

Estudio preliminar sobre la adaptación del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 a ambientes de diferente salinidad

F. J. Arjona, L. Vargas-Chacoff, M. P. Martín del Río y J. M. Mancera

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. Polígono Río San Pedro, s/n. E-11510 Puerto Real (Cádiz), España. Correo electrónico: francisco.arjonamadueno@alum.uca.es

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

El crecimiento del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 está influido por diferentes variables, y una de ellas es la salinidad ambiental. En este trabajo, se estudian los efectos osmorreguladores y metabólicos de la aclimatación a distintas salinidades (5, 15, 25, 42 y 55) durante un periodo de 14 días en juveniles de esta especie. La actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial presentó una relación lineal directa respecto a la salinidad ambiental, mientras que la actividad Na^+, K^+ -ATPasa renal no experimentó variación alguna. Ni la osmolalidad ni los niveles de iones plasmáticos analizados mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. El cortisol y los niveles de glucosa y lactato plasmático aumentaron en los ejemplares adaptados a la mayor salinidad. Los resultados mostraron una buena capacidad de aclimatación en el rango de salinidades ambientales analizado.

Palabras clave: *Solea senegalensis*, osmorregulación, salinidad, actividad Na^+, K^+ -ATPasa.

ABSTRACT

Preliminary study of the adaptation of Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup, 1858 to different salinities

Osmoregulatory and metabolic effects of adaptation to different water salinities (5, 15, 25, 42 and 55) were assessed during a period of 14 days in juveniles of Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup, 1858. The results showed a good capacity to adapt within the range of water salinities tested. Gill Na^+, K^+ -ATPase activity showed a direct lineal relationship with regard to water salinity, whereas kidney Na^+, K^+ -ATPase activity did not change. Plasma osmolality and ions levels did not present differences among the groups. Plasma cortisol, glucose and lactate were higher in the group maintained in the highest water salinity.

Keywords: *Solea senegalensis*, osmoregulation, salinity, Na^+, K^+ -ATPase activity.

INTRODUCCIÓN

El lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 es un teleosteo de alto valor comercial cuyo cultivo está extendiéndose en la región suratlántica española. En esta zona, el cultivo de la espe-

cie se realiza principalmente en esteros, en los que la salinidad del agua puede sufrir modificaciones notables según las condiciones meteorológicas, de modo que en las épocas de lluvias puede disminuir considerablemente, mientras que se incrementa en épocas de verano. Aunque

las observaciones de los acuicultores, así como los resultados de ciertos estudios de campo, han puesto de manifiesto la existencia de una capacidad de esta especie para adaptarse a ambientes de diferente salinidad, no existe ningún trabajo específico que aborde esta materia.

El objetivo de este estudio es analizar esta facultad de adaptación del lenguado senegalés a ambientes de diferentes salinidades. Los resultados permitirán conocer el rango de salinidad al que puede adaptarse la especie y las modificaciones inducidas en el sistema osmorregulador por la adaptación a ambientes hipoosmóticos e hiperosmóticos. Además, los resultados aportados podrán servir para desarrollar diseños experimentales con vistas a determinar la salinidad óptima de cultivo de esta especie. En un medio con salinidad óptima, la reducción del coste metabólico de la regulación osmótica e iónica, y gracias a la manipulación de la salinidad ambiental, podría traducirse en una mejora del crecimiento y de la utilización del alimento por parte del animal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo experimental

Los ejemplares inmaduros de lenguado senegalés ($n = 50$; peso medio: $43,42 \pm 1,85$ g) aclimatados a agua de mar (AM, salinidad 42) fueron proporcionados por la Planta de Cultivos Marinos –Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos (CASEM), Universidad de Cádiz, Puerto Real, Cádiz–. Una vez transferidos a los laboratorios húmedos de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales (Puerto Real, Cádiz), se man-

tuvieron en AM durante 14 días, en dos tanques de 400 l, en régimen de circuito abierto y con una renovación de 100 l/hora. Después de este periodo, fueron sometidos al experimento de adaptación a distintas salinidades.

Para la obtención de las salinidades experimentales, la salinidad se disminuyó mezclando AM con agua dulce previamente declorada, mientras que para incrementarla se incorporó al AM sal marina natural (Salina de La Tapa, El Puerto de Santa María, Cádiz). La osmolalidad y la composición iónica del agua con diferentes salinidades experimentales se muestran en la tabla I. Durante el experimento (octubre de 2004) los animales fueron mantenidos en condiciones naturales de fotoperiodo y a una temperatura del agua constante ($19,5$ °C).

Diseño experimental

Los peces fueron distribuidos aleatoriamente en cinco tanques cúbicos de fibra de vidrio de 400 l de capacidad, a razón de 10 animales por tanque, habiendo sido pesados y medidos antes de su distribución en los mismos. En cada tanque se empleó, en régimen de circuito cerrado, una salinidad distinta: 5, 15, 25, 42 y 55. El circuito cerrado de cada tanque disponía de un filtro exterior (Hydor Prime 30) con un caudal de 450 l/hora, con sus correspondientes cargas de filtro físico (teflón), filtro biológico (biobolas) y filtro químico (carbón activo), además de un filtro biológico exterior seco-húmedo (pequeños rodillos cerámicos y piedras artificiales porosas). La activación de los filtros biológicos se llevó a cabo mediante el activador biológico SERA Nitrivec (SERA, Heinsberg,

Tabla I. Osmolalidad y composición iónica del agua con diferentes salinidades experimentales.

