

Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae)

Francisco J. Moyano¹, Antonia M. Barros¹, Ana Prieto², José P. Cañavate², Salvador Cárdenas²

¹ Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior
Universidad de Almería (España)

² Departamento de Producción, CIFPA "El Toruño" (IFAPA)
Apartado de Correos 16, 11500 El Puerto de Santa María, Cádiz (España)
e-mail: salvador.cardenas.rojas@juntadeandalucia.es

Resumen

La hurta, *Pagrus auriga*, es un pez de elevado valor comercial en el Sur de España, cuyo cultivo está comenzando a ser desarrollado. En este trabajo, se presentan los primeros resultados obtenidos acerca de la evolución de las principales enzimas digestivas desde la eclosión de las larvas hasta que alcanzan una edad de 40 días. La actividad de la tripsina aumentó gradualmente a lo largo del desarrollo larvario, hasta alcanzar un valor estacionario en torno a 40 UF/individuo, en larvas a partir de 25 días. La quimotripsina presentó una actividad similar en las larvas de más edad. Sin embargo, hasta alcanzar los 10 días de edad, la actividad de la quimotripsina creció mucho más rápidamente. La actividad de proteasa ácida se detectó a partir de los 30 días de edad. La actividad amilasa también se incrementó a lo largo del desarrollo larvario, pero lo hizo con una velocidad muy inferior a la encontrada para las proteasas. Las esterasas se incrementaron en dos órdenes de magnitud desde el inicio de la alimentación hasta los 40 días de edad, alcanzando máximos cercanos a 100 U/individuo.

Palabras clave: ontogenia, enzimas, nutrición, larvas, hurta, *Pagrus auriga*, Sparidae

Summary

Ontogeny of digestive enzymes in redbanded seabream, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae), larvae

The redbanded seabream, *Pagrus auriga*, is a highly appreciated fish in South Spain, and its culture development is in course. In this work, initial information on digestive enzymes found in 0 to 40 DAH is given. Trypsin activity gradually increased throughout larval development until reaching a steady state, of around 40 UF/individual, for larvae older than 25 DAH. Chemotrypsin was found to have similar activity in old larvae, but showed a much faster initial activity in larvae up to 10 DAH. Acid protease activity was significant only in fish older than 30 DAH. Amylase activity also increased throughout larval development, but in a noticeably lesser extent than proteases. Esterases increased two-fold from first feeding to 40 DAH, reaching maximum activities close to 100 UF/individual.

Key words: ontogeny, enzymes, nutrition, larvae, redbanded seabream, *Pagrus auriga*, Sparidae

Introducción

La hurta, *Pagrus auriga* (Valenciennes, 1843), es un espárido marino muy apreciado comercialmente en Andalucía donde se denomina "urta" y en otras regiones como Canarias donde se denomina "sama roquera". Se caracteriza por su coloración rosada típica con 4-5 bandas transversales de distinta anchura, siendo la mayor la situada en posición central (Figura 1).

Estas bandas son más patentes en los juveniles, mientras que en los adultos este patrón queda más difuminado, especialmente en los machos donde puede ser prácticamente imperceptible.

Figura 1. Ejemplar adulto de hurta, *Pagrus auriga*.



Es una especie hermafrodita proterogina (Aleksseev, 1982). En las costas andaluzas la maduración sexual comienza en abril y termina en agosto (Cárdenas, 1997), momento en que comienza la puesta, cuando la temperatura del agua oscila entre 12 y 24°C. En cautividad la puesta se desarrolla desde septiembre hasta abril (Cárdenas, 2004).

La bibliografía existente sobre la biología larvaria de la hurta es muy escasa (Prieto y cols, 2003; Lozano y cols, 2004), en la cual se hace referencia a los magníficos crecimientos obtenidos en los 30 primeros días de vida.

En este trabajo se realiza una evaluación de las actividades de las principales enzimas digestivas presentes en larvas de hurta (*Pagrus auriga*) con objeto de determinar hasta qué punto su nivel de actividad puede ser un factor condicionante en el empleo de alimentos artificiales para su cría larvaria.

