  g) suministrados por el Estero Leocadia (Cádiz, España). Los animales fueron mantenidos en circuito cerrado durante 21 días a distintas salinidades ambientales (0, 12, 40 y 55 ppt) y alimentados con el 1 % de su peso. Tras el sacrificio de los individuos, se procedió a la extracción del tracto digestivo completo. Para los análisis de expresión génica, el digestivo completo fue congelado a  $-80$  °C y posteriormente homogenizado con  $N_2$  líquido. Los cambios en la expresión de pepsinógeno, tripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa fueron medidos por QPCR. Para los análisis de actividades enzimáticas, los digestivos fueron homogenizadas manualmente en frío con agua destilada. La cantidad de proteína soluble presente en los extractos, las proteasas ácidas, la actividad alcalina, así como la actividad amilasa, fueron determinadas según la metodología descrita por Moyano et al. (2005).

## Resultados y Discusión

Los datos obtenidos de actividad enzimática mostraron una relación lineal inversa de la actividad específica pepsina con la salinidad, indicando que en ambientes hipersalinos (55 ppt) esta enzima no trabaja con total eficiencia. Por otro lado, los resultados de proteasas alcalinas totales indicaron una actividad específica máxima en peces mantenidos a 40 ppt. Sin embargo, en los mantenidos a 55 ppt se observó una reducción en la actividad de estas enzimas, coincidiendo con lo obtenido para la pepsina. La actividad  $\alpha$ -amilasa presentó un perfil similar a la pepsina.

Los resultados de expresión génica de las distintas enzimas (Tabla I) mostraron que en ambientes isoosmóticos (12 ppt), los individuos expresaban más pepsinógeno. En cambio, el tripsinógeno y la  $\alpha$ -amilasa tenían su nivel máximo de expresión a 40 ppt. A pesar de que no existe correlación entre los resultados de actividad y los de expresión, se observa una relación con respecto a las distintas salinidades. Ambientes isoosmóticos favorecen la expresión de pepsinógeno y, por tanto, un aumento de la actividad pepsina. Mientras que ambientes hipersalinos (40 ppt) inducen un aumento de la expresión de enzimas alcalinas que conlleva en un aumento de su actividad, excepto en el caso de la amilasa, donde la actividad es mayor a bajas salinidades. De nuestros resultados se deduce que *C. labrosus* puede adaptarse fácilmente a las distintas salinidades ambientales, aunque su exposición a salinidades extremas (55 ppt) puede influir negativamente en la capacidad y eficiencia digestiva.

**Tabla I.** Expresión de las enzimas digestivas analizadas en los ejemplares de *C. labrosus* de los distintos grupos experimentales (n=6). Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ )

Expresión (SYBR $\Delta\Delta CT$ )	0 ppt	12 ppt	40 ppt	55 ppt
<b>Pepsinógeno</b>	1.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	5.3 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>
<b>Tripsinógeno</b>	2.2 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	4.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	2.0 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>	1.0 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>	1.1 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>

## Bibliografía

- Bucking, C. y Wood, C.M., 2006. Water dynamics in the digestive tract of the freshwater rainbow trout during the processing of a single meal. *J. Exp. Biol.*, 209: 1883-1893.
- Gregorio, S. F., Carvalho, E. S., Encarnacao, S., Wilson, J. M., Power, D. M., Canario, A. V. y Fuentes, J., 2013. Adaptation to different salinities exposes functional specialization in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata* L.). *J. Exp. Biol.*, 216: 470-479
- Moyano F.J., A.M. Barros, A. Prieto, J. P. Cañavate y S. Cárdenas, 2005. Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae). *AquaTIC*, 22: 39-47.
- Nikolopoulou, D., Moutou, K.A., Fountoulaki, E., Venou, B., Adamidou, S., Alexis, M.N., 2011. Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Bioch. Physiol., Parte A*, 158: 406-414.
- Pujante, I.M., Mancera, Moyano, F.J., 2012. Influencia de la salinidad sobre la capacidad proteolítica de la liseta (*Chelon labrosus*). *V Foro Iberoam. Rec. Mar. Acu.*, Cádiz.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Estero Leocadia (Cádiz, España) por el suministro de los animales experimentales. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-14876 del MICINN otorgado a JMM. JAM-S está financiado por una beca predoctoral FPU (Referencia AP2008-01194) del Ministerio de Educación (España).