

Control de la Digestión en Camarones

Olimpia Carrillo y Rolando González

Grupo de Biotecnología Marina, Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana, Cuba, Tel:(537) 30 98 21
olimpia@comuh.uh.cu

Introducción

Los organismos vivos poseen una intrincada red de sistemas de control a corto, mediano y largo plazo que les permite coordinar sus actividades a todos los niveles de organización. El control del proceso de la digestión se logra por la síntesis o alteración de gran variedad de sustancias que a menudo son componentes integrales de los propios procesos que controlan.

El control a largo plazo está representado por la síntesis de enzimas y hormonas que intervienen en el proceso digestivo. El control a corto plazo está regulado por alteraciones estructurales o conformacionales de las enzimas digestivas del hepatopáncreas. El conocimiento de los mecanismos de control de un proceso permite en cierta medida su modificación para lograr objetivos concretos.

Control a largo plazo

Los cambios en la cantidad de enzimas en las células pueden ser considerados como mecanismos de regulación a largo plazo. El aumento de la velocidad de síntesis de una enzima u otra proteína por una hormona, es llamado: inducción.

La producción de enzimas en el hepatopáncreas de los crustáceos se encuentra controlada por hormonas del pedúnculo ocular (Cecaldi, 1989). La 20-OH ecdisona estimula la síntesis proteica y la síntesis de RNA en este órgano, Favrel y Van Wormhoudt (1986) demostraron que la gastrina también estimula la síntesis proteica en el hepatopáncreas del *Palaemon serratus*. La síntesis de enzimas digestivas en el hepatopáncreas de peneidos ha sido estudiada mediante técnicas de biología molecular (técnicas inmunocitoquímicas, hibridación *in situ* y otras). La síntesis de amilasa y quimotripsinas fue localizada en las células tipo F del hepatopáncreas en *P. vannamei* por Van Wormhoudt *et al.* (1995), la cantidad de mRNA de quimiotripsina y la actividad de la enzima experimentaron variaciones durante diferentes etapas del ciclo de la muda en esta especie. Watanabe *et al.*, (1996) estudiaron un cDNA que codificaba para una quitinasa en *Penaeus japonicus* y detectaron transcripción de mRNA en el hepatopáncreas. Le Boulay, Van Wormhoudt y Sellos (1996) clonaron y secuenciaron dos cDNAs que codificaban para precursores de proteasas cisteíno dependientes del hepatopáncreas de *Penaeus vannamei*. Durante la intermuda se encontró correlación entre la actividad de las proteasas cisteíno y los niveles de mRNA. Se han informado adaptaciones de la actividad enzimática en el hepatopáncreas de camarones peneidos por el ayuno, el tamaño de los camarones, la fuente de proteína de la dieta y el nivel de proteína.

Carrillo F. O. y R. González. 2000. Control de la digestión en camarones. pp 138-148 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Symposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

La inducción específica de enzimas proteolíticas puede ser debida a la calidad proteica de la dieta como observaron Le Moullac, Van Wormhoudt y AQUACOP (1994).

Control a corto plazo

Enzimas digestivas en camarones:

La actividad catalítica de las enzimas está regulada por el control de la disponibilidad de las enzimas o mediante el control de la actividad enzimática .

Carbohidrasas.

Entre las carbohidrasas se han detectado α y β -amilasas, α y β -glucosidasas, α y β -galactosidasas, β -fructofuranosidasa, α manosidasa, α -xilosidasa, α -fucosidasa, quitobiasa, laminaranasa, quitinasa, celulasa, β -glucosaminidasa, β -glucuronidasa, xilanasas y rafinasa.

La actividad amilolítica es de gran importancia para los crustáceos que son herbívoros. Van Wormhoudt (1980) observó que esta enzima es más importante en *Palaemon serratus* que la actividad proteolítica. Algunas de estas enzimas han sido detectadas en un número limitado de especies (α - y β -galactosidasas, quitobiasa, α -fucosidasa, laminaranasa, α -manosidasa y β -glucuronidasa), incluso en una sola especie de decápodo (β -glucosaminidasa, xilanasas y α -xilosidasa) (Gibson y Barker, 1979). En muchos casos, se ha informado la presencia de algunas de estas enzimas porque se ha observado que extractos de hepatopáncreas son capaces de hidrolizar sustratos sobre los que también pueden actuar otras carbohidrasas; tal es el caso de la rafinasa que hidroliza la rafinosa, pero ésta también puede ser hidrolizada por la α -galactosidasa y la β -fructofuranosidasa, la última bien representada en los decápodos (Gibson y Barker, 1979). En otras enzimas, como la celulasa que es muy rara en el reino animal, la función no está muy clara, toda vez que la celulosa es el componente mayoritario en la dieta de los herbívoros y los decápodos tienen hábitos carnívoros u omnívoros, por lo que se piensa que la fuente de esta enzima sea exógena (microorganismos simbiotes que viven en el hepatopáncreas). Aunque Yokoe y Yasumasu (1964) mostraron, en *Procambarus clarkii*, que existe una considerable actividad celulásica en fracciones microsomales aisladas del hepatopáncreas y notaron que la actividad de la celulasa de bacilos gram negativos que vivían en el tracto digestivo de *Procambarus clarkii* era mucho menor que la obtenida de extracto del hepatopáncreas. Los trabajos que han estudiado las carbohidrasas con mayor profundidad, mediante su purificación y caracterización, la determinación del peso molecular, punto isoeléctrico (PI) y pH óptimo, desafortunadamente son pocos y sólo en la última década han cobrado una mayor atención. En *Palaemon serratus*, han sido detectadas la α -glucosidasa con un pH óptimo de 5.0 y un peso molecular de 65000 y la β -glucuronidasa con un pH óptimo de 6.0 y tres isoformas de 235000, 275000 y 320000 Da (Trellu y Ceccaldi, 1977).