Parámetros	Salinidad				
	5	15	25	42	55
Osmolalidad (mOsm/kg)	140	364	637	1 090	1 546
Na ⁺ (mM)	63	169	307	570	780
Cl ⁻ (mM)	77	194	355	588	957
Ca ²⁺ (mM)	2,67	5,19	7,88	13	17,72
K ⁺ (mM)	1,28	3,48	6,27	11,28	15,36
Mg ²⁺ (mM)	6,95	19,46	34,31	57,11	88,65

Alemania) siguiendo la metodología indicada por el fabricante.

Cada día se determinaba la salinidad y era ajustada en caso de ser necesario. Simultáneamente se evaluó la calidad del agua atendiendo a diversos criterios (nitritos, nitratos y amonio), sin apreciarse cambios significativos según los mismos. Los animales se mantuvieron en los tanques durante un periodo total de 14 días hasta ser sacrificados, y fueron alimentados diariamente con una ración equivalente al 1% del peso de los peces (excepto el día antes del sacrificio, que permanecieron en ayunas). A los 14 días los ejemplares fueron anestesiados, pesados, medidos y muestreados para análisis de plasma, branquias, riñón e hígado.

Toma de muestras

Al inicio del experimento los ejemplares fueron anestesiados en agua con 2-fenoxietanol (Sigma, P-1126) a la concentración de 0,5 ml/l para la obtención de los datos biométricos (longitud y peso), mientras que la concentración fue de 1 ml/l al final del experimento para la obtención de datos biométricos y toma de muestras para análisis. Las muestras de sangre, aproximadamente 0,5 ml, fueron obtenidas por punción de la arteria caudal utilizando jeringas de insulina previamente heparinizadas con heparina amónica (Sigma H-6279, 25 000 unidades/3 ml de solución salina 0,9 % de NaCl). Dichas muestras eran recogidas en tubos Eppendorf de 1,5 ml heparinizados y mantenidas a 4 °C. Posteriormente fueron centrifugadas durante 3 min a 10 000 G y a 4 °C de temperatura. Se obtuvieron tres alícuotas de plasma que fueron almacenadas a -80 °C en tubos Eppendorf de 0,5 ml hasta el posterior análisis de parámetros osmorreguladores (osmolalidad, sodio, calcio y cloruro), metabólicos (glucosa, lactato y proteínas) y hormonales (cortisol).

De cada animal se tomó el primer arco branquial del lado izquierdo, que fue secado con papel absorbente, del que se obtuvo una biopsia con tijeras de microdissección que fue almacenada en tubos Eppendorf de 0,5 ml conteniendo 100 µl de tampón SEI (McCormick, 1993) a -80 °C hasta el momento de su análisis. Tam-

bién se tomaron biopsias renales siguiendo el mismo procedimiento. Las biopsias branquiales y renales fueron analizadas para la determinación de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa. El hígado fue extraído y pesado para la determinación del índice hepatosomático (IHS).

Técnicas de análisis

La actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial y renal fue determinada usando el método para microplaca diseñado por McCormick (1993) y adaptado para el lenguado senegalés. Los tejidos branquial y renal de las biopsias fueron homogeneizados en 125 µl de tampón SEI con 0,1 % de ácido deoxicólico (Sigma, D-6750), siendo centrifugado a 2 000 G durante 30 s a 4 °C. El sobrenadante fue dispuesto por duplicado en la microplaca en volúmenes de 10 µl. En cada pocillo se añadieron 200 µl de reactivo de ensayo con o sin 0,5 mmol/l de ouabaína (Sigma, O-3125), midiéndose la absorbancia a 340 nm durante 12 min, con mezcla intermitente, a 25 °C. La actividad Na^+, K^+ -ATPasa sensible a la ouabaína fue detectada por acoplamiento enzimático de la hidrólisis de ATP a través de la acción de la piruvato kinasa y la lactato deshidrogenasa a la oxidación de NADH, fue medida por espectrofotometría como se ha descrito y se expresó como µmol de ADP/mg de proteína/h. Las proteínas solubles fueron medidas usando el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985) con el kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce, Prod #23225) adaptado para microplaca.

La osmolalidad plasmática y del agua fue medida con un osmómetro de presión de vapor (Fiske One-Ten Osmometer, Fiske; VT, EE UU) y expresada como mOsm/kg. Las concentraciones de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en el agua fueron medidas mediante un espectrómetro de plasma Iris Intrepid de Thermo Elemental (Servicio Central de Ciencia y Tecnología, Universidad de Cádiz), y la concentración de Cl^- con el kit comercial de medición de Spinreact (Ref. 1001360). En el plasma, la concentración de Na^+ fue medida por absorción atómica de llama usando un espectrómetro de absorción atómica Unicam 939, la concentración de Ca^{2+} con el kit comercial de Spinreact (Ref. 1001061) adapta-

do para microplaca y la de Cl^- con el kit usado para la medición de este anión en el agua.

