



I I M Y C

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-CONICET

**FLEXIBILIDAD FENOTÍPICA EN PECES ESTUARINO-DEPENDIENTES DE
INTERÉS REGIONAL Y COMERCIAL: ESTUDIO INTEGRATIVO SOBRE
AJUSTES DIGESTIVOS Y METABÓLICOS DE LA LISA RAYADA *MUGIL LIZA*
DE LA LAGUNA COSTERA MAR CHIQUITA (ACTINOPTERYGII; MUGILIDAE)**

Autora: Camila Albanesi
Directora: Dra. Alejandra A. López Mañanes
Co-Director: Dr. Mariano González-Castro

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS –
ÁREA BIOLOGÍA

Año 2024



Lic. Camila Albanesi
Firma del tesista



Dra. Alejandra López Mañanes
Firma del director



DR. GONZÁLEZ CASTRO, M.

Dr. Mariano González-Castro
Firma del co-director

Parte de los resultados de la presente Tesis han sido publicados. Como reconocimiento y agradecimiento a los co-autores de estos trabajos se detallan a continuación las citas correspondientes.

Artículos completos publicados en revistas científicas internacionales con referato indexadas:

- **Albanesi, C.**, González-Castro, M., & López-Mañanes, A. (2021). Understanding the early ontogenetic stages of *Mugil liza* (Mugilidae): Morphological traits and digestive/metabolic profile of pre-juveniles after recruitment. *Journal of Fish Biology*, 98(3), 643-654.
- **Albanesi, C.**, González-Castro, M., & López-Mañanes, A. (2022). Prejuveniles of *Mugil liza* (Actinopterygii; Fam. Mugilidae) show digestive and metabolic flexibility upon different postprandial times and refeeding. *Journal of Comparative Physiology B*, 192(5), 561-573.
- **Albanesi, C.**, González-Castro, M., & López-Mañanes, A. (2023). Differential digestive and metabolic profile of juveniles and adults of the estuarine-dependent marine fish *Mugil liza* (Mugilidae) cohabiting inside a southwestern Atlantic coastal lagoon. *Canadian Journal of Zoology*, 101 (12), 1079-1092.

Resúmenes publicados en libro de resúmenes:

- **Albanesi, C.**, López Mañanes, A. y González Castro, M. “Perfil digestivo de individuos virginales de *Mugil liza* (Actinopterygii; Mugilidae) de la laguna costera Mar Chiquita (Pcia de Bs.As)” XIII Encuentro Biólogos En Red, 20 y 21 de noviembre de 2018, Pág. 117; Mar del Plata, Argentina ISSN: 1853-3426
- **Albanesi, C.**, González Castro, M. y López Mañanes, A. “Enzimas digestivas en individuos virginales de *Mugil liza* (Actinopterygii; Mugilidae) de la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia de Bs.As)”. I Jornada InvestiAr UNMDP 2018. Mar del Plata, Buenos Aires. 30 y 31 de octubre del 2018. Pag 188; Mar del Plata, Argentina ISBN 978-987-544-874-2
- **Albanesi, C.**, López Mañanes, A. y González Castro, M. “Flexibilidad fenotípica en *Mugil liza* de la Laguna Costera Mar Chiquita: actividad de maltasa y N-aminopeptidasa (APN) en intestino de virginales en relación con la época del año”

XIV Encuentro Biólogos En Red, 19 y 20 de noviembre de 2019, Pág. 138; Mar del Plata, Argentina ISSN: 1853-9998

- **Albanesi, C.**, Mendez, E., Michiels, S., Pinoni, S., González Castro, M. y López Mañanes, A. Actividad de carbohidrasas en intestino de individuos adultos de *Mugil liza* (Actinopterygii; Mugilidae) de la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia de Bs. As). XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar-COLACMAR 2019. Asociación Latinoamericana de Investigadores en Ciencias del Mar-ALICMAR. p 325. 4-8 noviembre, Mar del Plata, Argentina. Resumen extendido
- **Albanesi, C.**, Mendez, E., Michiels, S., Pinoni, S., González Castro, M. y López Mañanes, A. Actividad de N-aminopeptidasa en intestino de individuos virginales de *Mugil liza* (Actinopterygii; Mugilidae) de la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia de Bs. As). XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar-COLACMAR 2019 Asociación Latinoamericana de Investigadores en Ciencias del Mar-ALICMAR. p 326. 4-8 noviembre, Mar del Plata, Argentina. Resumen extendido
- **Albanesi, C.**, González Castro, M. y López Mañanes, A. “Flexibilidad fenotípica digestiva a nivel bioquímico en Querimanas (prejuveniles) de *Mugil liza* de la Laguna Costera de Mar Chiquita (Pcia de Bs As)”. II Jornada InvestiAr UNMDP 2020. Mar del Plata, Buenos Aires. 19 al 30 de octubre del 2020. Mar del Plata, Argentina.
- **Albanesi, C.**, Mendez, E., Michiels, S., González-Castro, M. y López-Mañanes, A. Carbohydrases and glycogen reserves in prejuveniles of *Mugil liza* (Actinopterygii; Fam. Mugilidae) upon different postprandial times and refeeding. VII Conferencia latinoamericana sobre cultivo de peces nativos. Belo Horizonte, Brasil. 8 a 12 de agosto de 2022
- **Albanesi, C.**, Mendez, E., Michiels, S., López-Mañanes, A. y González-Castro, M. Morphological traits and body condition parameters in prejuveniles of *Mugil liza* (Actinopterygii; Fam. Mugilidae) upon different postprandial times and refeeding. VII Conferencia latinoamericana sobre cultivo de peces nativos. Belo Horizonte, Brasil. 8 a 12 de agosto de 2022
- **Albanesi, C.**, Mendez, E., Michiels, S., González Castro, M. y López Mañanes, A. Respuesta osmorregulatoria y ajustes digestivos a nivel bioquímico en prejuveniles de *Mugil liza* de la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia. Bs As) frente a un cambio

abrupto a baja salinidad. 7mo Simposio Argentino de Ictiología Chascomús, Provincia de Buenos Aires, Argentina 22-25 de noviembre 2022

- **Albanesi, C.**, Mendez, E., Michiels, S., González Castro, M. y López Mañanes, A. Efecto de un cambio abrupto a baja salinidad sobre las actividades de sacarasa y aminopeptidasa-N en intestino de prejuveniles del pez marino estuarino-dependiente *Mugil liza*. 5to Workshop de Fisiología Ecológica y del Comportamiento. Mar del Plata, Argentina. 15 al 17 de Marzo de 2023.

Agradecimientos

Mi más profundo y sincero agradecimiento a la Dra. Alejandra López Mañanes y al Dr. Mariano González-Castro, directora y co-director de esta investigación. Gracias por su paciencia, dedicación y supervisión continua de la misma. Ha sido un privilegio contar con su guía, motivación y apoyo durante estos años.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeras del Laboratorio de Fisiología Bioquímica Adaptativa e Integrativa, Dra. Eugenia Méndez y Dra. Soledad Michiels por la ayuda y paciencia que me han brindado. Por haber creado siempre un hermoso ambiente de trabajo y siempre dispuestas a compartir sus conocimientos.

A los jurados, por su tiempo y sus aportes, los cuales me ayudaron a enriquecer este trabajo, muchas gracias.

A todas mis amigas, que están siempre presentes de una u otra manera. A las que están desde siempre en mi vida y a las que se han ido sumando durante mi paso por la facultad y la juguetería, durante años han sido mi gran apoyo en todo momento.

A mi pareja que estuvo apoyándome y dándome ánimos en cada decisión que tomara. Gracias Nico por tu contención y paciencia durante estos años.

Finalmente, gracias a toda mi familia, y principalmente a mi mamá, mi papá y mi hermana, por estar siempre y brindarme su apoyo constante durante estos años, por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría, y que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

A todos ustedes, mi mayor reconocimiento y gratitud

Índice

Resumen	10
Abstract.....	12
Introducción general	14
Capítulo 1:.....	23
Perfil digestivo/metabólico de querimanas (prejuveniles) de <i>Mugil liza</i> luego del reclutamiento en la Laguna Costera Mar Chiquita	23
Introducción	24
Materiales y Métodos	27
Captura de querimanas	27
Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras	28
Determinaciones cuantitativas	29
Análisis estadístico	32
Resultados	33
Parámetros morfológicos de querimanas tempranas y tardías.....	33
Actividad de enzimas digestivas en intestino de querimanas	34
Reservas de energía en querimanas.....	39
Discusión	40
Capítulo 2:.....	49
Flexibilidad digestiva/metabólica a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y re-alimentación en querimanas de <i>Mugil liza</i>.....	49
Introducción	50
Materiales y Métodos	53
Captura y mantenimiento de querimanas	53
Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras	54
Determinaciones cuantitativas	54
Análisis estadístico	55
Resultados	55
Parámetros morfológicos de querimanas de <i>M. liza</i> a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la realimentación	55
Actividad de enzimas digestivas en intestino de querimanas a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la realimentación	56

Reservas de energía en querimanas a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación.....	59
Discusión	62
Capítulo 3:.....	70
Flexibilidad fenotípica en respuesta a un cambio abrupto de salinidad en querimanas de <i>Mugil liza</i>.....	70
Introducción	71
Materiales y métodos	73
Captura y mantenimiento de querimanas	73
Osmolalidad de la sangre y del medio externo	74
Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras	74
Determinaciones cuantitativas	75
Análisis estadístico	75
Resultados	76
Osmolalidad de la sangre de querimanas.....	76
Parámetros morfológicos de querimanas luego un cambio abrupto de salinidad.....	77
Efecto de un cambio abrupto de salinidad sobre la actividad de enzimas digestivas en intestino de querimanas.....	78
Efecto de un cambio abrupto de salinidad sobre la concentración de reservas de energía en querimanas	81
Discusión	83
Capítulo 4:.....	91
Perfil digestivo/metabólico de juveniles y adultos de <i>Mugil liza</i> de la Laguna Costera Mar Chiquita	91
Introducción	92
Materiales y Métodos	93
Captura de juveniles y adultos.....	93
Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras	94
Determinaciones cuantitativas	95
Análisis estadístico	95
Resultados	96
Parámetros morfológicos de juveniles y adultos.....	96
Actividad de enzimas digestivas de juveniles y adultos	97
Reservas de energía en juveniles y adultos	105

Discusión	106
Capítulo 5:.....	116
Actividad de disacaridasas y aminopeptidasa- N en intestino de juveniles de <i>Mugil liza</i>: modulación por mensajeros químicos.....	116
Introducción	117
Materiales y Métodos	119
Captura y mantenimiento de juveniles	119
Incubación con secciones de intestino.....	120
Determinaciones cuantitativas	120
Análisis estadístico	120
Resultados	121
Efecto in vitro de mensajeros químicos sobre la actividad de maltasa, sacarasa y APN en intestino de juveniles.....	121
Discusión	121
Consideraciones finales	128
Bibliografía.....	135

Resumen

El objetivo general de la presente tesis fue realizar un estudio integrativo de determinación del perfil digestivo/metabólico y sobre flexibilidad fenotípica en individuos del pez marino estuarino-dependiente *Mugil liza* (Actinopterygii; Mugilidae) de la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia. de Buenos Aires). Para cumplir con el objetivo se realizaron estudios de determinación de la existencia y características bioquímicas de la actividad de enzimas digestivas clave en intestino, la concentración de sustratos de energía en órganos de reserva y parámetros morfológicos para evaluar el perfil digestivo/metabólico de querimanas de *M. liza* en el ambiente natural (capítulo 1); de determinación la actividad de enzimas digestivas clave, concentración de sustratos de energía y parámetros morfológicos a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en querimanas de *M. liza* para evaluar la existencia de ajustes digestivos/ metabólicos en respuesta a la privación de alimento y a la realimentación (Capítulo 2); de determinación de la actividad de enzimas digestivas, concentración de sustratos de energía, parámetros morfológicos y respuesta osmorregulatoria antes y luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad para evaluar la existencia de ajustes digestivos/metabólicos en relación a diferentes respuestas osmorregulatorias en querimanas de *M. liza* (Capítulo 3). de determinación de la existencia y características bioquímicas de actividad de enzimas digestivas clave en intestino, la concentración de sustratos de energía en órganos de reserva y parámetros morfológicos para evaluar el perfil digestivo/metabólico de juveniles y adultos de *M. liza* en el ambiente natural (Capítulo 4); de determinación del efecto *in vitro* de mensajeros químicos que regulan procesos clave en tracto digestivo sobre la actividad de carbohidrasas y

proteasas de membrana en intestino de juveniles de *M. liza* para estudiar su posible rol en la modulación de enzimas digestivas involucradas en pasos finales de la digestión de hidratos de carbono y proteínas (Capítulo 5).

Los resultados muestran que querimanas, juveniles y adultos de *M. liza* de la Laguna Costera Mar Chiquita presentan características digestivas /metabólicas y flexibilidad fenotípica digestiva/metabólica (existencia y modulación diferencial de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y aminopeptidasa-N en intestino; distribución y modulación diferencial de reservas de glucógeno, triglicéridos y proteínas) que les permitiría realizar exitosamente su reclutamiento y crecimiento en la laguna y preparación para la migración reproductiva hacia el mar acorde a su estilo de vida marino estuarino-dependiente. Además, los resultados cubren un área de vacancia en el conocimiento sobre la fisiología bioquímica digestiva/metabólica de peces estuarino-dependientes en general y en particular de especies de interés regional, ecológico y económico como *M. liza*.

Palabras clave: Flexibilidad fenotípica, enzimas digestivas, reservas de energía, *Mugil liza*, Laguna Costera Mar Chiquita

Abstract

The general objective of this thesis was to carry out an integrative study to determine the digestive/metabolic profile and phenotypic flexibility in the marine estuarine-dependent fish *Mugil liza* (Actinopterygii; Mugilidae) from Mar Chiquita Coastal Lagoon (Buenos Aires Province, Argentina). To achieve this objective, studies were carried out to determine the existence and biochemical characteristics of the activity of key digestive enzymes in intestine, concentration of energy substrates in storage organs, and morphological parameters to assess the digestive/metabolic profile of prejuveniles (querimana) of *M. liza* in the wild (Chapter 1); to determine the activity of key digestive enzymes, concentration of energy substrates, and morphological parameters at different times after feeding in querimanas of *M. liza* to evaluate the existence of digestive/metabolic adjustments at different times after feeding and after re-feeding (Chapter 2); to determine the activity of key digestive enzymes, concentration of energy substrates, morphological parameters, and osmoregulatory responses before and after an abrupt change from high to low salinity to evaluate the existence of digestive/metabolic adjustments in relation to different osmoregulatory responses in querimanas of *M. liza* (Chapter 3); to determine the existence and biochemical characteristics of key digestive enzyme activity in intestine, the concentration of energy substrates in storage organs, and morphological parameters to assess the digestive/metabolic profile of juveniles and adults of *M. liza* in the wild (Chapter 4); and to determine the *in vitro* effect of chemical messengers that regulate key processes in the digestive tract on the activity of membrane-bound carbohydrases and proteases in intestine of juvenile *M.*

liza to study their possible role in modulating digestive enzymes involved in the final steps of carbohydrate and protein digestion (Chapter 5).

The results show that querimanas, juveniles, and adults of *M. liza* from Mar Chiquita Coastal Lagoon exhibit digestive/metabolic characteristics and phenotypic flexibility (existence and differential modulation of amylase, maltase, sucrase, lipase, trypsin, and aminopeptidase-N in intestine; distribution and differential modulation of glycogen, triglyceride, and protein reserves). These characteristics would allow them to face recruitment and growth in the lagoon, and preparation for reproductive migration to the sea in relation to its marine estuarine-dependent lifestyle. Furthermore, the results improve the scarce and fragmentary knowledge about the biochemical physiology of digestive/metabolic processes in estuarine-dependent fish in general and, in particular in species of regional, ecological, and economic interest such as *M. liza*.

Keywords: Phenotypic flexibility, digestive enzymes, energy reserves, *Mugil liza*, Mar Chiquita coastal lagoon.

Introducción general

La capacidad para balancear la adquisición, el almacenamiento y el uso de energía es crítica para la supervivencia, crecimiento y mantenimiento de los animales (Karasov y Douglas, 2013; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021; Olson et al., 2020; Zhong et al., 2023). En este contexto, el tracto gastrointestinal cumple un rol esencial debido a su participación central en múltiples funciones que incluyen la digestión y absorción de nutrientes (Karasov y Douglas, 2013; Chang y Leung, 2014; Chassaing y Gerwitz, 2018; Zhong et al., 2023). Las enzimas digestivas desempeñan un rol fisiológico fundamental como vínculo entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (del Valle y López Mañanes, 2011; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Chang y Leung, 2014; Imran et al., 2016; Oguchi et al., 2022). Así, el nivel de actividad de enzimas digestivas en el intestino constituye un factor clave que afecta la capacidad digestiva para sustratos específicos (Karasov y Douglas, 2013; Ramirez-Otarola et al., 2018). El tipo de sustrato de energía, su distribución y concentración en diferentes sitios de reserva son una expresión del perfil metabólico y de ajustes en el metabolismo de las principales macromoléculas (del Valle y López Mañanes, 2012; Cadiz et al., 2018; Calí et al., 2019; Guo et al., 2019). En este contexto, los estudios sobre presencia, modulación de enzimas digestivas específicas (carbohidrasas, lipasas, proteasas) en tracto digestivo y de concentración de reservas de energía en órganos de reserva, constituye una herramienta fundamental para el conocimiento de las características digestivas/metabólicas de un individuo y los posibles ajustes en los mismos.

La flexibilidad fenotípica implica variaciones reversibles dentro de un individuo en rasgos fenotípicos a diferentes niveles (bioquímico, fisiológico, morfológico), lo que puede aumentar las posibilidades de supervivencia de los animales en diferentes condiciones internas y externas (Piersman y Drent 2003; Kelly 2012; Pollock et al., 2019; Noakes y McKechnie, 2020). En varios animales, la modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas claves y de la concentración de reservas de energía constituye una importante estrategia a nivel bioquímico para hacer frente a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales (Li et al., 2008; del Valle y López Mañanes, 2008; Karasov et al., 2011; López Mañanes et al., 2020; Yang et al., 2019; Lallès 2020; Oguchi et al., 2022). Sin embargo, faltan estudios sobre existencia y características bioquímicas de enzimas digestivas, y de modulación por diferentes factores externos e internos de enzimas digestivas y de reservas de energía en grupos de importancia ecológica tales como peces marinos estuarino-dependientes.

El nivel y la modulación de actividad de carbohidrasas, lipasas y proteasas en tracto digestivo determinará la capacidad para la digestión y utilización de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, respectivamente. Las α -amilasas (α -1,4-glucono-4 gluconohidrolasa, EC 3.2.1.1) tienen una importancia fisiológica central en el metabolismo de hidratos de carbono debido a su rol en los pasos iniciales de la digestión de sustratos gluconeogénicos (Date et al., 2015; Gominho-Rosa et al., 2015; Tiwari et al., 2015; Dhital et al., 2017; Shad et al., 2023). Disacaridasas unidas a membrana, tales como la maltasa y sacarasa, son esenciales para llevar a cabo la digestión final de hidratos de carbono glucogénicos (Dhital et al., 2013; Li et al., 2019; Tannous et al., 2023). La existencia y modulación de maltasa y sacarasa en tracto digestivo permite además el uso de disacáridos glucogénicos (ej. maltosa,

sacarosa) potencialmente presentes en la dieta como fuentes de glucosa (Pavasovic et al., 2007; Li et al., 2019; Tannous et al., 2023). Las lipasas (EC 3.1.1.3) son de importancia central debido a su rol en la digestión de lípidos dietarios y de reserva (Casas-Godoy 2012; Karasov y Douglas, 2013; Pirahanchi y Sharma, 2019; Salhi et al., 2021). La endoproteasa tripsina (EC 3.4.21.4) involucrada en pasos iniciales de la digestión proteica es una de las proteasas más importantes en tracto digestivo de varias especies animales (Perera et al., 2015; Gurina y Mohiuddin, 2020; Small 2022; Solovyev et al., 2023). La aminopeptidasa-N (APN) (EC 3.4.11.2), una ectopeptidasa de membrana que tiene un rol principal en pasos finales de la digestión proteica, se utiliza como índice de la capacidad proteolítica de un individuo y de madurez intestinal (Ramirez- Otarola et al., 2011; 2018; Fairweather et al., 2012; Gurumallesh et al., 2019; Griego et al., 2021).

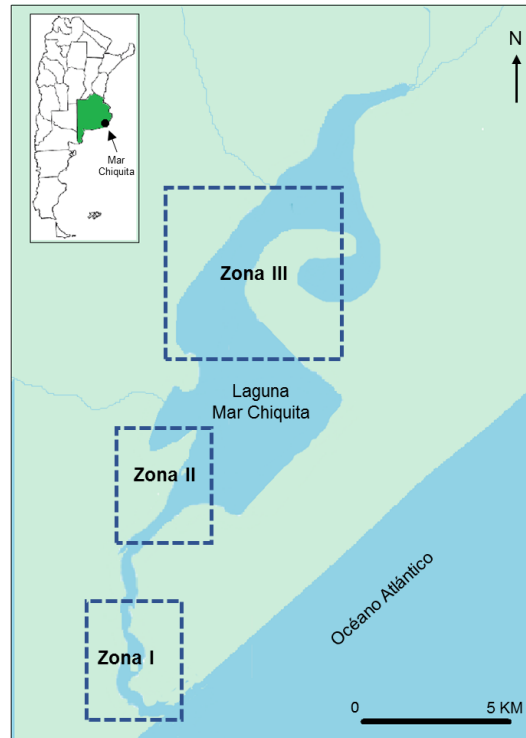
En peces teleósteos, el intestino constituye el sitio principal de digestión y absorción de nutrientes (Con et al., 2017; Gisbert et al., 2018; Steimberg 2018; Small 2022). En general, la batería de enzimas digestivas en el intestino parece ser cualitativamente similar a la de mamíferos. Sin embargo, el conocimiento sobre características digestivas a nivel bioquímico sigue siendo limitado para la mayoría de las especies de peces (Small 2022). Se ha señalado que la determinación de la actividad de enzimas digestivas en peces requiere el uso de protocolos específicos para cada especie (García-Meilán et al., 2023; Solovyev et al., 2023). En varias especies de peces, se ha observado la modulación de enzimas digestivas en respuesta a diferentes factores externos e internos, aunque los ajustes presentan diferencias intra e interespecíficas (Yúfera et al., 2012; Pujante et al., 2015; Pujante, 2019; Albanesi et al., 2021; 2024).

Los miembros de la familia Mugilidae, generalmente conocidos como lisas, son peces marinos costeros con una distribución mundial (Barletta y Dantas, 2016; González-Castro y Ghasemzadeh, 2016; Turan 2016). Existen más de 100 especies registradas a nivel global, siendo su gran mayoría clasificadas bioecológicamente como peces marinos estuarino-dependientes, lo cual indica que dependen, para su supervivencia, de estuarios o lagunas costeras en alguna/s de sus etapas del ciclo de vida (Ibáñez-Aguirre, 1993; Sánchez Rueda 2002; Dankwa et al., 2005; González-Castro et al., 2009b). Los estuarios y lagunas costeras constituyen áreas importantes para los peces marinos estuarino-dependientes ya que pueden pasar parte o incluso todo su ciclo de vida en estos hábitats (Nelson 2006; González-Castro y Ghasemzadeh, 2016). Estos ambientes desempeñan un papel esencial como áreas de refugio, alimentación, crecimiento y preparación para la migración reproductiva (Denis et al., 2022). Esto podría implicar ajustes intraespecíficos en el perfil digestivo y metabólico. Por otro lado, debido a su alimentación principalmente detritívora ocupan una posición única en las redes tróficas en estos ambientes (Blaber 1976; Cardona 2016).

La lisa rayada *Mugil liza* (Valenciennes, 1836), debido a su patrón de historia de vida, constituye un modelo adecuado para estudios integrativos de flexibilidad fenotípica digestiva y metabólica en peces marinos estuarino-dependientes. *Mugil liza* es la única especie de lisa de presencia permanente en Argentina (González-Castro et al., 2009b). La población sur de *M. liza* se distribuye desde el estado de São Paulo, Brasil (23°S) hasta Argentina (47°S) (Mai et al., 2014). Luego de realizar una migración reproductiva desde los estuarios/lagunas costeras hacia el mar, *M. liza* desova en el área costera del sur de Brasil (González Castro et al., 2009b; 2011). Posteriormente sus postlarvas son regresadas por las corrientes con sentido

Norte-Sur, pudiendo permanecer en la zona de rompiente durante un tiempo variable (González-Castro y Minos, 2016). Pasada esa etapa, los prejuveniles (querimanas) de *M. liza*, ingresan desde dicha zona de rompiente hacia zonas estuariales tales como la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia.Bs. As)

La Laguna Costera Mar Chiquita (LCMCh) se encuentra en el suroeste del Atlántico en la provincia de Buenos Aires, Argentina ($37^{\circ}32' - 37^{\circ}45' S$ $57^{\circ}19' - 57^{\circ}26' 0$). Tiene una superficie total de 46 km^2 y la profundidad puede variar entre 0,5 y 3 m (Prisco et al., 2001; González-Castro et al., 2009a). La LCMCh constituye un ambiente heterogéneo con cambios espacio-temporales abruptos y/o de amplitud variable principalmente en la salinidad ambiental. El agua de mar entra a la laguna con las mareas altas y la cantidad depende de la intensidad y la dirección de los vientos. La afluencia de agua dulce proviene de varios arroyos y canales, que aportan abundantes cantidades de agua durante los periodos de lluvias. En este contexto, González-Castro et al., 2009a han definido tres zonas en esta laguna: Zona I, cercana a la desembocadura de la laguna en el mar, con aguas mixo-eurihalinas y gran influencia de aguas marinas, Zona II de aguas mixo-mesohalinas, Zona III, ubicado en el extremo norte de la laguna, donde las aguas son mixo-oligohalina



Mapa de la Laguna Costera Mar Chiquita (Pcia Bs. As). Los recuadros señalan las diferentes zonas (Zona I, Zona II, Zona III) definidas por González-Castro et al., 2009 a.

En la LCMCh, *M. liza* representa la segunda especie más abundante tanto en términos de biomasa como de abundancia (González Castro et al., 2009 a,b). Los prejuveniles pasan varios años dentro de la laguna hasta alcanzar su adultez (González Castro et al., 2009b; 2011; González Castro y Minos, 2016). Así, la LCMCh constituye un área crucial para el crecimiento y alimentación de querimanas, juveniles y adultos y para la preparación de estos últimos para la migración costera reproductiva (González-Castro et al., 2009b; 2011; Bruno et al., 2013).

El objetivo general de la presente tesis fue realizar un estudio integrativo de determinación del perfil digestivo/metabólico y sobre flexibilidad fenotípica en individuos del pez marino estuarino-dependiente *Mugil liza* (Actinopterygii; Mugilidae) de la LCMCh.

En este contexto, los objetivos particulares fueron:

- Determinar la existencia y características bioquímicas de la actividad de enzimas digestivas clave en intestino, la concentración de sustratos de energía en órganos de reserva y parámetros morfológicos para evaluar el perfil digestivo/metabólico de querimanas de *M. liza* luego del reclutamiento en el ambiente natural (Capítulo 1).

- Determinar la actividad de enzimas digestivas, concentración de sustratos de energía y parámetros morfológicos a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en querimanas de *M. liza* para evaluar la existencia de ajustes digestivos/metabólicos en respuesta a la privación de alimento y a la re-alimentación (Capítulo 2).

- Determinar la actividad de enzimas digestivas, concentración de sustratos de energía, parámetros morfológicos y respuesta osmorregulatoria antes y luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad para evaluar la existencia de ajustes digestivos/metabólicos en relación a diferentes comportamientos osmorregulatorios en querimanas de *M. liza* (Capítulo 3).

- Determinar la existencia y características bioquímicas de actividad de enzimas digestivas claves en intestino, la concentración de sustratos de energía en órganos de reserva y parámetros morfológicos para evaluar el perfil digestivo/ metabólico de juveniles y adultos de *M. liza* en el ambiente natural (Capítulo 4).

- Estudiar el efecto *in vitro* de mensajeros químicos que regulan procesos claves en tracto digestivo sobre la actividad de carbohidrasas y proteasas de membrana en intestino de juveniles de *M. liza* para estudiar su posible rol en la

modulación de enzimas digestivas involucradas en pasos finales de la digestión de hidratos de carbono y proteínas (Capítulo 5).

Se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

El pez marino estuarino-dependiente *Mugil liza* exhibe ajustes digestivos/metabólicos a nivel bioquímico y en parámetros morfológicos en relación a su patrón de historia de vida en la laguna costera Mar Chiquita

Se formulan las siguientes predicciones:

- Querimanas de *M. liza* exhiben cambios cuali-cuantitativos de la actividad de enzimas digestivas específicas en tracto digestivo y de utilización de reservas de energía y en parámetros morfológicos en el ambiente natural en relación a la edad luego del reclutamiento en la LCMCh.
- Querimanas de *M. liza* exhiben modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas específicas, concentración de reservas de energía y parámetros morfológicos en respuesta a la privación de alimento y a la re-alimentación
- Querimanas de *M. liza* exhiben modulación diferencial de enzimas digestivas, contenido de reservas de energía y parámetros morfológicos luego de un cambio abrupto de alta a baja salinidad en relación al cambio en la respuesta osmoregulatoria
- Juveniles y adultos de *M. liza* exhiben cambios cuali-cuantitativos de la actividad de enzimas digestivas específicas y de utilización de reservas

de energía y en parámetros morfológicos en el ambiente natural en relación a la edad

- Aminas biogénicas y calcio extracelular modulan diferencialmente las actividades de maltasa, sacarasa y APN de juveniles de *M. liza* por efecto directo sobre el intestino

Capítulo 1:

Perfil digestivo/metabólico de querimanas (prejuveniles)
de *Mugil liza* luego del reclutamiento en la Laguna Costera
Mar Chiquita

Introducción

La digestión es el proceso de modificar y/o hidrolizar macromoléculas presentes en el alimento ingerido hasta moléculas más pequeñas, para posteriormente poder ser absorbidas (Assan et al., 2022). Debido a su rol fisiológico central como conexión entre la digestión y la absorción de nutrientes, resulta evidente la importancia de establecer la existencia y características bioquímicas de la actividad de enzimas digestivas específicas en el tracto digestivo (Karasov y Douglas, 2013; Sanz et al., 2015; Gisbert et al., 2018; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021). Sin embargo, el conocimiento específico sobre la existencia y características de diferentes enzimas digestivas y sobre su posible modulación por diferentes factores es aún limitado para la mayoría de las especies de peces teleósteos en general (Small 2022) y en particular, en grupos de importancia ecológica tales como mugílidos marinos estuarino-dependientes.

Mugil liza (Valenciennes, 1836) es un pez marino estuarino-dependiente que se caracteriza por un ciclo de vida diádromo complejo. La reproducción costera del stock sur de *M. liza* ocurre en el área costera entre Santa Catarina y Paraná, Brasil (28°-26°S) (González-Castro et al., 2011; González-Castro y Minos, 2016; Lemos et al., 2014). Al terminar el periodo reproductivo, las postlarvas neustónicas son llevadas desde el área costera hacia la costa (zona de rompiente) por corrientes superficiales generadas por el viento (Vieira y Scalabrin, 1991; González Castro et al., 2009a). Durante el reclutamiento hacia la LCMCh los individuos prejuveniles (<30 mm TL) sufren una serie de modificaciones en un corto pero crucial periodo de tiempo que incluye el cambio de una alimentación zooplanctófaga a detritívora

(Acha 1990; Vieira 1991, Castellini et al., 2019). En esta etapa, luego del reclutamiento, es cuando los alevines son denominados querimanas por algunos autores (Thomson 1997; Castellini et al., 2019). El término querimana se refiere a prejuveniles que exhiben dos espinas anales incluyendo el periodo de transición hasta que la tercera espina se encuentra completamente desarrollada (juveniles) (Jacot 1920; Thomson 1997; Cardona 2016). A pesar de la importancia de este estadio de transición para el éxito del establecimiento de futuras cohortes de juveniles dentro de la laguna costera, faltan estudios integrativos sobre el perfil digestivo/metabólico de querimanas de *M. liza* en el ambiente natural luego del reclutamiento hacia lagunas costeras.

La presencia de enzimas digestivas específicas (carbohidrasas/ lipasas/ proteasas) en el intestino, principal sitio de digestión y absorción de nutrientes en peces, está generalmente relacionada con la naturaleza de los ítems dietarios potencialmente utilizados en procesos metabólicos (Karasov y Douglas, 2013; Sanz et al., 2015; Wang et al., 2019; Oguchi et al., 2022). La α -amilasa (α -1,4 glucan-4-gluconohidrolasa) tiene una importancia fisiológica central debido a su rol en los pasos iniciales de la digestión de hidratos de carbono glucogénicos rindiendo maltosa la cual deber ser hidrolizada a unidades de glucosa para ser absorbidas por el intestino (Date et al., 2015; Peng et al., 2015; Rodríguez-Viera et al., 2021). Disacaridasas unidas a membrana tales como la maltasa y sacarasa son esenciales para llevar a cabo la digestión final de hidratos de carbono glucogénicos (Dhital et al., 2013; Li et al., 2019; Tannous et al., 2023). Las lipasas (también denominadas triacilglicerol acilhidrolasas) son un grupo de enzimas que naturalmente catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres de tri, di y monoglicéridos rindiendo ácidos grasos libres y glicerol (Casas-Godoy 2012). En este contexto, las lipasas, son de gran

importancia fisiológica debido a su papel en la digestión de lípidos dietarios y en la hidrólisis de triglicéridos de almacenamiento (Coleman y Maschek, 2011; Girouse y Landin, 2012; Henessy et al., 2014; Patricia y Dhamoon, 2019). Diversas proteasas en tracto digestivo intervienen en la digestión de ítems proteicos catalizando reacciones altamente específicas (Rawlings 2013; Mótyán et al., 2013; Gurumallesh et al., 2019; Gopalraaj et al., 2023). La endoproteasa tripsina, una de las proteasas más importantes en tracto digestivo de vertebrados (Perera et al., 2014; Wang et al., 2014; Gurina y Mohiuddin, 2020; Small 2022; Solovyev et al., 2023), cumple un rol esencial en los pasos iniciales de la digestión proteica. La ectoproteasa, APN unida a membrana, desempeña un papel principal en las etapas finales de la digestión de proteínas rindiendo di/-tri-péptidos y aminoácidos para ser absorbidos (Mentlein 2004; Goodman 2010; Fairweather et al., 2012; Gurumallesh et al., 2019; Griego et al., 2021). De esta manera, la actividad de APN en tracto digestivo se utiliza como un indicador de la capacidad digestiva proteica (Ramírez-Otárola et al., 2011; 2018). Además, la existencia de disacaridasas y APN en el intestino son indicadores de madurez intestinal y de la capacidad para la digestión extracelular (Holt 2011; Tran et al., 2011; Pérez-Sirkin et al., 2020).

La determinación de la concentración de sustratos de reserva (glucógeno, triglicéridos, proteínas) en diferentes órganos constituye una herramienta comúnmente utilizada para evaluar las características metabólicas a nivel bioquímico de un individuo y de ajustes en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas. Cuando se realiza de manera concomitante a la determinación de enzimas digestivas y de parámetros digestivos a nivel morfológico permite un análisis integral del perfil digestivo/metabólico y de ajustes en los mismos (del Valle

y López Mañanes, 2012; Del Valle, Michiels et al., 2016; Kalhoro et al., 2018; López Mañanes et al., 2020; Albanesi et al., 2024).

En este contexto, en este capítulo se describen estudios para determinar la existencia y características bioquímicas de la actividad de enzimas digestivas (amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN) en intestino, la concentración de sustratos de energía (glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas) en hígado y musculo y parámetros morfológicos (peso total, coeficiente intestinal e índice hepatosomático) para evaluar el perfil digestivo y metabólico de querimanas de *M. liza* en el ambiente natural luego del reclutamiento en la LCMCh.

Materiales y Métodos

Captura de querimanas

Querimanas (prejuveniles) fueron capturados después de su reclutamiento en la Zona II de la LCMCh (González Castro et al., 2009b). La Zona II (ver mapa en Introducción General de la presente tesis) está situada en el interior de la laguna costera, a una distancia de 6 km desde la boca, y se caracteriza por tener aguas mixo-mesohalinas. La profundidad varía desde aproximadamente 0,30 a 1,20 m. Las querimanas fueron capturadas utilizando una red de arrastre (10 m de largo x 1,8 m de alto, alas de 4 m de largo, un copo de 3 m de largo, malla en las alas laterales de 10 mm y malla en el copo de 5 mm) (Cousseau et al., 2001). La temperatura y la salinidad del agua al momento de la captura (agosto de 2019) fueron 13°C y 18 ups, respectivamente. La identificación taxonómica de los peces se realizó de acuerdo a González Castro et al. (2012) y Cousseau y Perrotta (2013).

Los individuos fueron congelados para ser posteriormente procesados en el laboratorio (Del Valle, Michiels et al., 2016; Ma et al., 2019).

Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras

La longitud total (LT), la longitud estándar (LS) y el peso total (PT) de cada individuo se determinó utilizando un calibre digital y una balanza electrónica. Los individuos se clasificaron en querimanas tempranas (n=10) o querimanas tardías (n=10) según los siguientes criterios: (a) querimanas tempranas: individuos con longitud estándar entre 23 y 33 mm, con dos espinas anales y el tercer elemento anal aún tabicado, mostrando signos incipientes de hialinización; (b) querimanas tardías: individuos con longitud estándar entre 38 y 47 mm, donde la tercera espina anal sufre hialinización y está casi completamente desarrollada, pero aun presenta una ligera segmentación. Inmediatamente, se extirparon el intestino, el hígado y el músculo de cada individuo, se pesaron (para el caso del intestino se registró también su longitud) y se colocaron en hielo para su posterior procesamiento. El coeficiente intestinal (CI) se determinó como longitud intestinal/ longitud estándar y el índice hepatosomático (IHS) como $(\text{peso del hígado}/\text{peso total}) \times 100$.