Penaeus japonicus y *Penaeus monodon* son dos de los decápodos en los que se han estudiado con mayor profundidad algunas de estas enzimas, α - y β -glucosidasas, β -galactosidasa y β -manosidasa para el primero, y α -manosidasa y α -fucosidasa para el segundo. En *Penaeus japonicus*, la α -glucosidasa es monomérica con un peso molecular de 105000 Da, PI de 3.8 y pH óptimo de 5.0 (Chuang *et al.*, 1992b), mientras que la β -glucosidasa presentó dos formas (unida a la membrana y libre) ambas monoméricas con un

peso molecular de 65000 Da, PI de 6.6 y 7.5 y pH óptimo de 5.5 y 4.5 respectivamente (Chuang *et al.*, 1992a). Por otra parte, la β -galactosidasa purificada por Chuang *et al.* (1991a) es una enzima dimérica, cada monómero tiene un peso molecular de 66000 Da y la enzima activa de 140000 Da, su PI es de 4.6 y el pH óptimo de 5.5. Chuang y Yang (1991) plantearon que el monómero de la β -manosidasa de *Penaeus japonicus* tiene un peso molecular de 31000 Da con un PI de 5.6 y un pH óptimo de 5.0, mientras que en *Penaeus monodon* Chuang *et al.* (1992c) purificaron una α -manosidasa con un peso molecular de 251000 Da, formada por un sólo tipo de monómero, un poco mayor que el de *Penaeus japonicus*, de 51000 Da. Su PI es de 4.4 y su pH óptimo de 4.0.

La α -fucosidasa de *Penaeus monodon* tiene un peso molecular de 233000 Da (su forma activa), un PI entre 8.4 y 8.6 y un pH óptimo de 5.5 (Chuang *et al.*, 1991b). Todavía se necesita trabajar mucho en la identificación y caracterización de las carbohidrasas, así como en su origen y función fisiológica. Omondi y Stark (1996) determinaron la capacidad de homogenados de hepatopáncreas para hidrolizar 27 carbohidratos que contenían una gran variedad de enlaces diferentes. El trabajo aporta un método para el estudio de la digestibilidad *in vitro* de carbohidratos y datos sobre las posibilidades de degradación de diferentes enlaces glicosídicos.

Lipasas y esterasas.

La presencia de una verdadera lipasa (glicerol-éster hidrolasa E.C.3.1.1.3) en crustáceos sólo ha sido demostrada en *Homarus americanus* (adultos) por Brockerhoff *et al.* (1967) y en larvas por Biesiot y Capuzzo (1990). En adultos, Brockerhoff *et al.* (1967) informaron la digestión del triglicérido trioleína por el jugo gástrico de este decápodo a pH 4.7. En un trabajo posterior Brockerhoff *et al.* (1970) plantearon que la hidrólisis de la tributirina a pH 6.5 y de la trioleína a pH 7.5 por el jugo gástrico de *Homarus americanus* estaba relacionado con una verdadera lipasa y que ésta tenía un peso molecular de 43000 Da. También Biesiot y Capuzzo (1990) utilizaron trioleína para determinar la actividad de la lipasa en larvas y registraron la liberación de ácidos grasos (ácido oleico), el pH óptimo de esta lipasa es de 5.5. No obstante, otras enzimas pueden ser las responsables de la actividad lipolítica registrada en los crustáceos, tales como carboxilesterasas o esterasas, enzimas que tienen una especificidad más amplia que la verdadera lipasa.

Trellu y Ceccaldi (1977) afirmaron que en *Palaemon serratus* no existe una verdadera lipasa, aunque encontraron dos esterasas. Recientemente Deering, Hewitt y Brock (1996) evaluaron la actividad lipolítica del intestino medio de *Penaeus monodon* para lo cual utilizaron trioleína como sustrato. La hidrólisis *in vitro* de la trioleína a pH 8.0 produjo 1,2 -diacilglicerol y ácidos grasos libres como únicos productos de hidrólisis. La especificidad de las lipasas de *P. monodon* es similar a la de la lipasa pancreática de vertebrados y a la de *Homarus americanus*.

Proteinasas y peptidasas.

Se le ha dado mucha importancia al estudio de las proteinasas y peptidasas en los crustáceos, principalmente en las especies de importancia económica como son los decápodos que se cultivan.

Una revisión muy amplia de la presencia de estas enzimas en los crustáceos fue presentada por Gibson y Barker (1979) y específicamente en camarón por Dall (1991). La detección y caracterización de estas enzimas se ha abordado de diferentes formas. En muy pocos casos, estos estudios se han realizado mediante la purificación de las enzimas (Galgani *et al.*, 1985; Honjo *et al.*, 1990; Iida *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1991; Tsai *et al.*, 1991; Van Wormhoudt *et al.*, 1992). En la mayoría, solo se ha detectado la presencia de las enzimas en extractos crudos utilizando sustratos sintéticos e inhibidores específicos para cada una de ellas. Los autores concuerdan en que el contenido de proteinasas serínicas en el hepatopáncreas es muy alto (Tsai *et al.*, 1986a), aunque también se plantea la presencia de algunas metalo-proteinasas (García-Carreño *et al.*, 1994). Una de las proteinasas serínicas ha sido caracterizada como una típica tripsina (Gates y Travis, 1969; Zwilling y Nuerath, 1981), y es una de las más importantes para los decápodos.