La concentración plasmática de glucosa y de lactato se midió mediante kits comerciales de Spinreact (glucosa: ref. 1001200; lactato: ref. 1001330) adaptados para microplaca. La concentración plasmática de proteínas solubles se determinó de igual modo que el descrito. Los ensayos adaptados a microplaca fueron realizados en un lector de microplacas automático (EL 340, Bio-Tek Instrument, Winooski; VT, EE UU) controlado por el software DeltaSoft 3 para Macintosh (BioMetallics, Inc, NJ).

La concentración plasmática de cortisol se midió mediante radioinmunoensayo (RIA) en plasma usando anticuerpos comerciales (Campro Scientific; Veenedaal, Países Bajos). Fracciones de 10 μl de muestra de plasma diluido 1:5 (v/v) con solución salina 0,9 % de NaCl fueron incubadas durante una noche a 4 °C con 100 μl del primer anticuerpo (IgG-F-1; 1:800), 2 000 cpm ^{125}I -cortisol (Amersham; Buckinghamshire, Reino Unido) y 100 μl del segundo anticuerpo (GARGG; 1:320). Todos los constituyentes fueron disueltos en tampón RIA para cortisol [0,063 M Na_2HPO_4 , 0,013 M Na_2EDTA , 0,02 % (p/v) NaN_3 , 0,1 % (p/v) de ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS; Sigma, A-1028) y 0,1 % (p/v) de γ -globulina bovina (Sigma, G4904)]. Los inmunocomplejos precipitaron por la adición de 1 ml de polietilenglicol 5 % (p/v) y BSA (Bovine serum albumin; Fluka, 05475) 2 % (p/v) enfriados con hielo con la subsiguiente centrifugación (20 min, 2 000 G, 4 °C). El cómputo de los *pellets* se realizó con un contador de radiación gamma (1272 Clinigamma, LKB Wallac; Turku, Fin-

land) determinándose la concentración de cortisol en plasma.

Estadística

Las diferencias significativas entre grupos fueron analizadas a través de un análisis de la varianza de un factor (salinidad). Cuando se obtuvieron diferencias significativas, se utilizó el test de Tukey para la comparación de grupos. Los grupos fueron considerados significativamente diferentes para $P < 0,05$. Previamente a la ejecución del análisis de la varianza de un factor, se practicaron tests de normalidad y de homocedasticidad. Si alguno de estos tests resultaba no válido, se procedía a una transformación logarítmica de los datos para cumplir las condiciones del análisis.

RESULTADOS

No se apreció mortalidad durante el desarrollo del experimento, lo que indica la buena adaptabilidad del lenguado senegalés al amplio rango de salinidades ambientales a que fue sometido (5 a 55).

Los resultados de osmolalidad y concentración plasmática de iones en los ejemplares después de 14 de días de aclimatación a las distintas salinidades se muestran en la tabla II. La osmolalidad plasmática no mostró una tendencia al incremento con la salinidad ambiental y no se observaron diferencias significativas entre grupos. Tampoco se apreciaron incrementos de las concentraciones plasmáticas de Na^+ , Cl^- y Ca^{2+}

Tabla II. Osmolalidad y concentración plasmática de diferentes iones en ejemplares de *S. senegalensis* aclimatados a diferentes salinidades ambientales por un periodo de dos semanas. Los datos son expresados como media \pm error estándar de la media (e.e.m.) ($n = 9-10$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos (anova, un factor; $P < 0,05$).

Parámetros	Salinidad				
	5	15	25	42	55
Osmolalidad (mOsm/kg)	362 \pm 7 a	355 \pm 5 a	373 \pm 10 a	379 \pm 9 a	357 \pm 5 a
Na^+ (mM)	161 \pm 9 a	163 \pm 4 a	171 \pm 4 a	156 \pm 4 a	166 \pm 6 a
Cl^- (mM)	233 \pm 11 a	193 \pm 9 a	211 \pm 12 a	200 \pm 16 a	221 \pm 12 a
Ca^{2+} (mM)	4,15 \pm 0,19 a	4,14 \pm 0,43 a	3,85 \pm 0,22 a	4,19 \pm 0,12 a	5,01 \pm 0,43 a

con la salinidad, ni diferencias significativas entre los grupos analizados para cada ión.

La actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial presentó una relación lineal directa respecto a la salinidad ambiental (figura 1). Se apreciaron diferencias significativas entre todos los grupos para cada una de las salinidades, excepto entre los grupos aclimatados a salinidades de 25 y 15. La actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial aumentó en un 33,71 % en los animales aclimatados a salinidad 55 respecto al grupo mantenido en AM (salinidad 42), mientras que disminuyó en un 77,13 % en los ejemplares adaptados a salinidad 5.