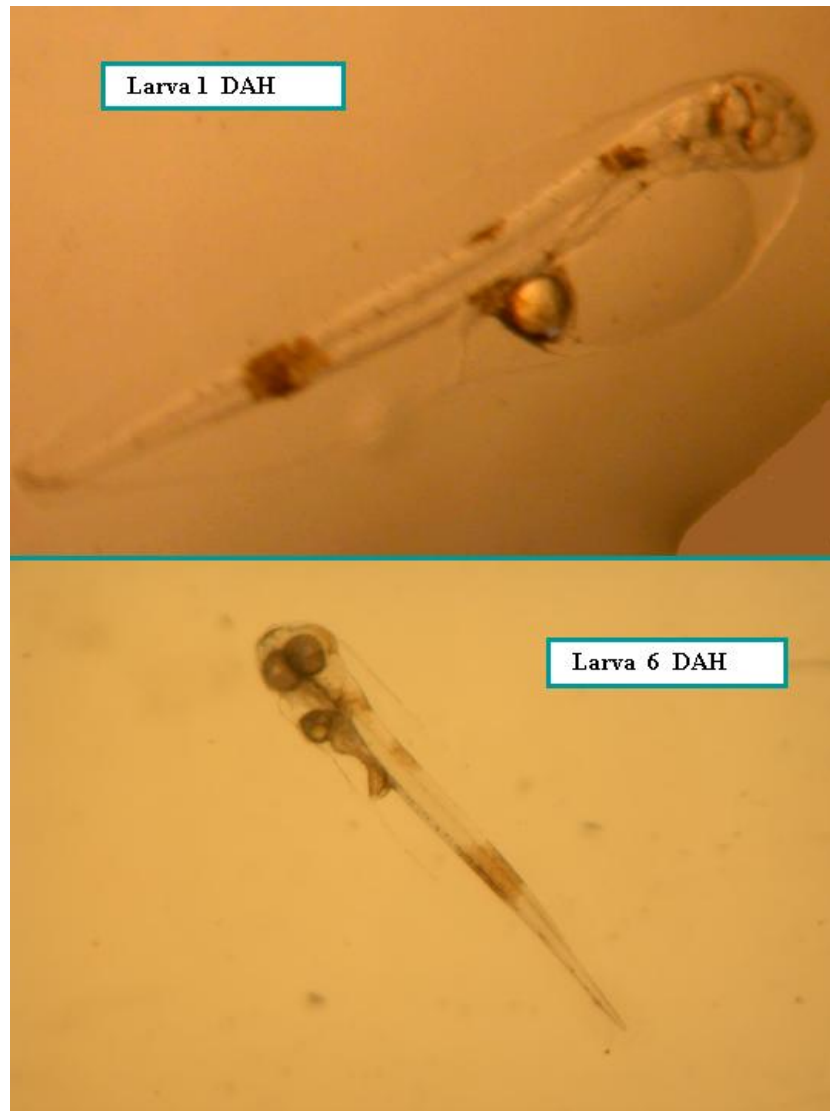
Material y métodos

• Material biológico y preparación de extractos

Se utilizaron muestras liofilizadas de distintos estadios larvarios de hurta (*Pagrus auriga*) desde 0 a 41 días de edad (Figura 2), procedentes de puestas obtenidas en cautividad en el CIFPA "El Toruño" (IFAPA). Para la determinación de actividades tripsina, quimotripsina y amilasa, dado que se iban a emplear sustratos fluorimétricos de alta sensibilidad, se homogenizaron individualmente 5 larvas por cada punto de muestreo; el resto de actividades se determinaría sobre extractos preparados a partir de un pool de larvas preparado a partir de 10 mg/ml.

Las muestras se homogenizaron en Tris-HCl 50 mM 20 mM CaCl₂ pH 7,5 empleando un homogeneizador mecánico (Heidolph) manteniendo la muestra en baño de hielo. Posteriormente los extractos obtenidos se centrifugaron a 16 900 g durante 15 min a 4°C. La cantidad de proteína soluble presente en los extractos se determinó mediante la técnica de Bradford (1976).

Figura 2. Larvas de hurtas de 1 y 6 días de vida (DAH).



• **Medición de actividades enzimáticas**

- Actividades de tripsina y quimotripsina: Se emplearon bis-(CBZ-Ala-Arg amida) y bis-(succinil-Ala-Ala-Pro-Phe) como sustratos específicos para determinar fluorimétricamente las actividades de tripsina y quimotripsina, respectivamente.
- Actividad de proteasa ácida: se empleó hemoglobina como sustrato, según la metodología descrita por Anson (1938).
- Amilasa: Se empleó un kit basado en el uso de almidón fluorescente (EnzChek, Molecular Probes).
- Lipasa: según el método de McKellar y Cholette (1986), modificado por Versaw y cols. (1989), empleando β -naftil caprilato y β -naftil butirato como sustratos.
- Fosfatasa: según el método descrito por Bergmeyer (1974), empleando como sustrato 4-nitrofenol.
- Leucina aminopeptidasa: según el método de Pfeiderer (1970).