En *Penaeus japonicus* y *Penaeus kerathurus*, esta enzima representa entre el 40-50% de la proteólisis total (Galgani *et al.*, 1984), mientras que en *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus penicillatus*, *Metapenaeus monoceros* y *Euphasia superba* es responsable del 50-60% (Tsai *et al.*, 1986a) y del 33% en *Uca pugilator* (Eisen y Jeffry, 1969). En la detección de actividad tipo tripsina en el hepatopáncreas de diferentes decápodos se han utilizado sustratos sintéticos tales como *p*-toluen- sulfonil-L-arginina-metil-éster (TAME), N-benzoil-L-arginina-etil-éter (BAEE), N, β -benzoil-arginina-*p*-nitroanilina (BapNA) y N-benzoil-L-arginina naftilamida (BANA), en todos los casos con resultados positivos. También se han empleado inhibidores sintéticos y naturales específicos para la tripsina. En *Penaeus japonicus*, la hidrólisis de TAME es afectada por fluoruro de sulfonil fenilmetilo (PMSF), N-tosil-lisina-clorometil cetona (TLCK), inhibidor de Kunitz de la soya (SBTI), donde los dos primeros son específicos para la tripsina y el tercero específico para proteinasas serínicas, mientras que el N-tosil-fenilalanina-clorometil cetona (TPCK) (específico de quimotripsina) y el 1,10-fenantrolina (1,10-Phe agente quelante) no tuvieron efecto inhibitorio (Galgani *et al.*, 1985).

En *Penaeus californiensis*, el TLCK, PMSF y SBTI inhibieron entre un 40-60% la actividad proteolítica de un extracto de hepatopáncreas (Vega- Villasante *et al.*, 1995), cuando se utilizó un sustrato específico para tripsina, como el TAME, el SBTI produjo una inhibición total (99%). La tripsina purificada por cromatografía de afinidad presentó un peso molecular de 25000 Da por electroforesis en gel de poliacrilamida con el agente desnaturizante sodio dodecil sulfato (SDS- PAGE) en *Penaeus japonicus* (Galgani *et al.*, 1985), mientras que en *Panulirus japonicus*, Galgani y Nagayama (1987) encontraron actividad tipo tripsina cuyo peso molecular era de 24000 Da en un pico de actividad proteolítica obtenido por filtración en gel.

En *Penaeus monodon*, Tsai *et al.* (1986b) después de una cromatografía en DEAE-celulosa encontraron dos picos grandes con actividad tipo quimotripsina que eluían antes de los picos con actividad de tripsina, y cuyos pesos moleculares por SDS-PAGE fueron de 27000 Da y 26000 Da respectivamente. Por otra parte, Hernández-Cortéz (1997) encontraron en *Penaeus vannamei* una sola fracción con actividad tipo quimotripsina después de una cromatografía de intercambio iónico seguida por otra de interacción hidrofóbica. En SDS-PAGE bajo condiciones desnaturizantes con DL-ditiotreitol (DTT) o β -mercaptoetanol esta "quimotripsina" se presentó como un monómero con un peso molecular de 33200 Da, lo que difiere del que habían informado previamente Van Wormhoudt *et al.* (1992) también para

Penaeus vannamei que fue de 25000 Da. mientras que el peso molecular deducido de la secuencia aminoacídica es de 23800 Da (Sellos y Van Wormhoudt, 1992).

Los sitios de hidrólisis de las "quimotripsinas" de *Penaeus monodon* sobre la insulina bovina oxidada, sugieren que la especificidad por el enlace peptídico es similar a la quimotripsina de cangrejo *Uca pugilator* (Grant y Eisen, 1980), ya que prefieren los enlaces del lado carboxilo de Tyr, Phe, Leu y en menor grado Lis, Arg y Glu. (Tsai *et al.*, 1986b). Con sustratos específicos pequeños, mostraron una mayor especificidad por los aromáticos. Además ambas "quimotripsinas" tienen mayor preferencia por los sustratos sintéticos pequeños de cadena extendida. Esta pudiera ser la causa de los intentos fallidos de detectar la actividad tipo quimotripsina por esta vía.

También se han utilizado inhibidores específicos sintéticos y naturales para detectar la presencia de actividad tipo quimotripsina. Tsai *et al.* (1986b) mostraron que el PMFS y el carbobenzoxi-alanina- glutamato-fenilalanina-clorometil cetona (ZAGPCK) inhibieron efectiva e irreversiblemente los dos picos de quimotripsina de *Penaeus monodon*, sin embargo el TPCK, el carbobenzoxi-fenilalanina-clorometil cetona (ZPCK) y el ácido fenilborónico, inhibidores de la quimotripsina bovina, no tuvieron efecto. Entre los naturales, encontraron que el SBTI, el de la clara de huevo de pollos y pavos y el inhibidor pancreático de la tripsina bovina (BPTI) sí fueron efectivos inhibiendo la actividad de las quimotripsinas. En *Pleurocondes planipes* y *Pacifastacus astacus* (García-Carreño *et al.*, 1994), los resultados concuerdan parcialmente.