El intestino, el hígado y el músculo se homogeneizaron por separado en buffer Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) (intestino e hígado: 4 ml de tejido por gr^{-1} ; músculo: 8 ml por gramo de tejido⁻¹) (homogeneizador CAT 9120, herramienta T10) en hielo (del Valle, Michiels et al., 2016; Albanesi et al., 2021) y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados para las correspondientes determinaciones cuantitativas.

Este estudio se realizó siguiendo protocolo aprobado por el Comité de Ética (CICUAL) de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales (RD 2022-105 FCEyN, UNMdP, Argentina).

Determinaciones cuantitativas

Las actividades de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN se determinaron como se describió (del Valle, Michiels et al., 2016; Albanesi et al., 2021) en los correspondientes homogenatos de intestino.

La actividad de amilasa se midió utilizando almidón (15 mg ml^{-1}) como sustrato. La muestra correspondiente se incubó durante 15 min. a 30°C en presencia de almidón en buffer fosfato 50 mM ($\text{pH } 7,4$). La reacción se detuvo con la adición de 300 ul de reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). Se realizó una incubación adicional durante 10 min a 100°C . Después de enfriar los tubos en hielo, la maltosa liberada se cuantificó leyendo la absorbancia en 540 nm . Para estudiar el efecto del pH , temperatura y concentración de almidón, la actividad se analizó a diferentes pH ($5,2\text{--}8,2$) (buffer fosfato 50 mM), temperatura ($4\text{--}45^\circ\text{C}$) y concentración de almidón ($0,06\text{--}17,5 \text{ mg ml}^{-1}$) en la mezcla de reacción. La actividad de amilasa se expresó como μg de maltosa $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

Las actividades de maltasa y sacarasa se determinaron midiendo la glucosa liberada del sustrato específico (maltosa y sacarosa, respectivamente). La muestra se incubó durante 10 min a 30°C en presencia de maltosa o sacarosa (42 mM) en buffer maleato $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH } 6, 4$). La reacción se detuvo con $1,5 \text{ ml}$ de reactivo de glicemia (glucosa oxidasa 10 kU l , peroxidasa 1 kU , $l,4\text{-aminofenazona } 0,5 \text{ mmol l}^{-1}$, fosfatos $\text{pH } 7,0$ 100 mmol l^{-1} , hidroxibenzoato 12 mmol l^{-1}) (Wiener Lab Glicemia

AA, Wiener lab, Rosario, Provincia de Santa Fe, Argentina) y luego se incubó durante 5 min a 37°C. La cantidad de glucosa se cuantificó leyendo la absorbancia en 505 nm del complejo de quinona coloreado. Para estudiar el efecto del pH, temperatura y concentración de sustrato sobre la actividad de disacaridasas la correspondiente actividad se determinó a diferentes pHs (5,2–8,0 buffer maleato 0,1 mM), temperaturas (4–45°C) y concentraciones de sustrato (0,12-42 mM). La actividad de maltasa y sacarasa se expresó como μg de glucosa $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína⁻¹.

La actividad de lipasa se determinó colorimétricamente mediante la cuantificación de p-nitrofenol liberado de p-nitrofenil-palmitato (pNPP). La muestra se incubó en presencia de pNPP (0,85 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), durante 5 min a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). La cantidad de p-nitrofenol liberado se determinó leyendo la absorbancia en 410 nm. Para determinar el efecto del pH, temperatura y concentración de sustrato, la actividad se analizó a diferentes pH (6,0–9,0) (buffer fosfato 50 mM, pH 6,0, buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,2-9,0), temperaturas (4-45°C) y concentraciones de pNPP (0,017–0,9 mM). La actividad de lipasa se expresó como μg de para- nitrofenil fosfato $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína⁻¹.

La actividad de tripsina se determinó utilizando N- α -benzoil-DL-arginina- 4-nitroanilida (BAPNA) como sustrato. La muestra se incubó en presencia de BAPNA (1,23 mM) en buffer Tris/HCl 50 mM (pH 9,0) y Cl_2Ca (400 mM) durante 15 min a 45°C. La reacción se detuvo agregando 250 μl de KOH 0,1 M y se midió la absorbancia en 405 nm. Para determinar el efecto del pH, temperatura y concentración de sustrato, la actividad se analizó a diferentes pH (6,0–11,0) (buffer

fosfato 50 mM, pH 6,0, buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4–9,0, Glicina 50 mM pH 11), temperaturas (4–70°C) y concentraciones de BAPNA (0.15–1.4 mM). La actividad de tripsina se expresó como μg para-nitroanilina de $\text{x min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína⁻¹.

La actividad de APN se determinó utilizando L-alanina-pnitroanilida (L-Ala-pNA) como sustrato. La muestra se incubó en presencia de L-Ala-pNA (1,23 mM) en buffer Tris/HCl 50 mM (pH 7,4) durante 15 min a 45°C. La reacción se detuvo con 0,2 ml de ácido acético (2 M) y la absorbancia se determinó en 384 nm. Para estudiar el efecto del pH, temperatura y concentración de sustrato, la actividad se determinó a diferentes pH (6,0–9,0) (buffer fosfato 50 mM, pH 6,0, buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4–9,0), temperaturas (4–45°C) y concentraciones de L-Ala-pNA (0,04–0,4 mM). La actividad de APN se expresó como μg para-nitroanilina de $\text{x min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína⁻¹.

Las concentración de glucógeno, glucosa libre y triglicéridos se determinaron de acuerdo a del Valle, Michiels et al., 2016 y Albanesi et al., 2021 en los correspondientes homogenatos de hígado y músculo.

La concentración de glucógeno se determinó por hidrólisis por α -amiloglucosidasa (Sigma Chemicals). La muestra correspondiente se hirvió durante 4 min y luego se incubó en buffer acetato (pH 4,8) en presencia y ausencia de 0,2 mg ml⁻¹ de α -amiloglucosidasa (Sigma Chemicals, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri) durante 2,5 h a 55°C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. La glucosa se cuantificó en el sobrenadante luego de la adición de 3 ml de reactivo de glicemia (Wiener Lab AA, Rosario, Santa Provincia de Fe, Argentina). La glucosa liberada por hidrólisis de glucógeno se calculó como la diferencia entre los valores obtenidos con y sin α -

amiloglucosidasa. Los resultados se expresaron como mg de glucosa x gr de tejido⁻¹. La glucosa libre se evaluó a partir del ensayo en ausencia de α -amiloglucosidasa.

La concentración de triglicéridos (TAG) se determinó por el método colorimétrico de glicerol fosfato oxidasa (código 861110001, Wiener-Lab AA). La muestra correspondiente se incubó con el reactivo durante 5 min a 37°C. La cantidad de glicerol liberado se determinó leyendo la absorbancia en 505 nm del complejo de quinona coloreada. Los resultados se expresaron como mg x gr de tejido⁻¹

La concentración de proteínas se cuantificó según Bradford (1976). Se utilizó albúmina de suero bovino (0,96 mg x ml⁻¹) como estándar. Los resultados se presentaron como mg x gr de tejido⁻¹

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Plot 12.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA de una vía) o el test-t para estimar diferencias estadísticas según se indica para cada experimento. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

Los resultados del efecto de concentraciones variables de sustrato en las actividades enzimáticas se analizaron mediante un análisis de regresión no lineal (software GraphPad Prism 6.0). Las correspondientes curvas son las que mejor se

ajustan a los datos experimentales. Los valores de Km (constante de Michaelis - Menten) se estimaron de las mismas (GraphPad Prism 6.0).

Resultados

Parámetros morfológicos de querimanas tempranas y tardías

La longitud total, la longitud estándar y el peso total fueron significativamente mayor en querimanas tardías (Tabla 1.1). El coeficiente intestinal fue mayor en querimanas tardías respecto a querimanas tempranas (3,04 y 2,06 respectivamente), mientras que no presentaron diferencias en el índice hepatosomático (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Longitud total (LT), longitud estándar (LS), peso total (PT), coeficiente intestinal (CI) e índice hepatosomático (IHS) de querimanas tempranas y tardías de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en querimanas tempranas (Test-t; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 10 individuos.

	Querimanas tempranas	Querimanas tardías
Longitud total (mm)	36,08 \pm 4,29	50,80 \pm 3,19*
Longitud estándar (mm)	30,05 \pm 3,44	42,80 \pm 2,78*
Peso total (g)	0,34 \pm 0,13	1,74 \pm 0,29*
Coeficiente intestinal (%)	2,06 \pm 0,38	3,04 \pm 0,52*
Índice hepatosomático (%)	2,06 \pm 0,96	1,96 \pm 0,68

Actividad de enzimas digestivas en intestino de querimanas

Inicialmente se determinó la actividad de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN en intestino de querimanas tardías y se realizó una caracterización parcial de las mismas.

La actividad de amilasa aumentó de pH 5,2 a 7,4. A pH 8,2 la actividad disminuyó hasta valores similares a los encontrados a pH 5,2–6,0 (Figura 1.1 a). La actividad fue similar a 4°C y 20°C y aumentó a 30°C. A 45°C, la actividad disminuyó hasta un valor similar al observado a 4°C y 20°C (Figura 1.1 b). La actividad de amilasa exhibió cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = 3,58 mM) (Figura 1.1 c).

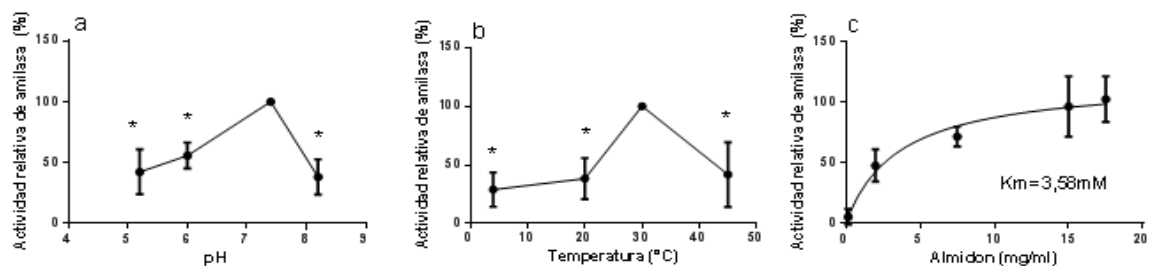


Figura 1.1 Caracterización parcial de la actividad de amilasa en intestino de querimanas tardías de *M. liza*. (a) Efecto del pH (5,2–8,2) sobre la actividad de amilasa. Los valores de actividad de amilasa se expresan en relación con la actividad a pH 7,4 (100%). (b) Efecto de temperatura (4–45°C) sobre la actividad de amilasa. Los valores de actividad de amilasa se expresan en relación a la actividad a 30°C (100%). (c) Efecto de la concentración de almidón sobre la actividad de amilasa (0,17–17,5 mg x ml⁻¹). La actividad se midió a 30°C y a pH 7,4. Los valores de actividad se expresan en relación a la correspondiente actividad en presencia de almidón 15 mg x ml⁻¹ (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 10 individuos.

La actividad de maltasa aumentó de pH 5,2 a 6,4, el valor se mantuvo similar hasta pH 8,0 (Figura 1.2 a). La actividad de maltasa fue similar dentro de todo el rango de temperatura 4-45°C (Figura 1.2 b) y exhibió cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente=2,60 mM) (Figura 1.2 c). La actividad de sacarasa aumentó de pH 5,2 a 6,4. A pH 7,4 y 8,0 la actividad disminuyó a un nivel similar a la de pH 5,2 (Figura 1.2 d). La actividad de sacarasa aumentó de 4 a 20°C, el valor se mantuvo similar dentro del rango de temperatura 20–45°C (Figura 1.2 e) y mostró cinética de Michaelis–Menten (K_m aparente = 2,95 mM) (Figura 1.2 f).

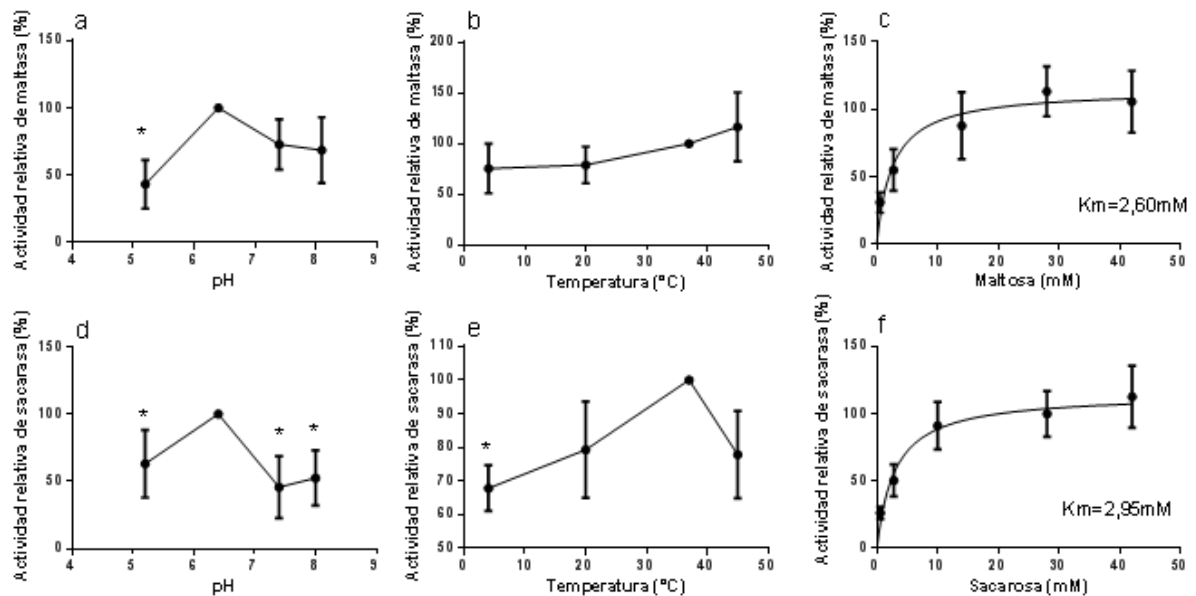


Figura 1.2 Caracterización parcial de las actividades de maltasa y sacarasa en intestino de querimanas tardías de *M. liza*. (a) Efecto del pH (5,2–8,0) sobre la actividad de maltasa. Los valores de actividad de maltasa se expresan en relación a la actividad a pH 6,4 (100%) (b) Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de maltasa. Los valores de la actividad de maltasa son expresados en relación a la actividad a 37°C (100%). (c) Efecto de la concentración de maltosa sobre la actividad de maltasa (0,65mM- 42mM). La actividad se midió a 37°C y a pH 6,4. Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad correspondiente en presencia de maltosa 28 mM (100%). (d) Efecto del pH (5,2–8,0) sobre la actividad de sacarasa. Los valores de la actividad de sacarasa se expresan en relación a la actividad a pH 6,4 (100%). (e) Efecto de la temperatura

(4-45°C) sobre la actividad de sacarasa. Los valores de la actividad de sacarasa se expresan en relación a la actividad a 37°C (100%). (f) Efecto de las concentraciones de sacarosa sobre la actividad de sacarasa (0,65 mM- 42mM). La actividad se midió en 37°C y a pH 6,4. Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad correspondiente en presencia de sacarosa 28 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 10 individuos.

La actividad de lipasa en el intestino de querimanas tardías fue similar dentro del rango de pH 6,0–9,0 (Figura 1.3 a). La actividad de lipasa fue similar de 4 a 20°C, el valor aumentó de 20°C a 37-45°C (Figura 1.3 b) y también exhibió cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente =0,58 mM) (Figura 1.3 c).

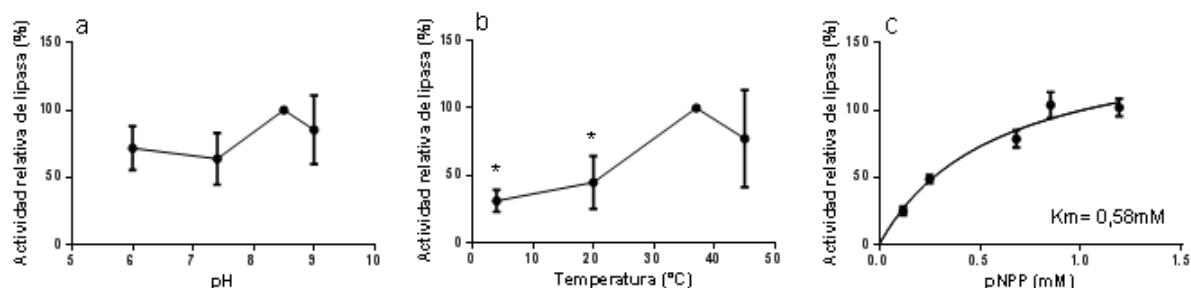


Figura 1.3 Caracterización parcial de la actividad de lipasa en intestino de querimanas tardías de *M. liza*. (a) Efecto del pH (6,0-9,0) sobre la actividad de lipasa. Los valores de actividad de lipasa se expresan en relación con la actividad específica a pH 8,5 (100%). (b) Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de lipasa. La actividad se expresa en relación a la actividad específica a 37°C (100%). (c) Efecto de la concentración de pNPP (0,12-1,19 mM) sobre la actividad de lipasa. Los valores de actividad son expresados en relación con la actividad correspondiente en presencia de pNPP 0,85 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 10 individuos.

La actividad de tripsina se detectó dentro de un amplio rango de pH. La actividad aumentó de pH 7,4 a 9,0 y disminuyó a pH 11,00 hasta valores similares

a los observados en pH 7,4 (Figura 1.4 a). La actividad de tripsina fue similar a los 4°C y 20°C. A 45°C aumentó y se mantuvo constante hasta 70°C (Figura 1.4 b). La tripsina presentó cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = 1,38 mM) (Figura 1.4 c). La actividad de APN aumentó de pH 6.0 a 7.4 – 9.0 (Figura 1.4 d). La actividad aumentó de 4°C a 45°C (Figura 1.4 e). Esta actividad también exhibió cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = 0,32 mM) (Figura 1.4 f).

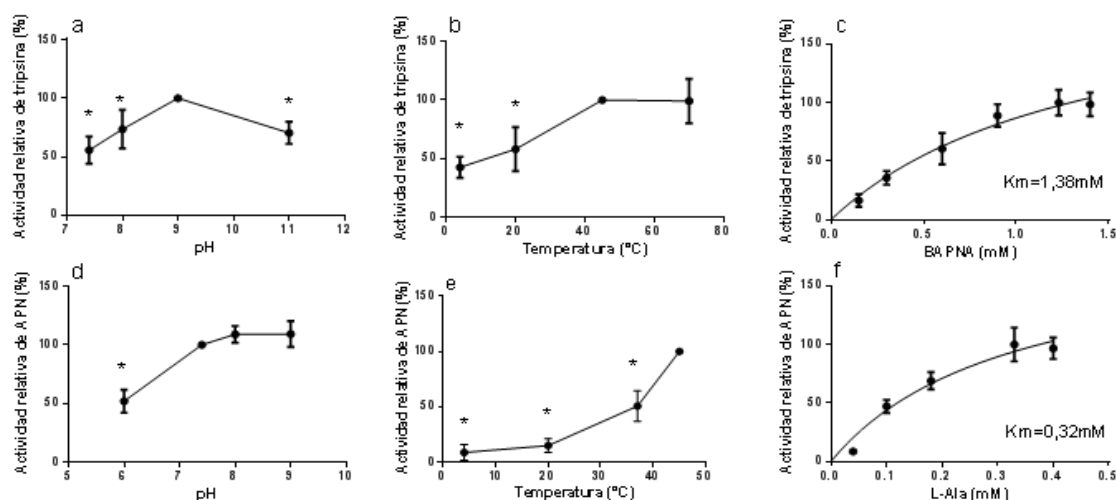


Figura 1.4 Caracterización parcial de las actividades de tripsina y APN en intestino de querimanas tardías de *M. liza*. (a) Efecto del pH (7,4-11,0) sobre la actividad de tripsina. Los valores de actividad de tripsina se expresan en relación con la actividad específica a pH 9,0 (100%). (b) Efecto de la temperatura (4-70°C) sobre la actividad de tripsina. La actividad se expresa en relación a la actividad específica a 45°C (100%). (c) Efecto de la concentración de BAPNA (0,15-1,4 mM) sobre la actividad de tripsina. Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad correspondiente en presencia de BAPNA 1,23 mM (100%). (d) Efecto del pH (6,0-9,0) sobre la actividad de APN. Los valores de actividad de APN se expresan en relación a la actividad específica a pH 7,4 (100%). (e) Efecto de la temperatura (4°C- 45°C) sobre la actividad de APN. La actividad se expresa en relación con la actividad a 37°C (100%) (f) Efecto de la concentración de L-Ala pNA (0,04-0,4 mM) sobre la actividad de APN. Los valores de la actividad son expresados en relación con la actividad correspondiente en presencia de L-Ala pNA 0,4 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 10 individuos.

Las querimanas tempranas también exhibieron actividad de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN en intestino (Figura 1.5 - 1.6). Las actividades específicas de amilasa, sacarasa, tripsina y APN fueron significativamente menores en las querimanas tempranas comparadas con la correspondiente actividad en intestino de querimanas tardías (Figura 1.5 - 1.6).

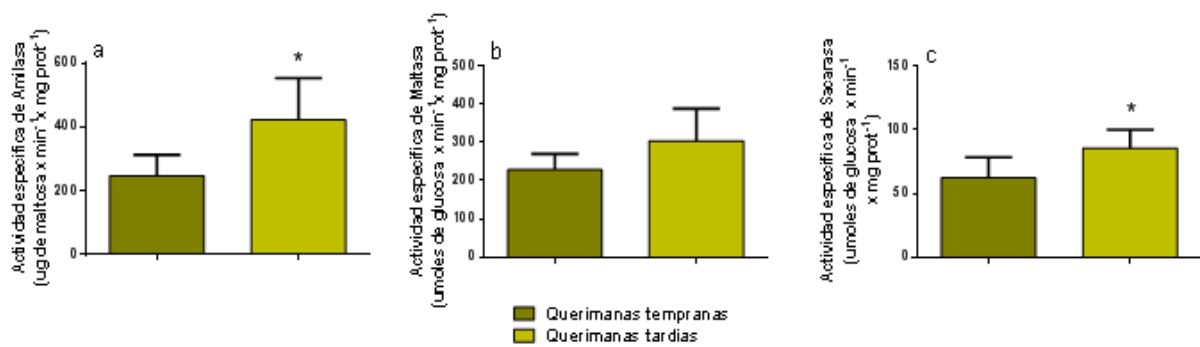


Figura 1.5 Actividades específicas de amilasa (a), maltasa (b) y sacarasa (c) en el intestino de querimanas tempranas y tardías de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en querimanas tempranas (Test-t; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 10 individuos.

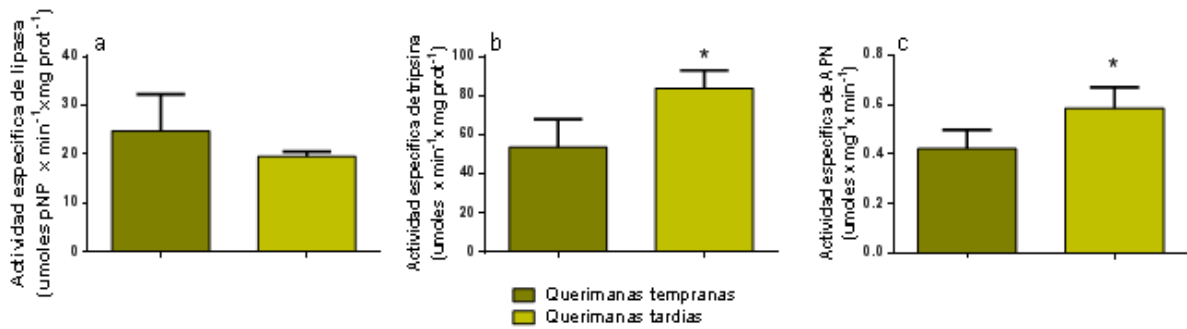


Figura 1.6 Actividades específicas de lipasa (a), tripsina (b) y APN (c) en el intestino de querimanas tempranas y tardías de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en querimanas tempranas (Test-t; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 10 individuos.

Reservas de energía en querimanas

En querimanas tardías se detectó glucógeno en hígado y en músculo. La concentración de glucógeno fue mayor en hígado (alrededor del 87%) que en músculo (Figura 1.7 a), mientras que la concentración de glucosa libre fue similar en ambos órganos (Figura 1.7 b). La concentración de triglicéridos fue mayor ($p < 0,05$) en hígado (alrededor del 87%) respecto a músculo (Figura 1.8 a). La concentración de proteína fue mayor ($p < 0,05$) en músculo (alrededor del 29%) que en hígado (Figura 1.8 b).

En querimanas tempranas la concentración de glucógeno, glucosa libre y proteína en músculo fue mayor (92, 82, 32%, respectivamente) ($p < 0,05$) que en querimanas tardías (Figura 1.7 a,b - 1.8 a,b), mientras que la concentración de triglicéridos fue similar (Figura 1.8 a).

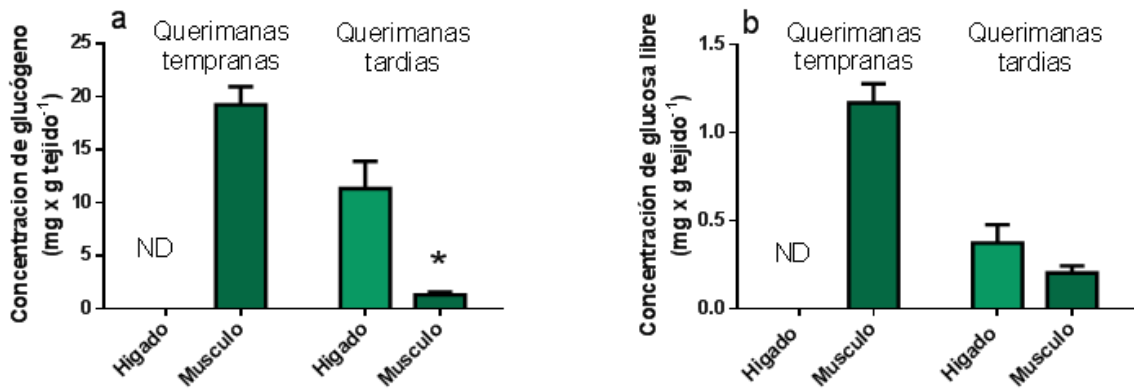


Figura 1.7 Concentración de glucógeno (a) y glucosa libre (b) en hígado y músculo de querimanas tempranas y tardías de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en hígado (Test-t; $p < 0,05$). ND= no determinado. Los datos son la media \pm S.D. para 10 individuos

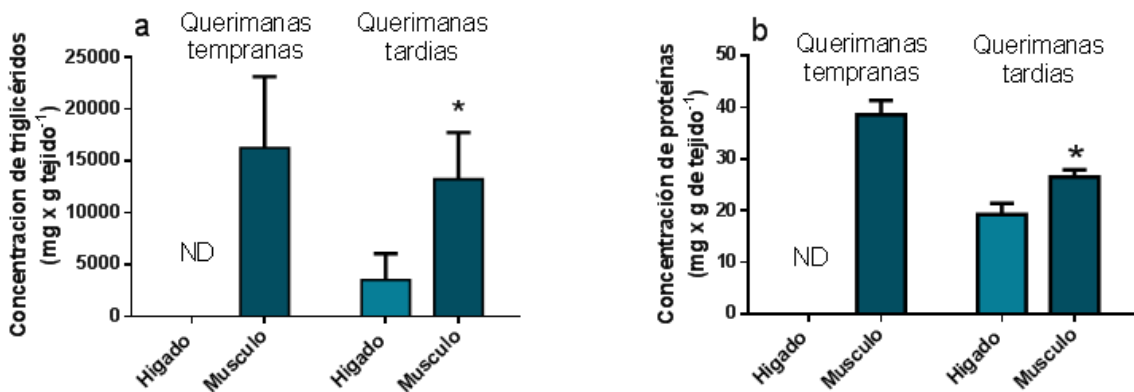


Figura 1.8 Concentración de triglicéridos (a) y de proteínas (b) en hígado y músculo de querimanas tempranas y tardías de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en hígado (Test-t; $p < 0,05$). ND= no determinado. Los datos son la media \pm S.D. para 10 individuos

Discusión

En vertebrados, incluyendo peces, la presencia de actividad de enzimas digestivas específicas en tracto gastrointestinal se relaciona generalmente con la

naturaleza de los ítems dietarios potencialmente utilizados por el organismo (Karasov y Douglas, 2013; Sanz et al., 2015; Wang et al., 2019; Oguchi et al., 2022). En particular en estadios tempranos de la ontogenia, la determinación de la existencia de enzimas digestivas se utiliza, además, como un índice del desarrollo del tracto digestivo (Kumar et al., 2019, Pérez-Sirkin et al., 2020). En este contexto, la actividad de enzimas digestivas unidas a membrana en intestino son indicadores de madurez intestinal y de la capacidad para la digestión extracelular (Holt 2011; Tran et al., 2011; Pérez-Sirkin et al., 2020). Los resultados del presente capítulo que muestran la existencia de actividad de carbohidrasas, lipasa y proteasas en intestino sugieren que querimanas de *M. liza* luego del reclutamiento en la LCMCh poseen una batería de enzimas digestivas adecuada para la hidrólisis de diferentes sustratos, madurez intestinal y capacidad para la digestión extracelular.

La presencia de amilasa y disacaridasas de membrana tales como maltasa y sacarasa (enzimas claves en pasos iniciales y finales de la digestión de hidratos de carbono, respectivamente) en intestino sugiere la capacidad potencial de querimanas de *M. liza* para la digestión completa de sustratos glucogénicos claves (ej. almidón; glucógeno) procedentes de ítems de origen vegetal y/ o animal presentes en el detrito. En varios animales, la amilasa, además de su actividad amilolítica, tiene capacidad para digerir glucógeno (Williams 2019; Rodríguez-Viera et al., 2021). En intestino de peces carnívoros, omnívoros y detritívoros la presencia de amilasa en tracto digestivo permitiría un mejor aprovechamiento de nutrientes mediante la hidrólisis de glucógeno presente en ítems de origen animal (Uscanga-Martínez et al., 2011; Nolasco-Soria 2021). La actividad de lipasa en estadios tempranos indica la capacidad de las querimanas para la digestión de lípidos de la dieta y su uso potencial para procesos metabólicos (Casas-Godoy 2012; Karasov

y Douglas, 2013; Steimberg 2018; Small 2022). La digestión de ítems lipídicos de la dieta, la posterior absorción de metabolitos lipídicos en tracto digestivo y su almacenamiento y/o utilización como sustratos de reserva constituyen procesos fisiológicos fundamentales a nivel bioquímico que permiten mantener la homeostasis lipídica (Dashty 2014; Henessy et al., 2014; Patricia y Dhamoon, 2019; Small, 2022). La presencia de endo-proteasas y de ecto-proteasas claves como tripsina y APN en intestino es un indicador de la potencial capacidad proteolítica digestiva y sugiere la habilidad de querimanas de *M. liza* de la LCMCh para la hidrólisis completa de proteínas dietarias (Ramirez-Otarola et al., 2011; 2018; Bakker et al., 2011; Steimberg, 2018; Small, 2022). La presencia de enzimas digestivas de borde en cepillo sugieren la madurez intestinal de las querimanas y su capacidad para la digestión extracelular. En otros mugílidos, tales como *Mugil cephalus* se ha descrito la aparición de enzimas digestivas de borde en cepillo en estadios tempranos (Koven et al., 2019). En peces, el valor de coeficiente intestinal se relaciona en general con el hábito alimentario (Ribble y Smith, 1983; German y Horn, 2006; Davis et al., 2013). Luego del reclutamiento, las querimanas de *M. liza* exhiben un hábito alimentario de tipo detritívoro (Acha 1990; Cardona 2016; Castellini et al., 2019; Karachle y Stergiou, 2010). Los detritos consumidos por querimanas de *M. liza* en la LCMCh contienen elementos tanto de origen vegetal como animal (Botto et al., 2005; Bruno et al., 2014; 2017) por lo que la capacidad digestiva amilolítica, lipolítica y proteolítica de las querimanas les permitiría sostener el hábito dietario detritívoro dentro de la laguna. En querimanas de *M. cephalus* mantenidos en condiciones controladas de laboratorio, se demostró la existencia de actividad de amilasa, maltasa, tripsina y APN en intestino, lo cual se

asoció con la capacidad para alimentarse de microorganismos bentónicos y micro-macroalgas (Gisbert et al., 2016; Koven et al., 2019).

Se ha señalado que conocer características bioquímicas de la actividad de enzimas digestivas presentes en el tracto digestivo de peces resulta fundamental para poder establecer protocolos de determinación especie-específicos (Solovyev et al., 2023). En intestino de varias especies de peces mantenidas en condiciones controladas de laboratorio, diferentes enzimas digestivas son activas dentro de un amplio rango de pH y temperatura y exhiben cinética de Michaelis-Menten (del Valle, Michiels et al., 2016; Gioda et al., 2017; Huo et al., 2019; Friedman y Fernandez Gimenez, 2023). Este parece ser el caso también para las enzimas digestivas detectadas en intestino de querimanas tardías de *M. liza* (amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN), las cuales exhibieron actividad dentro de un amplio rango de pH y temperatura y cinética michaeliana. Enzimas digestivas clave activas dentro de un amplio rango de pH permitirían el mantenimiento de la capacidad digestiva de las querimanas frente a potenciales cambios en el pH intestinal. En varias especies de peces el pH intestinal exhibe una variación estacional relacionada con la temperatura ambiental (Solovyev et al., 2018). Dentro de la LCMCh, los picos de abundancia de querimanas de *M. liza* se registran en estaciones frías (julio-agosto) y cálidas (diciembre-enero) (González-Castro et al., 2009b; Castellini et al., 2019) lo que sugiere su flexibilidad térmica. El mantenimiento de la actividad dentro de un amplio rango de temperaturas sugiere la termotolerancia de enzimas digestivas en el intestino de las querimanas lo cual permitiría sostener la capacidad digestiva para diferentes sustratos dietarios en distintas condiciones de temperatura. Particularmente, enzimas digestivas activas a altas temperaturas podrían mantener un suministro adecuado de metabolitos (ej.

glucosa; ácidos grasos; aminoácidos) para el crecimiento durante el verano cuando la temperatura del agua aumenta notablemente debido a la poca profundidad de las zonas internas de la LCMCh (González-Castro et al., 2009a)

La mayor actividad específica de amilasa, sacarasa, tripsina y APN en querimanas tardías de *M. liza* sugiere la existencia de ajustes digestivos específicos a nivel bioquímico en relación a la edad lo cual podría conducir a una capacidad incrementada para la digestión de hidratos de carbono glucogénicos y proteínas. En peces, similarmente a otros vertebrados, la digestión de los principales sustratos glucogénicos por amilasa y disacaridasas unidas a membrana en intestino constituye una de las fuentes principales de glucosa circulante (Bakker et al., 2011; Polakof et al., 2011; 2012; Gominho-Rosa et al., 2015; Steimberg 2018; Small 2022). Este proceso es importante para mantener la homeostasis de la glucosa y, por ende, respaldar diferentes funciones claves y ajustes en respuesta a variaciones en factores intrínsecos y extrínsecos (Polakof et al., 2011, 2012; La Fleur et al., 2014; Chen et al., 2018). En vertebrados, la actividad de maltasa en intestino puede ser sostenida por el complejo sacarasa-isomaltasa y/o por el complejo maltasa-glucoamilasa (actividad de maltasa independiente de sacarasa) localizados en la membrana en borde en cepillo (Bertucci et al., 2019; Chaudet et al., 2019; Brun et al., 2020; Morelos-Castro et al., 2020; Tannous et al., 2023). Contrariamente a la actividad de sacarasa, la actividad de maltasa fue similar en querimanas tempranas y tardías lo que sugiere que la actividad de maltasa en intestino de querimanas de *M. liza* sería independiente del complejo sacarasa-isomaltasa. Además, el aumento específico en la actividad de sacarasa sugiere una mayor capacidad para la digestión final de hidratos de carbono glucogénicos en querimanas tardías el cual podría ser sostenido por la modulación diferencial de la

actividad de esta disacaridasa. La mayor actividad de tripsina y de APN, enzimas con un rol central en los pasos iniciales y finales de la digestión proteica sugiere la mayor capacidad para la digestión de ítems proteicos en querimanas tardías. El hecho de que la actividad de lipasa fue similar en el intestino de querimanas tempranas y tardías sugiere que cambios en la digestión de lípidos dietarios no sería un ajuste a nivel bioquímico en relación a la edad. La modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas específicas sugiere que mecanismos específicos de regulación (ej, activación de enzimas preexistentes; cambios cuali y/o cuantitativos de enzimas digestivas, diferentes vías de señalización) podrían estar involucrados en ajustes digestivos a nivel bioquímico en relación a la edad de las querimanas. El mayor coeficiente intestinal de querimanas tardías sugiere también la existencia de ajustes digestivos a nivel morfológico que podrían implicar ajustes cuantitativos en enzimas digestivas de membranas y sistemas de transporte de nutrientes y por ende conducir a una mayor capacidad digestiva/absortiva. Sin embargo, debido a que faltan estudios sobre los mecanismos de regulación de la actividad y/o expresión de enzimas digestivas en prejuveniles de mugílidos, se necesitan más experimentos para establecer los posibles componentes involucrados en la regulación de enzimas digestivas específicas.