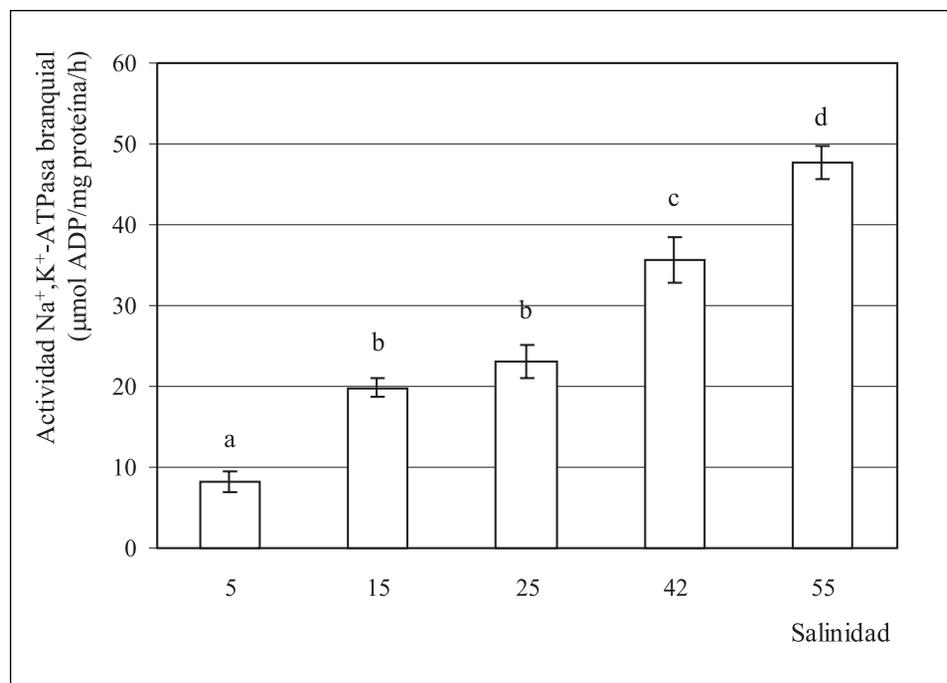
Por otra parte, la actividad Na^+, K^+ -ATPasa renal no presentó ningún patrón de cambio respecto a la salinidad ambiental, no observándose diferencias significativas entre los grupos para cada una de las salinidades (figura 2).

La concentración de cortisol plasmático aumentó en los ejemplares aclimatados a la mayor salinidad (55) respecto a los ejemplares mantenidos en AM (42). En los grupos aclimatados a salinidades 25 y 15, esta concentración aumentó gradualmente a medida que disminuía la salinidad, aunque disminuyó en el grupo aclimatado a salinidad 5 (figura 3). Sin embargo, las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$), si bien la probabilidad obtenida en el análisis de la varianza de

un factor fue $P = 0,074$, muy cercana al nivel de significación.

El índice hepatosomático (IHS) y la concentración plasmática de metabolitos en los ejemplares adaptados a diferentes salinidades ambientales se ofrecen en la tabla III. El IHS no fue estadísticamente significativo en ninguno de los grupos analizados, aunque se pudo observar una tendencia a incrementar su valor en las salinidades distintas a la de AM. La concentración plasmática de glucosa aumentó en los ejemplares adaptados a salinidad 55 con respecto a los animales en agua de mar (salinidad 42), aumento estadísticamente significativo. Entre los grupos aclimatados a salinidades 5, 15, 25 y 42 no hubo diferencias significativas, observándose en ellos aproximadamente las mismas concentraciones de glucosa. La concentración plasmática de lactato también aumentó en los animales adaptados a agua hipersalina (55) respecto al AM (42), pero este aumento no fue estadísticamente significativo. Por otra parte, las concentraciones de lactato en los otros grupos experimentales se mantuvieron aproximadamente iguales. La concentración de proteínas solubles en plasma presentó valores más elevados en los grupos adaptados a salinidades 25, 42 y 55 que en los de los grupos adaptados a salinidades 5 y 15, pero no se detectaron diferencias significativas entre grupos.

Figura 1. Efecto de la adaptación de *S. senegalensis* a distintas salinidades ambientales durante dos semanas sobre la actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial. Los datos son expresados como media \pm e.e.m. ($n = 9-10$). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos (anova, un factor; $P < 0,05$).