La hidrólisis del succinil- alanina-fenilalanina-p-nitroanilina (SAPNA) por extractos de ambas especies no fue muy sensible al inhibidor de la tripsina TLCK ni al de la quimotripsina PCK, sin embargo el ZPCK fue muy efectivo. El estudio de la presencia de una verdadera quimotripsina fue abordado por Hernández-Cortéz (1997) en *Penaeus vannamei*, quien después de purificar una enzima que exhibía actividad tipo quimotripsina, procedió a la secuenciación de los primeros 30 aminoácidos, donde encontró una gran similitud con un trabajo previo realizado en la misma especie por Sellos y Van Wormhoudt (1992) y un 93% de homología con una "proteasa colagenolítica" del cangrejo *Uca pugilator* (Tsu y Craik, 1996). Las proteasas serínicas han sido el grupo de enzimas más investigado. Se han aislado de diferentes fuentes y ellas muestran una marcada similitud en la estructura primaria y terciaria y poseen mecanismos catalíticos comunes (Blow *et al.*, 1969; Shotton y Watson, 1970; Woodbury *et al.*, 1978). Sin embargo, se ha descrito un nuevo grupo de proteasas serínicas que, a diferencia de las del páncreas de mamíferos, son capaces de hidrolizar la hélice triple del colágeno nativo en condiciones fisiológicas. Estas enzimas han sido llamadas "proteasas colagenolíticas" (Eisen *et al.*, 1973; Grant *et al.*, 1983; Yoshinaka *et al.*, 1986). Las verdaderas colagenasas (EC 3.4.24.7) son metalo-proteasas que degradan el colágeno nativo en condiciones fisiológicas, pero no son capaces de hidrolizar el colágeno desnaturalizado u otras proteínas nativas (Wooley *et al.*, 1978).

La principal diferencia con las proteasas colagenolíticas radica en la estructura de los centros activos (Sakharov *et al.*, 1994). Se han reconocido proteasas serínicas que poseen la capacidad de degradar el colágeno nativo en el camarón *Penaeus monodon* (Lu *et al.*, 1990; Tsai *et al.*, 1991). Como ha ocurrido con las otras endopeptidasas, el estudio de las "proteasas colagenolíticas" de los crustáceos se ha basado en el empleo de sustratos naturales y sintéticos y de inhibidores naturales y sintéticos de proteasas serínicas en general y específicos de tripsina y quimotripsina para poder establecer si la actividad encontrada se

debe a la presencia de una verdadera colagenasa o si es producto de una amplia especificidad de la tripsina y quimotripsina que incluye su acción sobre sustratos nativos.

En *Penaeus monodon*, Chen *et al.* (1991), utilizando ZAGPCK, un potente inhibidor de la quimotripsina de camarones, encontraron que el 73% de la actividad de la quimotripsina fue inhibida, mientras que la actividad colagenolítica se redujo en un 26%. Cuando emplearon TLCK, obtuvieron un 37% de inhibición de la hidrólisis de colágeno. Al probar SBTI encontraron que la actividad de tripsina y de quimotripsina fue inhibida completamente mientras que la hidrólisis del colágeno nativo fue inhibida en un 90%. Al probar este inhibidor junto con un agente quelante, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), la actividad colagenolítica fue inhibida casi completamente. Al ensayar solo el EDTA, comprobaron que no tuvo efecto sobre la actividad de tripsina y de quimotripsina purificada de *Penaeus monodon*, pero sí redujo en un 40% la actividad colagenolítica de cada enzima, por lo cual se plantea que el efecto del EDTA en la actividad colagenolítica de extractos se debe a la inhibición de la procolagenasa que usualmente existe en el colágeno nativo, y que esta procolagenasa es activada por las proteasas serínicas de los crustáceos, por lo que estas últimas un papel importante en la digestión del colágeno de la dieta así como también en la activación de la procolagenasa.

Las exopeptidasas presentes en el hepatopáncreas de los crustáceos no han sido estudiadas con tanta profundidad ni tan extensamente como las endopeptidasas. Como en estas últimas, el estudio se ha basado en el uso de sustratos sintéticos específicos para cada una de ellas (Tsai *et al.*, 1986^a; Galgani y Nagayama, 1987; Vega -Villasante *et al.*, 1995).

Control hormonal

Las colecistoquininas y la gastrina constituyen una familia de péptidos hormonales que ejercen efectos pleotrópicos en el intestino de muchas especies. Van Wormhoudt, Favrel y Guillaume (1989) caracterizaron péptidos tipo gastrina/colecistoquinina de *Penaeus japonicus* y *P. stylirostris*. Estos autores encontraron un aumento significativo de los péptidos después de 2 horas del suministro del alimento en *P. stylirostris*. y 3 horas en *P. japonicus*; el patrón inicial se restauró después de 5 horas. En este trabajo se detectaron fracciones inmunorreactivas con diferentes pesos moleculares que se comportaron de forma también diferente después de la alimentación.