Los niveles y tipos de reservas de energía en diferentes sitios de reserva permiten establecer el perfil metabólico a nivel bioquímico de un individuo (del Valle y López Mañanes, 2012; Zhu et al., 2019; Zhao et al., 2021). El músculo parece ser un sitio de almacenamiento de glucógeno en querimanas tempranas de *M. liza* en el ambiente natural luego de su reclutamiento en la LCMCh. Si bien, las querimanas tardías son capaces de almacenar glucógeno tanto en el hígado como en el músculo, la mayor concentración de glucógeno (870%) en hígado señala a este

órgano como el principal sitio de reserva. En prejuveniles de *Liza ramada*, el hígado es uno de los principales sitios de almacenamiento de glucógeno (Toutou y Farrag, 2023). Además, el mayor contenido de glucosa libre en el hígado de querimanas tardías con respecto al músculo soporta un rol principal del hígado en el mantenimiento de un suministro adecuado y sostenido de glucosa. En varias especies de peces, se ha descrito que el hígado es una fuente importante de glucosa para otros tejidos (Enes et al., 2009; Polakoff et al., 2012; Nebo et al., 2018; Small 2022). En peces, los lípidos se utilizan como fuente de energía para el mantenimiento de varios procesos fisiológicos, crecimiento, reproducción, migración y movimiento (Tocher 2003; Sandre et al., 2017; Steimberg 2018; Small 2022). Luego de la ingesta de alimento, el exceso de ácidos grasos se exporta del hígado como lipoproteínas y se almacenan como triglicéridos en sitios específicos de reserva (Grosell et al., 2011; Ballantyne 2014). Debido a que las querimanas de *M. liza* carecen de tejido adiposo desarrollado, otros órganos podrían desempeñar un rol como potenciales sitios de reserva de triglicéridos. Este parece ser el caso del músculo en querimanas tempranas y tardías. Si bien las querimanas tardías almacenan triglicéridos también en el hígado, su mayor concentración en músculo sugiere que este órgano constituye el principal sitio de reserva. En varios peces, la reserva en el músculo representa una alta proporción de las reservas totales de triglicéridos del organismo (Tocher 2003; Peng et al., 2015; Xie et al., 2017; Albanesi et al., 2021).

Como en otros animales, la digestión de proteínas dietarias y la construcción de reservas de proteínas en sitios de almacenamiento resultan esenciales para asegurar una provisión adecuada de aminoácidos para mantener el crecimiento y funciones vitales (Rahman et al., 2017; Herring et al., 2021). En este contexto, la

APN intestinal, al ser una proteína multifuncional, podría desempeñar otros roles importantes para la construcción de reservas proteicas tales como la regulación de la absorción de aminoácidos además de su participación esencial en pasos finales de la digestión de proteínas (Cui et al., 2019; Gurumallesh et al., 2019; Griego et al., 2021). En el intestino de mamíferos, APN forma complejos con transportadores de aminoácidos regulando así su función (Fairweather et al., 2012; Qi et al., 2021; Farhadi et al., 2022). La existencia de actividad de APN en intestino de querimanas de *M. liza* sugiere su vínculo con la potencial construcción de proteínas en sitios de reserva tales como hígado o músculo. Los resultados del presente capítulo muestran que en querimanas tempranas y tardías de *M. liza* de la LCMCh, el músculo constituye un sitio de reserva de proteínas luego del reclutamiento. Además, en querimanas tardías, el músculo sería el sitio principal ya que si bien el hígado parece ser un sitio de reserva proteica, la menor concentración de proteínas lo señala como un sitio probable de movilización y/o de distribución de aminoácidos. En varias especies, el músculo constituye el principal sitio de reserva de proteínas y el hígado es un órgano metabólico central de distribución de metabolitos (Small 2022).

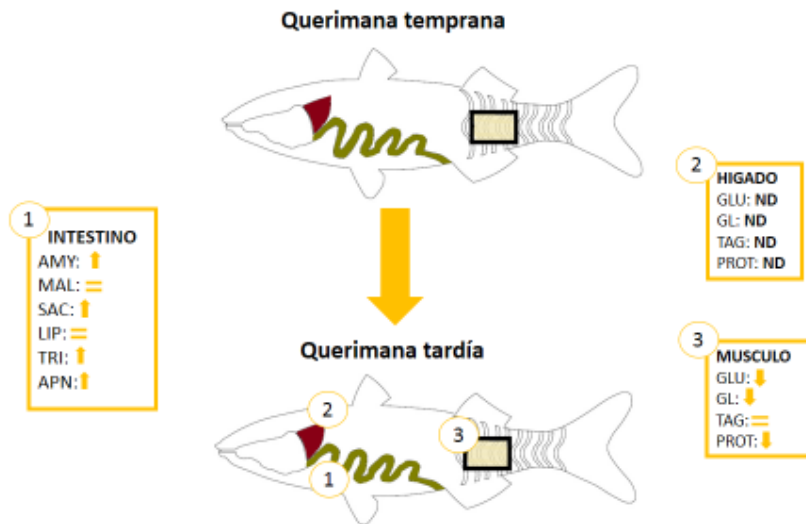


Figura 1.9. Resumen de parámetros digestivos y metabólicos en querimanas tempranas y tardías de *M. liza*. AMY: amilasa, MAL: maltasa, SAC: sacarasa, LIP: lipasa, TRI: tripsina, APN: aminopeptidasa-N, GLU: glucógeno, GL: glucosa libre, TAG: triglicéridos, PROT: proteínas. ↑, ↓, =, N: indican aumento, disminución, sin cambios o no determinado respectivamente, con respecto al valor correspondiente en querimanas tardías.

En resumen, los resultados del presente capítulo muestran que querimanas de *M. liza* exhiben una batería digestiva adecuada para la hidrólisis completa de diferentes sustratos dietarios lo que les permitiría sostener el hábito alimenticio detritívoro luego del reclutamiento y sugieren además la existencia de ajustes digestivos a nivel bioquímico y morfológico en relación a la edad (Figura 1.9) que podrían sustentar el crecimiento dentro de la LCMCh

Capítulo 2:

Flexibilidad digestiva/metabólica a diferentes tiempos luego
de la ingesta de alimento y re-alimentación en querimanas de

Mugil liza

Introducción

Conocer características digestivas/metabólicas a diferentes niveles de un individuo y los cambios en las mismas constituye un tema central en estudios de fisiología digestiva, nutricional y ecológica (Ramirez-Otarola et al., 2018; López Mañanes et al., 2020; Volkoff y Rønnestad, 2020; Nespolo et al., 2022). La flexibilidad fenotípica implica variaciones reversibles en características fenotípicas a diferentes niveles (por ej: bioquímico, morfológico) en un individuo lo cual puede aumentar la probabilidad de supervivencia bajo diferentes condiciones (Piersman y Drent, 2003; Kelly 2012; Pollock et al., 2019; Noakes y McKechnie, 2020). En este contexto, la flexibilidad digestiva/metabólica puede implicar ajustes en la adquisición, almacenamiento y/o utilización de energía que permiten la supervivencia y el mantenimiento de los animales, particularmente en ambientes heterogéneos (Karasov y Douglas 2013; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021; Olson et al., 2020; Zhong et al., 2023).

En varias especies animales, la modulación diferencial de la actividad de enzimas digestivas y de la concentración de reservas de energía constituye un ajuste a nivel bioquímico que les permite hacer frente a fluctuaciones temporales en las condiciones de alimentación (del Valle y López Mañanes, 2008; Li et al., 2008; Karasov et al., 2011; López Mañanes et al., 2020; Yang et al., 2019; Lallès 2020). La determinación de la actividad de enzimas digestivas y de la concentración de reservas de energía a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento permite establecer la dinámica temporal postprandial de componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas durante períodos variables de privación de alimento (Furné et al., 2008; Abolfathi et al., 2012; Caruso et al.,

2014; Pujante et al., 2018; Michiels et al., 2020; Albanesi et al., 2024). Por otro lado, la determinación de parámetros morfológicos como el peso total, coeficiente intestinal e índice hepatosomático, permite establecer el posible impacto sobre la condición física y la existencia de ajustes digestivos a nivel morfológico (Kalhor et al., 2018; Albanesi et al., 2021). Varios animales pueden enfrentar períodos variables de privación de alimento debido a factores ambientales o patrones de comportamiento que limitan la disponibilidad o el acceso al alimento (Secor y Carey, 2016; Ersminger et al., 2021). El ayuno representa una situación extrema de privación de alimento que muchos animales pueden enfrentar en el ambiente natural (Zaldúa y Naya, 2014; Secor y Carey, 2016; Yang et al., 2019). Sin embargo, los estudios para evaluar la dinámica temporal de cambios digestivos/metabólicos a nivel bioquímico involucrados en la transición al ayuno en peces son escasos y fragmentarios (Yang et al., 2019; Albanesi et al., 2024).

Los peces requieren distintas fuentes de energía para mantener su condición física y llevar a cabo procesos vitales tales como crecimiento, metabolismo y reproducción (Karasov y Douglas, 2013; Steimberg 2018; Gilannejad et al., 2020; Small 2022). La privación extrema de alimento puede generar efectos negativos en el metabolismo y la fisiología de peces, inclusive el deceso del individuo (Shan et al., 2008; Choi et al., 2012; Yang et al., 2019). Para sobrevivir al ayuno, varias especies de peces carnívoros movilizan diferencialmente reservas de energía para enfrentar el déficit energético y de esta manera poder mantener los procesos vitales (Salem et al., 2007; Furné et al., 2012; Yang et al., 2019). La determinación concomitante de la actividad de enzimas digestivas, concentración de reservas de energía y parámetros morfológicos a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento permite establecer la transición al ayuno y evaluar los posibles ajustes

digestivos/metabólicos a diferentes niveles. Además, realizar estas determinaciones luego de un periodo de re-alimentación permite evaluar la capacidad del animal para revertir los ajustes digestivos/ metabólicos ocurridos durante el periodo de privación de alimento (Tamadoni et al., 2020; Zaefarian et al., 2020).

Los estuarios o lagunas costeras son ambientes extremadamente desafiantes en los cuales factores bióticos y abióticos pueden variar abruptamente tanto espacial como temporalmente (Potter et al., 2010; Ducrotoy et al., 2019; Kennish 2019). Como se describió en el capítulo 1 de la presente tesis, las querimanas de *M. liza* de la LCMCh exhiben una batería digestiva adecuada para la hidrólisis completa de diferentes sustratos dietarios que les permitiría sostener el hábito alimenticio detritívoro luego del reclutamiento. Sin embargo, las condiciones heterogéneas que deben enfrentar las querimanas luego de su reclutamiento a los sistemas estuariales (ej. LCMCh) pueden conducir a períodos de restricción de alimento. En muchos peces, la privación de alimento a corto plazo es una estrategia importante para ajustar el metabolismo y hacer frente a múltiples estresores (Lu et al., 2019; Ensminger et al., 2021).

En este capítulo se describen estudios de determinación de la actividad de enzimas digestivas (amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN) en el intestino, concentración de sustratos de energía (glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas) en órganos de almacenamiento de energía y parámetros morfológicos y de condición física (peso total, coeficiente intestinal e índice hepatosomático) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en

querimanas tardías de *M. liza* para evaluar la existencia de ajustes digestivos y metabólicos en respuesta a la privación de alimento y a la re-alimentación.

Materiales y Métodos

Captura y mantenimiento de querimanas

Querimanas tardías (prejuveniles) fueron capturados luego de su reclutamiento en la Zona II (ver mapa en Introducción General de la presente tesis) de la LCMCh (González Castro et al., 2009a). Para la captura de los individuos se procedió como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis. La temperatura y la salinidad del agua al momento de la captura (agosto de 2019) fueron 13°C y 18 ups, respectivamente. Las querimanas fueron transportadas al laboratorio en agua del sitio de recolección.

Los individuos fueron mantenidos durante 10 días en acuarios en condiciones controladas de salinidad (18 ups) y temperatura (20°C) bajo fotoperiodo natural. El agua de los acuarios fue constantemente aireada y filtrada (Albanesi et al., 2024). Las querimanas se alimentaron *ad libitum* dos veces al día con alimento comercial para peces (alimento TetraMin, hojuelas. Composición: Pescados y subproductos de pescado, Cereales, Levaduras, Extractos de proteínas vegetales, Moluscos y crustáceos, Aceites y grasas, Azúcares (Oligofructosa 1%), Algas, Sustancias minerales)

Para la determinación de los correspondientes parámetros a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y de la re-alimentación, los individuos (n=7 para cada tiempo) fueron crioanestesiados inmediatamente (t=0) y a diferentes tiempos

(24, 72, 144 y 240h) luego de la ingesta de alimento y a las 72 h luego de la re-alimentación. Durante el periodo experimental no hubo mortalidad.

Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras

La determinación de parámetros morfológicos y la obtención de muestras se realizaron según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Este estudio se realizó siguiendo protocolo aprobado por el Comité de Ética (CICUAL) de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales (RD 2022-105 FCEyN, UNMdP, Argentina).

Determinaciones cuantitativas

Las actividades de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN en intestino se determinaron en las condiciones adecuadas de ensayo para cada actividad de acuerdo a lo que se describió en el Capítulo 1 de la presente tesis.

La determinación de la concentración de glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas se realizó como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Sigma 3.0 para Windows, el cual realiza automáticamente pruebas previas de igualdad de varianzas y normalidad. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para estimar la significancia estadística de las diferencias, y se consideró un valor de $p < 0,05$ como significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

Resultados

Parámetros morfológicos de querimanas de *M. liza* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la realimentación

El peso total fue similar a las 24 y 72 h luego de la ingesta de alimento (Tabla 1). A las 144 h el peso total disminuyó (aproximadamente 35 %) y se mantuvo constante hasta las 240 h. Luego de la re-alimentación, el peso corporal aumentó alcanzando valores similares a los de $t=0$ (recién alimentados) (Tabla 2.1).

El coeficiente intestinal disminuyó a 144 h (aproximadamente 23 %) después de la ingesta de alimento y se mantuvo constante hasta 240 h. Luego de la re-alimentación, ocurrió un incremento del coeficiente intestinal alcanzando valores similares a los de $t=0$ (Tabla 2.1). Durante el periodo experimental no se encontraron diferencias en el índice hepatosomático (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Peso total (PT), coeficiente intestinal (CI) e índice hepatosomático (IHS) de querimanas de *M. liza* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación (Re-alim).*Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 7 individuos.

	PT (g)	CI (%)	IHS (%)
t=0 h	1.97 \pm 0.34	3.13 \pm 0.09	1.81 \pm 0.65
t=24 h	2.08 \pm 0.55	3.04 \pm 0.33	1.90 \pm 0.49
t=72 h	1.59 \pm 0.33	2.55 \pm 0.30	1.87 \pm 0.64
t=144 h	1.41 \pm 0.22*	2.39 \pm 0.52*	1.50 \pm 0.31
t=240 h	1.20 \pm 0.29*	2.24 \pm 0.20*	1.36 \pm 0.31
Re-alim	1.51 \pm 0.28	2.93 \pm 0.28	2.03 \pm 0.51

Actividad de enzimas digestivas en intestino de querimanas a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la realimentación

Las actividades de amilasa y maltasa a las 24 hs luego de la ingesta de alimento fueron similares a t=0. Ambas actividades disminuyeron a las 72 h (45 % y 35 %, respectivamente) y se mantuvieron constantes hasta las 240 hs. Luego de la re-alimentación, las actividades de amilasa y maltasa aumentaron a niveles similares a t=0 (Figura 2.1 a- 2.1 b). La actividad de sacarasa disminuyó a las 24 h luego de la ingesta de alimento respecto a t=0 (alrededor del 40%). Esta actividad permaneció constante a las 72 y 240 hs. Luego de la realimentación, la actividad de sacarasa aumentó a niveles similares a t=0 (Figura 2.1 c).

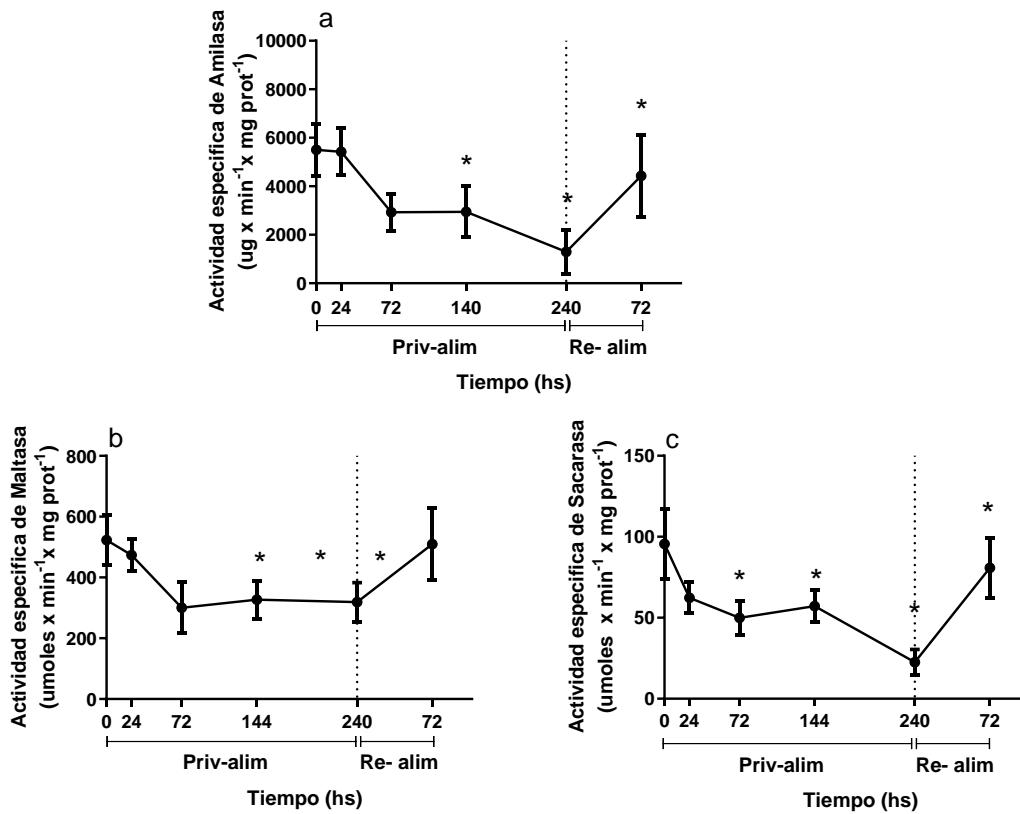


Figura 2.1 Actividades específicas de amilasa (a), maltasa (b) y sacarasa (c) en el intestino de querimanas de *M. liza* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación (Re-alim). La línea de puntos vertical indica el momento de la re-alimentación.*Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 7 individuos.

La actividad de lipasa disminuyó a las 24 h luego de la privación de alimento (alrededor de 70 %) y permaneció constante hasta las 240 h. Luego de la re-alimentación, la actividad mantuvo valores menores a t=0 (alrededor de 65%) (Figura 2.2 a).

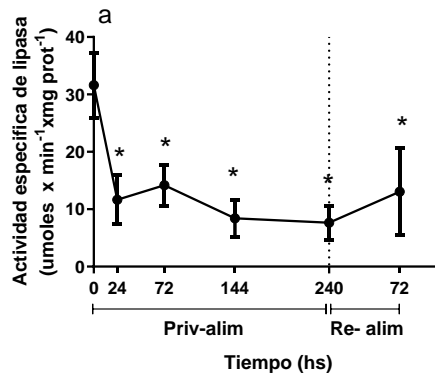


Figura 2.2 Actividad específica de lipasa en el intestino de querimanas de *M. liza* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación (Re-alim). La línea de puntos vertical indica el momento de la re-alimentación. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 7 individuos.

Las actividades de tripsina y APN fueron similares a t=0 durante todo el periodo experimental (Figura 2.3.a - 2.3.b).

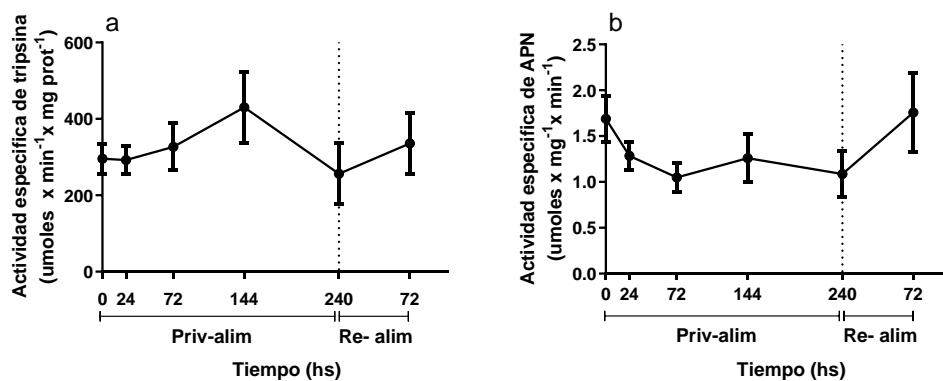


Figura 2.3 Actividades específicas de tripsina (a) y APN (b) en el intestino de querimanas de *M. liza* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación (Re-alim). La línea de puntos vertical indica el momento de la re-alimentación. *Indica diferencias significativas con respecto al

correspondiente valor a $t=0$ (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 7 individuos.

Reservas de energía en querimanas a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación

Las concentraciones de glucógeno y glucosa libre en el hígado disminuyeron a las 72 h luego de la ingesta de alimento (alrededor de 90 % y 92 %, respectivamente) y se mantuvieron constantes a las 144-240 h. Luego de la re-alimentación, la concentración de glucógeno y la glucosa libre aumentaron a valores similares a $t=0$ (Figura 2.4 a- 2.4 b).

En el músculo, la concentración de glucógeno aumentó a las 72-144 h (alrededor de 170 %), y la concentración de glucosa libre aumentó a las 144 h (alrededor de 165%). A las 240 hs luego de la ingesta de alimento, las concentraciones de glucógeno y glucosa libre disminuyeron a valores similares a $t=0$. Luego de la re-alimentación, las concentraciones de glucogeno y glucosa libre se mantuvieron a niveles similares a $t=0$ (Figura 2.4 c- 2.4 d).

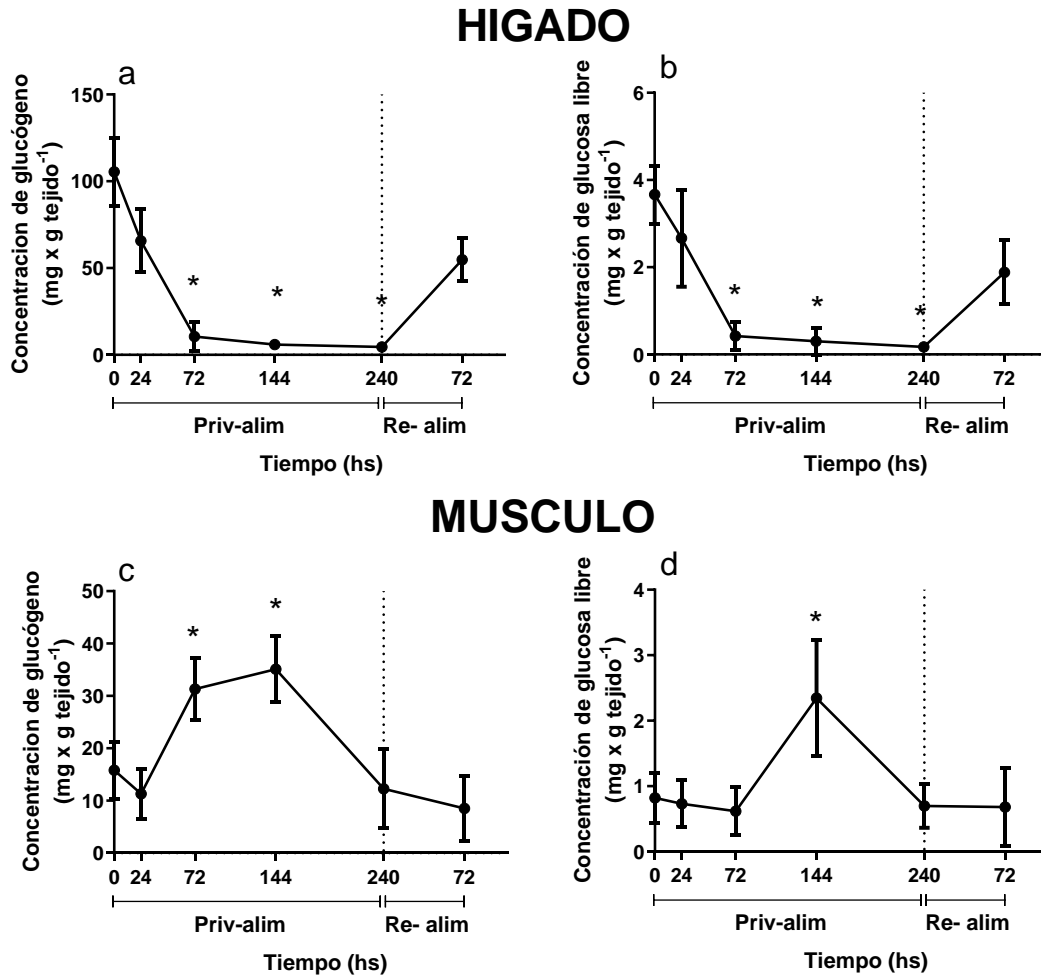


Figura 2.4 Concentración de glucógeno y glucosa libre en hígado (a,b) y músculo (c,d) de querimanas de *M. liza* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación (Re-alim). La línea de puntos vertical indica el momento de la re-alimentación. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 7 individuos.

La concentración de triglicéridos en el hígado fue similar a t=0 durante todo el periodo experimental (Figura 2.5 a). En el músculo, la concentración de triglicéridos disminuyó a las 24 h luego de ingesta de alimento (alrededor de 50%) y se mantuvo constante hasta las 240h. Luego de la re-alimentación, la concentración de

triglicéridos fue menor que la concentración a t=0 (alrededor del 50%) (Figura 2.5 c).

La concentración de proteínas en hígado y músculo fue similar a t=0 durante todo el periodo experimental (Figura 2.5 b- 2.5 d).

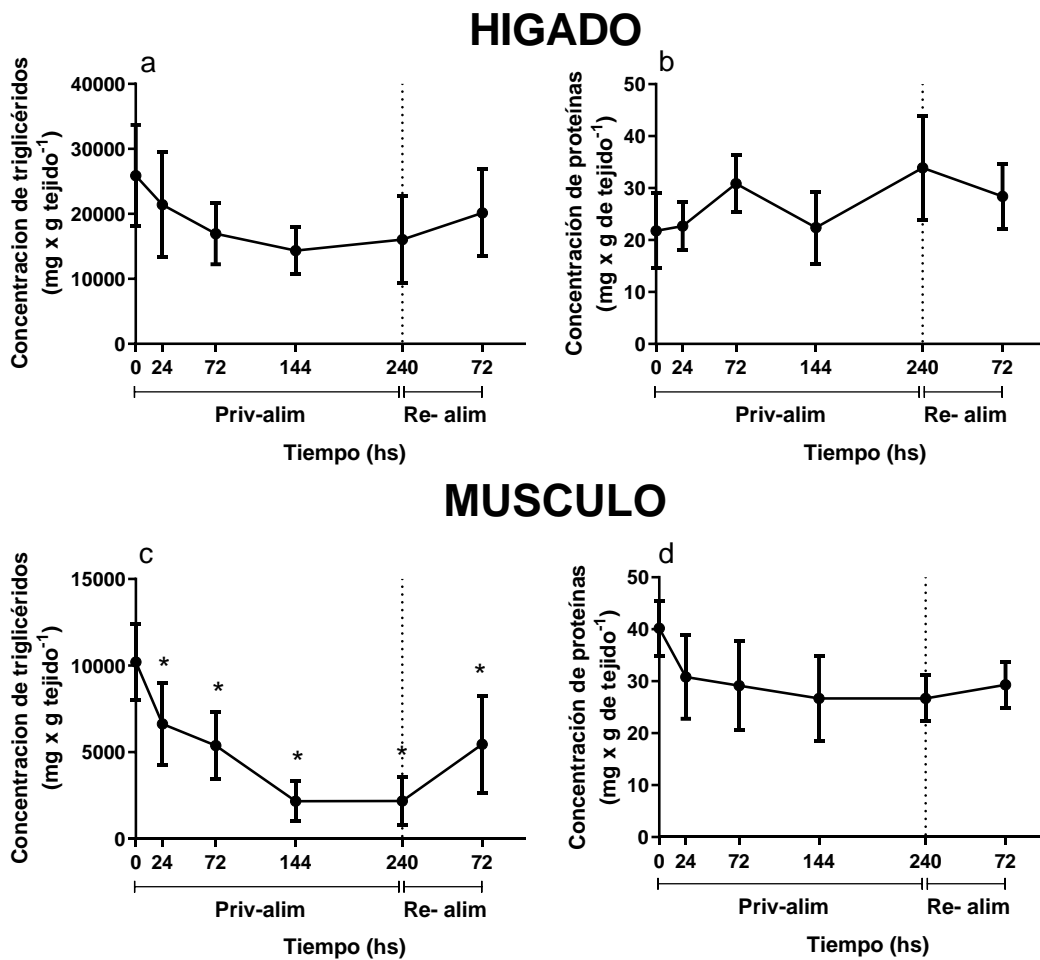


Figura 2.5 Concentración de triglicéridos y proteínas en hígado (a,b) y músculo (c,d) de querimanas de *M. liza* a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y después de la re-alimentación (Re-alim). La línea de puntos vertical indica el momento de la re-alimentación. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 7 individuos.

Discusión

La determinación de enzimas digestivas en el tracto digestivo a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento permite establecer la dinámica temporal postprandial a nivel bioquímico. En general, una disminución de la actividad de enzimas digestivas es un índice del pasaje de procesos digestivos a la privación de alimento (Krogdahl y Bakke-McKellep, 2005; Wang et al., 2006; Secor y Carey, 2016). Cambios en la actividad de enzimas digestivas específicas pueden conducir a variaciones en la capacidad digestiva del individuo para el sustrato dietario correspondiente (Karasov y Douglas, 2013; Bonelli et al., 2020). Este enfoque se utiliza comúnmente para establecer las rutas metabólicas (hidratos de carbono, lípidos, proteínas) implicadas en posibles ajustes en respuesta a la privación de alimento (Karasov y Douglas, 2013; Sanz et al., 2015; Pujante et al., 2016; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021). Sin embargo, la mayoría de los estudios en peces se han centrado en especies herbívoras, carnívoras y omnívoras (German et al., 2010; Yang et al., 2019; Shen et al., 2021, Day et al., 2014; Yang et al., 2019; Favero et al., 2020; Zhou et al., 2021).

Los resultados del presente capítulo sugieren la existencia de flexibilidad digestiva/metabólica a nivel bioquímico y morfológico en querimanas tardías de *M. liza* de la LCMCh en relación a la privación de alimento y re-alimentación. La menor actividad de amilasa a las 72 h luego de la ingesta de alimento sugiere una potencial disminución de la capacidad amilolítica y, por lo tanto, para pasos iniciales de la digestión de carbohidratos glucogénicos. En peces omnívoros y carnívoros, ocurre una disminución de la actividad de amilasa en el tracto digestivo luego de la privación de alimento (Fúrne et al., 2008; Abolfathi et al., 2012; Caruso et al., 2014;

Albanesi et al., 2024). En vertebrados, las enzimas digestivas de membrana tales como las disacaridasas sacarasa y maltasa constituyen un componente principal en la digestión final de sustratos glucogénicos. Sin embargo, en peces, la información sobre la modulación de disacaridasas en respuesta a diferentes períodos de privación de alimento es escasa y/o fragmentaria (Small 2022; Albanesi et al., 2024). La disminución de las actividades de sacarasa y maltasa en intestino de querimanas de *M. liza* sugieren también una menor capacidad para llevar a cabo pasos finales en la digestión de hidratos de carbono frente a la privación de alimento. En peces carnívoros tales como el salmón *Salmo salar* y juveniles del lenguado *Paralichthys orbignyanus* ocurre una disminución de la actividad de disacaridasas intestinales tras la privación de alimento (Krogdahl y Bakke-McKellep, 2005; Albanesi et al., 2024). Las actividades de sacarasa y maltasa en intestino de querimanas de *M. liza* (ver Capítulo 1 de la presente tesis) corresponderían al complejo sacarasa-isomaltasa y maltasa-glucoamilasa independiente de sacarasa, respectivamente (Burke 2019; Karasov y Caviedes Vidal, 2021) La disminución temporal diferencial de las actividades de sacarasa y maltasa (a las 24 y 72 hs, respectivamente) sugiere la regulación independiente de estos complejos. En varias especies de peces, cambios en la longitud intestinal pueden influir en la capacidad para la digestión y absorción de nutrientes (Krogdahl y Bakke-McKellep, 2005; Vidal et al., 2019; Small 2022). El menor coeficiente intestinal en querimanas de *M. liza* a las 144 h luego de la ingesta de alimento sugiere la existencia de ajustes digestivos a nivel morfológico que podrían conducir a cambios en los niveles y/o actividad de enzimas digestivas, particularmente las unidas a membrana. Sin embargo, el hecho que la disminución de las actividades de sacarasa y maltasa en intestino de querimanas de *M. liza* precedió a la del

coeficiente intestinal (144 h), sugiere que la modulación de estas enzimas sería independiente de cambios a nivel morfológico. La disminución a las 24 h de la actividad de lipasa en intestino indica también ajustes en componentes clave del metabolismo lipídico que podrían conducir a una menor capacidad lipolítica frente a la privación de alimento. La disminución en la actividad de lipasa previamente a la de amilasa es diferente a lo observado en especies de peces carnívoros como el esturión *Acipenser naccarii*, la trucha *Oncorhynchus mykiss* y el gobio jabalí *Synechogobius* en los que la disminución de la actividad de amilasa precedió a la de la actividad de lipasa (Furné et al., 2008; Zhou et al., 2021). El hecho que no se produjeron cambios a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en la actividad de proteasas clave, como tripsina y APN en intestino de querimanas de *M. liza*, contrariamente a lo observado para las actividades de amilasa, sacarasa, maltasa y lipasa, sugiere la modulación específica de componentes de las rutas de digestión de hidratos de carbono y lípidos. Las respuestas diferenciales de la actividad de diferentes enzimas digestivas sugieren, además, la existencia de dinámicas temporales y mecanismos de regulación específicos. En peces carnívoros ocurre una disminución diferencial de la actividad de carbohidrasas y lipasas en respuesta a la restricción alimentaria aunque el tiempo y el grado de disminución es específico para cada especie (Imani e Iranparast, 2010; Abolfathi et al., 2012; Caruso et al., 2014; Hahor et al., 2023; Albanesi et al., 2024).

La disminución del peso total de las querimanas de *M. liza* a las 144h señala que este tiempo de privación de alimento comprometió la condición física. La disminución de la actividad de carbohidrasas y de lipasas en el intestino podría conducir a una disponibilidad limitada de metabolitos específicos para la construcción y el mantenimiento de reservas de energía en órganos de

almacenamiento. Para sobrevivir al ayuno a corto plazo, varias especies de peces carnívoros, omnívoros y herbívoros movilizan reservas de energía para afrontar el déficit energético y mantener procesos vitales (Salem et al., 2007; Furné et al., 2012; Zaldúa y Naya, 2014; Yang et al., 2019). En hígado de varias especies de peces ocurre la regulación a diferentes niveles (expresión, cantidad y/o actividad) de varias enzimas involucradas en la síntesis/degradación de glucógeno y en vías gluconeogénicas en respuesta a la privación de alimento (Chen et al., 2017; Conde-Sieira y Soegas, 2017; Yang et al., 2019). En varias especies, durante las primeras etapas del ayuno, se moviliza inicialmente el glucógeno hepático para mantener la homeostasis de glucosa, siendo el primer sustrato utilizado como fuente de energía (Chen et al., 2018; Nebo et al., 2018; Lu et al., 2019). Este parece ser también el caso para las querimanas de *M. liza*. La disminución de la concentración de glucógeno y glucosa libre en el hígado a las 72 hs luego de la ingesta de alimento sugiere su modulación (mayor degradación/movilización y/o disminución de la síntesis). Esta podría ser un ajuste metabólico a nivel bioquímico en querimanas de *M. liza* para hacer frente a la menor disponibilidad de sustratos glucogénicos. El hecho de que el índice hepatosomático no varió por la privación de alimento soporta aún más la idea de ajustes a nivel bioquímico en hígado. Por otro lado, en varios peces carnívoros, herbívoros y omnívoros, el hígado es una fuente principal de suministro de metabolitos (por ejemplo, glucosa) para otros órganos como el músculo. El flujo neto de glucosa puede modificarse por las vías de producción y utilización en el hígado (Enes et al., 2009; Polakof et al., 2012; Nebo et al., 2018). El aumento de la concentración de glucógeno en músculo a las 72- 144 h y de glucosa libre a las 144 h, concomitante a la disminución de esta reserva en hígado sustenta que también en querimanas de *M. liza* este órgano podría constituir una

fuelle de glucosa para ser utilizada en músculo primariamente en procesos anabólicos. Sin embargo, la posterior disminución a las 240 h de la concentración de glucógeno y de glucosa libre en el músculo sugiere la activación de procesos catabólicos y la posible utilización local de glucosa en fases posteriores. En peces teleósteos, el músculo esquelético es un sitio principal de entrada de glucosa a través de un transportador de membrana del tipo GLUT4. La actividad y la cantidad de este transportador en la membrana parecen estar sujetas a procesos de regulación (Marín-Juez et al., 2013; Yang et al., 2021). La menor concentración de triglicéridos a las 24 hs luego de la ingesta de alimento sugiere que en querimanas de *M. liza* el músculo, contrariamente al hígado, constituiría un sitio de movilización de reservas lipídicas para soportar la potencial disminución en la disponibilidad de metabolitos. Esto podría ser particularmente importante para proporcionar energía para procesos fisiológicos clave como el movimiento (Morse 2019).

