

FOSFATASA ALCALINA DE CAMARÓN: ESTRUCTURA, CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES

SHRIMP ALKALINE PHOSPHATASE: STRUCTURE, CHARACTERISTICS, AND FUNCTIONS

Arias-Moscoso Joe Luis, Ezquerro-Brauer Josafat Marina*

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos/Universidad de Sonora, México. P.O. Box 1658, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Los estudios sobre la fosfatasa alcalina (FA) son escasos en especies de origen terrestre; existe poca información de esta enzima con respecto a las especies marinas, como el camarón. Los principales aspectos considerados en esta revisión son: la estructura, características y funciones de la fosfatasa alcalina presente en camarones (FAC), comparadas con sus homólogos de diferentes orígenes. Las tríadas del sitio activo de la FAC son muy similares a los de FA de origen bacteriano. Diversos agentes que actúan como inhibidores de la FA comercial, también pueden inhibir a la FAC. Las principales funciones de la FA en crustáceos, como el camarón, se relacionan con el proceso digestivo del organismo, participando en reacciones de transfosforilación, así como en el sistema inmunológico, en la que se ha asociado a la activación de los efectores celulares responsables del sistema de defensa del camarón, por lo que puede ser utilizado como un agente indicador de enfermedades en estos organismos. Por otro lado, debido a que las características químicas y estructurales de la FAC son similares a las de sus homólogos de origen bacteriano, se infiere que los usos y aplicaciones de la FAC pueden ser semejantes a las de origen bacteriano.

Palabras clave: enzimas marinas, crustáceos, fosfatasa alcalina, inhibición, sistema inmune.

ABSTRACT

Studies on alkaline phosphatase (AP) are few on terrestrial species; there is little information of this enzyme with respect to marine species, especially shrimp. The main aspects considered in this review are structure, characteristics and functions present in shrimp alkaline phosphatase (SAP) compared with their equivalents from different sources. The triads of the SAP active site are very similar to those of AP of bacterial origin, these last being widely studied and used as a model. Several agents that act as inhibitors of the commercial AP, also can inhibit the SAP. Of the main functions of the AP in crustaceans, such as shrimp, are those related to the digestive process of the organism, participating in transphosphorylation reactions and the immune system, which has been associated with activation of cellular effectors responsible of shrimp defense system, so it can be used as an indicator of disease agent in this organism. Moreover, because the chemical and structural characteristics of the SAP are similar to those of their bacterial homologues, uses and applications of SAP can be similar to those of bacterial origin.

Key words: marine enzyme, crustaceans, alkaline phosphatase, inhibition, immune system.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los estudios realizados sobre la fosfatasa alcalina (FA) es en organismos de origen terrestre como fosfatasa de placenta humana, fosfatasa del intestino de ratas y fosfatasa de gusanos aplanados (Sasajima et al., 2010; Whitehouse et al., 2010; Araujo et al., 2011), existiendo poca información sobre la fosfatasa alcalina en ambientes marinos, y estos están enfocados principalmente en ecosistemas acuáticos, insectos, algas y bacterias (Ivancic et al., 2010; Wende et al., 2010; Koodalingam et al., 2011; Kwon et al., 2011).

La información sobre las propiedades y características que existe sobre la FA de crustáceos proviene tanto de especies silvestres como cultivadas, principalmente de *Pandalus borealis* (Olsen et al., 1991; Zhisheng et al., 2010; Rader et al., 2012), *Penaeus japonicus* (Chuang y Shih, 1990), *Penaeus monodon* (Lee y Chuang, 1991), *Marsupenaeus japonicus* (Zhan et al., 2004), así como también en cangrejos como *Scylla serrata* (Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2001). Estos trabajos abordan temas sobre estructura, sitio activo, inhibidores y estabilidad térmica (Nilsen et al., 2001; Zhang et al., 2001). Asimismo, establecen el papel que juega esta enzima en el sistema digestivo y el sistema inmune de los camarones, principalmente en cultivo (Ivancic et al., 2010; Rivera et al., 2011a; Rivera et al., 2011b; Wang et al., 2009).