En investigaciones en las que se utilizaron enzimas digestivas del hepatopáncreas como aditivos alimentarios en dietas para *Penaeus schimitti*, *P. californiensis* y *P. vannamei* se detectó que la suplementación ejercía un efecto promotor del crecimiento hasta determinado nivel de suplementación, mientras que un aumento de este nivel no mejoraba el efecto y en algunos casos lo empeoraba (Forrellat *et al.*, 1998; Forrellat, 1998). Una explicación a estos hallazgos pudiera estar relacionada con el efecto de la tripsina sobre la liberación de CCK: el nivel de tripsina libre actúa como un control por retroalimentación de la secreción de colecistoquinina y por tanto de la propia secreción de enzimas digestivas. Las acciones de las CCK están mediadas por receptores que activan a la fosfolipasa C enlazada a la membrana. La última etapa del proceso es la activación de proteína quinasa C para fosforilar y modular la actividad de proteínas celulares. En *Penaeus monodon* (Huang y Chuang, 1995) purificaron la isoenzima delta de la proteína quinasa C de la membrana plasmática del hepatopáncreas,

que se fosforila específicamente en los residuos de tirosina. Aún no se han estudiado los receptores de gastrina/colecistoquinina ni el mecanismo de señalización en camarones.

Isoenzimas

Las formas múltiples de una enzima son llamadas isoenzimas y catalizan la misma reacción. Estas pueden encontrarse en la misma especie, el mismo tejido o en la misma célula. Las diferentes formas generalmente difieren en propiedades regulatorias o cinéticas en la distribución subcelular y tienen por lo general, secuencias aminoacídicas similares pero no idénticas. Van Wormhoudt, Le Chevalier y Sellos (1992) purificaron 2 quimotripsinas del hepatopáncreas de *P. vannamei* para lo cual se utilizó como sustrato una proteína marcada radioactivamente. Las dos proteasas mostraron una composición aminoacídica muy parecida y la secuencia N terminal resultó idéntica. Tsai, Lu y Chuang purificaron quimotripsinas de tres especies de camarones: *Penaeus monodon*, *P. japonicus* y *P. penicillatus*. En todas las especies encontraron 2 isoformas de quimotripsina. Juang, Moody y Chen (1992) también encontraron isoformas de proteasas tipo tripsina en el hepatopáncreas de *P. monodon*.

La trascendencia de la presencia de estas isoenzimas en el proceso digestivo del camarón no ha sido estudiada. Zimógenos La activación de una enzima por ruptura hidrolítica es un tipo de mecanismo regulatorio. Un precursor inactivo de la enzima llamado zimógeno se rompe para formar la enzima activa. Debido a que este tipo de inactivación es irreversible, se necesitan otros mecanismos para inactivar estas enzimas. Sellos y Van Wormhoudt (1992) encontraron un zimógeno putativo de 30 aminoácidos para la quimotripsina en *Penaeus vannamei*, de 27.2 kDa. La secuencia aminoacídica deducida para la quimotripsina mostró la existencia de una preproenzima que contenía un péptido señal altamente hidrofóbico de 14 aminoácidos. No se han encontrado hasta el momento otros zimógenos de enzimas digestivas en el hepatopáncreas ni se dispone de datos sobre el modo de activación del zimógeno putativo de la quimotripsina.

Inhibidores

El equilibrio dinámico en que se encuentran los procesos bioquímicos en los organismos vivos es mantenido por moléculas reguladoras. Muchas sustancias alteran la actividad de una enzima combinándose con ésta de manera tal que influyen en su enlace con el sustrato. Las sustancias que reducen la actividad enzimática de esta forma son conocidas como inhibidores.

Los inhibidores de proteasas son muy frecuentes en la naturaleza, donde tienen funciones protectoras como los que participan en los mecanismos de defensa de ciertas plantas que liberan inhibidores de proteasas en respuesta a la picada de insectos causando la muerte de éste por inanición al inactivar sus enzimas digestivas. Estas proteínas han sido aisladas de fuentes vegetales y animales. En el páncreas de los animales existe un inhibidor básico de la tripsina (BPTI), que tiene funciones reguladoras, es una proteína monomérica de 58 residuos de aminoácidos con 3 puentes disulfuro (Voet y Voet, 1990). Este péptido se une, en el páncreas, a la tripsina por el centro activo y forma un complejo sumamente estable cuya constante de asociación es de 10^{13} M^{-1} (es el valor más alto que se conoce de interacción proteína-proteína) protegiendo de esta forma al órgano de su autodigestión.

Los polipéptidos con actividad inhibidora de proteasas forman parte de los complejos mecanismos de control y regulación en los seres vivos, al impedir la proteólisis no deseada. Su presencia en animales, vegetales y microorganismos sugiere un papel importante relacionado con procesos vitales como la defensa del organismo, la reproducción y otros. Con excepción de las macroglobulinas, los inhibidores proteicos individuales inhiben proteinasas pertenecientes a una clase mecanística: proteasas serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalo. Los inhibidores serino han sido los más estudiados. Inhibidores de proteasas en crustáceos.

En los crustáceos el estudio de los inhibidores de proteasas se ha limitado fundamentalmente a los exógenos, o sea, a los que se encuentran en algunos ingredientes utilizados en la formulación de los alimentos porque disminuyen la calidad aparente de la proteína de la dieta por la limitación en la biodisponibilidad de los aminoácidos. La proteólisis de los sistemas en desarrollo requiere del funcionamiento de las proteasas dentro de ciertos límites fisiológicos. Muchos factores son necesarios para regular la actividad de las proteasas intracelulares que incluyen: compartimentación, asociaciones de membrana, niveles de cofactores, pH intracelular y la presencia de inhibidores de proteasas endógenos.