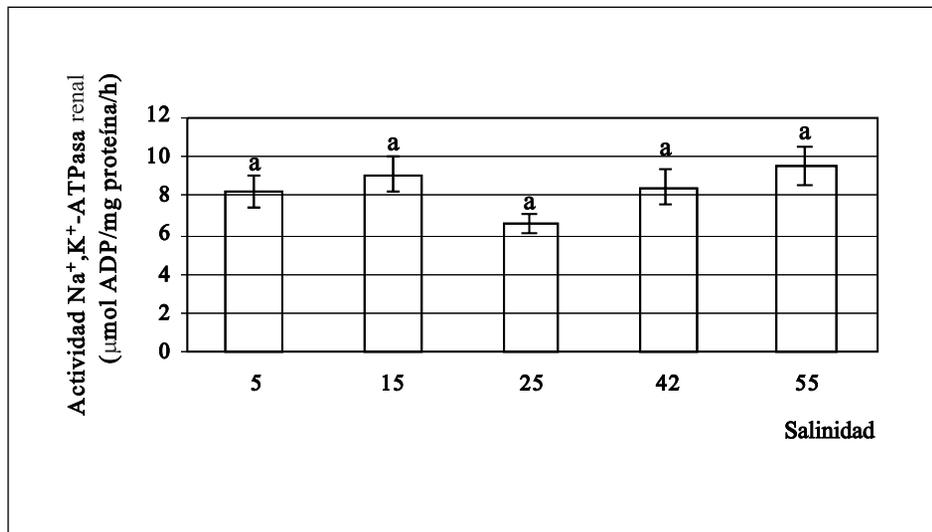


Figura 2. Efecto de la adaptación de *S. senegalensis* a distintas salinidades ambientales durante dos semanas sobre la actividad Na⁺,K⁺-ATPasa renal. Los datos son expresados como media ± e.e.m. (n = 9-10). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos (anova, un factor; P < 0,05).

DISCUSIÓN

El presente estudio muestra la buena eurihali- nidad y la capacidad del lenguado senegalés para sobrevivir y adaptar sus mecanismos osmorreguladores a un amplio rango de salinidades ambientales (desde 5 hasta 55). Sin embargo, estudios preliminares mostraron que ejemplares transferidos a agua dulce dechlorada después de 14 días de adaptación a salinidad 5 sufrían una mortalidad del 100 % (resultados no mostrados), indicando la incapacidad de esta especie para adaptarse a agua dulce. Además, la transferencia desde AM (salinidad 42) a agua de salinidad 2 no produjo mortalidad en el lenguado senegalés transcurridos 7 días de aclimatación (resultados no mostrados), sugiriendo que éste

podría ser el límite inferior de salinidad al que se puede adaptar esta especie.

Parámetros plasmáticos osmorreguladores

En teleósteos eurihalinos la transferencia a ambientes con salinidades distintas activa el sistema osmorregulador, distinguiéndose dos fases después de la transferencia: i) un periodo de adaptación, que implica diversos cambios en los parámetros osmorreguladores y metabólicos, y ii) un periodo crónico de regulación osmótica e iónica, en el que estos parámetros alcanzan un nuevo estadio homeostático similar al inicial, tras el cual el animal ya está perfectamente adaptado al nuevo ambiente (Holmes y Donaldson, 1969).

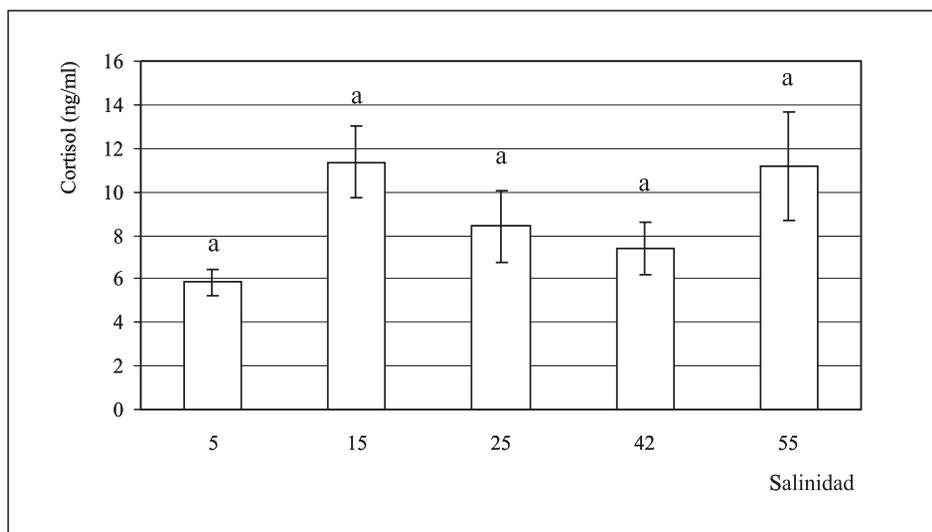


Figura 3. Efecto de la adaptación de *S. senegalensis* a distintas salinidades ambientales durante dos semanas sobre la concentración de cortisol plasmático. Los datos son expresados como media ± e.e.m. (n = 9-10). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos (anova, un factor; P < 0,05).

Tabla III. Concentración plasmática de glucosa, lactato y proteínas en ejemplares de *S. senegalensis* aclimatados a diferentes salinidades ambientales por un periodo de dos semanas. Los datos son expresados como media \pm e.e.m. (n = 9-10). Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos (anova, un factor; P < 0,05).