En peces carnívoros y herbívoros, la recuperación de la actividad de enzimas digestivas en el intestino después de la re-alimentación parece ser diferencial para enzimas específicas y depende de la especie y el hábito alimentario (Fúrne et al., 2008; Caruso et al., 2014; Day 2014; Babaei et al., 2020; Dar et al., 2021). Sin embargo, para nuestro conocimiento no hay estudios sobre las respuestas de privación de alimento y re-alimentación a nivel bioquímico en peces detritívoros estuarino-dependientes. El aumento del peso total de querimanas de *M. liza* después de 72 hs de re-alimentación sugiere la existencia de ajustes subyacentes que conducen a la recuperación de la condición física. El aumento de la actividad de amilasa, maltasa y sacarasa en el intestino a valores similares a los de t=0 señala la existencia de una modulación reversible de estas enzimas después de la re-alimentación. En peces carnívoros, omnívoros y herbívoros se ha demostrado

una recuperación de la actividad de carbohidrasas luego de la realimentación (Day et al., 2014). El aumento concomitante del coeficiente intestinal sugiere la existencia de ajustes integrados reversibles a diferentes niveles (por ejemplo, morfológico, bioquímico) en querimanas de *M. liza*. El proceso de ayuno y posterior re-alimentación, en varios animales, puede desencadenar un conjunto coordinado de respuestas en múltiples niveles (desde el molecular hasta el morfológico), con variaciones que van desde respuestas sencillas hasta significativamente complejas (Secor 2005; Secor y Lignot, 2010; Day et al., 2014; Lo Cascio et al., 2017).

Los mecanismos de regulación (es decir, mensajeros químicos primarios) involucrados en la modulación de la actividad y/o secreción de enzimas digestivas en peces han sido escasamente investigados y están muy lejos de haber sido dilucidados (Small 2022), particularmente en peces detritívoros estuarino-dependientes (Capítulo 5 de la presente tesis). En el intestino de *Carassius auratus* y *Odontesthes bonariensis*, la grelina y la nesfatina (mensajeros químicos primarios que regulan la ingesta de alimento) modulan *in vitro* la expresión de sacarasa-isomaltasa (Blanco et al., 2017; Bertucci et al., 2018). Sin embargo se necesita más trabajo experimental para establecer si estos mecanismos están involucrados en la regulación positiva de la actividad de disacaridasas después de la re-alimentación en querimanas de *M. liza*. La recuperación de la potencial capacidad digestiva para sustratos glucogénicos debido al aumento de la actividad de carbohidrasas en intestino podría permitir la reconstrucción de las reservas de glucógeno y del contenido de glucosa libre en el hígado después de la re-alimentación. Dado que la actividad de lipasa en el intestino y la concentración de triglicéridos en el músculo no se recuperaron, la regulación de componentes clave de la homeostasis de la glucosa parece ser suficiente para recuperar la condición física. La degradación de

proteínas enzimáticas, mecánicas y estructurales puede provocar el deterioro y/o disminución de tejidos y órganos críticos, y, por ende, graves desequilibrios homeostáticos que eventualmente podrían conducir a la muerte (Secor y Carey, 2016). Sin embargo, este no parece ser el caso de las querimanas de *M. liza*. El mantenimiento de la actividad de proteasas clave en el intestino y de la concentración de proteínas en el hígado y el músculo podría ser un factor importante que permitiría la supervivencia en respuesta a una privación de alimento de hasta 240h.

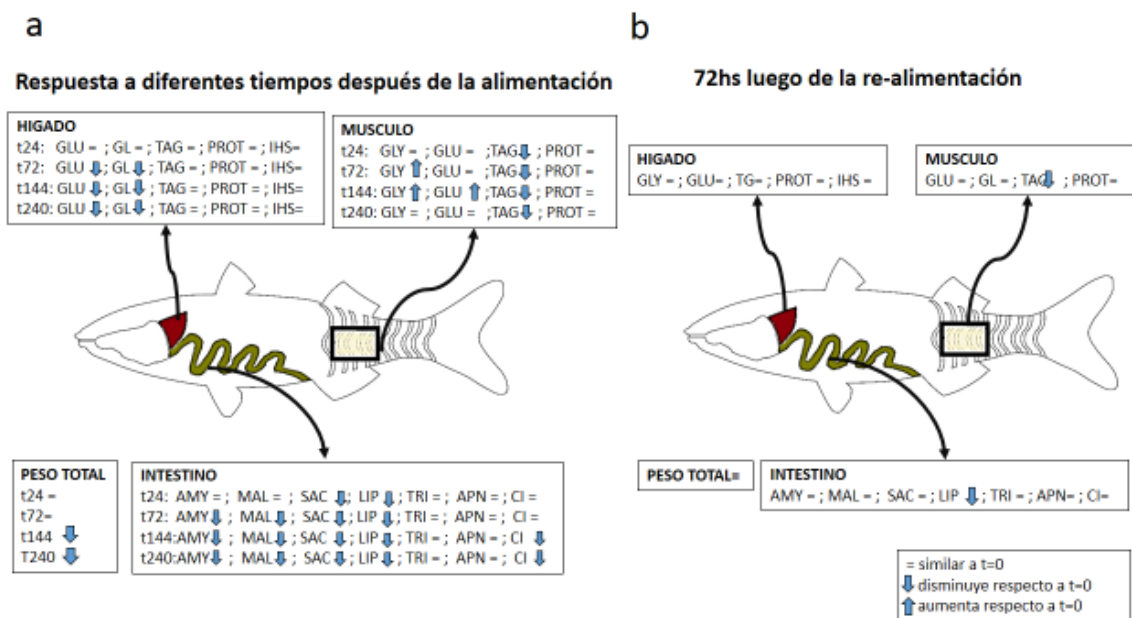


Figura 2.6 Resumen de parámetros morfológicos, digestivos y metabólicos en diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (a) y después de la realimentación (b) en querimanas de *M. liza* . CI: coeficiente intestinal; IHS: índice hepatosomático; AMY: amilasa; MAL: maltasa; SAC: sacarasa; LIP: lipasa; TRI: tripsina; APN: aminopeptidasa-N; GLU: glucógeno; GL: glucosa libre; TAG: triglicéridos; PROT: proteínas. ↑, ↓, = indican aumento, disminución y sin cambios, respectivamente, con respecto al correspondiente valor a t=0

En resumen, los resultados del presente capítulo muestran una modulación diferencial y específica de componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos (Figura 2.6). Esto sugiere la existencia de flexibilidad digestiva/metabólica en querimanas de *M. liza* lo cual les permitiría enfrentar períodos de alimentación irregular dentro de la LCMCh luego del reclutamiento.

Capítulo 3:

Flexibilidad fenotípica en respuesta a un cambio abrupto
de salinidad en querimanas de *Mugil liza*

Introducción

Los peces eurihalinos (<10% de los teleósteos) presentan adaptaciones a distintos niveles que les permiten soportar un amplio rango de salinidad ambiental (desde 0,5 psu a 40 psu) (Schubert et al., 2017; Li et al., 2022; Seales y Breves, 2022). La flexibilidad fenotípica a diferentes niveles puede aumentar las posibilidades de supervivencia para enfrentar cambios en la salinidad ambiental (Piersman y Drent, 2003; Kelly 2012; Pollock et al., 2019; Noakes y McKechnie, 2020; Seale y Breves, 2022). En alta salinidad, los peces hipo-reguladores son capaces de mantener la concentración osmótica del medio interno por debajo de la del medio externo principalmente mediante la secreción activa de Na^+ y Cl^- hacia el agua a través de las branquias (Griffith 2017; Kato et al., 2022; Su et al., 2022; Little et al., 2023). En baja salinidad, los peces hiper-reguladores mantienen la concentración osmótica del medio interno por encima de la del medio externo contrarrestando la pérdida de iones principalmente mediante la toma activa de Na^+ y Cl^- desde el ambiente acuático a través de las branquias (Griffith 2017; Kato et al., 2022; Su et al., 2022). Los estuarios y lagunas costeras constituyen ambientes fluctuantes en los cuales la salinidad puede variar abruptamente tanto espacial como temporalmente (Potter et al., 2010; Ducrotoy et al., 2019; Kennish, 2019). La amplitud y el tipo de variación en la salinidad ambiental (alta/baja salinidad) imponen desafíos osmóticos diferenciales que podrían implicar cambios en la respuestas osmoregulatorias (hipo/hiper-regulación). En este contexto, la flexibilidad en las respuestas osmo-regulatorias es esencial para la supervivencia, ocupación exitosa y uso del hábitat estuarial o de lagunas costeras para peces marinos estuarinos-dependientes.

El mantenimiento y activación de los mecanismos moleculares y bioquímicos involucrados en las respuestas hipo- e hiper-osmorregulatorias (ej. diferentes sistemas de transporte de iones en las branquias e intestino) son procesos de alta demanda energética que pueden requerir una reorganización metabólica diferencial (Handeland et al., 1998; Lisboa et al., 2015; Soengas et al., 2019; Ruiz-Jarabo et al., 2019). En distintas especies de animales osmoreguladores, la modulación diferencial de enzimas digestivas y de reservas de energía constituye un mecanismo de ajuste a nivel bioquímico frente a cambios en la salinidad ambiental (Michiels et al., 2017; 2020; López Mañanes et al., 2020; Xiong et al., 2020; Mozanzadeh et al., 2021). En peces eurihalinos, la relación entre las funciones de digestión/absorción de nutrientes y de osmorregulación del intestino es compleja. Los procesos de absorción de nutrientes y la función osmorregulatoria parecen estar relacionados ya que ambas funciones pueden involucrar enzimas y sistemas de transporte de membrana en común (Wood y Bucking, 2011; Con et al., 2017). Sin embargo, faltan estudios integrales sobre posibles ajustes en la actividad de enzimas digestivas en intestino y de la concentración de reservas de energía en órganos de reserva en diferentes condiciones de salinidad ambiental en peces marinos estuarino-dependientes.

Las querimanas tempranas de *M. liza* de la LCMCh deben enfrentar cambios amplios y/o abruptos de salinidad ambiental durante y luego de su reclutamiento (González-Castro et al., 2009b; González-Castro y Minos, 2016) lo cual sugiere su flexibilidad osmorregulatoria. Sin embargo, se desconocen aún las respuestas osmorregulatorias en querimanas de *M. liza*. Más aún, faltan estudios sobre la posible modulación de la actividad de enzimas digestivas claves y de reservas de

energía en respuesta a diferentes condiciones de salinidad que impliquen distintas respuestas osmorregulatorias (hipo/hiper-regulación).

En este capítulo se caracteriza la respuesta osmorregulatoria, la actividad de enzimas digestivas (amilasa, sacarasa, lipasa y APN en el intestino), concentración de reservas de energía (glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas) en órganos de almacenamiento y parámetros morfológicos y de condición física (peso total, coeficiente intestinal e índice hepatosomático) antes y luego de un cambio de alta a baja salinidad en querimanas tempranas de *M. liza*.

Materiales y métodos

Captura y mantenimiento de querimanas

Querimana tempranas (prejuveniles) fueron capturadas luego de su reclutamiento en la Zona II (ver mapa en Introducción General de la presente tesis) de la LCMCh (González Castro et al., 2009b). Para la captura de los individuos se procedió como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis. La salinidad y temperatura del agua registradas al momento de la captura (marzo de 2022) fueron 31 ups y 18°C, respectivamente. Los individuos fueron mantenidos en acuarios en condiciones controladas de salinidad (31 ups) y temperatura (20°C) bajo fotoperiodo natural durante 20 días. El agua de los acuarios fue constantemente aireada y filtrada (Albanesi et al., 2024). Las querimanas se alimentaron *ad libitum* dos veces al día con alimento comercial (alimento TetraMin, hojuelas). Para estudiar el efecto de un cambio abrupto de salinidad, individuos mantenidos en 31 ups fueron abruptamente transferidos a 25

o 10 ups. Antes de la transferencia ($t=0$) y a los 10 y 25 días luego de la correspondiente transferencia, los individuos fueron crioanestesiados ($n=6$ para cada tiempo) para realizar las correspondientes determinaciones como se describe más abajo. Un grupo de individuos fueron mantenidos en 31 ups (individuos no transferidos). En los individuos no transferidos no se produjeron cambios respecto a $t=0$ en ninguno de los parámetros estudiados durante el periodo experimental.

No hubo diferencias en el comportamiento de alimentación ni mortalidad durante todo el período experimental.

Osmolalidad de la sangre y del medio externo

Las muestras de sangre se tomaron de acuerdo a lo descrito por Babaei et al., 2013. Las querimanas ($n=6$ para cada salinidad) fueron anestesiadas y se les amputó la aleta caudal utilizando tijeras finas. Cada pez se introdujo, con la herida hacia abajo, en un tubo Eppendorf de 0,5 ml que había sido previamente perforado con agujas afiladas. Luego, el tubo se colocó dentro de otro tubo de 1,5 ml que contenía 10 μ l de heparina y se centrifugó a $40\times g$ durante 5 min. Se tomó la muestra de sangre (aproximadamente 50 μ l) y se midió la osmolalidad (mOsm kg^{-1}) de la sangre y con un osmómetro de crioscopia (Osmomat 030, Gonotec). Los resultados se expresaron como osmolalidad de la sangre (mOsm x kg^{-1}).

Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras

La determinación de parámetros morfológicos y la obtención de muestras se realizaron según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Este estudio se realizó siguiendo protocolo aprobado por el Comité de Ética (CICUAL) de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales (RD 2022-105 FCEyN, UNMdP, Argentina).

Determinaciones cuantitativas

Las actividades de amilasa, sacarasa, lipasa y APN en intestino se determinaron como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

La determinación de la concentración de glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas se realizó como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Sigma 3.0 para Windows como se describió en el capítulo 1 de la presente tesis. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para estimar la significancia estadística de las diferencias, y se consideró un valor de $p < 0,05$ como significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

Resultados

Osmolalidad de la sangre de querimanas

En individuos mantenidos a 31 ups, la osmolalidad de la sangre fue menor (58%) que la osmolalidad del medio externo (Figura 3.1).

A los 10 días luego del cambio abrupto de 31 a 25 ups, la osmolalidad de la sangre fue también menor (53 %) que la osmolalidad del correspondiente medio externo (Figura 3.1).

Luego del cambio abrupto a baja salinidad (31 a 10 ups) la osmolalidad de la sangre fue mayor (55 %) que la osmolalidad del correspondiente medio externo (Figura 3.1).

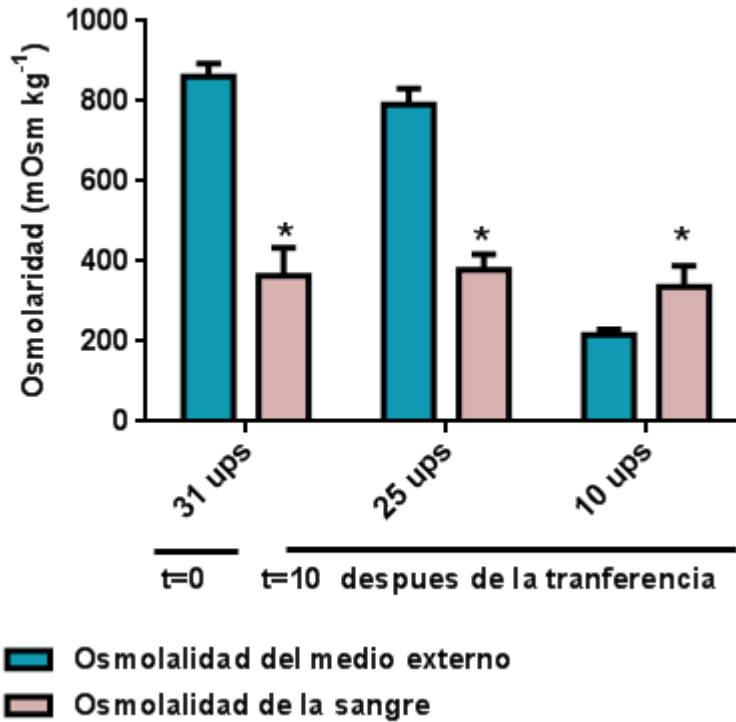


Figura 3.1. Osmolalidad de la sangre antes (31 ups; t=0) y luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups en querimanas de *M. liza*. Osmolalidad de la sangre a t=0 (31 ups; 862 mOsm \times kg⁻¹) y 10 días después del cambio abrupto de salinidad a 25 o 10 ups (792 mOsm \times kg⁻¹, 210 mOsm \times kg⁻¹, respectivamente) *indica diferencia significativa con respecto a la osmolalidad del correspondiente medio externo (One-Way ANOVA, $p < 0,05$). Los datos se expresan como media \pm SD para 6 individuos

Parámetros morfológicos de querimanas luego de un cambio abrupto de salinidad

El peso total de querimanas luego del cambio abrupto de salinidad de 31 a 25 ups o de 31 a 10 ups se mantuvo constante

A los 10 días (t=10) luego del cambio abrupto de salinidad de 31 a 25 ups el coeficiente intestinal y el índice hepatosomático fueron similares a t=0. A los 10 días

(t=0) luego de la transferencia de 31 a 10 ups el coeficiente intestinal fue menor (24 %) que t=0 mientras que el índice hepatosomático no varió (Tabla 1)

A los 25 días luego de ambas transferencias no se observaron diferencias en el peso total, coeficiente intestinal o índice hepatosomático con respecto al correspondiente t=10.

Tabla 3.1 Peso total (PT), coeficiente intestinal (IC) e índice hepatosomático (IHS) de querimanas de *M. liza* antes (31 ups; t=0) y luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups Tiempo: días luego de la transferencia. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 18 individuos.

Tiempo (días)	Salinidad (UPS)	PT (g)	CI (%)	IHS (%)
t=0	31	0,26 \pm 0,04	2,24 \pm 0,36	2,89 \pm 0,09
t=10	25	0,31 \pm 0,05	2,09 \pm 0,35	2,93 \pm 0,06
	10	0,30 \pm 0,06	1,72 \pm 0,17 *	2,84 \pm 0,08
t=25	25	0,34 \pm 0,04	2,22 \pm 0,32	2,88 \pm 0,15
	10	0,31 \pm 0,03	1,69 \pm 0,19 *	2,81 \pm 0,10

Efecto de un cambio abrupto de salinidad sobre la actividad de enzimas digestivas en intestino de querimanas

Luego del cambio abrupto de 31 a 25 ups, las actividades de amilasa, sacarasa, lipasa y APN a t=10 fueron similares con respecto al correspondiente valor antes de la transferencia (Figura 3.2 a,b- 3.3 - 3.4). Luego del cambio abrupto de 31 a 10 ups las actividades de amilasa y sacarasa, disminuyeron (alrededor 44% y 57%

respectivamente) con respecto al correspondiente valor antes de la transferencia (Figura 3.2 a, b). La actividad de lipasa aumentó (alrededor 78%, respectivamente) con respecto a $t=0$ (Figura 3.3 a). No se produjeron cambios en la actividad de APN luego de la transferencia (Figura 3.4).

A los 25 días luego de las transferencias no se observaron diferencias en las actividades enzimáticas determinadas con respecto al correspondiente $t=10$.

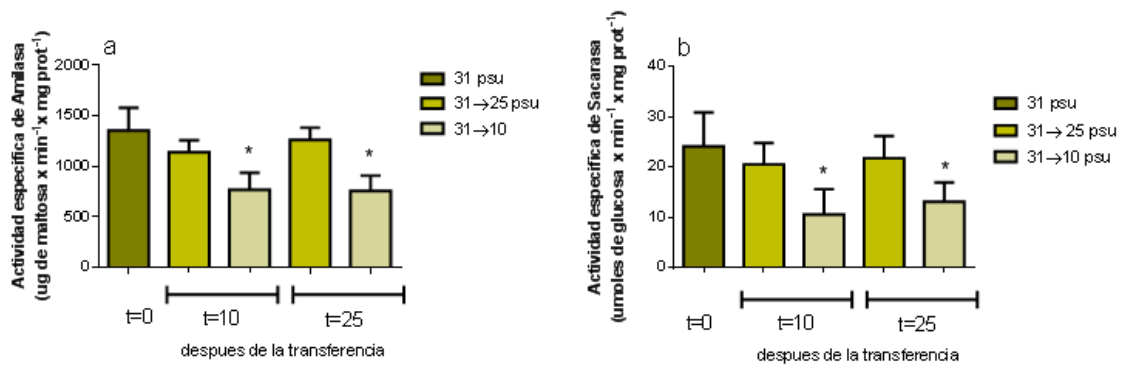


Figura 3.2. Actividades de amilasa (a) y sacarasa (b) en intestino de querimanas de *M. liza* antes (31 ups; $t=0$) y a los 10 ($t=10$) y 25 días ($t=25$) luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a $t=0$ (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 6 individuos.

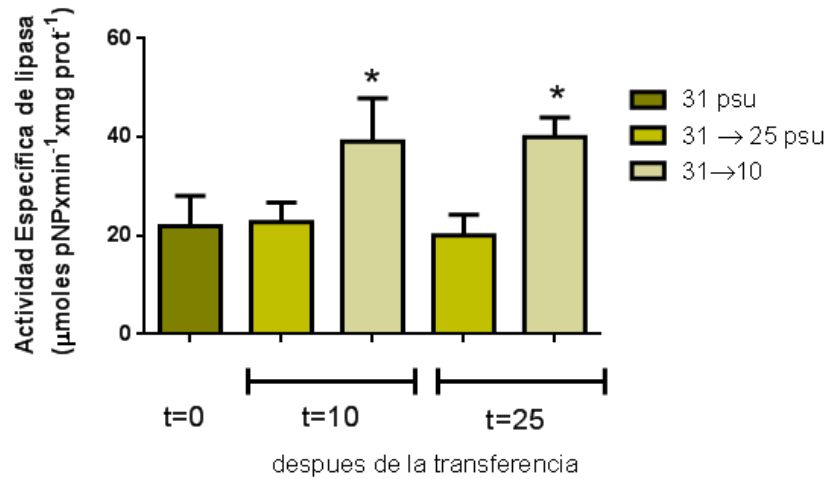


Figura 3.3. Actividad de lipasa en intestino de querimanas de *M. liza* antes (31 ups; t=0) y a los 10 (t=10) y 25 días (t=25) luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; p <0,05). Los datos son la media ± SD. para 6 individuos.

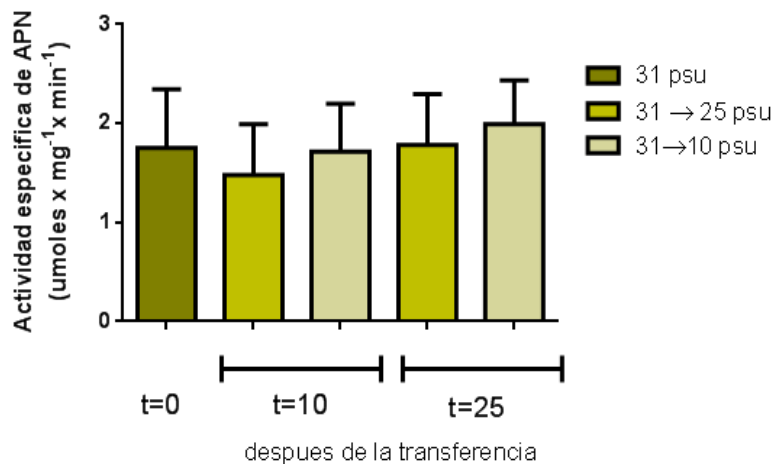


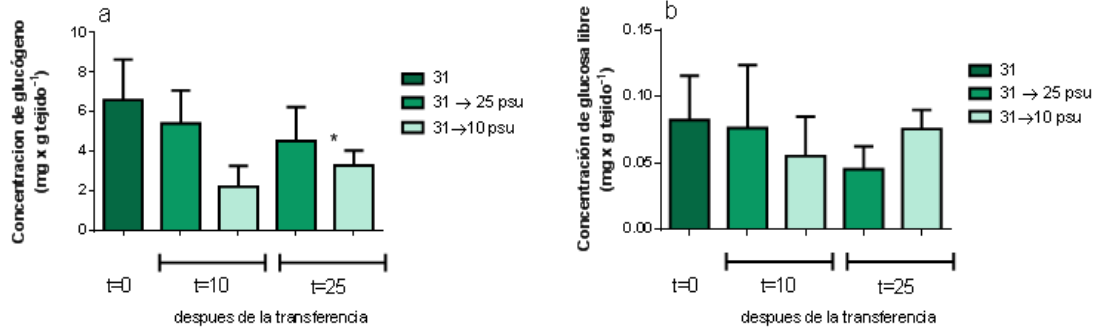
Figura 3.4. Actividad de APN en intestino de querimanas de *M. liza* antes (31 ups; t=0) y a los 10 (t=10) y 25 días (t=25) luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; p <0,05). Los datos son la media ± SD. para 6 individuos.

Efecto de un cambio abrupto de salinidad sobre la concentración de reservas de energía en querimanas

Luego del cambio abrupto de 31 a 25 ups, las concentraciones de glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas en hígado y músculo a $t=10$ fueron similares con respecto al correspondiente valor antes de la transferencia (Figuras 3.5- 3.6 - 3.7). Luego del cambio abrupto de 31 a 10 ups la concentración de glucógeno en hígado y músculo disminuyó (alrededor 67% y 58% respectivamente) con respecto al correspondiente valor antes de la transferencia (Figura. 3.5 a, c). No se produjeron cambios en la concentración de glucosa libre en ninguno de los órganos (Figura 3.5 b,d). La concentración de triglicéridos fue menor a $t=0$ en hígado (alrededor de 50%) y músculo (alrededor 51%) (Figura 3.6 a, b). La concentración de proteínas en hígado y músculo también disminuyó (alrededor de 33 y 40%) luego de la transferencia (Figura 3.7 a, b)

A los 25 días luego de las transferencias no se observaron diferencias en la concentración de ninguna reserva de energía con respecto al correspondiente $t=10$.

Higado



Músculo

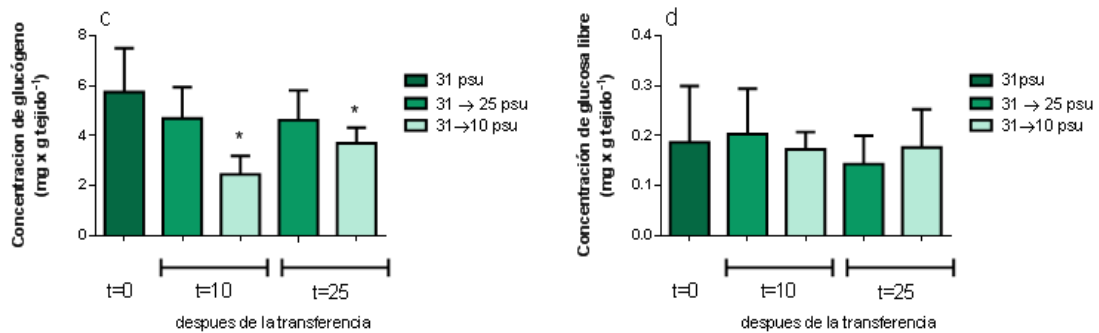


Figura 3.5 Concentración de glucógeno y glucosa libre en hígado (a,b) y músculo (c,d) de querimanas de *M. liza* antes (31 ups; t=0) y a los 10 (t=10) y 25 días (t=25) luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm SD. para 6 individuos.

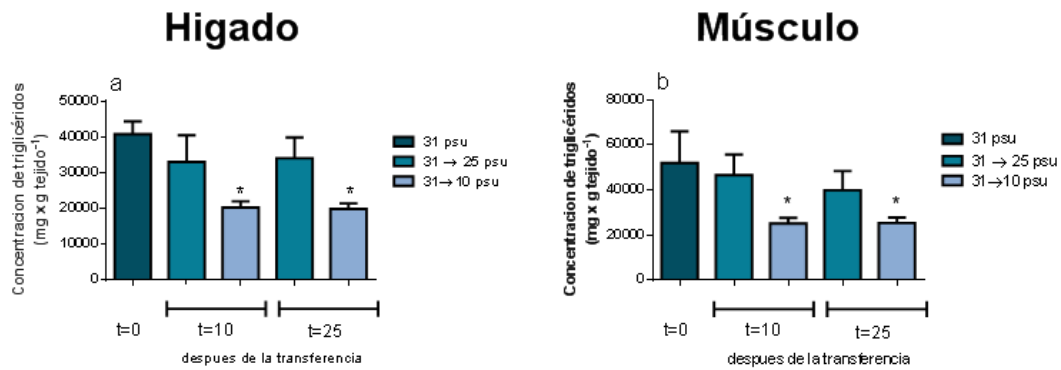


Figura 3.6 Concentración de triglicéridos en hígado (a) y músculo (b) de querimanas de *M. liza* antes (31 ups; t=0) y a los 10 (t=10) y 25 días (t=25) luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; p <0,05). Los datos son la media \pm SD. para 6 individuos.

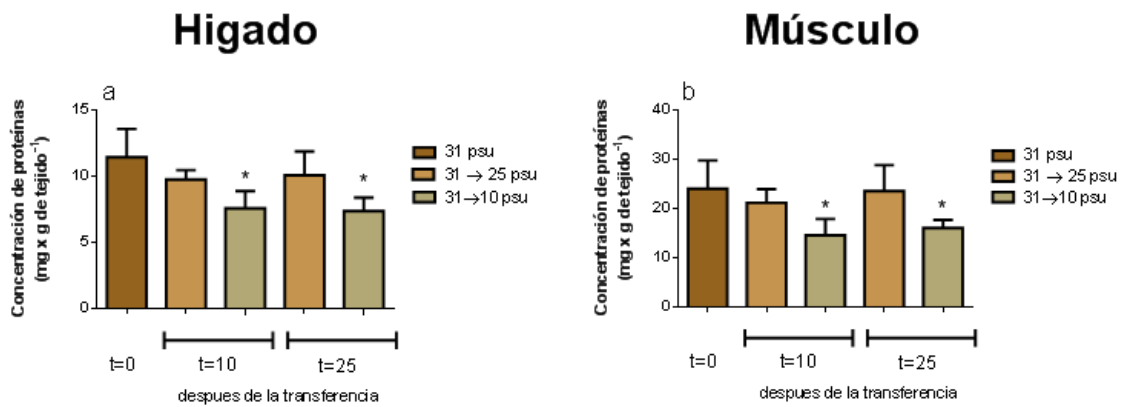


Figura 3.7 Concentración de proteínas en hígado (a) y músculo (b) de querimanas de *M. liza* antes (31 ups; t=0) y a los 10 (t=10) y 25 días (t=25) luego de un cambio abrupto a 25 o 10 ups. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor a t=0 (One-Way ANOVA; p <0,05). Los datos son la media \pm SD. para 6 individuos.

Discusión

Los peces eurihalinos hipo/hiper-reguladores son capaces de mantener la concentración osmótica de sus fluidos corporales dentro de valores estables, por

debajo y por encima de la del medio externo, en alta y baja salinidad, respectivamente. Las querimanas tempranas de *M. liza* de la LCMCh exhibieron capacidad hipo/hiper-regulatoria, manteniendo la concentración osmótica de la sangre por debajo de la del medio externo en alta salinidad (31 ups) y por encima de la del medio externo luego de un cambio a baja salinidad (10 ups). Estos resultados muestran la flexibilidad osmorregulatoria de las querimanas tempranas que les permitiría soportar un cambio amplio y abrupto de alta a baja salinidad durante su reclutamiento a la laguna costera.

En peces eurihalinos, los cambios moleculares y bioquímicos involucrados en los procesos osmorregulatorios que pueden incluir la activación y/o síntesis de novo de sistemas de transporte de membranas y/o de enzimas en branquias e intestino son procesos que demandan energía (Tseng y Hwang, 2008; Xiong et al., 2020; Little et al., 2023). Cambios en la longitud del intestino y, consecuentemente, en el área de superficie y el volumen total, en respuesta a diferentes condiciones ambientales pueden afectar la digestión y absorción de nutrientes, y en algunos casos, la condición física (Krogdahl y Bakke-McKellep, 2005; Vidal et al., 2019; Small et al., 2022). En varias especies de peces, las modificaciones en las dimensiones del largo intestinal parecen depender de la dirección del cambio de salinidad y por ende, del tipo de respuesta osmorregulatoria (Kipanyula et al., 2016, Mozanzadeh et al., 2021). En trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* se observó un aumento del largo intestinal luego de transferir a los individuos de un medio de baja salinidad a un medio de alta salinidad (Kipanyula et al., 2016). El menor coeficiente intestinal registrado en querimanas tempranas de *M. liza* en 10 ups sugiere la existencia de ajustes a nivel morfológico en condiciones de hiper-regulación que

podrían conducir a modificaciones en la capacidad digestiva y/o de absorción de nutrientes.

La modulación de la actividad de enzimas digestivas, al ser un vínculo entre la digestión y la absorción de nutrientes, puede conducir a cambios en la capacidad digestiva para un sustrato específico y de esta manera en la disponibilidad de metabolitos (Karasov y Douglas, 2013; Bonelli et al., 2020). Los cambios en la actividad de enzimas digestivas específicas y en la concentración de reservas de energía luego de un cambio abrupto de 31 a 10 ups observado en la presente tesis, sugieren también la existencia de ajustes en parámetros digestivos/metabólicos a nivel bioquímico en querimanas tempranas de *M. liza* en relación al tipo de respuesta osmoregulatoria (hipo o hiper-regulación). Esta idea se soporta además por el hecho de que luego de un cambio abrupto de 31 a 25 ups, durante el cual las querimanas mantuvieron la respuesta hipo-regulatoria, no se produjeron cambios en ninguno de los parámetros estudiados.

Los hidratos de carbono son una fuente de energía esencial para la osmorregulación en varios peces frente a cambios de salinidad (Tseng y Hwang 2008; Angadi et al., 2021). La digestión de sustratos glucogénicos por amilasa y sacarasa en intestino es una de las fuentes principales de glucosa circulante (Polakof et al., 2011; 2012; Small 2022). La menor actividad de amilasa en intestino de querimanas tempranas de *M. liza* sugiere ajustes en la capacidad para la digestión inicial de sustratos glucogénicos en condiciones de hiper-regulación. En juveniles de palometa *Trachinotus ovatus* y róbalo *Centropomus paralelos* transferidos gradualmente a medios hipo-osmóticos se ha observado una disminución de la capacidad para la digestión de hidratos de carbono (Tsuzuki et

al., 2007; Ma et al., 2016). La menor actividad de sacarasa en intestino sugiere también ajustes de las querimanas tempranas de *M. liza* para pasos finales de la digestión de hidratos de carbono en condiciones de hiper-regulación. Para nuestro conocimiento, no hay estudios en peces eurihalinos sobre la modulación de la actividad de sacarasa frente a cambios de salinidad. La alteración de la morfología intestinal en respuesta a la salinidad ambiental puede conducir a ajustes de la actividad de enzimas del borde en cepillo tales como disacaridasas (Hieu et al., 2021). Este podría ser el caso para la actividad de sacarasa en intestino de querimanas tempranas de *M. liza* cuya actividad fue menor concomitantemente con la disminución del coeficiente intestinal en 10 ups. Los cambios en la concentración de glucógeno son un indicador adecuado de ajustes en el metabolismo de hidratos de carbono (Sangiao Alvarellos et al., 2005; Small 2022). En diversas especies de peces, ocurre una movilización/degradación de glucógeno en órganos de reserva frente a cambios de salinidad (Vargas-Chacoff 2009; Vargas-Chacoff et al., 2015; Angadi et al., 2021). Generalmente en vertebrados, incluidos peces, el glucógeno en órganos de reserva se degrada hasta monosacáridos (ej. glucosa) cuando se requiere energía adicional (ej. osmorregulación) (Tseng y Hwang, 2008). Este podría ser el caso para las querimanas tempranas de *M. liza*. La menor concentración de glucógeno en el hígado y músculo en individuos transferidos de 31 ups a 10 ups sugiere que la movilización de esta reserva constituiría un ajuste a nivel bioquímico en relación al cambio en el comportamiento osmoregulatorio. En varias especies de peces, el hígado es una fuente importante de suministro de glucosa para otros tejidos y el flujo neto de este metabolito se modula mediante ajustes de las rutas catabólicas y anabólicas (Enes et al., 2009; Polakoff et al., 2012; Nebo et al., 2018). El hecho de que no se produjeron cambios en la concentración

de glucosa libre en músculo sugiere una movilización de glucosa desde el hígado hacia otros tejidos (por ej: branquias) en condiciones de baja salinidad. En el pez eurihalino, *Sparus aurata* se determinó que frente a un desafío osmótico se produce una movilización de reservas de glucógeno, lo que resulta en una mayor capacidad para exportar glucosa desde el hígado a otros órganos que consumen mucha energía (Sangiao-Alvarellos et al., 2005; Tseng y Hwang, 2008, Guo et al., 2020). La degradación del glucógeno hepático en respuesta a desafíos osmóticos diferenciales indica un suministro de energía adicional y una mayor tasa de catabolismo en diferentes órganos, especialmente órganos osmorreguladores (Sarma et al., 2020; Angadi et al., 2021). Por otro lado, el mantenimiento de la concentración de glucosa libre en músculo concomitante a la disminución de la reserva de glucógeno en querimanas tempranas de *M. liza* sugiere la potencial utilización local de glucosa en otras rutas metabólicas y/o para mantener una concentración adecuada disponible de este metabolito en el órgano.