La presencia de un inhibidor endógeno de proteasas fue informado por primera vez en crustáceos por Warner y Sonnenfeld-Karcz (1992) en *Artemia* sp. Este inhibidor múltiple específico para proteasas cisteínicas es muy importante en la prevención de la proteólisis inapropiada durante los primeros estadios de desarrollo de la *Artemia* sp. y especialmente en períodos de estrés ambiental (cambios en los niveles de salinidad y oxígeno del agua). Esta familia de inhibidores de proteasas se encuentra en una concentración *in vivo* de 1-2 μ M en huevos completamente hidratados, es un inhibidor no competitivo cuyo valor de K_i sugiere un comportamiento pseudoirreversible, es estable entre pH 6.0 y 9.5 a 4°C e inestable a pH por debajo de 5.0, su peso molecular está entre 8700 y 9000 Da por filtración en gel y entre 5000 y 14000 Da por SDS-PAGE, (Warner y Sonnenfeld-Karcz, 1992).

La presencia de actividad inhibidora de tripsina en el hepatopáncreas de camarones fue informado por primera vez por De Arazosa, González y Carrillo (1996) en extractos ácidos de hepatopáncreas de *Penaeus schmitti* y posteriormente en *P. californiensis* y *P. vannamei* por García Carreño, Carrillo y Navarrete (1997, enviado para publicar). Delfín, Marañón, De Arazosa y Carrillo (datos no publicados) comprobaron la presencia de actividad inhibidora de proteasas en extractos ácidos de *P. californiensis* y *P. schmitti* al fraccionar estos extractos mediante cromatografía de afinidad en tripsina-etiloxi-Sepharosa 4BCL. Como resultado de esta cromatografía se obtuvo una fracción con actividad inhibidora de proteasas, que se evaluó por el método de Trautchoold y Werle (1961) con la utilización de BAEE como sustrato.

Variaciones circadianas de las enzimas digestivas Van Wormhoudt (1980) realizó un estudio de los ritmos circadianos de las enzimas digestivas en *Palaemon serratus*. La actividad de la α -amilasa, fosfatasa, proteasas, fosfodiesterasas, DNAsas y algunas RNAsas presentó un comportamiento sincrónico bifásico y un período de alrededor de 12 horas. Para la actividad de la α -amilasa, fosfatasa, proteasas y fosfodiesterasas, el primer máximo aparece 5 horas después del comienzo de la iluminación, entre las 12:00 y 2:00 PM, el cual es más pequeño y otro entre las 22:00 y 1:00 horas que es el más importante. Existen otros 2 picos de actividad en las 7:00 PM y las 5:00 horas para la fosfatasa, las fosfodiesterasas, DNAsas y algunas RNAsas, también determinó la existencia de un ritmo en el contenido de RNA y proteínas del hepatopáncreas, que se correlaciona con el ritmo de la actividad de las enzimas digestivas,

precediendo la síntesis de RNA alrededor de 1 hora la síntesis de proteína y esta a su vez de 2 a 3 horas el máximo de actividad específica de las enzimas digestivas. Estos ritmos de las enzimas digestivas ya se encuentran presentes en los estadios larvales y poseen las mismas características que en los adultos. Van Wormhoudt (1980) encontró que ya en zoea 4 el ritmo tiene una tendencia bifásica, haciéndose éste más claro en las postlarvas y juveniles.

Los 2 períodos principales de actividad máxima de las enzimas digestivas pudieran corresponder de una parte a un fuerte período diurno de secreción de enzimas digestivas en el hepatopáncreas y de otra parte a una acumulación nocturna de enzimas digestivas en las vacuolas digestivas (Van Wormhoudt, 1980). González, Gómez y Carrillo (1995) y González, Suárez y Carrillo (1997) demostraron que la actividad de tipo tripsina, amilasa y proteolítica general del hepatopáncreas de *Penaeus schmitti* presentó una variación circadiana con dos máximos de actividad.

Estas enzimas aumentaron su actividad después de la ingestión del alimento hasta alcanzar el máximo entre 4 y 6 horas. La variación circadiana de la actividad proteolítica total estuvo afectada por el horario de alimentación y el fotoperíodo. El avance de los conocimientos sobre el proceso de la digestión del camarón en las dos últimas décadas ha sido notable, sin embargo la aplicación de estos conocimientos a la camaronicultura lamentablemente no ha tenido el mismo ritmo.

Referencias:

- Brockerhoff, H.; J.E. Stewart y W. Tracreiter** (1967): Digestion of tryglicerides by lobster. Can. J. Biochem. 45:421-422
- BROWN, F.A.** (1961): Physiological rhythms. En: Talbot H. Waterman (editor) The physiology of crustacea Vol.II Academic Press, New York San Francisco London. pp. 401-430.
- Brown, F.A., M. Fingerman; M. Sandeen y M.M Webb** (1953): Persistent diurnal and tidal rhythms of color change in the fiddler crab *Uca pugnax*. J. Exp. Zool. 123:29--60.
- Buchanan, J.; H.Z. Sarac; D. Poppi y R.T. Cowan** (1997). Effect of enzyme addition to canola meal in prawn diets. Aquaculture 151: 29-35.
- Chen, Y.L.; J.P. Lu e I.H. Tsai** (1991): Colagenolytic activity os crustacean midgut serine proteases: comparison with bacterial and mammalian enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 100B(4):763-768.
- Chuang, N-N. y B-C. Yang** (1991): Purification and properties of a β -mannosidase from the shrimp (*Penaeus japonicus*) hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol. 98B(4):627-630.
- Chuang, N-N; B-C. Yang y C-C. Yeh** (1991a): Purification and characterization of an acidic β - galactosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). J. Exp. Zool. 259:26-31.
- Chuang, N-N; B-C. Yang y K-S. Lin** (1992c): Purification and characterization of an acidic β -D- mannosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). J. Exp. Zool. 261:387-393.
- Chuang, N-N; C-C Yeh y K-S. Lin** (1991b): The basic form of α -L-fucosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea:Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 99B(2):395-398.
- Chuang, N-N; J.D. Huang y K-S. Lin** (1992a): Comparative study of free and membrane-bound acidic β -D- glucosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 102B(2):279-283.
- Chuang, N-N; K-S. Lin y B-C. Yang** (1992b): Purification and characterization of an α -glucosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea:Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 102B(2):273-277.
- Dall, W.** (1991): Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae in: G.L. Allan and W. Dall (ed) Proc. Aquaculture Nutrition Workshop, Salamander Bay, 15-17 April, pp57-63

- De Arazosa, M.; González, R. Y Carrillo, O.** Actividad inhibidora de tripsina en el hepatopáncreas de *P. schmitti*. Taller Internacional de Nutrición y Enfermedades de especies acuícolas cultivables. La Habana, Noviembre de 1996.
- Deering, M.J.; Hewitt, D.R. Y Brock, I.** (1996) Triacylglycerol digestion by the leader prawn *Penaeus monodon* J. World Aquacult. Soc. 27:359-361
- Eisen, A. y J. Jeffry** (1969): An extractable collagenase from crustacean hepatopancreas. Biochem biophys. Acta. 191:517-526.
- Eisen, A.Z.; K.O. Henderson; J.J. Jeffrey y R.A. Bradshaw** (1973): A collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator*. Purification and properties. Biochemistry 12:1814-1822.
- Favrel, P.; A. Van Wormhoudt y J.M. Studler.** (1987): Immunochemical and biochemical characterization of gastrin/cholecystokinin-like peptides in *Palaemon serratus* (Crustacea:Decapoda). Intermoult variation. Gen. Comp. Endocrinol. 65(3):363-372.
- Forellat, A.** (1998): El hepatopáncreas de camarón: fuente de enzimas digestivas para la camaronicultura .Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, Cuba.
- Forellat, A.; S. Blake y Carrillo, O.** (1998): Utilización de Hepatopancreatina como aditivo alimentario en dietas para poslarvas de *P. schmitti* . Rev. Inv. Mar (aceptado para publicar)
- Galgani, F. G.; Y. Benyamin y H. J. Ceccaldi** (1984): Identificación de digestives proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forskål): a comparison with *Penaeus japonicus* Bate. Comp. Biochem. Physiol. 78B:355-361.
- Galgani, F. y F. Nagayama** (1987): Digestive proteinase in the japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. 87B(4):889-893.
- Galgani, F., Y. Benyamin y J.H. Ceccaldi** (1985): Etude de la trypsine des crustacés peneide. Aquaculture Fascicule 8 (3 symposium franco-japonais sur l'aquaculture): 12-21 sep.
- García-Carreño, F.L.** (1996): Proteinase inhibitors. Trends in Food Science and Technology 7:197-204
- García-Carreño, F.L.; O. Carrillo y M.A. Navarrete** (1998): Control of Digestive Functions in Shrimp: I. Inhibitor of measured Trypsin Activity in the hepatopancreas (enviado a Crustaceana)
- García-Carreño, F.L.; M.P. Hernández-Cortez y N.F. Haard** (1994): Enzyme with peptidase and protease activity from the digestive systems of freshwater and marine decapod. J. of Agric. and Food Chem. 42:1456-1461.
- Gibson, R. y P.L. Barker** (1979): The decapod hepatopancreas. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17:285-346.
- González, R.; M. Gómez y O. Carrillo** (1995): Cambios cronobiológicos en la actividad de las principales enzimas proteolíticas de *Penaeus schmitti* y *Penaeus notialis*. Rev. Inv. Mar 16:177-183
- González, R.; O. Suárez y O. Carrillo** (1997): Ritmo circadiano de las proteasas generales de *Penaeus schmitti*. I. Efecto del horario de alimentación Rev. Inv. Mar 18:
- Grant, G.A.; J.C. Sacchetti y H.G. Welgus** (1983): A collagenase serine protease with trypsin-like specificity from fiddler crab *Uca pugilator*. Biochemistry 22:354-358.
- Grant, G.J. y A. Eisen** (1980): Substrate specificity of the collagenolytic serine protease from *Uca pugilator*. Studies with noncollagenous substrates. Biochemistry 19:6089-6095.
- Hernández Cortéz, P.; J.R. Whitaker y F.L. García Carreño** (1997): Purification and characterization of Chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). J. of Food Biochemistry 21: 497-514
- Hernández-Cortéz, M.P.** (1997): Crustacean protease characterization. Biochemical and molecular consideration. Comprehensive Summary Ph D Thesis. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México. 26 pp.
- Honjo, I.; S. Kimura y M. Nonaka** (1990): Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. Nippon Suisan Gakkaishi 56:1627-1634.
- Huang, C.F. and Chuang, N.N.** "Purification of the delta isoenzyme of protein kinase C from de hepatopancreas of the shrimp *Penaeus monodon* with phosphorylation on tyrosine residues. J.>Exp. Zool 272:258-265 1995
- Iida, Y; T. Nakagawa y F. Nagayama** (1991): Properties of collagenolytic proteinase in japanese spiny lobster and horsehair crab hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol. 98B:403-410.
- Jiang, S; M. Moody y H. Chen** (1991): Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). J. Food Sci. 56:322-326.