Concentraciones	Salinidad				
	5	15	25	42	55
Glucosa (mM)	2,61 \pm 0,12 a	2,58 \pm 0,31 a	2,56 \pm 0,13 a	3,01 \pm 0,25 a	4,49 \pm 0,30 b
Lactato (mM)	0,44 \pm 0,04 a	0,54 \pm 0,10 a	0,42 \pm 0,03 a	0,52 \pm 0,07 a	0,77 \pm 0,16 a
Proteínas (mg/ml)	39,01 \pm 1,25 a	39,44 \pm 1,48 a	43,89 \pm 1,79 a	43,43 \pm 1,19 a	43,50 \pm 1,54 a
IHS	1,42 \pm 0,09 a	1,55 \pm 0,18 a	1,58 \pm 0,11 a	1,08 \pm 0,05 a	1,54 \pm 0,05 a

En este experimento, después de dos semanas de aclimatación, el animal se encuentra en el periodo crónico de regulación, como lo indica el que no se observaran diferencias significativas en la osmolalidad y las concentraciones plasmáticas de Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} en los ejemplares de cada uno de los grupos aclimatados a las distintas salinidades ambientales. De acuerdo con Franklin, Forster y Davison (1992), en teleósteos, un desequilibrio osmótico es considerado como un síntoma de inadaptación al medio ambiente que le rodea. Nuestros resultados indican que en el lenguado senegalés no se da esta circunstancia en un rango de salinidad desde 5 hasta 55, al menos durante el periodo de tiempo estudiado (14 días). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados para *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842), especie cuya adaptación a un rango de salinidad desde 0 a 40 apenas produjo cambios en la osmolalidad y en la concentración iónica plasmática después de 15 días de adaptación (Sampaio y Bianchini, 2002).

Actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial

La actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial está relacionada con el flujo de Na^+ y Cl^- hacia el exterior del animal en medios hiperiónicos (Marshall, 2002). En casi todos los teleósteos, un incremento de la salinidad ambiental produce un aumento de la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial (McCormick, 1995). El lenguado senegalés presenta una clara relación lineal directa entre la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial y la salinidad ambiental, alcanzándose las mayores actividades en agua hipersalina (55) y las menores en agua de baja salinidad (5).

Sin embargo, existen especies con diferentes patrones de respuesta de la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial respecto a la salinidad ambiental. En *Platichthys flesus* (L., 1758) (Stagg y Shuttleworth, 1982) y *Morone saxatilis* (Walbaum, 1792) (Madsen *et al.*, 1994) no se observaron diferencias en la actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial entre ejemplares adaptados a agua dulce y agua de mar. En otras especies eurihalinas, esta actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial presenta una curva con forma de U respecto a la salinidad ambiental –Jensen, Madsen y Kristiansen (1998) para *Dicentrarchus labrax* (L., 1758); Laiz-Carrión *et al.* (2005) para *Sparus aurata* (L., 1758)–. Los peces eurihalinos de origen marino presentan una alta permeabilidad branquial y tasas de flujos iónicos mucho mayores que las especies eurihalinas de origen dulceacuícola. Así, los peces eurihalinos de origen marino necesitarían una mayor actividad Na^+ , K^+ -ATPasa branquial para compensar la pérdida iónica y (o) la ganancia de agua a través del epitelio branquial en ambientes de baja salinidad (McCormick, 1995).

La enzima Na^+ , K^+ -ATPasa se encuentra localizada, en las branquias, en las células de cloruro. Pisam y Rambourg (1991) describieron dos tipos morfológicos perfectamente diferenciados de células de cloruro: α y β . Las células de cloruro α aparecen en ambientes de agua salada, mientras que las células de cloruro β constituyen un subtipo que solamente se ha descrito en agua dulce (Hirose *et al.*, 2003). En las células de cloruro α , el mayor componente es la enzima Na^+ , K^+ -ATPasa, cuya actividad está relacionada con la capacidad osmorreguladora de este órgano para expulsar iones en un medio hiperosmótico (McCormick, 2001; Marshall, 2002). De esta

forma, el aumento observado en el presente estudio en la actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial en paralelo con el incremento de la salinidad ambiental está de acuerdo con el papel fisiológico de esta bomba, como ya se ha comentado.

Por el contrario, en medios hipoosmóticos aparecerían las células de cloruro β , cuyo principal componente es la enzima H^+ -ATPasa, principal enzima implicada en la captación de Na^+ en un medio hipoosmótico (Lin y Randall, 1993; Marshall, 2002). Con ello, a medida que disminuye la salinidad, la bomba Na^+, K^+ -ATPasa entra a desempeñar un papel secundario, siendo la bomba H^+ -ATPasa la principal enzima implicada en la toma de iones del medio externo (al menos, en lo que se refiere al Na^+). Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, donde la actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial del lenguado senegalés disminuye a medida que decrece la salinidad. Así mismo, y de acuerdo con McCormick (1995), la baja actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial en salinidad 5 podría reflejar la capacidad del lenguado para reducir en este ambiente la permeabilidad del epitelio branquial y así disminuir los procesos de difusión de agua e iones. Esto reflejaría la buena capacidad de adaptación de esta especie a ambientes de baja salinidad.