La información sobre modulación de componentes claves del metabolismo lipídico en respuesta a cambios en la respuesta osmorregulatoria es escasa y fragmentaria para la mayoría de especies eurihalinas de peces y parece ser dependiente de la especie (Tseng y Hwang, 2008; Little et al., 2023). La mayor actividad de lipasa en intestino de querimanas tempranas y la menor concentración de triglicéridos en hígado y músculo luego de la transferencia a baja salinidad sugieren que ajustes en componentes claves del metabolismo lipídico serían parte de la reorganización metabólica en condiciones de hiper-regulación en querimanas tempranas de *M. liza*. La mayor capacidad lipolítica en intestino en querimanas tempranas en 10 ups podría aumentar la disponibilidad de metabolitos lipídicos. La disminución en la concentración de triglicéridos en hígado sugiere la movilización

de estas reservas probablemente como fuente adicional de metabolitos lipídicos para ser utilizados en tejidos con demanda de energía (ej. branquias). En peces anádromos y catádromos la migración de agua de mar a agua dulce o la inversa implica alteraciones en el metabolismo de lípidos que conlleva a la movilización de triglicéridos (Kipanyula et al., 2016). La menor concentración de triglicéridos en músculo sugiere la potencial utilización local de este metabolito en querimanas tempranas de *M. liza*. Por otro lado, la modulación concomitante de la actividad de lipasas y de la concentración de triglicéridos sugiere la existencia de ajustes coordinados en componentes principales del metabolismo de lípidos en querimanas tempranas de *M. liza* en hiper-regulación.

El metabolismo de proteínas juega un rol esencial en respuestas a nivel bioquímico a la salinidad soportando una adecuada provisión de aminoácidos necesaria para el mantenimiento de la osmorregulación (Arjona et al., 2008; Nemova et al., 2021). En el tracto digestivo de vertebrados, incluyendo varias especies de peces, la actividad de la ectoproteasa APN unida a membrana de borde en cepillo intestinal (enzima esencial en los pasos finales de la digestión de ítems proteicos) se utiliza como índice de la capacidad para la digestión proteica (Cui et al., 2019; Gurumallesh et al., 2019; Griego et al., 2021). En larvas de bagre rayado *Pangasianodon hypophthalmus*, se observó que la actividad de la APN no parece verse afectada por cambios de salinidad (Hieu et al., 2021). El hecho de que luego de la transferencia a 10 ups disminuyó la longitud intestinal mientras que la actividad de APN se mantuvo constante sugiere la posible existencia de otros mecanismos de regulación (ej. modulación de enzima preexistente) que permitirían el mantenimiento de niveles adecuados de esta actividad en hiper-regulación. La APN es una enzima multifuncional que además de estar involucrada en los pasos finales

de la digestión de proteínas modula la actividad de transportadores específicos de aminoácidos y la acción de varios péptidos biológicamente activos (ej.angiotensinas) involucrados en la regulación de funciones digestivas, absortivas y osmorregulatorias en intestino (Fairweather et al., 2012, Qi et al., 2021; Farhadi et al., 2022). La movilización de metabolitos proteicos parece ser importante para la osmorregulación (Nemova et al., 2021). La disminución concomitante en la concentración de proteínas en hígado y músculo de querimanas tempranas de *M. liza* sugiere la existencia de ajustes en el proceso de degradación de proteínas en condiciones de hiper-regulación. En varios peces, domina temporalmente el catabolismo de proteínas en hígado y en músculo en respuesta a cambios de salinidad (Arjona et al., 2008; Nemova et al., 2021). Los aminoácidos resultantes pueden ser utilizados para la síntesis de macromoléculas en branquias y otros órganos osmorreguladores (Tseng y Hwang 2008). Por otro lado, la movilización de las reservas de proteína en músculo puede conducir a un agotamiento de las mismas y en última instancia comprometer la supervivencia (Nemova et al., 2021). Este no sería el caso para querimanas tempranas de *M. liza* ya que no se produjo mortalidad luego del cambio abrupto de 31 a 10 ups, y mantuvieron la condición física.

La adaptación fisiológica se define como los cambios compensatorios reversibles (aclimatización/aclimatación) de un individuo en respuesta a variaciones en condiciones ambientales (Schubert et al., 2017). El hecho que todos los parámetros digestivos/ metabólicos y de condición física se mantuvieron constantes a un tiempo más largo (25 días) en 10 ups indicaría la adaptación fisiológica de las querimanas de *M. liza* a las condiciones de hiper-regulación.

En resumen, los resultados del presente capítulo muestran que querimanas tempranas de *M. liza* exhiben flexibilidad osmorregulatoria siendo capaces de cambiar de hipo- a hiper-regulación luego de un cambio amplio y abrupto desde alta a baja salinidad. Las respuestas en las actividades de enzimas digestivas, contenido de reservas de energía y parámetros morfológicos (Figura 3.8) sugieren la existencia de ajustes diferenciales digestivos/metabólicos subyacentes a la activación de la correspondiente maquinaria hipo o hiper-regulatoria. La flexibilidad osmorregulatoria y digestiva/metabólica de las querimanas tempranas de *M. liza* les permitiría enfrentar las condiciones heterogéneas de salinidad luego del reclutamiento en la LCMCh.

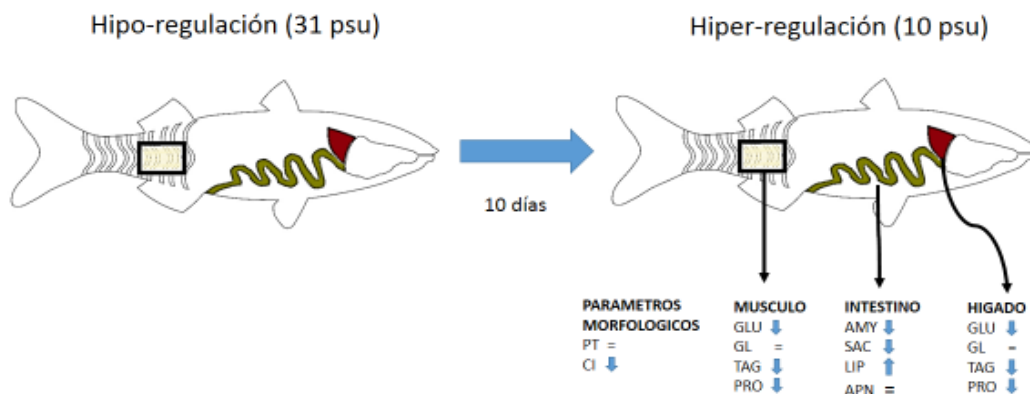


Figura 3.8 Resumen de parámetros morfológicos, digestivos y metabólicos antes (31 ups; t=0) y a los 10 (t=10) luego de un cambio abrupto a 10 ups en querimanas tempranas de *M. liza*. PT: peso total; CI: coeficiente intestinal; AMY: amilasa; SAC: sacarasa; LIP: lipasa; APN: N-aminopeptidasa; GLU: glucógeno; GL: glucosa libre; TAG: triglicéridos; PROT: proteínas.. ↑, ↓, = indican aumento, disminución y sin cambios, respectivamente, con respecto al correspondiente valor a t=0

Capítulo 4:

Perfil digestivo/metabólico de juveniles y adultos de *Mugil*
iza de la Laguna Costera Mar Chiquita

Introducción

Los estuarios y/o lagunas costeras juegan un papel fundamental para refugio, crecimiento y alimentación de juveniles y adultos de peces marinos estuarino-dependientes y en el caso de los peces diádromos, además, en la preparación para su migración reproductiva tales como la acumulación y /o utilización de sustratos de energía específicos en distintos órganos de reserva (Nelson 2006; González-Castro y Ghasemzadeh, 2016; Denis et al., 2022). Las demandas energéticas del crecimiento y la preparación previa a la migración fuera del estuario y/o laguna costera podrían implicar ajustes intraespecíficos en el perfil digestivo/metabólico a diferentes niveles. El equilibrio entre la capacidad para la obtención, distribución, reserva y uso de la energía es fundamental para el crecimiento, la reproducción y la supervivencia (Karasov y Douglas, 2013; Olson et al., 2020; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021; Zhong et al., 2023). Sin embargo, faltan estudios integrativos y comparativos sobre el perfil digestivo/metabólico a distintos niveles en juveniles y adultos de mugílidos estuarino-dependientes que cohabitan dentro de una laguna costera en general y en particular de *Mugil liza*.

Mugil liza, exhibe un complejo ciclo de vida diádromo, utilizando estuarios o lagunas costeras como área de cría (Cervigón et al., 1993; Castellini 2017). La LCMCh, debido a la abundancia de nutrientes, la disponibilidad de materia orgánica, la baja profundidad y la vegetación costera constituye un área crucial para el crecimiento y la alimentación de juveniles y adultos de *M. liza*. Luego del reclutamiento, los juveniles pasan varios años hasta alcanzar la etapa adulta (González Castro et al., 2009b; 2011; González Castro y Minos, 2016). La etapa juvenil está definida morfológicamente por el desarrollo completo de la tercer espina

anal y la osificación completa del esqueleto, mientras que este estadio termina cuando inicia la maduración gonadal (Cardona 2016). En el ambiente natural, juveniles y adultos conservan el hábito detritívoro adquirido por las querimanas durante el reclutamiento (Acha 1990; González- Castro et al., 2009b; Cardona 2016). Sin embargo, a pesar de la importancia para la comprensión de su fisiología digestiva/metabólica y ecofisiología, faltan estudios de determinación de la existencia y caracterización de enzimas digestivas, reservas de energía y parámetros morfológicos de juveniles y adultos en el ambiente natural. La determinación conjunta de la actividad de enzimas digestivas específicas, concentración de reservas de energía y parámetros morfológicos permite un análisis integrado del perfil digestivo/metabólico a diferentes niveles de un individuo y además, establecer aspectos comparativos intraespecíficos (Kalhor et al., 2018; Albanesi et al., 2021; 2024).

En este contexto, se describen estudios para determinar la existencia y características bioquímicas de la actividad de enzimas digestivas clave en intestino, la concentración de sustratos de energía en órganos de reserva y parámetros morfológicos para evaluar el perfil digestivo y metabólico de juveniles y adultos de *M. liza* cohabitando un mismo área de la LCMCh en el ambiente natural.

Materiales y Métodos

Captura de juveniles y adultos

Individuos juveniles y adultos de *M. liza* fueron capturados en la Zona III (ver mapa en Introducción General de la presente tesis) de la LCMCh. La Zona III se

ubica en el extremo norte de la laguna costera y se caracteriza por tener aguas mixo-oligohalinas (1-15 ups) (González Castro et al., 2009b). Los individuos fueron capturados utilizando redes de enmalle monofilamento (25 m de largo y 2 m de alto con mallas de 120, 68 y 57 mm (González-Castro et al., 2009b; 2011). La salinidad y temperatura del agua al momento de la captura (abril-mayo de 2018) fueron 2-4 ups ups y 8-13°C respectivamente. La identificación taxonómica de los peces se realizó de acuerdo a González Castro et al. (2012) y Cousseau y Perrotta (2013). Los individuos fueron congelados para ser posteriormente procesados en el laboratorio (del Valle, Michiels et al., 2016; Ma et al., 2019).

Determinación de parámetros morfológicos y obtención de muestras

A cada individuo se le tomó medidas morfológicas y se les extrajo los órganos correspondientes para las mediciones según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis. Se registró la presencia de grasa retroperitoneal. Los individuos capturados fueron agrupados en juveniles (n=6) y hembras adultas (n=6) , de acuerdo con los siguientes criterios: (a) juveniles: individuos con LT menor que L50 para *M. liza* de la LCMCh (450 mm LT para hembras; González-Castro et al., 2011) y presencia de gónadas inmaduras, y (b) adultos: individuos con LT mayor que L50 y gónadas desarrolladas (en reposo o maduración).

Se determinaron el coeficiente intestinal y el índice hepatosomático y se realizaron homogenatos de intestino, hígado y músculo según lo descrito en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis. La grasa

retroperitoneal se homogeneizó en buffer Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) (4 ml de tejido por gr⁻¹)(homogeneizador CAT 9120, T10) en hielo.

Este estudio se realizó siguiendo protocolo aprobado por el Comité de Ética (CICUAL) de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales (RD 2022-105 FCEyN, UNMdP, Argentina).

Determinaciones cuantitativas

Las actividades de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN en intestino se determinaron como se describió en Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

La determinación de la concentración de glucógeno, glucosa libre, triglicéridos y proteínas en hígado, músculo y de triglicéridos en grasa retroperitoneal se realizó como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Plot 12.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA de una vía) o el test-t para estimar diferencias estadísticas. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

Los resultados del efecto de concentraciones variables de sustrato sobre las actividades enzimáticas se analizaron como se describió en Materiales y Métodos del capítulo 1 de la presente tesis.

Resultados

Parámetros morfológicos de juveniles y adultos

Juveniles y adultos de *M. liza* mostraron diferencias significativas en el CI (Tabla 4.1). No se encontraron diferencias en el IHS entre ambos estadios.

Se encontró grasa retroperitoneal en los individuos adultos (Tabla 4.1).

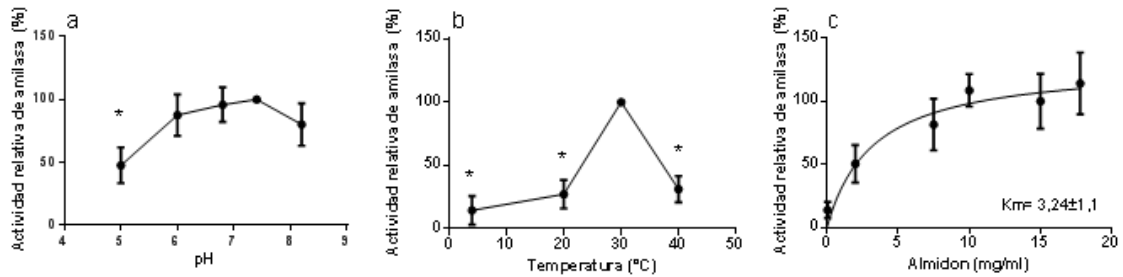
Tabla 4.1. Longitud total (LT), longitud estándar (LS), peso total (PT), coeficiente intestinal (CI), índice hepatosomático (IHS) y grasa retroperitoneal (GR) de juveniles y adultos de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en juveniles (Test-t; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

	Juveniles	Adultos
Longitud total (mm)	212,3 \pm 28,52	467,8 \pm 24,43*
Longitud estándar (mm)	169,5 \pm 24,21	371,2 \pm 18,20*
Peso total (g)	123,6 \pm 67,30	1146,6 \pm 123,89*
Coeficiente intestinal (%)	4,47 \pm 0,56	5,87 \pm 0,51*
Índice hepatosomático (%)	1,1 \pm 0,35	1,38 \pm 0,15
Grasa retroperitoneal (g)	<0,1	32,27 \pm 8,74*

Actividad de enzimas digestivas de juveniles y adultos

En juveniles, la actividad de amilasa aumentó de pH 5,0 a 6,0 y fue similar dentro del rango de pH 6,0-8,2 (Figura 4.1 a). En adultos, la actividad de amilasa fue similar a pH 5,0-6,8. La actividad máxima se encontró a pH 7,4. A pH 8,2 la actividad disminuyó hasta valores similares a los encontrados a pH 5,0-6,8 (Figura 4.1 d). En juveniles y adultos, la actividad de amilasa fue similar a 4 y 20 °C y aumentó a 30 °C. A 37°C, la actividad disminuyó a un nivel similar al de 4 y 20°C (Figura 4.1 b, e). En ambos estadios, la actividad de amilasa exhibió la cinética de Michaelis-Menten (juveniles: $K_m = 3,24 \pm 1,1$ mM y adultos: $K_m = 6,61 \pm 1,5$ mM) (Figura 4. 1c- 1f).

Juveniles



Adultos

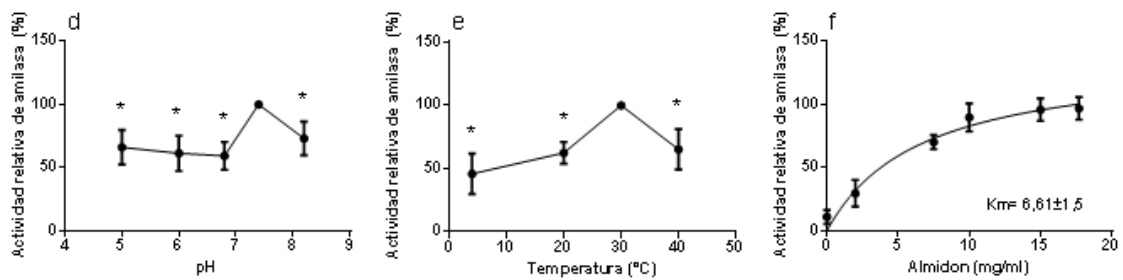


Figura 4. 1. Caracterización parcial de la actividad de amilasa en intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. (a, d) Efecto del pH (5,0–8,2) sobre la actividad de amilasa. Los valores de actividad de amilasa se expresan en relación con la actividad a pH 7,4 (100%). (b, e) Efecto de temperatura (4-40°C) sobre la actividad de amilasa. Los valores de actividad de amilasa se expresan en relación a la actividad a 30°C (100%). (c, f) Efecto de la concentración de almidón sobre la actividad de amilasa (0,17-17,5 mg x ml⁻¹). La actividad se midió a 30°C y a pH 7,4. Los valores de actividad se expresan en relación a la correspondiente actividad en presencia de almidón 15 mg x ml⁻¹ (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; p < 0.05). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

En juveniles, la actividad de maltasa fue similar en el rango de pH 5,0 a 8,5 (Figura 4.2 a). La actividad también fue similar de 4-20°C y aumentó a 30-45°C (Figura 4.2 b). La actividad de maltasa exhibió una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = $1,5 \pm 0,8$ mM) (Figura 4.2 c).

En adultos, la actividad de maltasa aumentó de pH 5,2 a 6,4 . A pH 7,4-8,5 la actividad disminuyó y fue similar a pH 5,2 (Figura 4.2 d). La actividad fue similar en el amplio rango de temperatura 4-30°C y aumentó a 37°C. A 45°C la actividad disminuyó alcanzando valores similares a los de 4-30°C (Figura 4.2 e). La actividad de maltasa también mostró una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente = $1,55 \pm 0,3$ mM) (Figura 4.2 f).

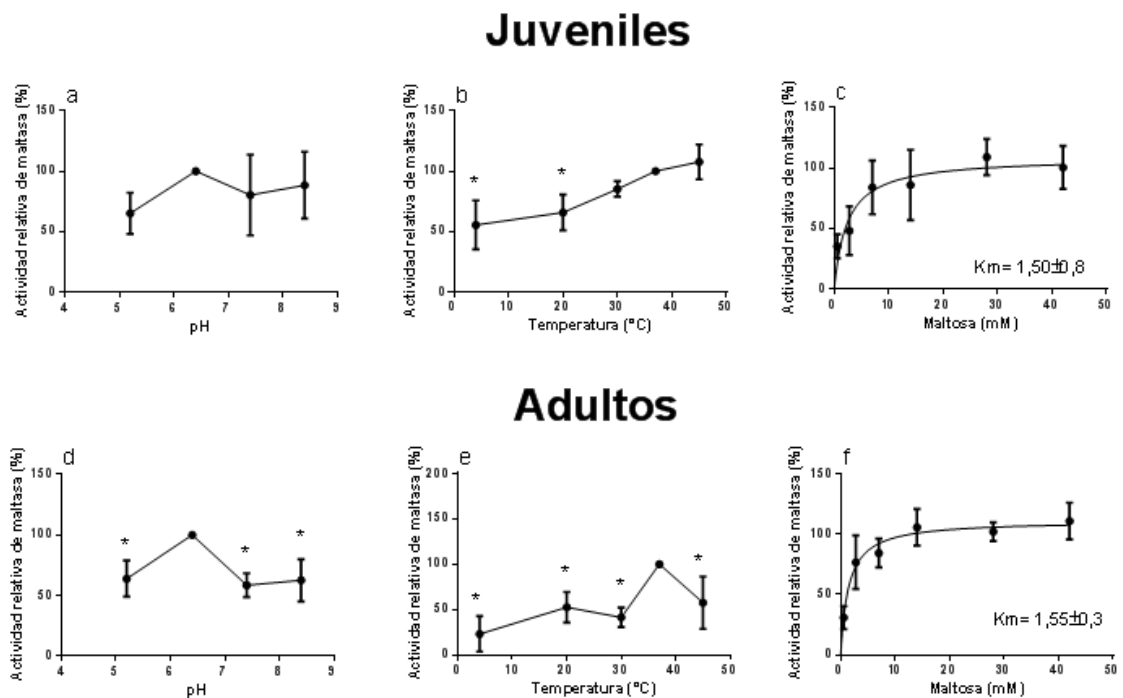


Figura 4.2 Caracterización parcial de la actividad de maltasa en intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. (a, d) Efecto del pH (5,2–8,5) sobre la actividad de maltasa. Los valores de actividad de maltasa se expresan en relación a la actividad a pH 6,4 (100%) (b, e) Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de maltasa. Los valores de la actividad de maltasa son expresados en relación a la actividad a 37°C (100%). (c, f) Efecto de la concentración de maltosa sobre la actividad de maltasa (0,65mM- 42mM). La actividad se midió a 37°C y a pH 6,4. Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad correspondiente en presencia de maltosa 28 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

En el estadio juvenil y adulto, la actividad de sacarasa fue similar en un rango de pH (5.2-8.0) (Figura 4.3 a, d) y temperatura (4-45°C) en intestino (Figura 4.3 b, e). La actividad de sacarasa también mostró la cinética de Michaelis-Menten (Km: juveniles = $1,17 \pm 0,5$ mM; adultos = $1,61 \pm 0,6$ mM) (Figura 4.3 c, f).

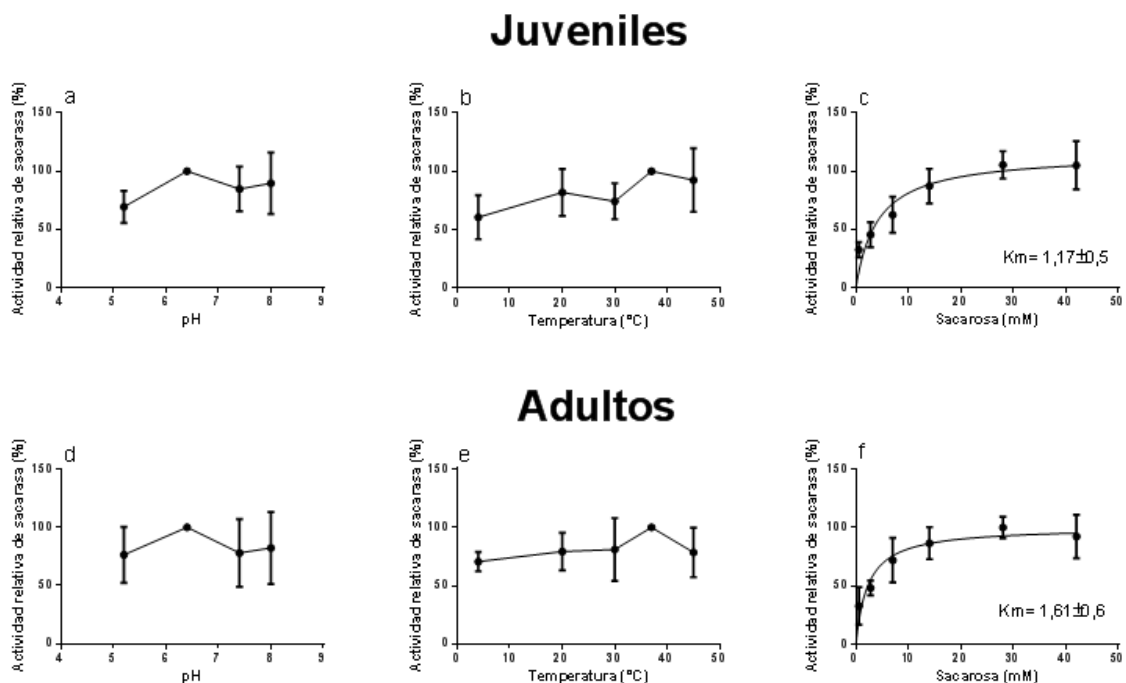


Figura 4.3. Caracterización parcial de la actividad de sacarasa en intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. (a, d) Efecto del pH (5,2–8,0) sobre la actividad de sacarasa. Los valores de la actividad de sacarasa se expresan en relación a la actividad a pH 6,4 (100%). (b, e) Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de sacarasa. Los valores de la actividad de sacarasa se expresan en relación a la actividad a 37°C (100%). (c, f) Efecto de las concentraciones de sacarosa sobre la actividad de sacarasa (0,65 mM- 42mM). La actividad se midió en 37°C y a pH 6,4. Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad correspondiente en presencia de sacarosa 28 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

En juveniles, la actividad de la lipasa fue similar a pH 6,0 y 8,0 y aumentó a pH 8,5-9,0 (Figura 4.4 a). En adultos, la actividad de la lipasa fue similar a pH 6,0-8,5 y aumentó a 9,0 (Figura 4.4 d). Tanto en juveniles como en adultos, la actividad de la lipasa fue similar a 4-20°C pero fue máxima a 30°C. La actividad disminuyó a los 37-45°C alcanzando valores similares a los registrados a 4-20°C (Figura 4.4 b, e). La actividad de la lipasa exhibió la cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente: juveniles = $0,27 \pm 0,04$ mM; adultos = $0,32 \pm 0,07$ mM) (Figura 4.4 c, f).

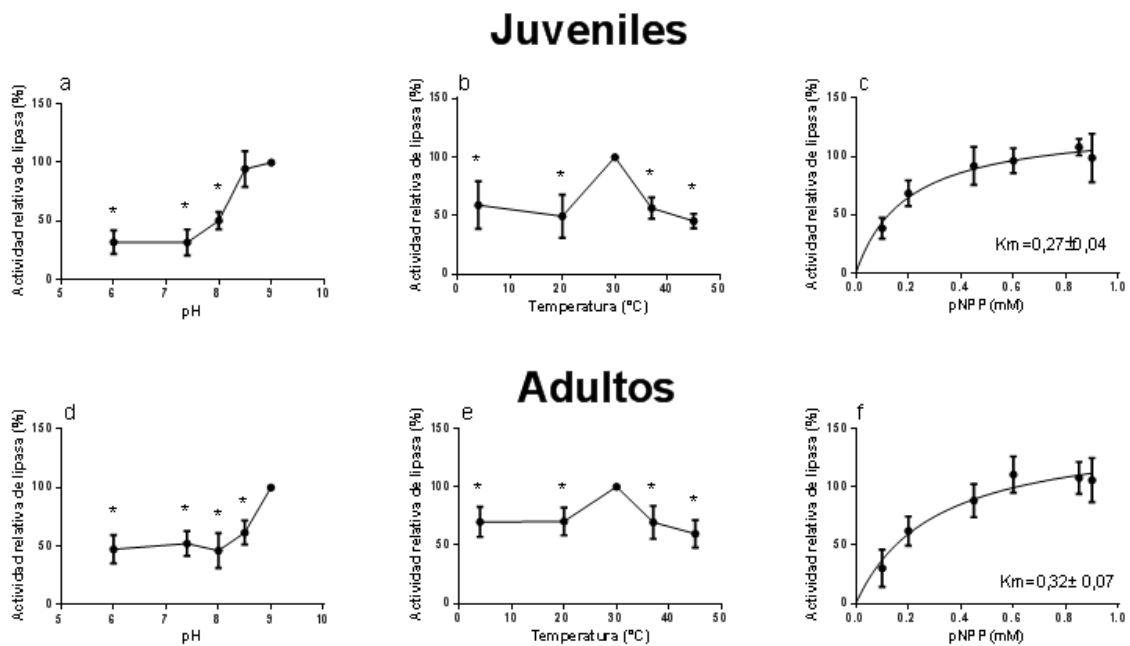


Figura 4.4 Caracterización parcial de actividad de lipasa en intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. (a, d) Efecto del pH (6,0-9,0) sobre la actividad de lipasa. Los valores de actividad de lipasa se expresan en relación con la actividad específica a pH 9 (100%). (b, e) Efecto de la temperatura (4-45°C) sobre la actividad de lipasa. La actividad se expresa en relación a la actividad específica a 37°C (100%). (c, f) Efecto de la concentración de pNPP (0,1-0,9 mM) sobre la actividad de lipasa. Los valores de actividad son expresados en relación con la actividad correspondiente en presencia de pNPP 0,85 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

En juveniles y adultos, la actividad de tripsina fue similar dentro del rango de pH estudiado (6,0-11,0) (Figura 4.5 a, d). La actividad de la tripsina en el intestino de los juveniles fue similar entre 4°C y 20°C y aumentó entre 37 y 45°C. A altas temperaturas (70°C) la actividad de la tripsina disminuyó (Figura 4.5 b). En adultos, la actividad de tripsina fue similar de 4°C a 37°C y aumentó a 45-70°C (Figura 4.5 d). La actividad de tripsina mostró cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente: juveniles = $0,98 \pm 0,08$ mM; adultos: $0,81 \pm 0,09$ mM) (Figura 4.5 c, f).

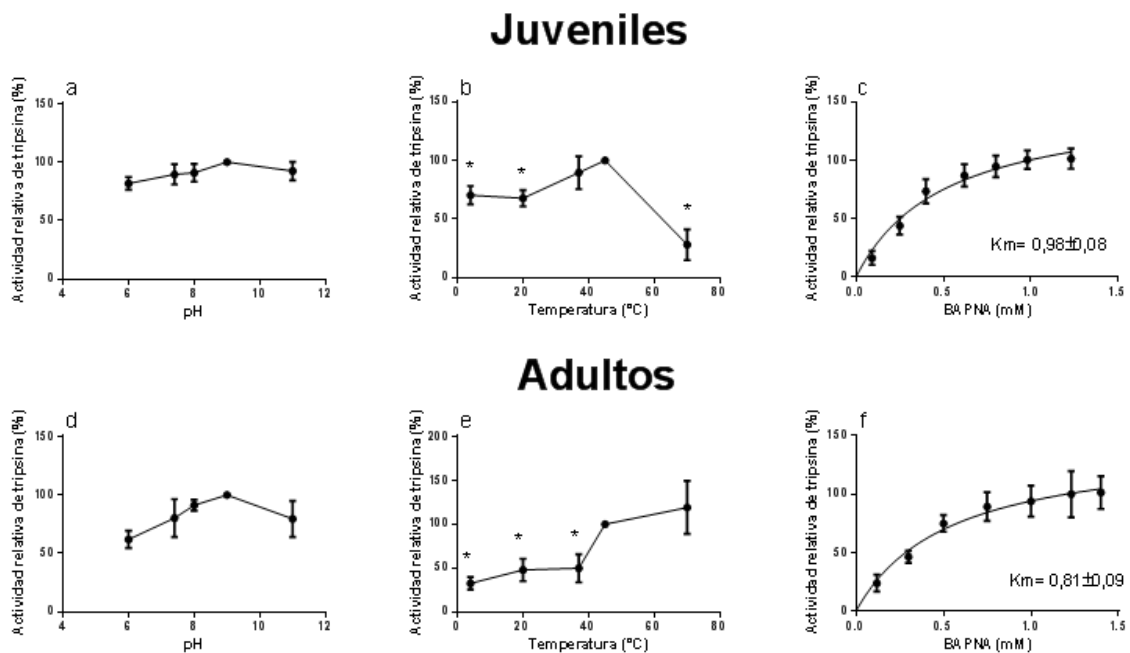


Figura 4.5. Caracterización parcial de actividad de tripsina en intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. (a, d) Efecto del pH (6-11,0) sobre la actividad de tripsina. Los valores de actividad de tripsina se expresan en relación con la actividad específica a pH 9,0 (100%). (b, e) Efecto de la temperatura (4-70°C) sobre la actividad de tripsina. La actividad se expresa en relación a la actividad específica a 45°C (100%). (c, f) Efecto de la concentración de BAPNA (0,12-1,23 mM) sobre la actividad de tripsina. Los valores de actividad se expresan en relación a la actividad correspondiente en presencia de BAPNA 1,23 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

La actividad de APN fue similar dentro del rango de pH 6,0- 9,0, en juveniles y adultos (Figura 4.6 a, d). En los juveniles, la actividad de APN no se vio afectada al aumentar la temperatura desde 4°C hasta 30°C. La actividad aumentó a 37-45°C (Figura 4.6 b). En adultos, la actividad de APN aumentó de 4°C a 30-45°C (Figura 4.6 e). La actividad de APN mostró una cinética de Michaelis-Menten (K_m aparente: juveniles = $0,19 \pm 0,033$ mM; adultos = $0,15 \pm 0,027$ mM) (Figura 4.6 c, f).

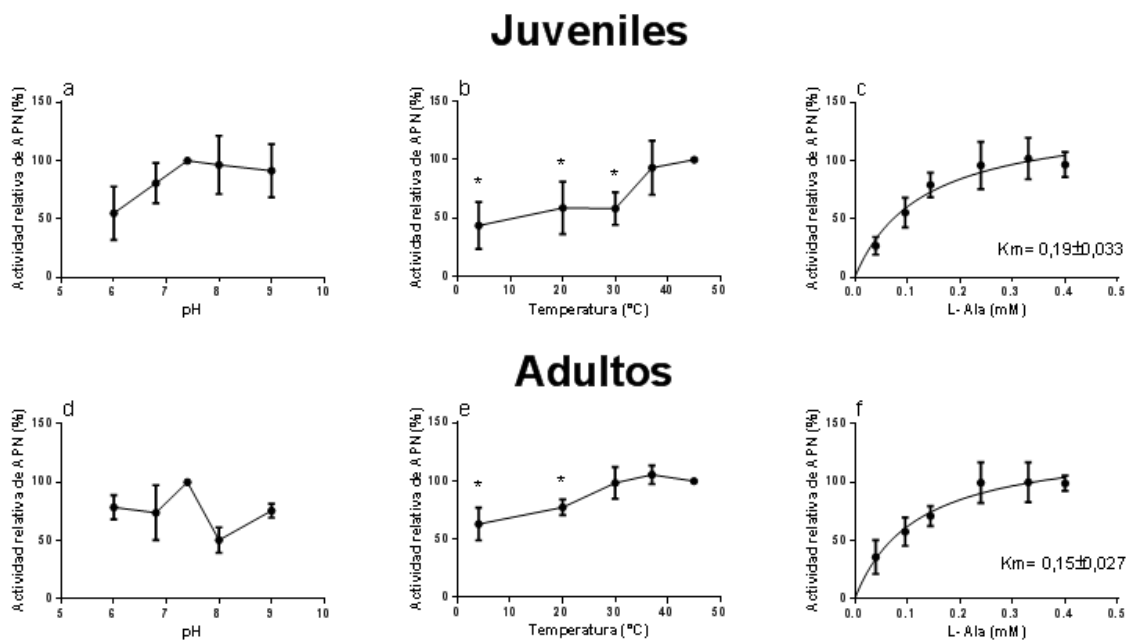


Figura 4.6. Caracterización parcial de actividad de APN en intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. (a, d) Efecto del pH (6,0-9,0) sobre la actividad de APN. Los valores de actividad de APN se expresan en relación a la actividad específica a pH 7,4 (100%). (b, e) Efecto de la temperatura (4°C- 45°C) sobre la actividad de APN. La actividad se expresa en relación con la actividad a 37°C (100%) (c, f) Efecto de la concentración de L-Ala pNA (0,04-0,4 mM) sobre la actividad de APN. Los valores de la actividad son expresados en relación con la actividad correspondiente en presencia de L-Ala pNA 0,4 mM (100%). *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor tomado como 100% (One-Way ANOVA; $p < 0.05$). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

En el intestino de adultos de *M. liza*, la actividad específica de amilasa fue significativamente mayor (Figura 4.7 a), mientras que la actividad de maltasa y lipasa fue significativamente menor en comparación con las correspondientes actividades en juveniles (Figura 4.7 b, d). No se encontraron diferencias en las actividades de sacarasa, tripsina y APN entre estadios (Figura 4.7 c, e, f)

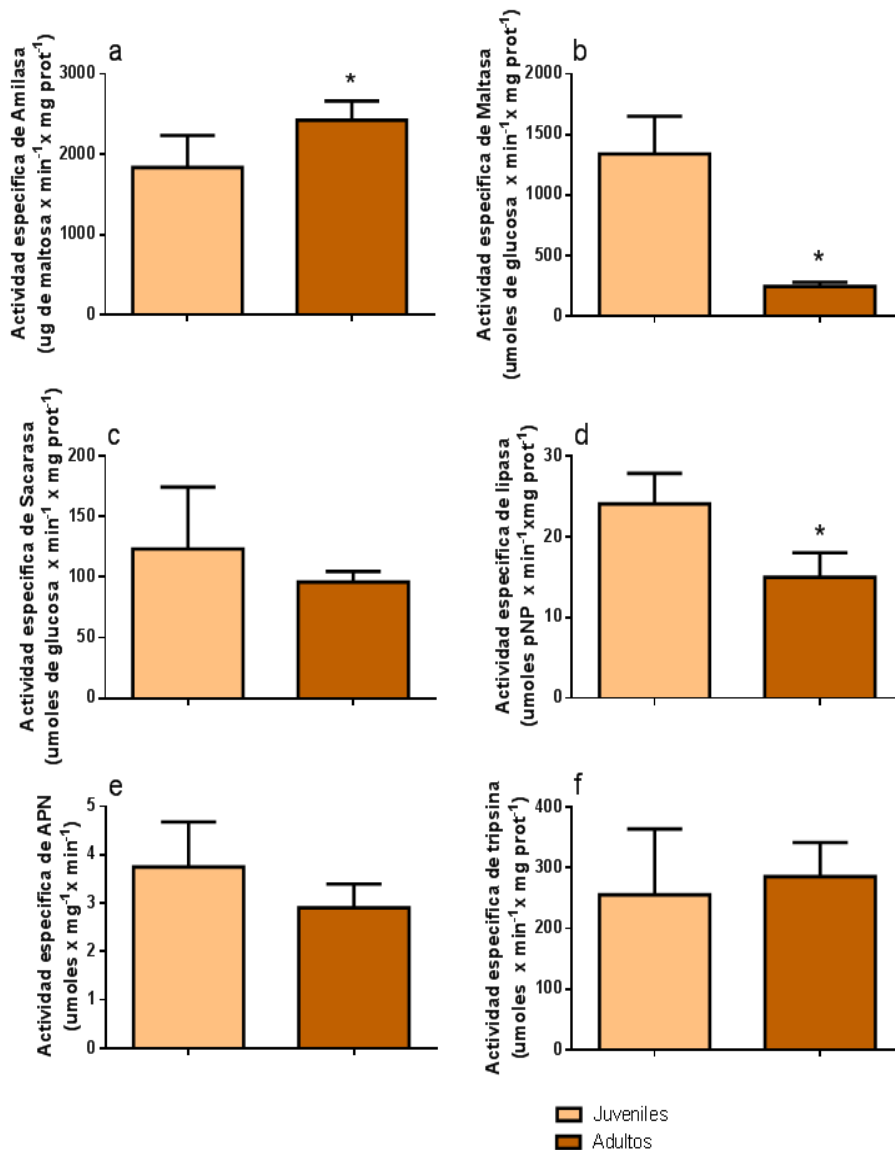


Figura 4.7. Actividad específica de amilasa (a) , maltasa (b), sacarasa (c), lipasa (d), tripsina (e) y APN (f) en intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en juveniles (Test-t; p < 0.05). Los datos son la media \pm S.D para 6 individuos.