• Zimograma de la actividad proteasa

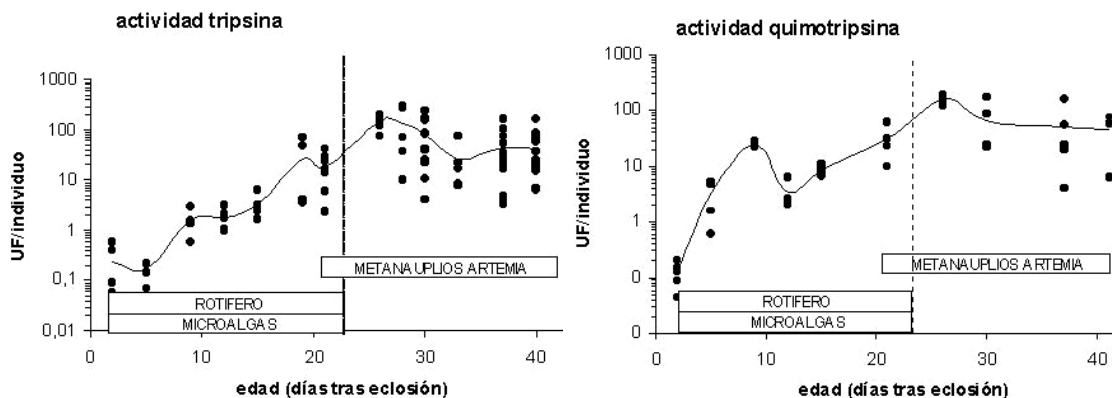
Se realizaron electroforesis de proteínas SDS-PAGE de las preparaciones enzimáticas de acuerdo a Laemmli (1970), usando geles de 8 x 10 x 0.075 cm y 12% de acrilamida. La preparación de las muestras y los zimogramas de las actividades proteasa de las distintas fracciones separadas por electroforesis se llevaron a cabo según García-Carreño y cols. (1993). Previamente, las muestras fueron filtradas a través de una columna Sephadex G-25S (1/10, v/v). Las electroforesis se llevaron a cabo a voltaje constante de 100 V por gel durante 60 min a 5°C.

Posteriormente, los geles fueron lavados e incubados en caseína Hammerstein al 0,5%, pH 9, durante 30 min a 5°C y después se transfirieron a la misma solución durante 150 min a 37°C sin agitación. A continuación, fueron lavados y fijados con TCA al 12% previamente a su tinción con azul Coomassie (BBC R-250) al 0,1% en una solución metanol - ácido acético - agua (50:20:50). El desteñido se llevó a cabo en una solución metanol - ácido acético - agua (35:10:50).

Resultados y discusión

La evolución temporal de la actividad de las dos principales proteasas digestivas, tripsina y quimotripsina, se detalla en la Figura 3.

Figura 3. Actividad de proteasas alcalinas en larvas de *Pagrus auriga* a lo largo de su desarrollo.

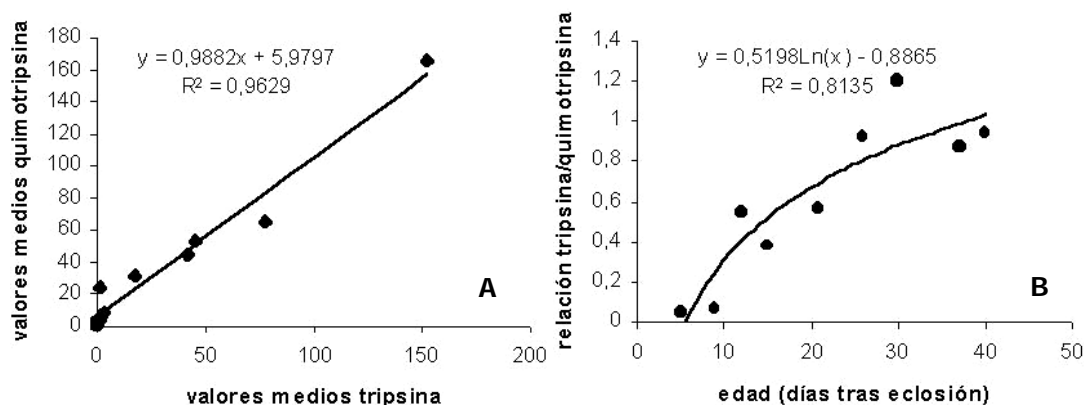


De los datos obtenidos se pueden deducir lo siguiente:

- El mayor crecimiento de la actividad quimotripsina hasta los 10 días de edad
- La existencia de un perfil similar para ambas enzimas a partir de los 20 días de edad
- Los valores se sitúan en rangos muy similares para ambas actividades
- La variabilidad en los valores de actividad individual se incrementa conforme aumenta la edad de las larvas

La clara correlación entre ambos tipos de actividad se pone en evidencia al representar los valores medios obtenidos para cada punto de muestreo, como se detalla en la Figura 4.

Figura 4. Correlación entre valores de tripsina y quimotripsina (A) y variación a lo largo del desarrollo (B).

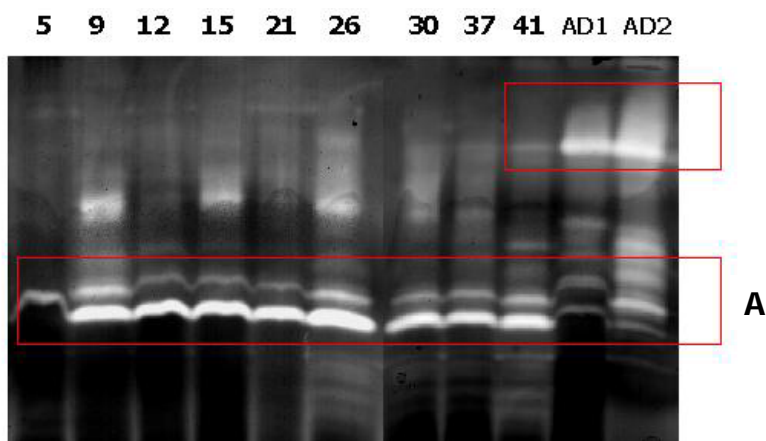


Igualmente se comprueba que, pese a ser proporcionales dichas actividades, su relación se modifica con la edad, de manera que la actividad de tripsina progresivamente se hace más importante.

De los datos obtenidos, se puede concluir que el patrón de desarrollo de ambas proteasas se corresponde con el descrito para otras especies como la dorada, el sargo o el lenguado y que muestra una pronta y clara activación en respuesta al crecimiento y la modificación de la naturaleza del alimento. Por otra parte, se ha representado la relación tripsina/quimotripsina, la cual según distintos autores se puede utilizar como indicador del estado nutricional de las larvas. En condiciones normales la cantidad de tripsina va aumentando como respuesta a la demanda de hidrólisis proteica, pero si los peces sufren algún tipo de restricción alimenticia, tanto en cantidad como en calidad, la proporción tripsina/quimotripsina se estanca o disminuye ya que se produce relativamente menos tripsina frente a una secreción constante de quimotripsina. En las larvas estudiadas resulta patente que dicha relación sufrió cierto empeoramiento conforme aumentaba la edad de las mismas.

El zimograma que ilustra el desarrollo de la actividad de proteasas alcalinas se detalla en la Figura 5. La imagen obtenida coincide con el perfil cuantitativo representado en la Figura 3; las bandas mayoritarias (A) corresponden casi con toda probabilidad a la actividad tripsina que, como es posible apreciar, muestra un temprano desarrollo ya que resulta bien patente desde el día 9 tras la eclosión.

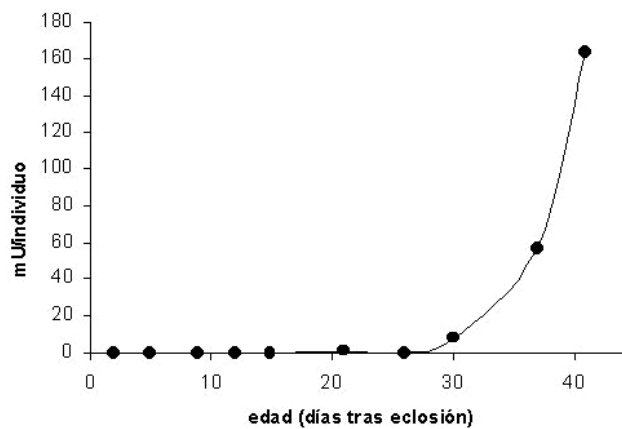
Figura 5. Zimograma que muestra las variaciones en actividad de proteasas alcalinas a lo largo del desarrollo de la hurta. Los números sobre cada carril indican la edad en días. Se incluyen como referencia los perfiles obtenidos en dos individuos adultos.