Actividad Na^+, K^+ -ATPasa renal

El riñón de los teleósteos eurihalinos experimenta cambios en la morfología, la excreción de iones divalentes, la tasa de filtración glomerular y la producción de orina durante la aclimatación a ambientes de distinta salinidad (Beyenbach, 1995). De forma análoga, la actividad Na^+, K^+ -ATPasa renal también presenta cambios en respuesta a la variación de la salinidad ambiental (Venturini *et al.*, 1992). En *S. aurata* la aclimatación a ambientes de elevada salinidad produce un aumento de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa renal (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003). Este aumento de la actividad puede ser atribuido a un aumento en la producción de orina y a un incremento del transporte iónico en los ejemplares adaptados a medios hiperosmóticos. Sin embargo, en el lenguado senegalés no se observaron cambios en la actividad Na^+, K^+ -

ATPasa renal debidos a la adaptación a las distintas salinidades ambientales.

La nefrona posee distintas regiones con actividad Na^+, K^+ -ATPasa que ejercen diferentes funciones en los procesos de absorción y secreción de agua e iones, tanto en ambientes hipoosmóticos como hiperosmóticos (Jobling, 1995; Beyenbach, 1995). En el análisis de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa renal se trabajó con homogeneizados de biopsias de riñón, por lo que no se discriminó entre distintas regiones de la nefrona, pudiendo existir diferentes modificaciones (aumentos/descensos) de dicha actividad en estas regiones que se contrarrestarían entre sí. En caso de ser cierta esta hipótesis, no deberían obtenerse modificaciones significativas en la actividad Na^+, K^+ -ATPasa renal ante cambios en la salinidad ambiental.

Cortisol

El cortisol desempeña un papel muy importante en la adaptación de teleósteos a ambientes hiperosmóticos, induciendo respuestas fisiológicas tales como un aumento del número y el tamaño de las células de cloruro y un incremento de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial (McCormick, 1995). En los ejemplares de lenguado senegalés se apreció un aumento de los niveles plasmáticos de cortisol en la salinidad 55 respecto al grupo control de AM (salinidad 42). Esto concordaría con la consideración del cortisol como una hormona que facilita la adaptación a ambientes de alta salinidad y cuyos niveles deberían aumentar en dichos ambientes. Así, en el caso del lenguado senegalés, y tras 14 días de aclimatación, el aumento de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial en el grupo aclimatado a salinidad 55 podría ser producido por el cortisol. Además, el cortisol también presenta otras acciones metabólicas que necesitan ser tenidas en cuenta (ver el contenido del epígrafe siguiente).

Algunos estudios también han demostrado una implicación del cortisol en la toma de iones del medio, lo que sugiere una función del cortisol en la adaptación a ambientes hipoosmóticos (McCormick, 2001). Así mismo, el cortisol, en peces teleósteos, también desempeña una función de glucocorticoide al aumentar la disponibilidad de glucosa plasmática, gracias a una esti-

mulación de la gluconeogénesis en el hígado, así como incrementar los niveles de lactato plasmático (Van der Boon *et al.*, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). Los mayores niveles de cortisol plasmático en los ejemplares aclimatados a alta salinidad podría ser la razón del aumento de la concentración plasmática de glucosa y lactato. Por debajo de la salinidad 42, los ejemplares aclimatados a salinidad 15 también presentan niveles elevados de cortisol; sin embargo, los parámetros plasmáticos osmorreguladores y metabólicos no indican una situación de estrés en esta salinidad. La razón de este incremento en los niveles de cortisol en una salinidad ambiental cercana al punto isoosmótico del lenguado merece ser analizada en mayor profundidad.

Parámetros plasmáticos metabólicos

En los peces teleósteos, la glucosa y el lactato son considerados, al igual que el cortisol, indicadores de estrés (Wendelaar Bonga, 1997). Los mayores valores plasmáticos de estas sustancias se obtuvieron en los individuos del grupo adaptado a la mayor salinidad (55), lo que podría revelar la existencia de una situación de estrés para los ejemplares de lenguado senegalés mantenidos en esta salinidad.

La branquia presenta una alta actividad metabólica (Mommensen, 1984). Este órgano usa la glucosa y el lactato como sustratos para mantener su alta actividad metabólica. En un ambiente hipersalino (55) el lenguado senegalés presenta un incremento de la actividad Na^+, K^+ -ATPasa en las branquias, de forma que los elevados niveles plasmáticos de glucosa y lactato podrían ser usados por este órgano para satisfacer la demanda energética que supone la adaptación a un ambiente hipersalino. En el caso de ambientes de baja salinidad, se han descrito incrementos de la glucosa y el lactato plasmáticos en *S. aurata* (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2003; Guzmán *et al.*, 2004; Laiz-Carrión *et al.*, 2005), apuntando la existencia de una situación de estrés continuado en esta salinidad. En el caso del lenguado senegalés no se observaron incrementos de los niveles plasmáticos de lactato ni de glucosa en ambientes de baja salinidad, pudiéndose sugerir

un efecto de hemodilución y de alto consumo de estos metabolitos en los tejidos osmorreguladores, lo que originaría la ausencia de apreciación de un aumento en los niveles plasmáticos de estos metabolitos.