Reservas de energía en juveniles y adultos

La concentración de glucógeno en hígado y músculo de adultos fue similar a la correspondiente concentración de juveniles (Figura 4.8 a). En el hígado de adultos, la concentración de glucosa libre fue mayor (190 veces) que en juveniles. La concentración de glucosa libre en el músculo fue baja en juveniles y adultos (Figura 4.8 b).

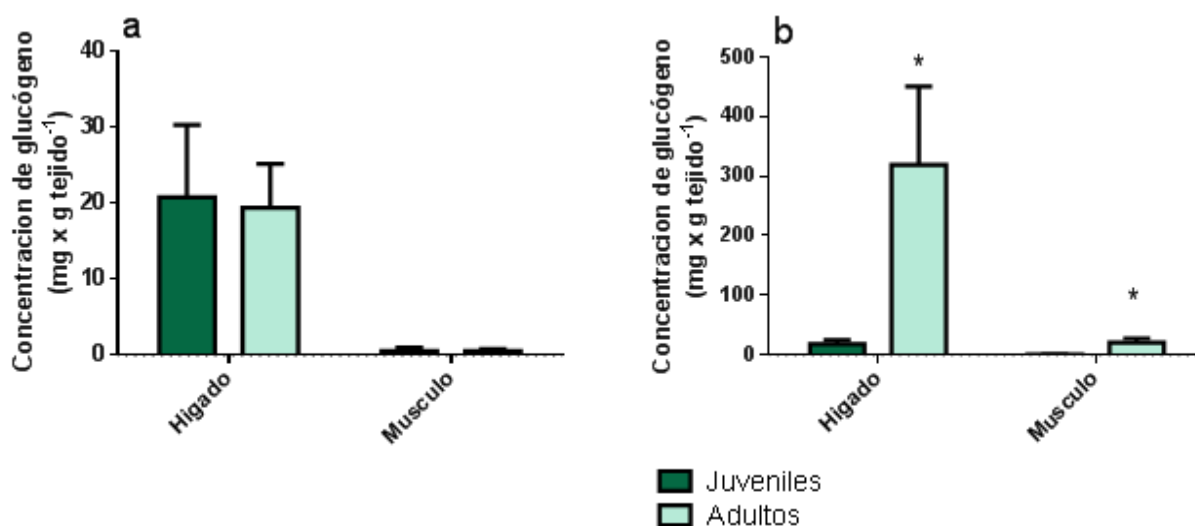


Figura 4.8. Concentración de glucógeno (a) y glucosa libre (b) en hígado y músculo de juveniles y adultos de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en hígado (Test-t; $p < 0,05$). Los datos son la media \pm S.D. para 6 individuos

La concentración de triglicéridos en hígado y músculo de adultos fue menor, cuando se comparó con los correspondientes valores en juveniles. En adultos, la concentración de triglicéridos en grasa retroperitoneal fue mayor que en hígado y

músculo (Figura 4.9 a). La concentración de proteínas en el hígado y el músculo de adultos fue similar a la correspondiente concentración de juveniles (Figura 4.9 b).

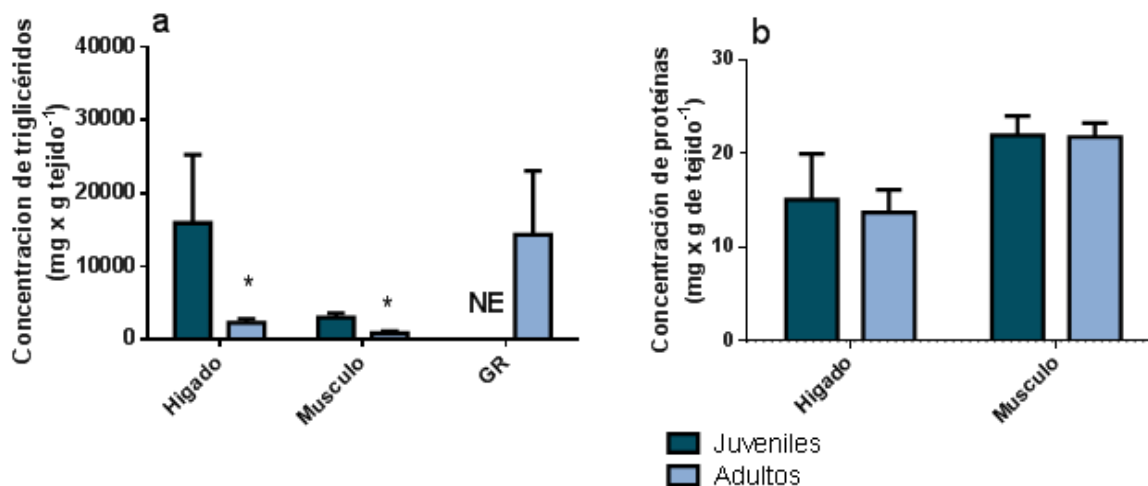


Figura 4.9. Concentración de triglicéridos (a) y proteína (b) en hígado y músculo de juveniles y adultos y de triglicéridos en grasa retroperitoneal (GR) de adultos de *M. liza*. *Indica diferencias significativas con respecto al correspondiente valor en hígado (Test-t; $p < 0,05$). NE= no encontrado. Los datos son la media \pm S.D. para 6 individuos

Discusión

En el presente capítulo, se analizó el perfil digestivo/metabólico a diferentes niveles de juveniles y adultos de *M. liza* de la LCMCh. Los valores del coeficiente intestinal de juveniles y adultos (4,5 y 5,8 respectivamente) correspondieron a los asociados a una dieta detritívora (Brusle 1981; Karachle y Stergiou, 2010; Cardona 2016; Castellini et al., 2019). El intestino de juveniles y adultos de *M. liza* mostró, además, una batería de enzimas digestivas cualitativamente (respuesta a pH, temperatura y concentración del sustrato específico) similar a la de querimanas (capítulo 1 de la presente tesis) que les permitiría realizar una digestión completa

de diferentes items dietarios. Los detritos consumidos por juveniles y adultos de *M. liza*, particularmente dentro de la laguna costera, contienen elementos de origen vegetal y animal (Botto et al., 2005; Bruno et al., 2014; 2017). La digestión de sustratos glucogénicos en el intestino es una fuente principal de glucosa circulante en los peces, lo cual es importante para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y, por lo tanto, para sostener funciones regulares y respuestas a estrés ambiental (Polakof et al., 2011; 2012; Chen et al. 2018). La presencia en el intestino de carbohidrasas como amilasa, maltasa y sacarasa sugiere la capacidad de los juveniles y adultos de *M. liza* para digerir elementos glucogénicos potencialmente presentes en los detritos consumidos. La existencia de actividad de lipasa y proteasas como la tripsina y la APN también indica la capacidad para la digestión y el uso potencial de elementos lipídicos y proteicos. Los niveles de la endoproteasa tripsina y la ectoproteasa APN en el intestino se utilizan comúnmente como indicadores de la capacidad digestiva proteolítica (Ramirez-Otarola et al., 2011, 2018; Bakker et al., 2011; Steimberg 2018; Small 2022). Varios peces detritívoros exhiben actividades de carbohidrasas, lipasas y proteasas en el intestino (German et al., 2010; Almeida et al., 2018). Una alta actividad de carbohidrasas se asocia con una capacidad para optimizar la utilización de mayores niveles de nutrientes de los detritos (López-Vásquez et al., 2009; German y Bittong, 2009; German et al., 2010).

La información sobre características bioquímicas (por ejemplo, la respuesta al pH y temperatura y parámetros cinéticos) de enzimas digestivas de peces en la naturaleza es fragmentaria en general y en particular en especies marinas estuarino-dependientes. Las respuestas a pH y temperatura de la actividad de enzimas digestivas en intestino de juveniles y adultos de *M. liza* y la cinética de

Michaelis-Menten fueron similares a las encontradas en varios peces en condiciones controladas de laboratorio (del Valle, Michiels et al., 2016; Gioda et al., 2017; Huo et al., 2019; Friedman y Fernández-Gimenez, 2023). El mantenimiento de la actividad de enzimas digestivas específicas en un amplio rango de pH podría asegurar la capacidad potencial para la digestión de varios sustratos dietarios a valores cambiantes de pH intestinal en diferentes condiciones fisiológicas. En este contexto, el pH intestinal en lisas oscila entre 3,5 y 8,5 (Cardona 2016). El hecho de que amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN en el intestino estuvieran activas dentro de un amplio rango de temperaturas indica la termotolerancia de estas enzimas en juveniles y adultos de *M. liza*. Las enzimas digestivas en el intestino de varias especies de peces exhiben temperaturas óptimas altas (entre 40 y 60 °C) y son termoestables a alta temperatura (más de 37 °C hasta 70 °C) (del Valle, Michiels et al., 2016; Bkhairia et al., 2016; de Freitas-Júnior et al., 2021; Small 2022; Friedman y Fernández-Gimenez, 2023). Las enzimas digestivas termotolerantes podrían garantizar la digestión de carbohidratos glucogénicos, lípidos y proteínas y el suministro de metabolitos resultantes para mantener funciones fisiológicas en distintas condiciones de temperatura (Asaro et al 2017; Nolasco-Soria 2021; Solovyev et al., 2021). *Mugil liza* en la LCMCh está expuesta a un amplio rango de temperaturas del agua, lo que señala su plasticidad térmica (Acha 1990; González-Castro 2007; González Castro et al., 2009 b; Castellini et al., 2019). Las enzimas digestivas activas, en particular alrededor de los 30°C o más, podrían ser especialmente importantes para soportar el crecimiento durante el verano, cuando se produce un aumento de la temperatura del agua (González-Castro et al., 2009b). Se ha registrado que la temperatura del agua en la LCMCh puede alcanzar los 30°C durante el verano en las zonas interiores, donde

la profundidad de la laguna oscila entre 0,35 y 1,00 mts. Los juveniles y adultos de *M. liza* pueden soportar temperaturas de 30 °C en el ambiente natural (González-Castro observación personal). Varias enzimas digestivas en el intestino de peces exhiben varias isoformas/isoenzimas con características bioquímicas distintas, como parámetros cinéticos, valores óptimos de pH y respuestas a la temperatura (Small 2022; Solovyev et al., 2023). En varias especies de peces, se ha detectado la existencia de isoformas de amilasa y tripsina que exhiben diferentes parámetros cinéticos (Champasri et al., 2021; Solovyev et al., 2021; Navarro-Guillé et al., 2022; Solovyev et al., 2023). El valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) (que indica la afinidad de la enzima por su sustrato) es inversamente proporcional a la afinidad de la enzima por el sustrato correspondiente (Bindu y Mohanan, 2020). La mayor K_m para la actividad de amilasa en el intestino de adultos de *M. liza* sugiere una menor afinidad por sustratos glucogénicos como el almidón o glucógeno en comparación con los juveniles. Las diferencias en características bioquímicas (ej. valor de K_m de la actividad de amilasa y la sensibilidad a la temperatura de la actividad de tripsina) sugiere la posible existencia de distintas isoformas/isoenzimas de amilasa y tripsina en el intestino de juveniles y adultos de *M. liza*. Sin embargo, se necesitan más investigaciones (por ej, análisis de zimogramas y sensibilidad a inhibidores) para probar esta hipótesis. La síntesis de diferentes isoformas/isoenzimas con diferentes características bioquímicas se considera un mecanismo de ajuste en varios peces para aumentar su capacidad digestiva bajo diversos factores intrínsecos y extrínsecos (Zhou et al., 2011; Small 2022; Solovyev et al., 2023).

La comparación (por ejemplo, intraespecífica) de las actividades de enzimas digestivas permite evaluar los posibles ajustes en la capacidad digestiva para el

sustrato correspondiente (Pradhan et al., 2013; Small 2022). La mayor actividad específica de amilasa y las menores actividades específicas de maltasa y lipasa en adultos de *M. liza* en comparación con las de juveniles sugieren la existencia de ajustes digestivos diferenciales a nivel bioquímico en relación con el estadio. El aumento de la actividad de amilasa indica una mayor capacidad para los pasos iniciales de la digestión de sustratos glucogénicos en adultos. El aumento de la actividad de amilasa (ej, por la activación de enzima preexistente y/o el aumento de la síntesis *de novo*) podría compensar la aparente menor afinidad por el sustrato (debido a la menor K_m) y, por lo tanto, asegurar una capacidad amilolítica adecuada. En varios animales, la amilasa también puede hidrolizar glucógeno (Asaro et al. 2018; Nolasco-Soria 2021). La alta actividad de amilasa en intestino de peces carnívoros y omnívoros les permite digerir el glucógeno de items de origen animal (Uscanga-Martínez et al., 2011). Este también podría ser el caso de los adultos de *M. liza* de la LCMCh. Como describimos anteriormente, los detritos dentro de la LCMCh contienen elementos de origen vegetal y animal (Botto et al., 2005; Bruno, 2014; Bruno et al., 2017). Además, aunque los adultos son principalmente detritívoros y se alimentan de microalgas bentónicas, también son capaces de alimentarse de plancton y de invertebrados (Odum 1970; Withfield 2012). El espacio entre los elementos del filtro branquial conformado por las branquiespinas y sus elementos menores aumenta alométricamente con la longitud del cuerpo (Cardona 2016), lo que podría resultar en una menor capacidad de los adultos para retener las partículas dietéticas más pequeñas. El coeficiente intestinal se emplea comúnmente en Mugilidae como índice de la eficiencia de la digestión (Whitfield et al., 2012). Las diferencias en el coeficiente intestinal entre juveniles y adultos dentro de la LCMCh sugiere la existencia de ajustes digestivos a nivel

morfológico en relación a los cambios en items dietarios como ha sido sugerido en varios animales incluyendo peces (Sanchez-Hernandez et al., 2019).

La actividad de las enzimas de la membrana del borde en cepillo intestinal generalmente aumenta con la edad (Goldberg et al., 2008; Wang et al., 2018). Este no fue el caso para los adultos de *M. liza* dentro de la LCMCh, ya que la actividad específica de maltasa fue más baja en comparación con los juveniles, mientras que la actividad específica de sacarasa fue similar en ambos estadios. Las actividades de maltasa y sacarasa en intestino de *M. liza* (Capítulo 1 de la presente tesis) corresponderían al complejo maltasa-glucoamilasa independiente de sacarasa y al complejo sacarasa-isomaltasa, respectivamente (Burke 2019; Karasov y Caviedes Vidal, 2021). La disminución de la actividad de maltasa en el intestino de adultos, mientras que no se produjeron cambios en la actividad de sacarasa, indica una regulación (ej., de enzima preexistente) independiente del complejo maltasa-glucoamilasa. Esto es similar a lo observado en querimanas de *M. liza* (Capítulo 1 de la presente tesis). En querimanas de *M. liza* de la LCMCh, las actividades de maltasa y sacarasa se regulan de forma independiente a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (Capítulo 2 de la presente tesis). En el intestino del pez dorado *Carassius auratus*, la grelina modula la expresión de sacarasa-isomaltasa (Blanco et al., 2017). La menor actividad de lipasa sugiere un ajuste digestivo también en la capacidad lipolítica en adultos de *M. liza*. En distintas especies de lisas como *Mugil cephalus* y *Liza saliens*, las diatomeas son la principal fuente de lípidos (Cardona 2016). El nivel de proteasas claves (p. ej., tripsina/APN) en el intestino es un índice de la capacidad digestiva proteolítica (Ramirez-Otarola et al., 2011, 2018; Bakker et al. 2011; Steimberg 2018; Small 2022). La similar actividad específica de tripsina y de APN en el intestino sugiere que no se producirían

cambios en la capacidad digestiva proteolítica de la dieta a nivel bioquímico entre juveniles y adultos de *M. liza* en el ambiente natural. El hecho de que las actividades específicas de sacarasa, tripsina y APN fueran similares en juveniles y adultos (mientras que la actividad de amilasa fue mayor y las actividades de maltasa y lipasa fueron menores en adultos) sugiere que mecanismos refinados específicos de regulación podrían estar involucrados en ajustes digestivos a nivel bioquímico a lo largo de la ontogenia.

Los niveles y tipos de reservas de energía son una expresión de las características metabólicas de un animal (del Valle y López Mañanes, 2012). El hígado parece ser el sitio principal de almacenamiento de glucógeno tanto en juveniles como en adultos de *M. liza*, con un papel secundario del músculo. La mayor actividad de amilasa en el intestino de adultos podría conducir a una mayor disponibilidad potencial de glucosa. Esto podría sustentar la mayor concentración de glucosa libre en el hígado de adultos en comparación con juveniles. El aumento de la concentración de glucosa libre podría ser importante para respaldar una mayor demanda de este metabolito en otros órganos como el músculo para hacer frente a la demanda energética durante la preparación de la migración reproductiva de adultos. En varios peces, el hígado es una fuente importante de suministro de glucosa para otros tejidos y el flujo neto de este metabolito se modula mediante ajustes en las rutas catabólicas y anabólicas (Enes et al., 2009; Polakoff et al., 2012; Nebo et al., 2018). En peces, el músculo esquelético es un sitio importante de captación de glucosa a través de un transportador de tipo GLUT4 (Marin-Juez et al., 2013; Yang et al., 2021).

En peces, los triglicéridos constituyen la principal reserva de lípidos (Steimberg 2018, Oishi et al., 2020; Small 2022). El hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo son sitios de almacenamiento de triglicéridos en varios peces (Xie et al., 2017; Albanesi et al., 2021; Small 2022). En juveniles de *M. liza*, de la LCMCh, el hígado parece ser el sitio principal para el almacenamiento de triglicéridos. La menor concentración de triglicéridos en hígado de adultos en comparación con la de los juveniles indica que este no sería el caso de adultos. Si los valores más bajos de triglicéridos en hígado de adultos se deben a una movilización de esta reserva para rutas de gluconeogénesis (Small 2022) requiere más investigación. Esta idea está respaldada por el hecho de que la concentración de glucosa libre fue mayor en hígado de adultos. La mayor concentración de triglicéridos en la grasa retroperitoneal indica su papel como sitio principal de almacenamiento en adultos. La grasa retroperitoneal se vuelve particularmente notoria en adultos maduros de *M. liza* antes de su migración reproductiva hacia el sur de Brasil (González-Castro 2007; González-Castro et al., 2009a; 2011). En este contexto, la mayor concentración de triglicéridos en este tejido podría representar una importante reserva de combustible para afrontar el gasto energético de este evento. Esta idea se ve respaldada por el hecho de que el tiempo dedicado a la alimentación puede disminuir drásticamente durante la migración reproductiva, así como en la reproducción *per se* (González-Castro et al., 2009b; Cardona 2016). La menor concentración de triglicéridos en el músculo, indicaría que sería un sitio menor de almacenamiento de triglicéridos tanto en juveniles como en adultos.

El hígado y el músculo son sitios de reservas de proteínas en juveniles y adultos de *M. liza* de la LCMCh, lo que sugiere un vínculo entre las proteasas involucradas en los pasos finales de la digestión de proteínas, como la APN en el intestino, y la

absorción adecuada de aminoácidos para ser utilizados en la construcción de esta reserva en sitios de almacenamiento. En el intestino de mamíferos, la APN forma complejos con transportadores de aminoácidos regulando de esta manera su absorción (Fairweather et al., 2012; Qi et al., 2021; Farhadi et al., 2022). El hecho de que la concentración de proteínas en hígado y músculo no fuera diferente a la de los juveniles sugiere que cambios cuantitativos de esta reserva no serían parte de las respuestas a factores internos o externos en los adultos que habitan el interior de la LCMCh.

En resumen, los resultados del presente capítulo muestran la existencia de modulación diferencial y específica de componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos en relación al estadio en *M. liza* (Figura 4.10), lo que podría representar ajustes en individuos adultos relacionados a la preparación para afrontar la demanda energética de la migración reproductiva y la reproducción.

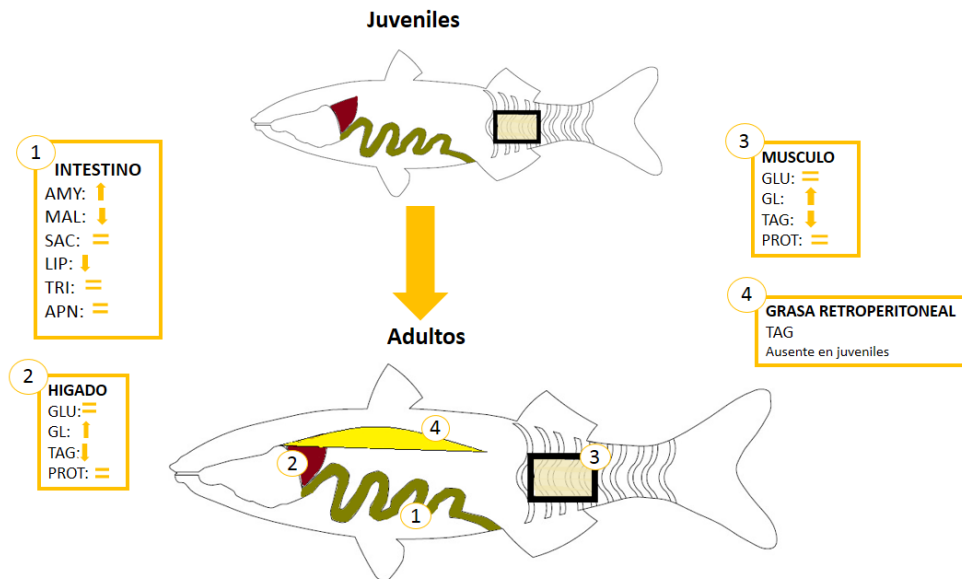


Figura 4.10. Resumen de parámetros digestivos y metabólicos en juveniles y adultos de *M. liza*. AMY: amilasa, MAL: maltasa, SAC: sacarasa, LIP: lipasa, TRI: tripsina, APN: N-aminopeptidasa, GLU: glucógeno, GL: glucosa libre, TAG: triglicéridos, PROT: proteínas. ↑, ↓, = indican aumento, disminución o sin cambios respectivamente, con respecto al valor correspondiente en juveniles.

Capítulo 5:

Actividad de disacaridasas y aminopeptidasa-N en intestino
de juveniles de *Mugil liza*: modulación por mensajeros
químicos

Introducción

La digestión constituye un proceso clave en el metabolismo, ya que determina el grado de disponibilidad de nutrientes (ej: hidratos de carbono/proteínas) requeridos para el mantenimiento de diversas funciones bioquímicas/fisiológicas. La actividad de enzimas digestivas constituye un vínculo funcional entre la ingestión, absorción y asimilación de nutrientes (Karasov y Martínez del Río, 2007; Karasov et al., 2011; Karasov y Douglas, 2013; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021). En este contexto, la capacidad de un individuo para modular la actividad de enzimas digestivas (ej. vía regulación por mensajeros químicos primarios) es un atributo fisiológico importante que puede modificar la capacidad digestiva para un sustrato específico y, por lo tanto, tiene importantes implicaciones para la performance de todo el organismo (Karasov y Douglas, 2013; Fan et al., 2017; Oguchi et al., 2022).

En vertebrados, la superficie microscópica del epitelio intestinal (borde en cepillo) cumple un rol esencial en pasos finales de la digestión de hidratos de carbono y proteínas (Karasov y Douglas, 2013; Karasov y Caviedes-Vidal, 2021; Small 2022). Los productos resultantes de las etapas iniciales e intermedias de la digestión de estas macromoléculas experimentan una degradación final por enzimas de membrana hasta metabolitos que puedan ser absorbidos (ej. glucosa, di/ tripéptidos, aminoácidos). Estas enzimas incluyen las disacaridasas maltasa y sacarasa y la ectoproteasa aminopeptidasa-N (APN) (McConnell et al., 2011; Mamone y Picariello, 2023). La modulación de la actividad de disacaridasas y de APN en el intestino constituye un mecanismo de ajuste principal en respuesta a distintas condiciones fisiológicas y/o ambientales en varios animales (Michiels et al., 2015a ; 2017; 2020; López Mañanes et al., 2020; Brun et al., 2021a, b; Karasov

y Caviedes-Vidal, 2021, Albanesi et al., 2024). Este es el caso para individuos de *Mugil liza* en el ambiente natural (capítulo 1 y 4 de la presente tesis) y en condiciones controladas de laboratorio (capítulos 2 y 3 de la presente tesis). Los resultados que mostraron la modulación específica y diferencial de maltasa, sacarasa y APN sugieren la existencia de posibles vías de regulación mediada por factores intrínsecos (capítulos 1, 2, 3 y 4 de la presente tesis). En peces, diversos mensajeros químicos primarios actuando a distancia o en forma paracrina controlan varias funciones en intestino (Blanco et al., 2017; Small 2022). Sin embargo, los mecanismos de regulación de la actividad de enzimas digestivas están muy poco comprendidos.

En diversos tejidos de varios animales, el Ca^{++} extracelular actúa como primer mensajero a través del receptor sensible al calcio CaSR (Zhang et al., 2018). En intestino de mamíferos, CaSR está involucrado en la regulación de varios procesos fisiológicos y actúa como un sensor de nutrientes coordinando la digestión y absorción (Ding et al., 2018; Calo et al., 2021; Gushchina et al., 2023). En hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata*, se demostró que el Ca^{++} extracelular, actuando como mensajero químico primario, regula *in vitro* la actividad de APN (Michiels et al., 2020). Aminas biogénicas tales como la dopamina y la histamina regulan componentes clave en procesos digestivos y metabólicos (ej. actividad y/o secreción de enzimas digestivas) en varios animales (Michiels et al., 2013; 2015a; 2017; Fan et al., 2017; Gribble y Reimann, 2019; Chen et al., 2023; Biradar y Ganesh, 2023). En peces, la dopamina participa en la regulación de una amplia gama de funciones desde el control motor hasta la ingesta de alimento (Muñoz et al., 2021). En el bacalao del Atlántico *Gadus morhua* y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, la histamina estimula varias funciones en el tracto digestivo

incluyendo la secreción de ácido (Peitsaro et al., 2007; Jonsson y Holmgren, 2011; Serna-Duque y Esteban, 2020).

En este contexto en el presente capítulo se determinó el posible efecto *in vitro* de Ca⁺ extracelular y de dopamina e histamina sobre las actividades de maltasa, sacarasa y APN en intestino de juveniles de *M. liza*.

Materiales y Métodos

Captura y mantenimiento de juveniles

Individuos juveniles de *M. liza* fueron capturados en la Zona III (ver mapa en Introducción General de la presente tesis) de la LCMCh (González-Castro et al., 2009b) como se describió en el capítulo 4 de la presente tesis. La identificación taxonómica de los peces se realizó de acuerdo a González Castro et al., (2012) y Cousseau y Perrotta (2013). Los juveniles fueron transportadas al laboratorio en agua del sitio de recolección.

Los individuos fueron mantenidos en acuarios durante 10 días en condiciones controladas de salinidad (8 ups) y temperatura (20°C) bajo fotoperiodo natural. El agua de los acuarios fue constantemente aireada y filtrada (Albanesi et al., 2024). Los juveniles (n=5) se alimentaron *ad libitum* dos veces al día con alimento comercial (alimento TetraMin, hojuelas tropicales) pero fueron privados de alimento 24 h antes de los experimentos.

Incubación con secciones de intestino

Secciones de intestino (50 mg) se incubaron en ausencia o en presencia de Ca^{+2} 10^{-4}M , Ca^{+2} + EGTA 10^{-4}M , dopamina 10^{-4}M e histamina 10^{-4}M en 1 ml de un medio conteniendo: NaCl (400 mM), KCl (1M), MgCl_2 (0,005g), H_3BO_3 (0,02 g), pH 7,6 a 30°C . Después de 30 minutos de incubación, se separó el medio de incubación y se homogeneizó el tejido como se describió en Materiales y Métodos del capítulo 1 de la presente tesis para determinar la correspondiente actividad enzimática. .

Este estudio se realizó siguiendo protocolo aprobado por el Comité de Ética (CICUAL) de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales (RD 2022-105 FCEyN, UNMdP, Argentina).

Determinaciones cuantitativas

Las actividades de maltasa, sacarasa, y APN en intestino se determinaron como se describió en Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente tesis.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico Sigma-Plot 12.0 para Windows, el cual realiza automáticamente un test previo de igualdad de varianzas y normalidad. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA de una vía) Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo. Se realizaron pruebas a posteriori de ANOVA (Bonferroni) para identificar las diferencias.

Resultados

Efecto *in vitro* de mensajeros químicos sobre la actividad de maltasa, sacarasa y APN en intestino de juveniles.

Ca^{2+} extracelular 10^{-4}M no tuvo efecto sobre las actividades de maltasa y sacarasa en intestino de juveniles de *M. liza* (Figura 5.1 a, b).

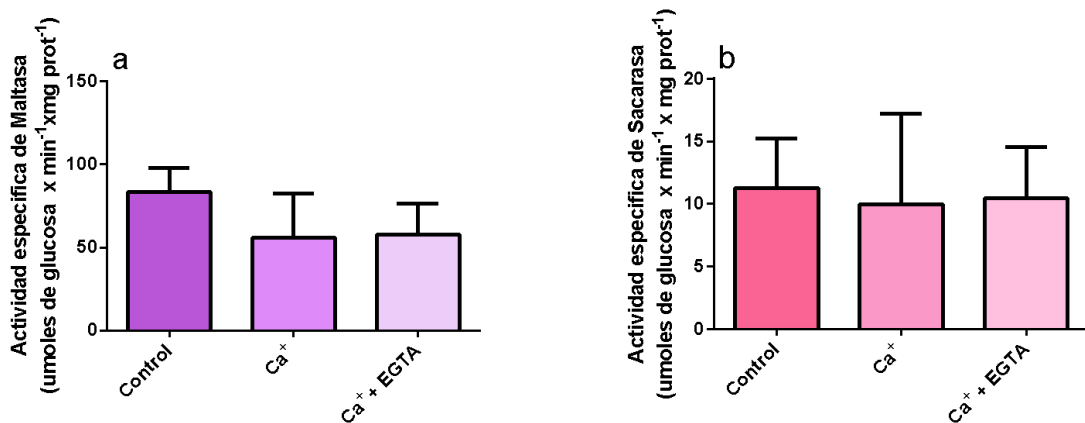


Figura 5.1 Efecto *in vitro* de Ca^{2+} extracelular 10^{-4}M sobre la actividad de maltasa (a) y sacarasa (b) en intestino de juveniles de *M. liza*. Ausencia (control) y en presencia de Ca^{2+} y Ca^{2+} + EGTA (10^{-4}M). Los datos son la media \pm S.D para 5 individuos.

Ca^{2+} extracelular 10^{-4}M no tuvo efecto sobre la actividad de APN en intestino de juveniles de *M. liza* (Figura 5.2).

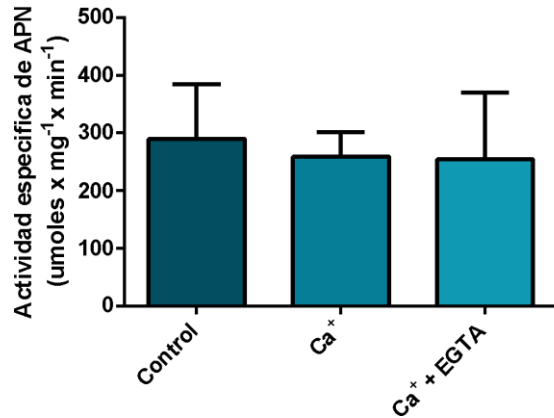


Figura 5.2 Efecto *in vitro* de Ca²⁺ extracelular 10⁻⁴M sobre la actividad de APN en intestino de juveniles de *M. liza*. Ausencia (control) y en presencia Ca²⁺ y Ca²⁺ + EGTA (10⁻⁴M). Los datos son la media ± S.D para 5 individuos.

Dopamina 10⁻⁴ M aumentó (alrededor del 86 y 98%, respectivamente) las actividades de maltasa y sacarasa *in vitro* en intestino de juveniles de *M. liza* (Figura 5.3 a, b). Histamina 10⁻⁴ M no afectó las actividades *in vitro* de ambas disacaridasas

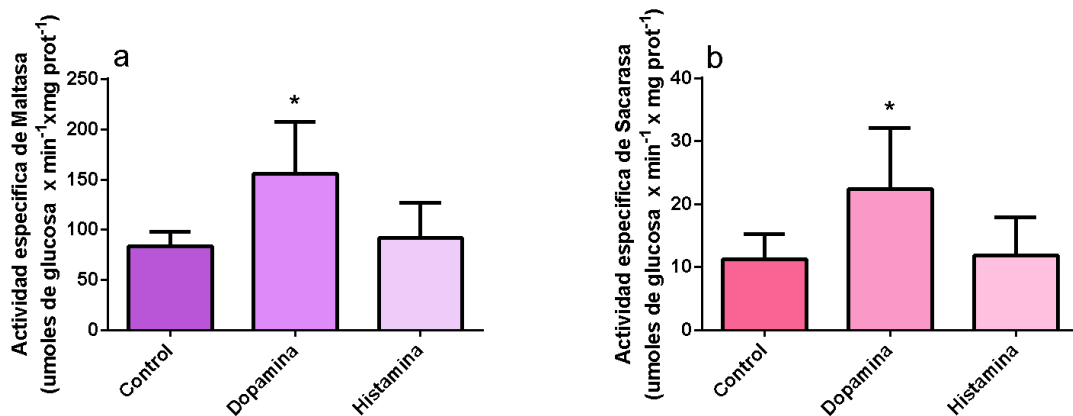


Figura 5.3 Efecto *in vitro* de aminas biogénicas (dopamina 10⁻⁴M e histamina 10⁻⁴M) sobre las actividades de maltasa (a) y sacarasa (b) en intestino de juveniles de *M. liza*. Ausencia (control) y en presencia de dopamina o histamina.*Indica diferencia significativa con respecto a la actividad en ausencia

del correspondiente de mensajeros químicos (One-Way ANOVA $p < 0,05$). Los datos son la media \pm S.D para 5 individuos.

Dopamina 10^{-4} M e histamina 10^{-4} M aumentaron (alrededor del 73 y 57%, respectivamente) la actividad de APN *in vitro* en intestino de juveniles de *M. liza* (Figura 5.4).

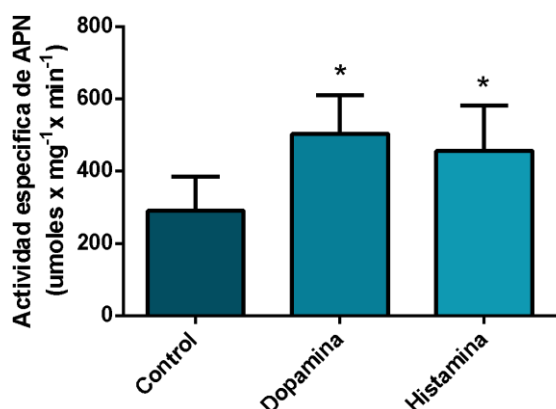


Figura 5.4 Efecto *in vitro* de aminas biogénicas (dopamina 10^{-4} M e histamina 10^{-4} M) sobre la actividad de APN en intestino de juveniles de *Mugil liza*. Ausencia (control) y en presencia de dopamina o histamina. *Indica diferencia significativa con respecto a la actividad en ausencia del correspondiente mensajero químico (One-Way ANOVA $p < 0,05$). Los datos son la media \pm S.D para 5 individuos.

Discusión

Los resultados del presente capítulo muestran la modulación diferencial de la actividad de maltasa, sacarasa y APN por dopamina e histamina en intestino de juveniles de *M. liza* sugiriendo el rol de estas aminas biogénicas como mensajeros químicos primarios en la regulación de componentes claves de los pasos finales de la digestión de hidratos de carbono y proteínas.

A pesar de su importancia fisiológica inherente, la modulación de enzimas digestivas por mensajeros químicos primarios en el intestino de peces ha sido poco investigada (Blanco et al., 2017; Bertucci et al., 2018). En intestino de mamíferos el Ca^{2+} extracelular vía un receptor sensible al calcio (CaSR) actúa como un sensor de nutrientes coordinando la digestión y absorción (Ding et al., 2018; Calo et al., 2021; Gushchina et al., 2023). La presencia de CaSR se ha identificado en el intestino de varios peces como la tilapia, *Oreochromis mossambicus*, el lenguado *Pleuronectes americanus*, el salmón del Atlántico *Salmo salar* y la trucha arco iris *O. mykiss* (Nearing et al., 2002; Radman et al., 2002; Loretz et al., 2007). En peces marinos, el CaSR media la secreción de HCO^{+3} y la absorción de agua en intestino (Gregório y Fuentes, 2018). Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron la estimulación *in vitro* por Ca^{2+} extracelular 10^{-4} M de la actividad de APN en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Neohelice granulata* sugiriendo su rol como mensajero químico primario en la regulación de una enzima digestiva (Michiels et al., 2020). El hecho que no se observó variación *in vitro* de la actividad específica de maltasa, sacarasa y APN sugiere que el Ca^{2+} extracelular no estaría involucrado en la regulación de enzimas de membrana en borde en cepillo en el intestino de juveniles de *M. liza*. Sin embargo, se necesitan más experimentos (ej curvas dosis respuestas) para definir el rol del Ca^{2+} extracelular en la regulación de enzimas digestivas en intestino de *M. liza*.