La fosfatasa alcalina (AP; E.C. 3.1.3.1) es una enzima hidrolasa, considerada metaloenzima homodimérica, que cataliza la hidrólisis en la presencia de aceptores de fosfato (Hough et al., 2002; Wende et al., 2010), así también, cataliza la transfosforilación de una amplia variedad de mono ésteres de fosfato (R-OPO₃) para la producción de fosfato inorgánico y alcohol o agua. El producto fosfato inorgánico, es también un inhibidor para la enzima. La función biológica de la FA es la hidrólisis de monoésteres de fosfato, la cual se considera una reacción importante ligada al metabolismo energético, regulación metabólica y a una variedad de rutas de transducción de señales (Helland et al., 2009; Puttige y Nooralabettu, 2012). Algunos ejemplos de las estructuras disponibles de la fosfatasa alcalina son las obtenidas de *Escherichia coli* (FAEC), placenta humana (FAPH) y camarón (FAC), éstas muestran que el núcleo y la tríada metálica catalítica han sido preservada a través de la evolución, indicando que la forma más

*Autor para correspondencia: Josafat Marina Ezquerro-Brauer
Correo electrónico: ezquerro@guayacan.uson.mx

Recibido: 16 de abril de 2014

Aceptado: 05 de octubre de 2014

eficiente para realizar las funciones dentro de los diferentes organismos sigue siendo mediante un sistema compuesto por una triada metálica en el núcleo (Backer et al., 2004; Barford, 2011).

La triada metálica, presente en cada monómero, es usualmente ocupada por dos iones de zinc y uno de magnesio, por cada monómero. Los sitios de unión son comúnmente referidos como M1 y M2, para las uniones con zinc, y M3, para los sitios que contienen zinc/magnesio (Backer et al., 2004).

La fosfatasa alcalina es una enzima intrínseca de la membrana plasmática encontrada en la mayoría de los animales (Lee y Chuang, 1991), se encuentra presente en microorganismos, en células animales de origen terrestre y marino, sin embargo, se encuentra ausente en los tejidos de plantas (Rédei, 2008).

La fosfatasa alcalina encontrada en camarones puede tener tres diferentes isoformas o isoenzimas (Lee y Chuang, 1991); sin embargo, llevan a cabo las mismas reacciones con el mismo grado de especificidad, las variables son: las características cinéticas, como constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidad máxima (V_{max}) y *energía de activación* (E_a), así como las propiedades físicas y químicas, como el peso molecular, punto isoeléctrico y diámetro de la molécula (Puttigitte y Nooralabettu, 2012).

Las alteraciones o modificaciones que sufren, se deben a la actividad que realizan en las diferentes regiones donde se encuentran (Chuang, 1990). Se ha observado que el peso molecular de la enzima varía según la especie de camarón estudiada, oscilando normalmente entre 40 a 65 kDa, y que actúa dentro del proceso de desfosforilación, durante la digestión de algunos nutrientes como las proteínas, así como en procesos de detoxificación o ante la presencia de algunas enfermedades, activando el sistema inmune (Martínez, 1999).

ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS DE LA FOSFATASA ALCALINA DE CAMARÓN

Los estudios realizados en la fosfatasa alcalina del camarón (*Pandalus borealis*) se han realizado principalmente en dos regiones anatómicas del organismo, hepatopáncreas y hemolinfa (Tabla 1), a partir de éstos se ha podido establecer, además de sus funciones, sus características estructurales, las cuáles se describen a continuación.

La fosfatasa alcalina del camarón es, como ya se mencionó, un homodímero con dimensiones de alrededor de los $95\text{Å} \times 65\text{Å} \times 50\text{Å}$ (Holtz et al., 2000; Hough et al., 2002; Wende et al., 2010). Los dos monómeros que la constituyen forman un eje de dos pliegues, conformado por 429 residuos de cada monómero, que corresponde a la longitud total de la proteína, sin contar los tres residuos del N-terminal. Cada pliegue está compuesto por 10 hojas β , de las cuales, sólo una no es paralela, dando la estructura de una N en el pliegue inferior y una C en el pliegue superior (Fig. 1), por lo que el dímero es considerado una unidad asimétrica (Wende et al., 2010).

Tabla 1. Estudios realizados en la fosfatasa alcalina extraída de diferentes regiones anatómicas en distintas especies de camarón.

Table 1. Studies on alkaline phosphatase extracted from different anatomical regions of different shrimp species.