- Kono, M.; M.N. Wilder, T. Matsui, ; K. Furukawa, ; D. Koga y K. Aida** (1995): "Chitinolytic enzymes activities in the hepatopancreas tail, fan and hemolymph of kuruma prawn *Penaeus japonicus* during the molt cycle. *Fish Sci* 61:727-728
- Le Moullac, G., Van Wormhoudt, A. y AQUACOP** (1994): "Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea: Decapoda). *Aquat Living Resour* 7:203-210 LU, P.J.;
- H.C. Liu e I.H. Tsai** (1990): The midgut trypsins of shrimp (*Penaeus monodon*): high efficiency toward native protein substrates including collagens. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 371:851- 859.
- Omondi, J.G. y J.R. Stark** (1996): In vitro carbohydrate digestibility tests in hte Indian white shrimp *Penaeus indicus*. *Aquaculture* 139:315-328
- Sakharov, I.Yu.;F.E. Litvin; O.V. Mitkevitch; G.P. Samoklin y Z.D. Bespalova** (1994):Substrate specificity of collagenolytic proteases from the crab *Paralithodes camtschatica*. *Comp. Biochem Physiol*. 107B(3):411-417.
- Sellos, D. y A. Van Wormhoudt** (1992): Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Lett*. 309:219-224.
- Trautschold, I.Y. Y Werle, E.** (1961)"Spectrophotometric determination of kellykrein and its inactivators" *Hoppe-Seyler s Z. Physiol Chem* 325:48-59
- Tsai, I.H.; K.C. Lien y J.L. Chuang** (1986a): Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimp). *Comp. Biochem. Physiol*. 85B(1):235-239.
- Tsai, I. H.; K.C. Liu y K.L. Chuang** (1986b): Properties of two chymotrypsins from the digestive gland of the prawn *Penaeus monodon*. *Febs. Letters* 203:257-261.
- Tsai, I.; K.C. Liu y J. Chang** (1991): The midgut chymotrypsins of shrimps (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* y *Penaeus penicillatus*). *Biochem. Biophys. Acta* 1080:59-67.
- Tsu, C. y C. Craik** (1996): Substrate recognition by recombinant serine collagenase 1 from *Uca pugilator*. *J. Biol. Chem.* 271(19):11563-11570.
- Van Wormhoudt, A.** (1980): Adaptation des activites digestives de leurs cycles et de leur controle, aux facteurs du milieu chez *Palaemon serratus* (Crustacea: Decapoda: Natantia). These presen-tee a l'Universite d'Aix-Marseilli II pour obtenir le grade de Doctor d'Etat es Sciences. 351 pp.
- Van Wormhoudt, A., Favrel, P. y Guillaume, J.** (1989) "Gastrin/Cholecystokinin-like post-prandial variations: quantitative and qualitative changes in the haemolymph of penaeids (Crustacea: Decapoda). *J Comp Physiol B* 159:269-273
- Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Donval, A., Plaire-Goux, S. y Le Moullac, G.** (1995) "Chymotrypsin gene expressioin during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Experientia* 51:159-163
- Van Wormohudt, A.; P. Chevalier y D. Sellos** (1992): Purification, biochemical characterization and N-terminal sequence of a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in a tropical shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol*. 103B:675-680.
- Vega-Villasante, F.; H. Nolasco y R. Civera** (1995): The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. II- Propperties of protease activity in the whole digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol*. 112(1): 123-129.
- Voet, D. y G. Voet** (1990): *Biochemistry*. J. Wiley & Sons (ed.) NY. pp. 379-380.
- Warner, A.H. y M.J. Sonnenfeld-Karcz** (1992): Purification and partial characterization of thiol protease inhibitors from embryos of the brine shrimp *Artemia*. *Biochem Cell Biol*. 70:1020-1029.
- Walsh, K. A.** (1970): Trypsinogens and trypsin of various species. En: *Methods of enzymology*. Vol. XIX. Colowich, S.F. y Kaplan, N.O. (Editores) Academic Press. New York. N.Y. pp. 41-43.
- Watanabe, T.; M. Kono, ; K. Aida y H. Nagasawa** (1996): Isolation of a cDNA encoding a putative chitinase precursor in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5: 299-303
- Wooley, D.E.; R.W.Glanville; D.R. Roberts y J.M. Evanson** (1978): Purification, characterization and inhibition of human skin collagenase. *Biochem. J.* 169:265-276.
- Yokoe, Y y I. Yasumasu** (1964): The distribution of cellulase in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol*. 13:323-338.
- Zwilling, R.G. y H. Nuerath** (1981): Invertebrates proteases. *Methods Enzymol*. 80:633-664.