En mamíferos, la dopamina actuando como neurotransmisor o en forma paracrina está involucrada en la regulación de varios procesos digestivos y metabólicos en tracto gastrointestinal (Liu y Zhu, 2020; Feng et al., 2021; Zheng et al., 2021). En páncreas, la dopamina regula la secreción de varias enzimas digestivas (Chandra y Liddle, 2020; Hong et al., 2021). En peces, la dopamina

participa en la regulación de una amplia gama de funciones, desde el control motor hasta la ingesta de alimento (Muñoz et al., 2021). Algunos estudios en peces han sugerido la participación de vías dopaminérgicas en la regulación central de la ingesta de alimento (Conde-Sieira et al., 2018; Soengas et al., 2018). En el pez dorado *Carassius auratus* se ha determinado que el ayuno puede inducir una disminución en el contenido de dopamina en el hipotálamo (De Pedro et al., 2001). Se desconoce aún su posible efecto sobre la actividad de enzimas digestivas en intestino de peces. La estimulación por dopamina de la actividad de maltasa, sacarasa y APN en intestino de *M. liza* sugiere su rol como mensajero químico primario para la regulación de enzimas digestivas y su efecto directo en el intestino. El aumento de la actividad de maltasa, sacarasa y APN inducido por dopamina podría conducir a la regulación de funciones digestivas clave tales como los procesos finales de la digestión de hidratos de carbono y proteínas. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron el efecto *in vivo* de dopamina sobre la actividad de lipasa en hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *Cyrtograpsus angulatus* y el efecto *in vitro* de dopamina sobre la actividad de lipasa y APN en hepatopáncreas de *N. granulata* sugiriendo el rol de esta amina biogénica como modulador de la actividad de enzimas digestivas y su efecto directo sobre el hepatopáncreas (Michiels et al., 2013; 2015a, b; 2017; 2020).

En tracto digestivo de mamíferos, la histamina tiene un papel principal en la regulación de enzimas y canales claves involucrados en procesos de digestión y absorción (Sander et al., 2006; Ramsay y Carr, 2011; Deiteren et al., 2015). La estimulación por histamina 10^{-4} M de la actividad de APN sugiere su rol en la regulación de componentes clave de la digestión proteica en intestino de juveniles de *M. liza*. La estimulación por histamina de la APN podría conducir a un aumento

en la capacidad para pasos finales de la digestión proteica y por ende a una mayor provisión de metabolitos resultantes. En mamíferos, la histamina cumple un rol esencial en la regulación de componentes claves para la digestión de proteínas dietarias en el tracto digestivo (ej. modulación de la secreción de ácido; estimulación de enzimas claves tales como anhidrasa carbónica y de sistemas de transporte de membrana apical) (Kim y Hong 2023). En hepatopáncreas del cangrejo eurihalino *C. angulatus* la histamina modula *in vivo* e *in vitro* la actividad de tripsina sugiriendo el rol de esta amina biogénica como modulador de la actividad de proteasas clave y su efecto directo sobre este órgano (Michiels et al. 2013; 2017). En el tracto digestivo de mamíferos, las acciones fisiológicas de la histamina están mediadas por receptores de membrana específicos acoplados a distintas vías de señalización, como la del AMPc y el Ca^{2+} (Venerito y Malfertheiner, 2010 ; Chang y Leung, 2014; Lopez et al., 2020). En el pez cebra *Danio rerio* se ha demostrado la expresión del receptor H1 en intestino (Peitsaro et al., 2007). Por otro lado, el hecho que la histamina incrementó la actividad de APN mientras que no tuvo efecto sobre la actividad de maltasa o sacarasa sugiere el posible rol específico de la histamina en la regulación de la digestión proteica en juveniles de *M. liza*. Sin embargo, no se puede descartar la posible sensibilidad diferencial de maltasa o sacarasa a esta amina biogénica.

Debido a que la APN está anclada a la membrana en borde en cepillo (Chen et al., 2013; Amin et al., 2018) es necesario realizar futuros trabajos para evaluar si posibles mecanismos de acción de la dopamina e histamina involucran la activación directa por unión del mensajero químico a la proteína; la regulación por estas aminas biogénicas de activadores y/o inhibidores endógenos de la APN; o la modulación de la retranslocación de APN hacia la membrana apical desde sitios de

reserva intracelular. Por otro lado, la estimulación de la actividad de APN por dopamina e histamina sugiere que esta enzima estaría bajo regulación múltiple por diferentes mensajeros químicos en intestino de juveniles de *M. liza*. En hepatopáncreas de *N. granulata* la actividad de APN está bajo control por diferentes mensajeros químicos representativos de distintas vías de señalización (Michiels et al., 2020).

En resumen los resultados de este capítulo muestran la estimulación diferencial *in vitro* por dopamina e histamina de las actividades de maltasa, sacarasa y APN lo cual sugiere el rol de estos mensajeros químicos en la regulación de enzimas digestivas por efecto directo en el intestino de juveniles de *M. liza* (Figura 5.5). Los resultados presentados en capítulos previos de la presente tesis mostraron la modulación diferencial de la actividad de maltasa, sacarasa y APN en intestino en diferentes estadios de *M. liza* (capítulo 1 y 4) y en intestino de querimanas en respuesta a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento (capítulo 2) y a un cambio abrupto de salinidad (capítulo 3).

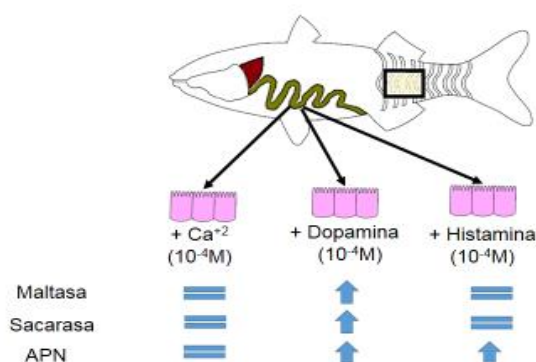


Figura 5.5. Resumen de efecto *in vitro* de mensajeros químicos sobre la actividad de maltasa, sacarasa y APN en secciones de intestino de juveniles de *M. liza*. ↑, ↓, = indican aumento, disminución o sin cambios respectivamente, con respecto a la actividad en ausencia del correspondiente mensajero químico.

Consideraciones finales

La flexibilidad fenotípica implica variaciones reversibles dentro de un individuo en rasgos fenotípicos a diferentes niveles (por ejemplo, bioquímico, fisiológico, morfológico) lo que puede aumentar las probabilidades de supervivencia de los animales frente a diferentes condiciones internas y externas. Estos cambios implican, en muchos casos, ajustes en la capacidad digestiva y una reorganización metabólica. Las enzimas digestivas cumplen un rol fisiológico esencial ya que constituyen un vínculo entre la digestión y absorción de nutrientes. Así, la existencia y modulación de la actividad de enzimas digestivas (carbohidrasas, lipasas, proteasas) en tracto digestivo constituyen un factor clave que afecta la capacidad digestiva para sustratos específicos. Cuando se determina junto con la concentración de reservas de energía permite conocer posibles ajustes digestivo/metabólicos a nivel bioquímico, evaluar la condición de los individuos y establecer la naturaleza de los componentes dietarios y/o de reserva que pueden ser potencialmente utilizados para hacer frente a diferentes condiciones fisiológicas y/o ambientales. En este contexto, resulta evidente la importancia de realizar este tipo de estudios en especies de interés regional, ecológico y/o económico tales como mugílidos marinos estuarino-dependientes.

Los resultados de la presente tesis representan un estudio integrativo sobre flexibilidad fenotípica digestiva/metabólica a diferentes niveles en individuos del pez marino estuarino-dependiente *Mugil liza* de la LCMCh.

- Se estudió el perfil digestivo/metabólico de querimanas de *M. liza* luego del reclutamiento en el ambiente natural en la LCMCh (Capítulo 1). Para ello, se determinó la existencia y características bioquímicas de actividad de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y aminopeptidasa- N (APN) en intestino y la concentración de sustratos de energía (glucógeno, triglicéridos, proteínas) en órganos de reserva. Individuos querimanas exhibieron una batería digestiva a nivel bioquímico adecuada para la potencial digestión de diferentes sustratos dietarios que les permitiría sostener el hábito alimenticio detritívoro dentro de la LCMCh luego del reclutamiento. La existencia de actividad de enzimas digestivas de membrana tales como maltasa, sacarasa y APN en intestino sugiere la madurez intestinal y la capacidad para la digestión extracelular en estadios tempranos de *M. liza*. Se determinó que el hígado y músculo constituyen sitios de reserva de glucógeno, triglicéridos y proteínas. Se demostró que el valor de coeficiente intestinal en querimanas de *M. liza* de la LCMCh se correspondería con una dieta de tipo detritívora (Capítulo 1).

- Se estudió la existencia de flexibilidad fenotípica digestiva/metabólica a diferentes niveles en querimanas de *M. liza* en relación a la edad en el ambiente natural luego del ingreso a la LCMCh (Capítulo 1). Querimanas tardías exhibieron un mayor coeficiente intestinal, mayor actividad de amilasa, sacarasa, lipasa y APN en intestino y una diferente distribución de reservas de energía en músculo que querimanas tempranas lo que sugiere la existencia de ajustes digestivos diferenciales que podrían sustentar el crecimiento dentro de la laguna luego del reclutamiento.

- Se estudió la existencia de flexibilidad fenotípica digestiva/metabólica en querimanas tardías de *M. liza* en respuesta a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y luego de la re-alimentación (Capítulo 2). Se determinó la actividad de amilasa, maltasa, sacarasa, lipasa, tripsina y APN, la concentración de glucógeno, triglicéridos y proteínas en órganos de reserva y parámetros morfológicos y de condición física (peso corporal) a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento y luego de la re-alimentación. Se demostró la disminución temporal diferencial de la actividad de carbohidrasas y lipasa a diferentes tiempos luego de la ingesta de alimento en intestino y de la concentración de reservas de glucógeno y triglicéridos en hígado y músculo; la disminución del coeficiente intestinal y la pérdida de peso corporal a las 144 h luego de la ingesta de alimento. La recuperación del peso corporal, el coeficiente intestinal, la actividad de carbohidrasas y de reservas de glucógeno mientras que la actividad de lipasa y la concentración de triglicéridos en el músculo se mantuvieron disminuidas sugeriría que la regulación de componentes clave de la homeostasis de glucosa sería suficiente para recuperar la condición física luego de la re-alimentación. El mantenimiento de la actividad de tripsina y de APN en el intestino y de la concentración de proteínas en hígado y músculo podría ser un factor importante que permitiría la supervivencia en respuesta a una privación de alimento de hasta 240 h (Capítulo 2). La flexibilidad digestiva/metabólica a diferentes niveles les permitiría a querimanas de *M. liza* enfrentar períodos de alimentación irregular dentro de la LCMCh luego del reclutamiento.

- Se estudió la respuesta osmorregulatoria y la posible existencia de flexibilidad digestiva/metabólica a diferentes niveles en querimanas tempranas de *M. liza* en respuesta a un cambio amplio y abrupto de salinidad (Capítulo 3). Se

determinó la actividad de amilasa, sacarasa, lipasa, y APN en intestino, la concentración de glucógeno, triglicéridos y proteínas en órganos de reserva y parámetros morfológicos y de condición física (peso corporal) antes y luego de un cambio abrupto de alta (31 ups) a baja (10 ups) salinidad. Los cambios en la respuesta osmoregulatoria de hipo-regulación en 31 ups a hiper-regulación en 10 ups demostró la flexibilidad osmorregulatoria de querimanas tempranas de *M. liza*. Las respuestas diferenciales en la actividad de amilasa, sacarasa y lipasa, la concentración de reservas de energía y el coeficiente intestinal sugieren una reorganización metabólica específica en relación al tipo de respuesta osmorregulatoria (hipo- o hiper-regulación) (Capítulo 3) Esta reorganización metabólica en relación a las diferentes respuestas osmorregulatorias podría ser un componente importante para soportar las condiciones heterogéneas de salinidad que deben enfrentar querimanas tempranas de *M. liza* luego del reclutamiento en la LCMCh.

- Se estudió el perfil digestivo/metabólico de juveniles y adultos de *M. liza* que cohabitan dentro de la LCMCh en el ambiente natural (Capítulo 4). Se determinaron la existencia y características bioquímicas de carbohidrasas (amilasa, maltasa y sacarasa), lipasa y proteasas (tripsina y APN) en intestino y la concentración de sustratos de energía (glucógeno, triglicéridos, proteínas) en órganos de reserva. Individuos juveniles y adultos exhibieron una batería digestiva a nivel bioquímico cualitativamente similar y adecuada para la hidrólisis completa de diferentes items dietarios. Sin embargo, el valor diferencial de Km de las actividades de amilasa y tripsina sugieren la posible existencia de diferentes isoformas en adultos. Se determinó que el hígado y el músculo constituyen sitios de reserva de glucógeno, triglicéridos y proteínas en juveniles y adultos. En adultos se detectó la presencia

de grasa retroperitoneal la cual constituyó el principal sitio de almacenamiento de triglicéridos (Capítulo 4). Se demostró que el valor de coeficiente intestinal en juveniles y adultos se correspondería con una dieta de tipo detritívora.

- Se estudió la existencia de flexibilidad fenotípica digestiva/metabólica a diferentes niveles en relación al estadio en juveniles y adultos de *M. liza* que cohabitan dentro de la LCMCh en el ambiente natural (Capítulo 4). Los adultos exhibieron una mayor actividad de amilasa y una menor actividad de sacarasa y lipasa en intestino y mayor concentración de glucosa libre en hígado y músculo que juveniles. La modulación diferencial y específica de componentes clave del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos, y la distribución diferencial de triglicéridos en juveniles y adultos de *M. liza* sugiere que estos ajustes podrían estar relacionados a la preparación de adultos para afrontar la demanda energética de la migración reproductiva.

- Se estudió en juveniles de *M. liza* el posible rol de mensajeros químicos primarios involucrados en la regulación de diferentes funciones en tracto digestivo sobre la actividad de enzimas digestivas clave de membrana involucradas en pasos finales de la digestión de hidratos de carbono y proteínas. El aumento *in vitro* por dopamina de la actividades de maltasa, sacarasa y por dopamina e histamina de la actividad de APN en intestino sugiere el rol de estas aminas biogénicas en la regulación de estas enzimas por efecto directo en el tejido y la existencia de mecanismos de regulación diferenciales de componentes clave de la digestión de hidratos de carbono y de proteínas (Capítulo 5).

Los resultados de la presente tesis muestran que querimanas, juveniles y adultos de *Mugil liza* de la LCMCh presentan características digestivas /metabólicas

y flexibilidad fenotípica digestiva/metabólica a distintos niveles que les permitiría enfrentar el reclutamiento en la laguna (querimanas), el crecimiento y la preparación para la migración reproductiva hacia el mar en relación a su estilo de vida diádromo.

Por otro lado, los resultados de la presente tesis aportan información y contribuyen a incrementar el conocimiento sobre la fisiología bioquímica digestiva y metabólica de peces teleósteos en general y de peces estuarino-dependientes en particular, cubriendo un área de vacancia hasta el presente de la fisiología bioquímica, ecológica y ambiental de estos organismos. Además, contribuyen también al conocimiento del rol ecológico que cumplen los ambientes mixohalinos (ej. Laguna Costera Mar Chiquita) en diferentes estadios de peces marinos estuarino-dependientes.

Los resultados de modulación de enzimas digestivas y de reservas de energía por factores internos y/o externos en *M. liza* constituyen un potencial punto de partida para futuros estudios sobre mecanismos de regulación de componentes claves del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. El conocimiento de estos mecanismos resulta de fundamental importancia no solo para el conocimiento general de la fisiología de esta especie sino también por su potencial aplicación en proyectos de acuicultura. En este contexto, la batería de enzimas digestivas a nivel bioquímico de querimanas, juveniles y adultos de *M. liza* permitiría utilizar dietas ricas en hidratos de carbono permitiendo abaratar costos de mantenimiento. Por otro lado, las respuestas de las querimanas frente a la privación de alimento y su capacidad hiper-regulatoria permitiría la disminución en la frecuencia de la alimentación y la utilización de condiciones de salinidad que podría implicar una disminución en los costos de mantenimiento. Además, las respuestas

de las actividades de maltasa, sacarasa y APN en intestino de juveniles a aminas biogénicas sugiere la posibilidad de la utilización de mensajeros químicos que podrían estimular la capacidad digestiva para hidratos de carbono y proteínas.

Bibliografía

- Abolfathi, M., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., & Zamani, A. (2012). Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in juvenile roach, *Rutilus Rutilus caspicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 161(2), 166–173.
- Acha, E. M. (1990). Estudio anatómico-ecológico de la lisa (*Mugil liza*) durante su primer año de vida [Anatomic and ecological study of the mullet (*Mugil liza*) during the first year of life]. *Frente Marítimo*, 7, 37–43.
- Albanesi, C. P., Méndez, E., Michiels, M. S., Radonic, M., López, A., & López-Mañanes, A. A. (2024). Differential modulation of digestive enzymes and energy reserves at different times after feeding in juveniles of the marine estuarine-dependent flatfish *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Journal of Fish Biology*, 104(1), 34-43.
- Albanesi, C. P., Radonic, M., Lopez, H. A., & Lopez Mañanes, A. A. (2021). Phenotypic flexibility in juvenile flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839): Differential modulation of digestive enzymes and energy reserves in relation to diet. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 16(1), 79-89.
- Almeida, A. P. G., Zardo, E. L., Toni, C., Behr, E. R., Silva, L. P. D., & Vieira, J. P. (2018). Composition of gastrointestinal content, protease and lipase activities in summer and winter of four freshwater siluriforms (Teleostei: Actinopterygii) with two different feeding habits. *Zoologia (Curitiba)*, 35, 1–8.
- Amin, S. A., Adhikari, N., & Jha, T. (2018). Design of aminopeptidase-N inhibitors as anti-cancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(15), 6468-6490.
- Angadi, P., Das, M., & Roy, R. (2021). Effect of high salinity acclimation on glucose homeostasis in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(6), 2055-2065.
- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Del Rio, M. M., Flik, G., Mancera, J. M., & Klaren, P. H. M. (2008). The involvement of thyroid hormones and cortisol in the osmotic acclimation of *Solea senegalensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 155(3), 796-803.
- Asaro, A., Paggi, R. A., Del Valle, J. C., & Mañanes, A. A. L. (2018). Glucose homeostasis in the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus*: Effects of salinity on amylase, maltase, and sucrase activities in the hepatopancreas and

carbohydrate reserves in different tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 216, 39-47.

- Asaro, A., Paggi, R., Castro, R. D., & Mañanes, A. L. (2017). Amylase in the hepatopancreas of a euryhaline burrowing crab: characteristics and modulation. *Turkish Journal of Zoology*, 41(3), 443–453.
- Assan, D., Kuebutornye, F. K. A., Hlordzi, V., Chen, H., Mraz, J., Mustapha, U. F., & Abarike, E. D. (2022). Effects of probiotics on digestive enzymes of fish (finfish and shellfish); status and prospects: a mini review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 257, 110653.
- Babaei, F., Ramalingam, R., Tavendale, A., Liang, Y., Yan, L. S. K., Ajuh, P., ... & Lam, Y. W. (2013). Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish. *Journal of Proteome Research*, 12(4), 1580-1590.
- Babaei, S., Abedian-Kenari, A., Naseri, M., Yazdani-Sadati, M. A., & Metón, I. (2020). Impact of starvation on digestive enzyme activities and plasma metabolites in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869). *Aquaculture Research*, 51(4), 1689-1699.
- Bakker, A. M., Sissener, N. H., Sanden, M., Krogdahl, Å., Johannessen, L. E., & Hemre, G. I. (2011). Genetically modified plants as fish feed ingredients. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68, 563–574.
- Ballantyne, J. S. (2014). Membranes and metabolism of fishes. In: *The Physiology of Fishes* (pp. 81–147). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Barletta, M., & Dantas, D. V. (2016). Biogeography and distribution of Mugilidae in the Americas. In *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)* (pp. 42–62). Edited by D. Crosetti and S.J.M. Blaber. CRC Press.
- Bertucci, J. I., Blanco, A. M., Sánchez-Bretaña, A., Unniappan, S., & Canosa, L. F. (2019). Ghrelin and NUCB2/Nesfatin-1 co-localization with digestive enzymes in the intestine of Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *The Anatomical Record*, 302(6), 973–982.
- Bindu, V. U., & Mohanan, P. V. (2020). Thermal deactivation of α -amylase immobilized magnetic chitosan and its modified forms: a kinetic and thermodynamic study. *Carbohydrate Research*, 498, 108185. doi:10.1016/j.carres.2020.108185.

- Biradar, A., & Ganesh, C. B. (2023). Histamine H2 receptor agonist dimaprit dihydrochloride stimulates the hypothalamo-hypophysial-testicular axis in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 579, 740163.
- Bkhairia, I., Khaled, H. B., Ktari, N., Miled, N., Nasri, M., & Ghorbel, S. (2016). Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata*: Structural features explaining thermal stability. *Food Chemistry*, 196, 1346-1354.
- Blaber, S. J. (1976). The food and feeding ecology of Mugilidae in the St. Lucia lake system. *Biological Journal of the Linnean Society*, 8(3), 267–277.
- Blanco, A. M., Bertucci, J. I., Sánchez-Bretaña, A., Delgado, M. J., Valenciano, A. I., Unniappan, S. (2017). Ghrelin modulates gene and protein expression of digestive enzymes in the intestine and hepatopancreas of goldfish (*Carassius auratus*) via the GHSR1a: possible roles of PLC/PKC and AC/PKA intracellular signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 442, 165–181.
- Bonelli, M., Bruno, D., Brilli, M., Gianfranceschi, N., Tian, L., Tettamanti, G., ... & Casartelli, M. (2020). Black soldier fly larvae adapt to different food substrates through morphological and functional responses of the midgut. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4955.
- Botto, F., Valiela, I., Iribarne, O., Martinetto, P., & Alberti, J. (2005). Impact of burrowing crabs on C and N sources, control, and transformations in sediments and food webs of SW Atlantic estuaries. *Marine Ecology Progress Series*, 293, 155–164. doi:10.3354/meps293155.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Brun, A., Magallanes, M. E., Barrett-Wilt, G. A., Karasov, W. H., & Caviedes-Vidal, E. (2021a). Dietary adaptation to high starch involves increased relative abundance of sucrase-isomaltase and its mRNA in nestling house sparrows. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 320(2), R195-R202.
- Brun, A., Magallanes, M. E., Karasov, W. H., & Caviedes-Vidal, E. (2021b). Rapid and parallel changes in activity and mRNA of intestinal peptidase to match altered dietary protein levels in juvenile house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Experimental Biology*, 224(3), jeb234708.
- Brun, A., Mendez-Aranda, D., Magallanes, M. E., Karasov, W. H., Martínez del Rio, C., Baldwin, M. W., & Caviedes-Vidal, E. (2020). Duplications and

functional convergence of intestinal carbohydrate-digesting enzymes. *Molecular Biology and Evolution*, 37(6), 1657–1666.

- Bruno, D. O., Barbini, S. A., Díaz de Astarloa, J. M., & Martos, P. (2013). Fish abundance and distribution patterns related to environmental factors in a choked temperate coastal lagoon (Argentina). *Brazilian Journal of Oceanography*, 61, 43–53.
- Bruno, D. O., Delpiani, S. M., Cousseau, M. B., de Astarloa, J. M. D., Blasina, G. E., Mabragana, E., & Acha, E. M. (2014). Ocean–estuarine connection for ichthyoplankton through the inlet channel of a temperate choked coastal lagoon (Argentina). *Marine and Freshwater Research*, 65(12), 1116–1130.
- Bruno, D. O., Riccialdelli, L., Botto, F., & Acha, E. M. (2017). Organic matter sources for fish larvae and juveniles in a marine-estuarine interface (Mar Chiquita lagoon, Argentina). *Environmental Biology of Fishes*, 100(12), 1609–1622. doi:10.1007/s10641-017-0669-z.
- Brusle, J. (1981). Food and feeding in grey mullet. In *Aquaculture of Grey Mulletts*. International Biological Programme No. 26. Edited by O.H. Oren. Cambridge University Press, Cambridge, England. pp. 185–217.
- Burke, M. (2019). Carbohydrate intolerance and disaccharidase measurement—a mini-review. *Clinical Biochemistry Reviews*, 40(4), 167.
- Cadiz, L., Zambonino-Infante, J.-L., Quazuguel, P., Madec, L., Le Delliou, H., & Mazurais, D. (2018). Metabolic response to hypoxia in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) displays developmental plasticity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 215, 1-9.
- Calì, C., Tauffenberger, A., & Magistretti, P. (2019). The strategic location of glycogen and lactate: From body energy reserve to brain plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 82.
- Calo, J., Blanco, A. M., Comesaña, S., Conde-Sieira, M., Morais, S., & Soengas, J. L. (2021). First evidence for the presence of amino acid sensing mechanisms in the fish gastrointestinal tract. *Scientific Reports*, 11(1), 4933.
- Cardona, L. (2016). Food and feeding of Mugilidae. In *Biology, Ecology and Culture of Grey Mulletts (Mugilidae)*. Edited by D. Crosetti and S.J.M. Blaber. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 165–195.
- Caruso, G., Denaro, M. G., Caruso, R., De Pasquale, F., Genovese, L., & Maricchiolo, G. (2014). Changes in digestive enzyme activities of red porgy

(*Pagrus pagrus*) during a fasting–refeeding experiment. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(5), 1373–1382.

Casas Godoy, L. (2012). Lipase-catalyzed purification and functionalization of Omega-3 polyunsaturated fatty acids and production of structured lipids. *Food and Nutrition*. INSA de Toulouse; Universidade técnica (Lisbonne), 2012. (NNT : 2012ISAT0057).

Castellini, D. L., Brown, D., Lajud, N. A., De Astarloa, J. M. D., & González-Castro, M. (2019). Juveniles recruitment and daily growth of the southern stock of *Mugil liza* (Actinopterygii; fam. Mugilidae): new evidence for the current life-history model. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(1), 215–221.

Cervigón, F., Cipriani, R., Fischer, W., Garibaldi, L., Hendrickx, M., Lemus, A. J., ... & Rodríguez, B. (1993). FAO species identification sheets for fishery purposes: Field guide to the commercial marine and brackish-water resources of the northern coast of South America. Rome: FAO.

Champasri, C., Phetlum, S., & Pornchoo, C. (2021). Diverse activities and biochemical properties of amylase and proteases from six freshwater fish species. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11.

Chandra, R., & Liddle, R. A. (2020). Regulation of pancreatic secretion. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*.

Chang, E. B., & Leung, P. S. (2014). Intestinal water and electrolyte transport. In *The Gastrointestinal System* (pp. 107-134). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8771-0_5.

Chassaing, B., & Gewirtz, A. T. (2018). Gut microbiome and metabolism. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (pp. 775-793). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00035-9>.

Chaudet, M. M., Amiri, M., Marth, N., Naim, H. Y., & Rose, D. R. (2019). Phylogenetic analysis reveals key residues in substrate hydrolysis in the isomaltase domain of sucrase-isomaltase and its role in starch digestion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1863 (9), 1410–1416.

Chen, D., Hagen, S. J., Boyce, M., & Zhao, C. M. (2023). Neuroendocrine mechanism of gastric acid secretion: Historical perspectives and recent developments in physiology and pharmacology. *Journal of Neuroendocrinology*, e13305.

- Chen, L., Yi-Lun, L., Guiqing, P., Fang, L. (2013). Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 17966–71.
- Chen, Y. J., Wang, X. Y., Pi, R. R., Feng, J. Y., Luo, L., Lin, S. M., & Wang, D. S. (2018). Preproinsulin expression, insulin release, and hepatic glucose metabolism after a glucose load in the omnivorous GIFT tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 482, 183–192.
- Chen, Y. J., Zhang, T. Y., Chen, H. Y., Lin, S. M., Luo, L., & Wang, D. S. (2017). An evaluation of hepatic glucose metabolism at the transcription level for the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*, during postprandial nutritional status transition from anabolism to catabolism. *Aquaculture*, 473, 375–382.
- Choi, C. Y., Shin, H. S., Choi, Y. J., Kim, N. N., Lee, J., & Kil, G. S. (2012). Effect of LED light spectra on starvation-induced oxidative stress in the cinnamon clownfish *Amphiprion melanopus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163, 357–363.
- Coleman, R. A., & Mashek, D. G. (2011). Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chemical Reviews*, 111(10), 6359-6386.
- Con, P., Nitzan, T., & Cnaani, A. (2017). Salinity-dependent shift in the localization of three peptide transporters along the intestine of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Frontiers in Physiology*, 8, 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00008>.
- Conde-Sieira M, Soengas JL (2017) Nutrient sensing systems in fish: impact on food intake regulation and energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 603.
- Conde-Sieira, M., Chivite, M., Míguez, J. M., & Soengas, J. L. (2018). Stress effects on the mechanisms regulating appetite in teleost fish. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 631.
- Cousseau, M. B., & Perrotta, R. G. (2013). *Peces marinos de Argentina: biología, distribución, pesca*. 4a. ed. Mar del Plata: Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero INIDEP. 193 p. ISBN 978-987- 1443-09-3. (Publicaciones Especiales INIDEP).
- Cousseau, M. B., Díaz de Astarloa, J. M., & Figueroa, D. E. (2001). La ictiofauna de la laguna Mar Chiquita. *Reserva de la Biosfera Mar Chiquita: Características Físicas, Biológicas y Ecológicas*. (Ed. O. Iribarne.) pp, 187–203. Mar del Plata, Argentina: Editorial Martín.

- Cui, T., Theuns, S., Xie, J., Van den Broeck, W., & Nauwynck, H. J. (2019). Role of porcine aminopeptidase N and sialic acids in porcine coronavirus infections of primary enterocytes. A new co-culture system of primary porcine enterocytes/myofibroblasts to investigate the replication characteristics of porcine enteric viruses in their target cell, 107.
- Dankwa, H. R., Blay, J., Jr., & Yankson, K. (2005). Food and feeding habits of grey mullets (Pisces: Mugilidae) in two estuaries in Ghana. *West African Journal of Applied Ecology*, 8, 1–13.
- Dar, S. A., Srivastava, P. P., Nazir, M. I., Jahan, I., Varghese, T., Hajam, I. A., & Gupta, S. (2021). Modulations of digestive and metabolic enzyme profiles during restriction feeding in Rohu (*Labeo rohita*) fingerlings. *North American Journal of Aquaculture*, 83(2), 58–66.
- Dashty, M. (2014). A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry*, 47(1-2), 4-6.
- Date, K., Satoh, A., Iida, K., & Ogawa, H. (2015). Pancreatic α -Amylase Controls Glucose Assimilation by Duodenal Retrieval through N-Glycan-specific Binding, Endocytosis, and Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), 17439-17450.
- Davis, A. M., Unmack, P. J., Pusey, B. J., Pearson, R. G., & Morgan, D. L. (2013). Ontogenetic development of intestinal length and relationships to diet in an Australasian fish family (Terapontidae). *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 1-16.
- Day, R. D., Tibbetts, I. R., & Secor, S. M. (2014). Physiological responses to short-term fasting among herbivorous, omnivorous, and carnivorous fishes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 184(4), 497–512.
- de Freitas-Júnior, A. C. V., da Costa, H. M. S., Marcuschi, M., Icimoto, M. Y., Machado, M. F., Bezerra, R. S., ... & Machado, M. F. (2021). Substrate specificity, physicochemical and kinetic properties of a trypsin from the giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35, 102073.
- De Pedro, N., Delgado, M. J., & Alonso-Bedate, M. (2001). Fasting and hypothalamic catecholamines in goldfish. *Journal of Fish Biology*, 58(5), 1404-1413.
- Deiteren, A., De Man, J. G., Pelckmans, P. A., & De Winter, B. Y. (2015). Histamine H4 receptors in the gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology*, 172(5), 1165-1178.

- Del Valle, J. C., & López Mañanes, A. A. (2008). Digestive strategies in the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 150(4), 387-394.
- Del Valle, J. C., & López Mañanes, A. A. (2011). Digestive flexibility in females of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* in their natural habitat. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 315A(3), 141-148. <https://doi.org/10.1002/jez.658>
- Del Valle, J. C., & López Mañanes, A. A. (2012). Fisiología integrativa y adaptativa de roedores subterráneos *Ctenomys talarum*: Modelo de estudio de cambios plásticos frente a variaciones del ambiente y de demanda energética. LAP Lambert Academic Publishing GmbH&Co. Editorial Académica Española. Madrid, 64 p.
- Del Valle, J. C., Michiels, M. S., & López Mañanes, A. A. (2016). Digestive and metabolic profile at the biochemical level of juvenile flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 11, 309–323.
- Denis, J., Rabhi, K., Le Loc'h, F., Ben Rais Lasram, F., Boutin, K., Kazour, M., and Amara, R. (2022). Role of estuarine habitats for the feeding ecology of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *PLoS ONE*, 17(7), e0270348.
- Dhital, S., Lin, A. H. M., Hamaker, B. R., Gidley, M. J., & Muniandy, A. (2013). Mammalian mucosal α -glucosidases coordinate with α -amylase in the initial starch hydrolysis stage to have a role in starch digestion beyond glucogenesis. *PLoS One*, 8(4), e62546.
- Dhital, S., Warren, F. J., Butterworth, P. J., Ellis, P. R., & Gidley, M. J. (2017). Mechanisms of starch digestion by α -amylase—Structural basis for kinetic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), 875-892.
- Ding, K. H., Cain, M., Davis, M., Bergson, C., McGee-Lawrence, M., Perkins, C., ... & Isales, C. M. (2018). Amino acids as signaling molecules modulating bone turnover. *Bone*, 115, 15-24
- Ducrotoy, J. P., Michael, E., Cutts, N. D., Franco, A., Little, S., Mazik, K., & Wilkinson, M. (2019). Temperate estuaries: their ecology under future environmental changes. In *Coasts and Estuaries* (pp. 577-594). Elsevier.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), 519–539. d

- Ensminger, D. C., Salvador-Pascual, A., Arango, B. G., Allen, K. N., & Vázquez-Medina, J. P. (2021). Fasting ameliorates oxidative stress: A review of physiological strategies across life history events in wild vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 256, 110929.
- Fairweather, S. J., Bröer, A., O'Mara, M. L., & Bröer, S. (2012). Intestinal peptidases form functional complexes with the neutral amino acid transporter B0AT1. *Biochemical Journal*, 446(1), 135-148.
- Fan, P., Song, P., Li, L., Huang, C., Chen, J., Yang, W., ... & Ma, X. (2017). Roles of biogenic amines in intestinal signaling. *Current Protein and Peptide Science*, 18(6), 532-540.
- Farhadi, A., Liu, Y., Xu, C., Wang, X., & Li, E. (2022). The role of the renin-angiotensin system (RAS) in salinity adaptation in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1089419.
- Favero G, Gimbo RY, Montoya LNF, Carneiro DJ, Urbinati EC (2020) A fasting period during grow-out makes juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) leaner but does not impair growth. *Aquaculture*, 524, 735242.
- Feng, X. Y., Xue, H., Guo, Z. H., Yan, J. T., Liu, S., & Zhu, J. X. (2021). Dopamine and Gastrointestinal Mucosa Function. *Dopamine in the Gut*, 87-131.
- Friedman, M., & Fernandez Gimenez, A. V. (2023). Enzyme kinetics of digestive enzymes in fish: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-29.
- Furné M, García-Gallego M, Hidalgo MC, Morales AE, Domezain A, Domezain J, Sanz A (2008) Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149(4), 420–425.
- Furné M, Morales AE, Trenzado CE, García-Gallego M, Hidalgo MC, Domezain Rus AS (2012) The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(1), 63–76.
- García-Meilán, I., Herrera-Muñoz, J. I., Ordóñez-Grande, B., Fontanillas, R., & Gallardo, Á. (2023). Growth Performance, Digestive Enzyme Activities, and Oxidative Stress Markers in the Proximal Intestine of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fed High Starch or Lipid Diets. *Fishes*, 8(5), 223.

- German AV, Zakonov VV, Mamontov AA (2010) Organochlorine compounds in bottom sediments, benthos, and fish in the Volga Pool of the Rybinsk Reservoir. *Water Resources*, 37(1), 84–88.
- German, D. P., & Horn, M. H. (2006). Gut length and mass in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. *Marine Biology*, 148, 1123-1134.
- German, D.P., and Bittong, R.A. (2009). Digestive enzyme activities and gastrointestinal fermentation in wood-eating catfishes. *Journal of Comparative Physiology B*, 179(8), 1025–1042.
- Gilannejad, N., de Las Heras, V., Martos-Sitcha, J. A., Moyano, F. J., Yúfera, M., & Martínez-Rodríguez, G. (2020). Ontogeny of expression and activity of digestive enzymes and establishment of gh/igf1 axis in the omnivorous fish *Chelon labrosus*. *Animals*, 10(5), 874.
- Gioda, C. R., Pretto, A., Freitas, C. D. S., Leitemperger, J., Loro, V. L., Lazzari, R., & Salbego, J. (2017). Different feeding habits influence the activity of digestive enzymes in freshwater fish. *Ciência Rural*, 47(3).
- Girousse, A., & Langin, D. (2012). Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *International Journal of Obesity*, 36(4), 581-594.
- Gisbert, E., Mozanzadeh, M. T., Kotzamanis, Y., & Estévez, A. (2016). Weaning wild flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) fry with diets with different levels of fish meal substitution. *Aquaculture*, 462, 92-100.
- Gisbert, E., Nolasco, H., & Solovyev, M. (2018). Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture*, 487, 102-108.
- Goldberg, R. F., Austen, W. G., Jr., Zhang, X., Munene, G., Mostafa, G., Biswas, S., & Hodin, R. A. (2008). Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), 3551–3556. doi:10.1073/pnas.0712140105.
- Gominho-Rosa, M. do C., Rodrigues, A. P. O., Mattioni, B., de Francisco, A., Moraes, G., & Fracalossi, D. M. (2015). Comparison between the omnivorous jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the utilization of dietary starch sources: Digestibility, enzyme activity, and starch microstructure. *Aquaculture*, 435, 92-99.