Las diferencias observables en esta actividad con respecto a los adultos es la presencia en éstos últimos de un mayor número de isoformas. Por otro lado, destaca la presencia de bandas de mayor masa molecular que se muestran variaciones a lo largo del desarrollo pero están bien establecidas en los adultos y que corresponderían muy probablemente a la quimotripsina, cuantitativamente menos importante que la tripsina.

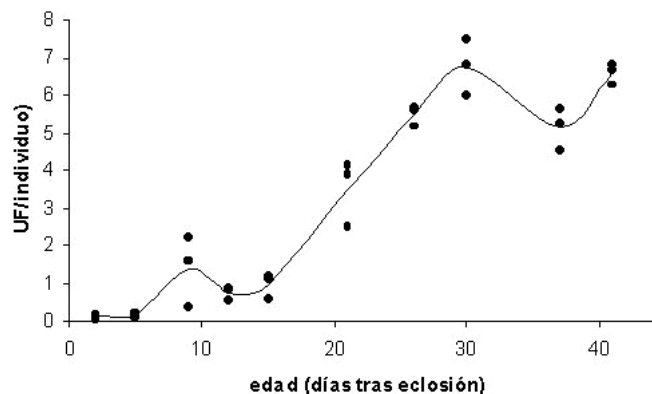
La actividad de proteasa ácida se detalla en la Figura 6. Se pudo comprobar como dicha actividad, indicadora del inicio de la funcionalidad del estómago, sólo alcanzaba valores apreciables a partir de los 30 días de vida, resultando significativa a partir de los 35. Este dato coincide con lo descrito para el sargo (*Diplodus sargus*) o el dentón (*Dentex dentex*), especies ambas que muestran una mayor precocidad que la dorada (Alarcón y cols, 1998; Cara y cols, 2003).

Figura 6. Actividad de proteasa ácida en larvas de *Pagrus auriga* a lo largo de su desarrollo.



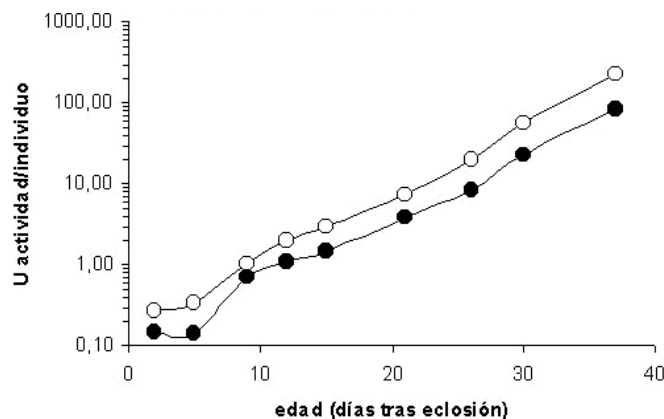
La pauta de desarrollo de la actividad amilasa se detalla en la Figura 7. En este caso se observó un incremento progresivo de la actividad de amilasa, algo ya reseñado para otras especies y que se corresponde más con una expresión "basal" que aumenta lógicamente al aumentar el peso de la larva, que a una necesidad nutricional, ya que las diferencias entre valores son muy escasas (el rango medido oscila entre 1 y 7 unidades/individuo, comparado con las determinaciones de actividad proteasa que se incrementan hasta en 2 órdenes de magnitud). Distintos autores apuntan la idea de que la actividad de esta enzima responde a una expresión programada de genes y que sólo resultaría cuantitativamente importante en caso de ser reforzada por la presencia de sustratos adecuados, algo quizá improbable en el caso de la hurta, de hábitos esencialmente carnívoros.

Figura 7. Actividad de amilasa en larvas de *Pagrus auriga* a lo largo de su desarrollo.