CONCLUSIONES

El lenguado senegalés es capaz de adaptarse a un amplio rango de salinidades ambientales con cambios pequeños de sus parámetros osmorreguladores plasmáticos (osmolalidad y concentraciones iónicas), lo que indica una adecuada capacidad osmorreguladora en estos ambientes. La actividad Na^+, K^+ -ATPasa branquial presentó una relación lineal directa con la salinidad ambiental que reflejaría una buena adaptación de este órgano osmorregulador (modificaciones en la permeabilidad epitelial) en ambientes de baja salinidad. Además, los requerimientos energéticos necesarios para hacer frente a las distintas condiciones osmóticas son cubiertos por la glucosa y el lactato principalmente, indicación, también, de una buena adecuación del metabolismo a las distintas situaciones osmorreguladoras.

AGRADECIMIENTOS

F. J. Arjona es becario predoctoral del Programa Nacional FPU del MEC. Trabajo parcialmente subvencionado por los proyectos CEDT/OTRI-07 y CEDT/ATT-D10-2004 (Consejería de Empleo y Desarrollo Tecnológico de la Junta de Andalucía), BFU2004-04439-C02-01 y PETRI 95-0945-OP (Ministerio Educación y Ciencia) a J. M. Mancera.

BIBLIOGRAFÍA

- Beyenbach, K. W. 1995. Secretory electrolyte transport in renal proximal tubules of fish. En: *Fish Physiology. "Ionoregulation: Cellular and Molecular approaches"*. C. M. Wood y T. J. Shuttleworth (eds.) XIV: 85-106. Academic Press. Nueva York.
- Boon, J. van der, G. E. E. J. M. van den Thillart y A. D. F. Addink. 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 47-53.

- Franklin, C. E., M. E. Forster y W. Davison. 1992. Plasma cortisol and osmoregulatory changes in sockeye salmon transferred to seawater: comparison between successful and unsuccessful adaptation. *J. Fish Biol.* 41: 113-122.
- Guzmán, J. M., S. Sangiao-Alvarellos, R. Laiz-Carrión, J. M. Míguez, M. P. Martín del Río, J. L. Soengas y J. M. Mancera. 2004. Osmoregulatory action of 17 β -Estradiol in the gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Exp. Zool.* 301A: 828-836.
- Hirose, S., T. Kaneko, N. Naito e Y. Takei. 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B: 593-620.
- Holmes, W. N. y E. M. Donaldson. 1969. The body compartments and the distribution of electrolytes. En: *Fish Physiology*. W. S. Hoar y D. J. Randall (eds.) 1: 1-89. Academic Press. San Diego, EE UU.
- Jensen, M. K., S. S. Madsen y K. Kristiansen. 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Exp. Zool.* 282: 290-300.
- Jobling, M. 1995. *Environmental biology of fishes*. Chapman & Hall. Londres: 455 pp.
- Laiz-Carrión, R., P. M. Guerreiro, J. Fuentes, A. V. M. Canario, M. P. Martín del Río y J. M. Mancera. 2005. Branchial osmoregulatory response to salinity in the Gilthead Sea Bream, *Sparus auratus*. *J. Exp. Zool.* 303A: 563-576.
- Lin, H. y D. J. Randall. 1993. H⁺-ATPase activity in the crude homogenates of fish gill tissue: Inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. *J. Exp. Biol.* 180: 163-174.
- Madsen, S. S., S. D. McCormick, G. Young, J. S. Enderesen, R. S. Nishioka y H. A. Bern. 1994. Physiology of seawater acclimation in the striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry* 13: 1-11.
- Marshall W. S. 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *J. Exp. Zool.* 293: 264-283.
- McCormick, S. D. 1993. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 50: 656-658.
- McCormick, S. D. 1995. Hormonal control of gill Na⁺,K⁺-ATPase and chloride cell function. En: *Fish Physiology*. C. M. Wood y T. J. Shuttleworth (eds.) 14: 285-315. Academic Press. Nueva York.
- McCormick, S. D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in fish. *Am. Zool.* 41: 781-794.
- Mommsen, T. P. 1984. Metabolism of the fish gill. En: *Fish Physiology*. W. S. Hoar y D. J. Randall (eds.) XB: 203-238. Academic Press. Nueva York.
- Pisam, M. y A. Rambourg. 1991. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *Int. Rev. Cytol.* 130: 191-232.
- Sampaio, L. A. y A. Bianchini. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 269: 187-196.
- Sangiao-Alvarellos, S., R. Laiz-Carrión, J. M. Guzmán, M. P. Martín del Río, J. M. Míguez, J. M. Mancera y J. L. Soengas. 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285: R897-R907.
- Smith, O. K., R. I. Krohon, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson y D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using biocinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Stagg, R. M., y T. J. Shuttleworth. 1982. Na⁺, K⁺-ATPase, ouabain binding and ouabain-sensitive oxygen consumption in gill from *Platichthys flesus* adapted to seawater and freshwater. *J. Cell. Physiol.* 147: 93-99.
- Venturini, G., E. Cataldi, G. Marino, P. Pucci, L. Garibaldi y P. Bronzi. 1992. Serum ions and ATPase activity in gills, kidney and oesophagus of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Pisces, Perciformes) during acclimation trial to fresh water. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A: 451-454.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 7: 591-625.