- González Castro, M., and Minos, G. (2016). Sexuality and reproduction of Mugilidae. In *Biology, ecology and culture of grey mullet (Mugilidae)*. Edited by D. Crosetti and S.J.M. Blaber. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 227–263.
- González Castro, M., Ibáñez, A. L., Heras, S., Roldán, M. I., & Cousseau, M. B. (2012). Assessment of lineal versus landmarks-based morphometry for discriminating species of Mugilidae (Actinopterygii). *Zoological Studies*, Editorial: Academia Sinica, Taiwan.
- González-Castro, M. (2007). Los peces representantes de la familia Mugilidae en Argentina. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP), Mar del Plata, Argentina. 187pp.
- González-Castro, M., Abachián, V., and Perrotta, R.G. (2009b). Age and growth of the striped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37°32' s- 57°19' w): a proposal for a life-history model. *J. Appl. Ichthyol.*, 25(1), 61–66.
- González-Castro, M., and Ghasemzadeh, J. (2016). Morphology and morphometric-based taxonomy of Mugilidae. In *Biology, ecology and culture of grey mullet (Mugilidae)*. Edited by D. Crosetti and S.J.M. Blaber. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 1–20.
- González-Castro, M., Díaz de Astarloa, J.M., Cousseau, M.B., Figueroa, D.E., Delpiani, S.M., Bruno, D., and Deli Antoni, M.Y. (2009a). Fish composition in a South-Western Atlantic temperate coastal lagoon: spatial–temporal variation and relationships with environmental variables. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 89, 593–660.
- González-Castro, M., Macchi, G.J., and Cousseau, M.B. (2011). Studies on reproduction of the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880 (Actinopterygii, Mugilidae) from the Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina: similarities and differences with related species. *Ital. J. Zool.*, 78(3), 343–353.
- Goodman, B.E. (2010). Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education*, 34, 44–53.
- Gopalraaj, J., Velayudhannair, K., Arockiasamy, J. P., & Radhakrishnan, D. K. (2023). The effect of dietary supplementation of proteases on growth, digestive enzymes, oxidative stress, and intestinal morphology in fishes—A review. *Aquaculture International*, 1-21.
- Gregório, S. F., & Fuentes, J. (2018). Regulation of bicarbonate secretion in marine fish intestine by the calcium-sensing receptor. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1072.

- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2019). Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(4), 226-237.
- Griego, M., DeSimone, J., Ramirez, M. G., & Gerson, A. R. (2021). Aminopeptidase-N modulation assists lean mass anabolism during refuelling in the white-throated sparrow. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1943), 20202348.
- Griffith, M. B. (2017). Toxicological perspective on the osmoregulation and ionoregulation physiology of major ions by freshwater animals: teleost fish, Crustacea, aquatic insects, and Mollusca. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(3), 576-600.
- Grosell, M., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (2011). *Fish Physiology: The multifunctional gut of fish (Vol. 30) (pp. 1–55)*. Burlington, MA: Academic Press.
- Guo, C., Sun, D., Wang, X., and Mao, S. (2019). An integrated metabolomics and proteomic study revealed the difference in metabolite and protein expression profiles in ruminal tissue from goats fed hay or high grain diets. *Front. Physiol.*, 10, 66.
- Guo, T., Yang, Y., Meng, F., Wang, S., Xia, S., Qian, Y., ... & Wang, R. (2020). Effects of low salinity on gill and liver glycogen metabolism of great blue-spotted mudskippers (*Boleophthalmus pectinirostris*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 230, 108709.
- Gurina, T. S., & Mohiuddin, S. S. (2020). *Biochemistry, Protein Catabolism*. In StatPearls.
- Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 254-267.
- Gushchina, V., Kupper, N., Schwarzkopf, M., Frisch, G., Piatek, K., Aigner, C., ... & Schepelmann, M. (2023). The calcium-sensing receptor modulates the prostaglandin E2 pathway in intestinal inflammation. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1151144.
- Hahor, W., Takaeh, S., Esor, N., Saekhow, S., & Thongprajukaew, K. (2023). Postprandial Patterns of Digestive Enzyme Activity in Male Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). *Journal of Fisheries and Environment*, 47(1), 1-10.

- Handeland, S. O., Berge, Å., Björnsson, B. T., & Stefansson, S. O. (1998). Effects of temperature and salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in seawater. *Aquaculture*, 168(1-4), 289-302.
- Hennessy, A. A., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N., & Stanton, C. (2014). Role of the Gut in Modulating Lipoprotein Metabolism. *Current Cardiology Reports*, 16(8), 1-12.
- Herring, C. M., Bazer, F. W., & Wu, G. (2021). Amino acid nutrition for optimum growth, development, reproduction, and health of zoo animals. *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in the Nutrition of Companion, Zoo and Farm Animals*, 233-253.
- Hieu, D. Q., Hang, B. T. B., Huong, D. T. T., Kertaoui, N. E., Farnir, F., Phuong, N. T., & Kestemont, P. (2021). Salinity affects growth performance, physiology, immune responses and temperature resistance in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) during its early life stages. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47, 1995-2013.
- Holt, G. J. (2011). *Larval Fish Nutrition*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Hong, F., Li, G. W., Liu, S., Zhang, Y., Feng, X. Y., & Zhu, J. X. (2021). Dopamine in the pancreas. In *Dopamine in the Gut*, 203-232.
- Huo, Z., Rbbani, M. G., Cui, H., Xu, L., Yan, X., Fang, L., & Yang, F. (2019). Larval development, juvenile survival, and burrowing rate of geoduck clams (*Panopea japonica*) under different pH conditions. *Aquaculture International*, 27(5), 1331–1342.
- Ibáñez-Aguirre, A. L. (1993). Coexistence of *Mugil cephalus* and *Mugil curema* in a coastal lagoon in the Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, 42, 959–961.
- Imani, A., & Iranparast, R. (2010). Activity of digestive enzymes during food deprivation and refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Science and Technology*, 8(3), 24-33.
- Imran, M., Nazar, M., Saif, M., Khan, M. A., Sanullah, D., Vardan, M., & Javed, O. (2016). Role of Enzymes in Animal Nutrition: A Review. *PSM Veterinary Research*, 1(2), 38-45.
- Jacot, A. P. (1920). Age, growth and scale characters of the mullets, *Mugil cephalus* and *Mugil curema*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 39, 199–229.

- Jönsson, E., & Holmgren, S. (2011). Integrated function and control of the gut endocrine systems of the gut. In *Encyclopedia of Fish Physiology*, 2, 1341-1347.
- Kalhor, H., Zhou, J., Hua, Y., Ng, W. K., Ye, L., Zhang, J., & Shao, Q. (2018). Soy protein concentrate as a substitute for fish meal in diets for juvenile *Acanthopagrus schlegelii*: effects on growth, phosphorus discharge and digestive enzyme activity. *Aquaculture Research*, 49(5), 1896–1906.
- Karachle, P. K., & Stergiou, K. I. (2010). Intestine morphometrics of fishes: a compilation and analysis of bibliographic data. *Acta Ichthyol. Piscatoria*, 40(1), 45–54.
- Karasov, W. H., & Caviedes-Vidal, E. (2021). Adaptation of intestinal epithelial hydrolysis and absorption of dietary carbohydrate and protein in mammals and birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 253, 110860.
- Karasov, W. H., & Douglas, A. E. (2013). *Comparative Digestive Physiology*. *Comprehensive Physiology*, 3(2), 741-783.
- Karasov, W. H., & Martínez del Rio, C. (2007). *Physiological Ecology of Diet and Digestive Systems*. Princeton University Press.
- Karasov, W. H., Martínez del Rio, C., & Caviedes-Vidal, E. (2011). Ecological Physiology of Diet and Digestive Systems. *Annual Review of Physiology*, 73(1), 69-93.
- Kato, A., Nagashima, A., Hosono, K., & Romero, M. F. (2022). Membrane transport proteins expressed in the renal tubular epithelial cells of seawater and freshwater teleost fishes. *Frontiers in Physiology*, 13, 939114.
- Kelly, S. A., Panhuis, T. M., & Stoehr, A. M. (2012). Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance. In Y. S. Prakash (Ed.), *Comprehensive Physiology* (1st ed., pp. 1417-1439). Wiley.
- Kennish, M. J. (2019). *Ecology of Estuaries: Volume 1: Physical and Chemical Aspects*. CRC press.
- Kim, H. J., & Hong, J. H. (2023). Trafficking of carbonic anhydrase 12 and bicarbonate transporters by histamine stimulation mediates intracellular acidic scenario in lung cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 2247181.
- Kipanyula, M. J., Maina, K. W., & Maulilio Kipanyula, C. J. (2016). Morphological and adaptational changes associated with fish migration from fresh to marine

- water bodies. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(4), 125-129.
- Koven, W. M., Patiño, R., & Sullivan, C. V. (2019). Circulating levels of reproductive hormones and related gene expression during embryonic and larval development in a temperate bivalve, *Mytilus trossulus*. *General and Comparative Endocrinology*, 276, 15-26.
- Krogdahl Å & Bakke-McKellep AM (2005) Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *CompBiochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 141(4), 450–460.
- Kumar, A., Pradhan, P. K., Chadha, N. K., Mohindra, V., Tiwari, V. K., Sood, N., & Gisbert, E. (2019). Ontogeny of the digestive tract in stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45, 667-679.
- La Fleur, S. E., Fliers, E., & Kalsbeek, A. (2014). Neuroscience of glucose homeostasis. *Handbook of Clinical Neurology*, 126, 341–351.
- Lallès, J.P. (2020). Intestinal alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of fish: Biology, ontogeny, and environmental and nutritional modulation. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 555-581. <https://doi.org/10.1111/raq.12340>
- Lemos, V. M., Varela, A. S. Jr., Schwingel, P. R., Muelbert, J. H., & Vieira, J. P. (2014). Migration and reproductive biology of *Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) in South Brazil. *Journal of Fish Biology*, 85(3), 671–687.
- Li, E., Chen, L., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z., Chen, X., & Qin, J. G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274(1), 80-86.
- Li, W.-T., Chuang, Y.-H., & Hsieh, J.-F. (2019). Characterization of Maltase and Sucrase Inhibitory Constituents from *Rhodiola crenulata*. *Foods*, 8(11), 540.
- Li, X., Shen, Y., Bao, Y., Wu, Z., Yang, B., Jiao, L & Jin, M. (2022). Physiological responses and adaptive strategies to acute low-salinity environmental stress of the euryhaline marine fish black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Aquaculture*, 554, 738117.
- Lisboa, V., Barcarolli, I. F., Sampaio, L. A., & Bianchini, A. (2015). Effect of salinity on survival, growth and biochemical parameters in juvenile Lebranch mullet *Mugil liza* (Perciformes: Mugilidae). *Neotropical Ichthyology*, 13, 447-452.

- Little, A., Pasparakis, C., Stieglitz, J., & Grosell, M. (2023). Metabolic cost of osmoregulation by the gastro-intestinal tract in marine teleost fish. *Frontiers in Physiology*, 14, 1163153.
- Liu, C. Z., & Zhu, J. X. (2020). Source, metabolism and function of dopamine in digestive tract. *Sheng li xue bao:[Acta Physiologica Sinica]*, 72(3), 336-346.
- Lo Cascio P, Calabrò C, Bertuccio C, Paterniti I, Palombieri D, CalòM, Gabriella Denaro M (2017) Effects of fasting and refeeding on the digestive tract of zebrafish (*Danio rerio*) fed with Spirulina (*Arthrospira platensis*), a high protein feed source. *Nat Prod Res*, 31(13), 1478–1485.
- Lopez Mañanes AA, Asaro A, Méndez E, Michiels MS, Pinoni SA (2020) Digestive flexibility in *Neohelice granulata* from the Mar Chiquita Coastal Lagoon: characterization and modulation of key enzymes in hepatopancreas. *Cambridge Scholars Publishing*, 2, 255–274.
- Lopez, A. G., Duparc, C., Naccache, A., Castanet, M., Lefebvre, H., & Louiset, E. (2020). Role of mast cells in the control of aldosterone secretion. *Hormone and Metabolic Research*, 52(06), 412-420.
- López-Vásquez, K., Castro-Pérez, C. A., & Val, A. L. (2009). Digestive enzymes of eight Amazonian teleosts with different feeding habits. *Journal of Fish Biology*, 74(7), 1620–1628.
- Loretz, C. A. (2008). Extracellular calcium-sensing receptors in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149(3), 225-245.
- Lu DL, Ma Q, Wang J, Li LY, Han SL, Limbu SM, Du ZY (2019). Fasting enhances cold resistance in fish through stimulating lipid catabolism and autophagy. *Journal of Physiology*, 597(6), 1585–1603.
- Ma, F., Yang, Y., Jiang, M., Yin, D., & Liu, K. (2019). Digestive enzyme activity of the Japanese grenadier anchovy *Coilia nasus* during spawning migration: influence of the migration distance and the water temperature. *Journal of Fish Biology*, 95(5), 1311–1319.
- Ma, Z., Guo, H., Zheng, P., Wang, L., Jiang, S., Zhang, D., & Qin, J. G. (2016). Effect of salinity on the rearing performance of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*, 47(6), 1761-1769.
- Mai, A. C., Mino, C. I., Marins, L. F., Monteiro-Neto, C., Miranda, L., Schwingel, P. R., ... & Vieira, J. P. (2014). Microsatellite variation and genetic structuring in

- Mugil liza* (Teleostei: Mugilidae) populations from Argentina and Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 149, 80-86.
- Mamone, G., & Picariello, G. (2023). Optimized extraction and large-scale proteomics of pig jejunum brush border membranes for use in in vitro digestion models. *Food Research International*, 164, 112326.
- Marín-Juez R, Diaz M, Morata J, Planas JV (2013). Mechanisms regulating GLUT4 transcription in skeletal muscle cells are highly conserved across vertebrates. *PLoS ONE*, 8, e80628.
- McConnell, R. E., Benesh, A. E., Mao, S., Tabb, D. L., & Tyska, M. J. (2011). Proteomic analysis of the enterocyte brush border. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(5), G914-G926.
- Mentlein, R. (2004). Cell-surface peptidases. *International Review of Cytology*, 235, 165–213.
- Michiels, M. S., Daleo, G. R., & López Mañanes, A. A. (2020). Differential modulation after feeding in different salinities and response to abscisic acid (ABA) and extracellular Ca²⁺ of aminopeptidase N (APN) activity in the hepatopancreas of the intertidal euryhaline crab *Neohelice granulata*. *Canadian Journal of Zoology*, 98(4), 262-268.
- Michiels, M. S., del Valle, J. C., & Lopez Mañanes, A. A. (2015a). Biochemical characteristics and modulation by external and internal factors of aminopeptidase-N activity in the hepatopancreas of a euryhaline burrowing crab. *Journal of Comparative Physiology B*, 185, 501-510.
- Michiels, M. S., del Valle, J. C., & Mañanes, A. A. L. (2013). Effect of environmental salinity and dopamine injections on key digestive enzymes in hepatopancreas of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* (Decapoda: Brachyura: Varunidae). *Scientia Marina*, 77(1), 129-136.
- Michiels, M. S., del Valle, J. C., & Mañanes, A. A. L. (2015b). Lipase activity sensitive to dopamine, glucagon and cyclic AMP in the hepatopancreas of the euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). *Crustaceana*, 88(1), 51-65.
- Michiels, M. S., Del Valle, J. C., & Mañanes, A. A. L. (2017). Trypsin and N-aminopeptidase (APN) activities in the hepatopancreas of an intertidal euryhaline crab: Biochemical characteristics and differential modulation by histamine and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 204, 228-235.

- Miller, G. L. (1959). The Use of 3, 5-Dinitrosalicylic Acid in Reducing Sugar Quantification. *Analytical Chemistry*, 31, 462-428.
- Morelos-Castro, R. M., Román-Reyes, J. C., Luis-Villaseñor, I. E., Ramírez- Pérez, J. S., & Rodríguez-Montes de Oca, G. A. (2020). Expression analyses of digestive enzymes during early development and in adults of the Chame fish *Dormitator latifrons*. *Aquaculture Research*, 51(1), 265–275.
- Morse EJ (2019). Parr Going the Distance: How Migratory Difficulty Influences Red Muscle Lipid Storage in Juvenile *Oncorhynchus mykiss* (Doctoral dissertation, Portland State University).
- Mótyán J, Tóth F, Tózsér J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3, 923–942.
- Mozanzadeh, M. T., Safari, O., Oosooli, R., Mehrjooyan, S., Najafabadi, M. Z., Hoseini, S. J., ... & Monem, J. (2021). The effect of salinity on growth performance, digestive and antioxidant enzymes, humoral immunity and stress indices in two euryhaline fish species: Yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) and Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 534, 736329.
- Muñoz, D., Fuentes, R., Carnicero, B., Aguilar, A., Sanhueza, N., San-Martin, S., ... & Boltana, S. (2021). Viral infection drives the regulation of feeding behavior related genes in *Salmo salar*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11391.
- Navarro-Guillen, C., Yufera, M., and Perera, E. (2022). Biochemical features and modulation of digestive enzymes by environmental temperature in the greater amberjack, *Seriola dumerili*. *Frontiers in Marine Science*, 9, 960746. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.960746>.
- Nearing, J., Betka, M., Quinn, S., Hentschel, H., Elger, M., Baum, M., ... & Harris, H. W. (2002). Polyvalent cation receptor proteins (CaRs) are salinity sensors in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9231-9236.
- Nebo, C., Gimbo, R. Y., Kojima, J. T., Overturf, K., Dal-Pai-Silva, M., and Portella, M. C. (2018). Depletion of stored nutrients during fasting in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. *Journal of Applied Aquaculture*, 30(2), 157–173. <https://doi.org/10.1080/10454438.2017.1420516>.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the world*. John Wiley and Sons. Inc., Hoboken, NJ.
- Nemova, N. N., Kantserova, N. P., & Lysenko, L. A. (2021). The traits of protein metabolism in the skeletal muscle of teleost fish. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 57(3), 626-645.

- Nespolo RF, Fontúrbel FE, Mejias C, Contreras R, Gutierrez P, Oda E, Bozinovic F (2022). A mesocosm experiment in ecological physiology: The modulation of energy budget in a hibernating marsupial under chronic caloric restriction. *Physiological and Biochemical Zoology*, 95(1), 66–81.
- Noakes, M. J., & McKechnie, A. E. (2020). Phenotypic flexibility of metabolic rate and evaporative water loss does not vary across a climatic gradient in an Afrotropical passerine bird. *Journal of Experimental Biology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1242/jeb.220137>.
- Nolasco-Soria, H. (2021). Amylase quantification in aquaculture fish studies: A revision of most used procedures and presentation of a new practical protocol for its assessment. *Aquaculture*, 538, 736536.
- Odum, W. E. (1970). Utilization of the direct grazing and plant detritus food chains by the striped mullet *Mugil cephalus*. In *Marine Food Chains* (J. H. Steele, Ed.). University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 222–240.
- Oguchi, Y., Rolle, M., Mai, D., Tsai-Brown, C., Rott, K. H., Caviedes-Vidal, E., & Karasov, W. H. (2022). Macronutrient signals for adaptive modulation of intestinal digestive enzymes in two omnivorous Galliformes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 271, 111243.
- Oishi, K., Miyazaki, M., Takase, R., Chigwechokha, P. K., Komatsu, M., and Shiozaki, K. (2020). Regulation of triglyceride metabolism in medaka (*Oryzias latipes*) hepatocytes by Neu3a sialidase. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(2), 563–574. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00730-6>.
- Olson, B., Marks, D. L., & Grossberg, A. J. (2020). Diverging metabolic programmes and behaviours during states of starvation, protein malnutrition, and cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11(6), 1429-1446. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12630>.
- Patricia, J. J., & Dhamoon, A. S. (2019). Physiology, Digestion. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Pavasovic, A., Anderson, A. J., Mather, P. B., & Richardson, N. A. (2007). Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Research*, 38(6), 644-652. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01708.x>.
- Peitsaro, N., Sundvik, M., Anichtchik, O. V., Kaslin, J., & Panula, P. (2007). Identification of zebrafish histamine H1, H2, and H3 receptors and effects of

- histaminergic ligands on behavior. *Biochemical Pharmacology*, 73(8), 1205-1214.
- Peng, T., Wang, D., Yu, Y., Liu, C., & Zhu, B. (2015). Identification and expression of an ecdysteroid-responsive amylase from red crayfish *Procambarus clarkii*. *Fisheries Science*, 81, 345–352.
- Perera, E., Rodríguez-Viera, L., Perdomo-Morales, R., Montero-Alejo, V., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., & Mancera, J. M. (2015). Trypsin isozymes in the lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804): From molecules to physiology. *Journal of Comparative Physiology B*, 185(1), 17-35.
- Pérez-Sirkin, D. I., Solovyev, M., Delgadin, T. H., Herdman, J. E., Miranda, L. A., Somoza, G. M., ... & Gisbert, E. (2020). Digestive enzyme activities during pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) ontogeny. *Aquaculture*, 524, 735151.
- Piersma, T., & Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), 228-233. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00036-3).
- Pirahanchi, Y., & Sharma, S. (2019). Biochemistry, Lipase. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537346/>.
- Polakof, S., Mommsen, T. P., & Soengas, J. L. (2011). Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 160, 123–149. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.006>.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 182, 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>.
- Pollock, H. S., Brawn, J. D., Agin, T. J., & Cheviron, Z. A. (2019). Differences between temperate and tropical birds in seasonal acclimatization of thermoregulatory traits. *Journal of Avian Biology*, 50(4), jav.02067. <https://doi.org/10.1111/jav.02067>.
- Potter, I. C., Chuwen, B. M., Hoeksema, S. D., & Elliott, M. (2010). The concept of an estuary: a definition that incorporates systems which can become closed to the ocean and hypersaline. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87(3), 497-500.
- Pradhan, P. K., Jena, J., Mitra, G., Sood, N., & Gisbert, E. (2013). Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae. *Aquaculture*, 372, 62-69.

- Prisco, A. R., De La Rosa, S. B. G., & Astrarloa, J. M. D. D. (2001). Feeding ecology of flatfish juveniles (Pleuronectiformes) in Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Estuaries*, 24, 917-925.
- Pujante Rodríguez I, Moyano FJ, Martos-Sitcha JA, Mancera JM, Martínez-Rodríguez G (2018). Efecto de diferentes salinidades en la expresión génica y actividad de las enzimas digestivas en la liseta (*Chelon labrosus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(1), 349–373.
- Pujante, I. M. (2019). Fisiología y bioquímica digestiva de la liseta (*Chelon labrosus*). <https://rodin.uca.es/handle/10498/21268>.
- Pujante, I. M., Martos-Sitcha, J. A., Moyano, F. J., Ruiz-Jarabo, I., Martínez-Rodríguez, G., & Mancera, J. M. (2015). Starving/re-feeding processes induce metabolic modifications in thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 180, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.10.005>.
- Qi, H., Zhang, Z., Zhang, X., Li, B., & Li, L. (2021). Two Dipeptide-Bound Pyrrolines with Ile or Ala: A Study on Their Synthesis, Transport across Caco-2 Cell Monolayers, and Interaction with Aminopeptidase N. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(37), 10962-10973.
- Radman, D. P., McCudden, C., James, K., Nemeth, E. M., & Wagner, G. F. (2002). Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 186(1), 111-119.
- Ramirez-Otarola, N., Narváez, C., & Sabat, P. (2011). Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds: Dietary and phylogenetic correlates. *Journal of Comparative Physiology B*, 181(6), 817-827. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0557-3>
- Ramirez-Otarola, N., Naya, D. E., & Sabat, P. (2018). Seasonal changes in digestive enzymes in five bird species. *Canadian Journal of Zoology*, 96(7), 707-712. <https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0350>
- Ramsay, P. T., & Carr, A. (2011). Gastric acid and digestive physiology. *Surgical Clinics*, 91(5), 977-982.
- Rawlings, N. D. (2013). Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In *Proteases: Structure and Function* (pp. 1-36). Springer Vienna.
- Ribble, D. O., & Smith, M. H. (1983). Relative intestine length and feeding ecology of freshwater fishes. *Growth*, 47(3), 292.

- Rodríguez-Viera, L., Alpízar-Pedraza, D., Mancera, J. M., & Perera, E. (2021). Toward a More Comprehensive View of α -Amylase across Decapods Crustaceans. *Biology*, 10(10), 947.
- Ruiz-Jarabo, I., Fuentes, J., & Mancera, J. M. (2019). Osmoregulation. In *The Biology of Sole* (pp. 354-374). CRC Press.
- Salem M, Silverstein J, Rexroad CE, Yao J (2007) Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics*, 8, 328.
- Salhi, A., Carriere, F., Grundy, M. M.-L., & Aloulou, A. (2021). Enzymes Involved in Lipid Digestion. En M. M.-L. Grundy & P. J. Wilde (Eds.), *Bioaccessibility and Digestibility of Lipids from Food* (pp. 3-28). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-56909-9_1
- Sánchez Rueda, P. (2002). Stomach content analysis of *Mugil cephalus* and *Mugil curema* (Mugiliformes: Mugilidae) with emphasis on diatoms in the Tamiahua lagoon. Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 50, 245–252.
- Sánchez-Hernández, J., Nunn, A. D., Adams, C. E., & Amundsen, P. A. (2019). Causes and consequences of ontogenetic dietary shifts: a global synthesis using fish models. *Biological Reviews*, 94(2), 539-554.
- Sander, L. E., Lorentz, A., Sellge, G., Coeffier, M., Neipp, M., Veres, T., ... & Bischoff, S. C. (2006). Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut*, 55(4), 498-504.
- Sandre, L. C. G., Buzollo, H., Neira, L. M., Nascimento, T. M. T., Jomori, R. K., & Carneiro, D. J. (2017). Growth and energy metabolism of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed diets with different levels of carbohydrates and lipids. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 8,1–8.
- Sangiao-Alvarellos, S., Arjona, F. J., del Río, M. P. M., Míguez, J. M., Mancera, J. M., & Soengas, J. L. (2005). Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Biology*, 208(22), 4291-4304.
- Sanz, A., Furné, M., Hidalgo, M. C., Domezain, A., & García-Gallego, M. (2015). Growth and digestive enzymatic profile of *Acipenser naccarii* and *Oncorhynchus mykiss* fed on different dietary macronutrient levels. A comparative study. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6,1–6.
- Sarma, K. A. M. A. L., Dey, A., Kumar, S., Chaudhary, B. K., Mohanty, S., Kumar, T., ... & Bhatt, B. P. (2020). Effect of salinity on growth, survival and

- biochemical alterations in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton 1822). *Indian Journal of Fisheries*, 67, 41-7.
- Schubert, H., Telesh, I., Nikinmaa, M., & Skarlato, S. (2017). Physiological adaptations. *Biological oceanography of the Baltic Sea*, 255-278.
- Seale, A. P., & Breves, J. P. (2022). Endocrine and osmoregulatory responses to tidally-changing salinities in fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 326, 114071.
- Secor SM & Lignot JH (2010) Morphological plasticity of vertebrate aestivation. *Aestivation*, 183–208.
- Secor SM (2005) Physiological responses to feeding, fasting and estivation for anurans. *Journal of Experimental Biology*, 208(13), 2595–2609.
- Secor, S. M., & Carey, H. V. (2016). Integrative physiology of fasting. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 773-825.
- Serna-Duque, J. A., & Esteban, M. Á. (2020). Effects of inflammation and/or infection on the neuroendocrine control of fish intestinal motility: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 103, 342-356.
- Shad, M., Hussain, N., Usman, M., Akhtar, M. W., & Sajjad, M. (2023). Exploration of computational approaches to predict the structural features and recent trends in α -amylase production for industrial applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(8), 2092-2116.
- Shan XJ, Cao L, Huang W, Dou SZ (2008) Feeding, morphological changes and allometric growth during starvation in miiuy croaker larvae. *Chinese Fishes*. Springer, Dordrecht, pp 121–130
- Shen L, Guan F, Yuan Y (2021) Fasting affects the intestine and bacterial flora in mudskippers (*Boleophthalmus pectinirostris*) in semi-aquatic and underwater conditions. *Aquaculture*, 533, 736162.
- Small, B. C. (2022). Chapter 8—Nutritional physiology. En R. W. Hardy & S. J. Kaushik (Eds.), *Fish Nutrition (Fourth Edition)* (pp. 593-641). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819587-1.00007-0>
- Soengas, J. L., Cerdá-Reverter, J. M., & Delgado, M. J. (2018). Central regulation of food intake in fish: an evolutionary perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(4), R171-R199.

- Soengas, J. L., Sangiao-Alvarellos, S., Laiz-Carrión, R., & Mancera, J. M. (2019). Energy metabolism and osmotic acclimation in teleost fish. In *Fish osmoregulation* (pp. 277-307). CRC Press.
- Soloviev, M., Veklich, T., & Kozyritskiy, O. (2018). Seasonal changes in the intestinal pH in cyprinids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 215, 53-58.
- Solovyev, M. M., Izvekova, G. I., Kashinskaya, E. N., & Gisbert, E. (2018). Dependence of pH values in the digestive tract of freshwater fishes on some abiotic and biotic factors. *Hydrobiologia*, 807, 67-85.
- Solovyev, M. M., Kashinskaya, E. N., Rogozhin, E. A., & Moyano, F. J. (2021). Seasonal changes in kinetic parameters of trypsin in gastric and agastric fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 47, 381-391.
- Solovyev, M., Kashinskaya, E., & Gisbert, E. (2023). A meta-analysis for assessing the contributions of trypsin and chymotrypsin as the two major endoproteases in protein hydrolysis in fish intestine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 278, 111372.
- Steinberg, C. E. W. (2018). Diets and Digestive Tracts – ‘Your Food Determines Your Intestine’. En C. E. W. Steinberg, *Aquatic Animal Nutrition* (pp. 9-59). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91767-2_2
- Su, M., Liu, N., Zhang, Z., & Zhang, J. (2022). Osmoregulatory strategies of estuarine fish *Scatophagus argus* in response to environmental salinity changes. *BMC Genomics*, 23(1), 545.
- Tamadoni, R., Naisi Bahabadi, M., Morshedi, V., Bagheri, D., Tori Mozanzadeh, M. (2020). Effect of short-term fasting and re-feeding on growth, digestive enzyme activities and antioxidant defence in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Houttuyn, 1782). *Aquaculture Research*, 51(4), 1437–1445.
- Tannous, S., Stellbrinck, T., Hoter, A., & Naim, H. Y. (2023). Interaction between the α -glucosidases, sucrase-isomaltase and maltase-glucoamylase, in human intestinal brush border membranes and its potential impact on disaccharide digestion. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1160860.
- Thomson, J. M. (1997). The Mugilidae of the world. *Memoirs of the Queensland Museum*, 41, 457–562.

- Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, C. S., Shukla, K., Singh, R. K., Singh, P., ... & Sharma, R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J Global Biosci*, 4(1), 1886-1901.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11, 107–184.
- Toutou, M., & Farrag, M. (2023). Effect of carbohydrates and crude protein levels in diets on the growth performance of sea bream, *Sparus aurata* fingerlings. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 27(1), 1-8.
- Tran, C. D., Cool, J., & Xian, C. J. (2011). Dietary zinc and metallothionein on small intestinal disaccharidases activity in mice. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 17(3), 354.
- Turan, C. (2016). Biogeography and distribution of Mugilidae in the Mediterranean and the Black Sea, and North-East Atlantic. *Biology, ecology and culture of grey mullets (Mugilidae)*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 116-127.
- Tsuzuki, M. Y., Sugai, J. K., Maciel, J. C., Francisco, C. J., & Cerqueira, V. R. (2007). Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*, 271(1-4), 319-325.
- Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Álvarez-González, C. A., Moyano, F. J., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, G. E., ... & Indy, J. R. (2011). Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 667-680.
- Venerito, M., & Malfertheiner, P. (2010). Interaction of *Helicobacter pylori* infection and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in gastric and duodenal ulcers. *Helicobacter*, 15(4), 239-250.
- Vidal, N., González-Bergonzoni, I., & Naya, D. E. (2019). The effect of fasting on nutritional status, organs size and isotopic composition in a Neotropical fish species (*Jenynsia multidentata*). *Hydrobiologia*, 828, 73-82.
- Vieira, J. P. (1991). Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in the estuary of Lagoa dos Patos, RS, Brazil. *Copeia*, 1991, 409–418.
- Vieira, J. P., & Scalabrin, C. (1991). Migração reprodutiva da “tainha” (*Mugil platanus* Gunther, 1980) no sul do Brasil. *Atlantica*, 13(1), 131–141.
- Volkof H, Rønnestad I (2020) Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature*, 7(4), 307–320.

- Wang, L., Caviedes-Vidal, E., & Karasov, W. H. (2019). Diet composition modulates intestinal hydrolytic enzymes in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Journal of Mammalogy*, 100(5), 1512-1521.
- Wang, T., Hung, C. C., & Randall, D. J. (2006). The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. *Annual Review of Physiology*, 68, 223-251.
- Wang, W., Wu, X., Liu, Z., Zheng, H., Cheng, Y. (2014). Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: Gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. *PLOS ONE*, 9, 1-15.
- Wang, Y.Z., Sun, J.F., Lv, A.J., Zhang, S.L., Sung, Y.Y., Shi, H.Y., and Xing, K.Z. (2018). Histochemical distribution of four types of enzymes and mucous cells in the gastrointestinal tract of reared half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *Journal of Fish Biology*, 92(1), 3–16.
- Whitfield, A.K., Panfili, J., & Durand, J.D. (2012). A global review of the cosmopolitan flathead mullet (*Mugil cephalus* Linnaeus 1758) (Teleostei: Mugilidae), with emphasis on the biology, genetics, ecology and fisheries aspects of this apparent species complex. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 22(3), 641–681. doi:10.1007/s11160-012-9263-9.
- Williams, J. A. (2019). Amylase. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- Wood, C. M., & Bucking, C. (2011). The role of feeding in salt and water balance. In: *The Multifunctional Gut of Fish, Fish Physiology*, Vol. 30 (ed. M. Grosell, A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 165-212. Amsterdam: Academic Press.
- Xie, D., Yang, L., Yu, R., Chen, F., Lu, R., Qin, C., & Nie, G. (2017). Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 479, 696–703.
- Xiong, Y., Huang, M., Zhou, Y., Chen, X., Yang, J., Wang, F., & Dong, S. (2020). Growth, osmoregulation and energy budget of rainbow and steelhead trout under different salinity acclimation methods and the best transition size of steelhead trout. *Aquaculture Research*, 51(6), 2369-2378.
- Yang, L., Zhi, S., Yang, G., Qin, C., Yan, X., Niu, M., & Nie, G. (2021). Molecular identification of GLUT4: the responsiveness to starvation, glucose, insulin, and glucagon on glucose transporter 4 in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Fish Biology*.

- Yang, M., Deng, K., Pan, M., Gu, Z., Liu, D., Zhang, Y., Zhang, W., & Mai, K. (2019). Glucose and lipid metabolic adaptations during postprandial starvation of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) previously fed different levels of dietary carbohydrates. *Aquaculture*, 501, 416-429.
- Yúfera, M., Moyano, F. J., Astola, A., Pousão-Ferreira, P., & Martínez-Rodríguez, G. (2012). Acidic Digestion in a Teleost: Postprandial and Circadian Pattern of Gastric pH, Pepsin Activity, and Pepsinogen and Proton Pump mRNAs Expression. *PLoS ONE*, 7(3), e33687.
- Zaefarian A, Yeganeh S, Ouraji H (2020) The Effects of starvation and refeeding on growth and digestive enzymes activity in Caspian brown trout (*Salmo caspius* Kessler, 1877) fingerlings. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(3), 1111–1129.
- Zaldúa N, Naya DE (2014) Digestive flexibility during fasting in fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 169, 7–14.
- Zhang, H., Freitas, D., Kim, H. S., Fabijanic, K., Li, Z., Chen, H., ... & Lyden, D. (2018). Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 332-343.
- Zhao, J., Prchal, M., Kause, A., Vandeputte, M., Gela, D., Kroupová, H. K., ... & Kocour, M. (2021). The role of energy reserves in common carp performance inferred from phenotypic and genetic parameters. *Aquaculture*, 541, 736799.
- Zheng, L. F., Liu, S., Zhou, L., Zhang, X. L., Yu, X., & Zhu, J. X. (2021). Dopamine and gastrointestinal motility. *Dopamine in the Gut*, 133-202.
- Zhong, Q.-M., Zheng, Y.-H., & Wang, J.-L. (2023). Seasonal flexibility of the gut structure and physiology in *Eremias multiocellata*. *Journal of Comparative Physiology B*, 193(3), 281-291.
- Zhou YL, He GL, Jin T, Chen YJ, Dai FY, Luo L, Lin SM (2021) High dietary starch impairs intestinal health and microbiota of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 534, 736261.
- Zhou, L., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, M. S., and Dave, D. (2011). Extraction, purification and characterization of fish chymotrypsin: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3), 104–123.
- Zhu, W., Zhang, M., Chang, L., Zhu, W., Li, C., Xie, F & Jiang, J. (2019). Characterizing the composition, metabolism and physiological functions of the fatty liver in *Rana omeimontis* tadpoles. *Frontiers in zoology*, 16(1), 1-17.