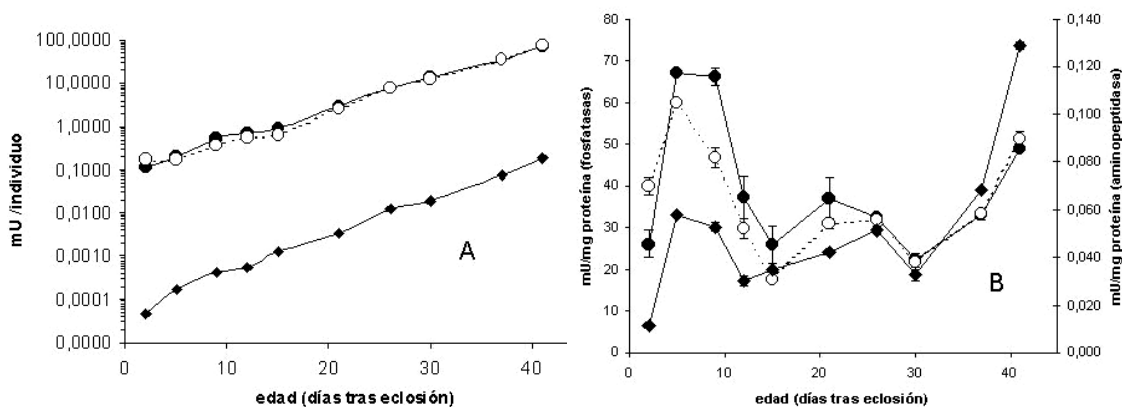
La evolución de la actividad de esterases (lipasas) que actúan sobre sustratos de cadena corta se detalla en la Figura 8. Se comprobó una clara tendencia hacia el aumento de actividad sobre los dos sustratos ensayados conforme aumentaba la edad de las larvas. Igualmente se evidenció una menor actividad sobre el sustrato de cadena más larga (caprilato, de 6 C) que sobre el de cadena más corta (butirato, de 4 C). Los resultados son acordes con lo descrito para otras especies y ponen de manifiesto un desarrollo temprano y progresivo de la capacidad lipolítica en las larvas de esta especie.

Figura 8. Actividad de esterases en larvas de *Pagrus auriga* a lo largo de su desarrollo, medida sobre sustrato de 4 C (-o-) o de 6 C (-•-).



La evolución de la actividad de las enzimas implicadas en los procesos de digestión "parietal" (fosfatasa ácida y alcalina y aminopeptidasa) se detalla en la Figura 9.

Figura 9. Actividad de fosfatasa ácida (-o-) y alcalina (-•-) y aminopeptidasa (-♦-) en larvas de *Pagrus auriga* a lo largo de su desarrollo. A: actividad por individuo; B: actividad específica.

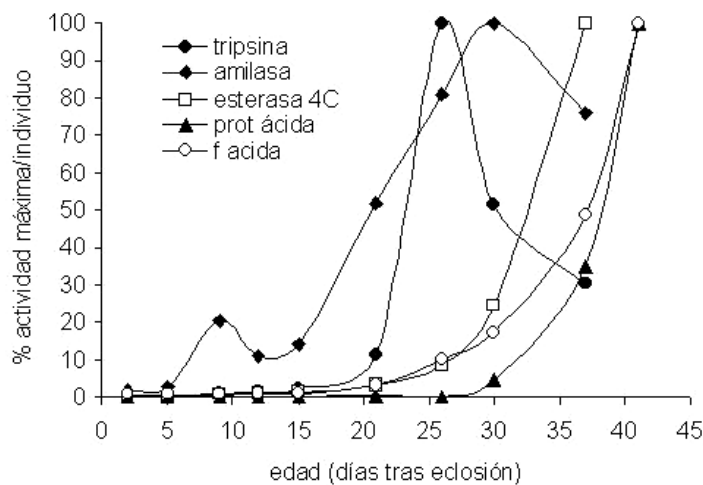


Diferentes autores han indicado que el proceso de maduración del digestivo a lo largo del desarrollo larvario se puede evaluar mediante la medición de estas enzimas, dado que la actividad de las fosfatasa parece estar ligada en buena medida a procesos de absorción de macromoléculas y posterior digestión intracelular, en tanto que la actividad de aminopeptidasa, enzima situada en el borde en cepillo de los enterocitos, consiste en finalizar la digestión luminal, hidrolizando los péptidos cuya digestión iniciaron las proteasas intestinales típicas (tripsina y quimotripsina). De esta forma, sería lógico encontrar valores más elevados de actividad de las fosfatasa en las primeras etapas del desarrollo y una progresiva disminución de los mismos para dar paso a una digestión intestinal bien establecida que se evidenciaría por mayores valores de actividad aminopeptidasa.