Especie	Región anatómica	Análisis realizados	Autor
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Hemolinfa	Inhibición de la fosfatasa alcalina ELISA Inmuno Blot	Zhan et al., 2004
<i>Pandalus borealis</i>	Tejido muscular	Cristalografía de rayos x	Hough et al., 2002
<i>Penaeus japonicus</i>	Hepatopáncreas	Electroforesis Ensayo de ADN topoisomerasa Western Inmuno-blotting	Chuang et al., 1996
<i>Penaeus monodon</i>	Hepatopáncreas	Purificación Electroforesis Ensayo de actividad	Lee y Chuang 1991
<i>Scylla serrata</i>	Vísceras	Ensayo de actividad Cinética de hidrólisis	Zhang et al., 2001
<i>Penaeus japonicus</i>	Hepatopáncreas	Purificación Electroforesis Ensayo de actividad	Chuang, 1990
<i>Scylla serrata</i>	Hepatopáncreas	Ensayo de actividad Determinación de la constante de inactivación cinética	Zhang et al., 2000
<i>Penaeus monodon</i>	Hemolinfa	Aislamiento del RNA Análisis de secuencia Análisis de RT y PCR Inmunohistoquímica	Pongsomboon et al., 2008
<i>Paralithodes camtschatica</i>	Hepatopáncreas	Purificación Cromatografía Ensayo de actividad	Menzorova et al., 2008
<i>Pandalus borealis</i>	Hepatopáncreas	Purificación Electroforesis Ensayo de actividad Determinación de proteína	Olsen et al., 1991
<i>Penaeus vannamei</i>	Hepatopáncreas	Aplicación de probióticos Ensayo de actividad	Wang y He, 2009
Camarón N/I	NR	Cristalografía de rayos x	Backer et al., 2004

N/I: no identificado; N/R sin registro

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Fuente: elaborado por J.L. Arias-Moscoso a partir de datos obtenidos de los autores en la última columna.



Figura 1. Estructura de la fosfatasa alcalina de camarón
Figure 1. Shrimp alkaline phosphatase structure.
 Fuente: Hough *et al.*, 2002.

Sitio activo de la fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina de camarón (FAC), así como las fosfatasas de origen bacteriano, vibrio y humano, tiene en el sitio activo dos iones metálicos que utiliza para catalizar la transferencia de fosforilos (Wende *et al.*, 2010; Koutsoulis *et al.*, 2010; Bobyr *et al.*, 2012). Asimismo, en la acción catalítica de la fosfatasa alcalina de cualquier origen, se produce una hidrólisis de fosfato monoéster, en donde dos iones metálicos del sitio activo se coordinan con el grupo nucleofílico del grupo saliente, respectivamente, formando un puente entre el átomo de oxígeno y los dos iones metálicos del grupo fosforilo transferido (Fig. 2) (Zalatan *et al.*, 2008).

Por otra parte, el sitio activo de la fosfatasa alcalina de *E.coli* contiene un tercer ion metálico, que es constituido por el ion Mg^{2+} . Se ha sugerido que el Mg^{2+} actúa como una base para desprotonar el nucleófilo de la serina (Zalatan *et al.*, 2008). Los sitios activos de la FA son accesibles por los

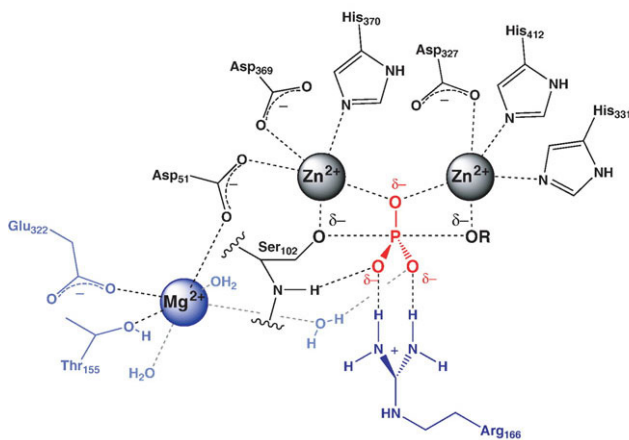


Figura 2. Sitio activo de la fosfatasa alcalina de *E. coli*.
Figure 2. Active site of *E. coli* alkaline phosphatase.
 Fuente: Zalatan, *et al.*, 2008