En el caso de las larvas de hurta estudiadas, los patrones de actividad de las tres enzimas han sido muy similares, lo que se puso de manifiesto tanto al expresarlas como actividad específica en los extractos como con relación a individuo. Se podría concluir que la capacidad de llevar a cabo una digestión intracelular se mantuvo hasta una edad bastante avanzada y que complementaba de manera efectiva el paulatino incremento de la digestión luminal.

Como resumen y con fines comparativos, en la Figura 10 se representa la evolución de las principales actividades estudiadas, expresadas como porcentaje del máximo valor determinado en cada caso. De esta forma es posible apreciar más claramente cómo algunas actividades se van incrementando netamente con la edad (proteasa ácida, esterasa, fosfatasa ácida), en tanto que otras disminuyen claramente (tripsina, amilasa).

Figura 10. Actividad de las principales enzimas digestivas expresada en valores relativos a lo largo del desarrollo.



Conclusiones

- Las larvas de hurta (*Pagrus auriga*) muestran un desarrollo temprano de las principales actividades de enzimas implicadas en la digestión del alimento.
- Entre las actividades estudiadas destaca la pronta aparición de la proteasa alcalina (tripsina y quimotripsina), así como el relativamente temprano desarrollo de la digestión ácida, evidenciado por la actividad pepsina medida a los 35 días de edad.
- La actividad lipasa sobre ácidos grasos de cadena corta crece de forma muy rápida durante el periodo estudiado.
- La evolución global de las actividades estudiadas indica un desarrollo de la función digestiva equilibrado y bastante precoz.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Plan Nacional de Cultivo de Espáridos (Planes Nacionales de Cultivos Marinos, JACUMAR).

Bibliografía

1. Alarcón, F.J., M. Díaz, F.J. Moyano y E. Abellán (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology & Biochemistry*, 19:257-267
2. Alekseev, F.E. (1982). Hermaphroditism in sparid fishes (Perciformes, Sparidae). I. Protogyny in porgies, *Pagrus pagrus*, *P. orphus*, *P. ehrenbergi* and *P. auriga*, from West Africa. *J. Ichthyol.* 22:85-94
3. Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22:79-89
4. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254
5. Bergmeyer, H.V. (1974). Methods of enzymatic analysis. En: *Phosphatase*. Verlag Chemie Academic Press Inc. New York. 2:856-860
6. Cara, J.B., F.J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. (2003). Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology*, 63:48-58
7. Cárdenas, S. (1997). Reproducción de la hurta, *Pagrus auriga* (Valenciennes, 1843), en el Golfo de Cádiz. En: *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*. Cartagena, Murcia. Universidad de Murcia y Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid
8. Cárdenas, S. (2004). Manejo y Reproducción de Espáridos en el CIFPA "El Toruño". En: *Jornadas Científico-Técnicas Andalucía-Marruecos sobre Diversificación de Especies en Acuicultura*. Observatorio de la Pesca Andalucía-Marruecos (OPAM), Facultad de Ciencias, UCA, Puerto Real (Cádiz, España), 4-5 de marzo de 2004
9. García-Carreño, F.L., L.E. Dimes y N.F. Haard (1993). Substrate gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, 214: 65-69.
10. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
11. Lozano, I., A.M. Plazuelo, J.P. Cañavate y S. Cárdenas (2004). Crecimiento con alimento vivo e inerte de larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae), en cultivo masivo. En: *III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA 2004)*: 446-455. Disponible en URL: <http://www.civa2004.org>
12. Mckellar, R.C. y H. Cholette (1986). Determination of the extracellular lipases of *Pseudomonas fluorescens* spp. in skim milk with the beta-naphthyl caprylate assay. *Journal of Dairy Research*, 53:301
13. Pfeiderer, G. (1970). Particle bound peptidase from pig kidney. En: *Methods in Enzimology*. Academic Press. New York. XIX:514-521
14. Prieto, A., J.P. Cañavate y S. Cárdenas (2003). Crecimiento de larvas de hurta (*Pagrus auriga*). En: *Libro de Resúmenes del IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz, España: Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. 386-387
15. Versaw, W.K., S.L. Cuppet, D.D. Winters y L.E. Williams (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54:1557-1558