sustratos, incluyendo los sustratos de baja especificidad. Los estudios realizados en los sitios activos de la FA destacan el papel esencial de los iones metálicos, como son Zn, Co, y Mg (Wende *et al.*, 2010). La cristalografía de dispersión revela que la fosfatasa alcalina de camarón, al igual que su homóloga de la *E. coli*, tienen dos iones zinc de los tres iones metálicos en el sitio activo, estos lugares en otras especies están ocupados por iones magnesio (Hough *et al.*, 2002). La resolución atómica ha mostrado que los residuos involucrados en la triada del sitio activo siguen conservándose, a pesar de la especie, la única variación se produce en la fosfatasa alcalina procedente de la placenta humana, la cual tiene una serina en lugar de una treonina (Hough *et al.*, 2002; Zalatan *et al.*, 2008; Wende *et al.*, 2010). La carga neta de la enzima (-80) se distribuye de tal manera que, la superficie es predominantemente de carga negativa, excepto para el sitio activo, de carga positiva. El sustrato con carga negativa, debe ser dirigido hacia el sitio activo para poder iniciar la catálisis por la enzima (Zalatan *et al.*, 2008). La activación de la FA está limitada por la concentración de cationes divalentes como el Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} , Co^{++} (Zhang *et al.*, 2001; Puttige y Nooralabettu, 2012). Dependiendo de la ubicación de la misma será el uso de los cationes correspondientes, si se encuentra en membranas se necesitara la presencia de magnesio o zinc, si la ubicación de la enzima es en células hepáticas o el hepatopáncreas, para el caso de la fosfatasa alcalina de camarón, será necesario magnesio o manganeso para activarla (Puttige y Nooralabettu, 2012).

INHIBIDORES DE LA FOSFATASA ALCALINA

Un inhibidor es una sustancia que reduce la actividad de una enzima; asimismo, los inhibidores enzimáticos son usados en la naturaleza y están implicados en la regulación del metabolismo de los organismos (Segel, 1993). El propósito del inhibidor es afectar la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, las sustancias que pueden afectar la velocidad pueden ser sustancias endógenas, producidas por el propio organismo y sustancias exógenas (químicos) (Harper, 2001). Una vez que, las zonas que el inhibidor ocupó en el complejo enzima-sustrato, son desocupadas, la enzima puede o no volver a su estado original de actividad, lo que indica que el comportamiento del inhibidor puede ser, según sea el caso, reversible o irreversible (Whisnant y Gilman, 2002; McDonald y Tipton 2012).

Los inhibidores enzimáticos, cuyo diseño se basa en la estructura del estado de transición de la reacción catalizada por la enzima a inhibir (análogos del estado de transición), constituyen uno de los métodos de diseño racional más efectivo que se dispone, esto se debe a la elevada afinidad que presenta el centro activo de la enzima, frente a especies estructuralmente relacionadas con el estado de transición que presenta el estado de máxima energía del complejo enzima-sustrato (Delgado *et al.*, 2002).

Ciertos inhibidores endógenos, análogos del estado de transición de metaloenzimas, en general son del tipo aminoácidos (Smyth, 2004). Los inhibidores exógenos pue-

den ser fármacos o químicos (Delgado et al., 2002). A continuación, se muestran algunos inhibidores tanto endógenos como exógenos de la fosfatasa alcalina.

Inhibición por aminoácidos

El contenido de aminoácidos también puede afectar la actividad de la enzima, siendo el aminoácido L-fenilalanina un inhibidor no competitivo y estereoespecífico de las isoenzimas de fosfatasa alcalina. De manera diferencial, esta inhibición es posible cuando la concentración de este aminoácido se encuentra entre 5 y 10 mM, igual comportamiento ha sido mostrado por el aminoácido L-triptófano, el cual tiene un efecto inhibitorio a una concentración de 3 mM (Wang et al., 2013). En otros estudios se reporta a los residuos de histidina y lisina como inhibidores competitivos, impidiendo la activación de la enzima (Chen et al., 2005). Asimismo, para la fosfatasa alcalina del camarón y cangrejo, los residuos de tirosina tienen un efecto esencial en la inhibición de esta enzima (Zhang et al., 2001).

Inhibición con sodio

El arseniato de sodio, ejerce su función de manera reversible, atacando de manera competitiva a la fosfatasa alcalina (Whisnant y Gilman, 2002). Se han reportado valores de K_i (constante de ionización) para arseniato de sodio que van desde 2 μM para la inhibición de la FA (Whisnant y Gilman, 2002). Asimismo, se ha reportado la inhibición con vanadato de sodio, el cual es un inhibidor competitivo y reversible de la FA (McLauchlan et al., 2010). Los valores de K_i reportados para inhibir la fosfatasa alcalina intestinal de ratas, utilizando vanadato es de 4 μM ; para inhibir la fosfatasa alcalina de *E. Coli* se requiere una concentración de 12 μM ; mientras que, para inhibir la fosfatasa alcalina de camarón (*Penaeus monodon*), son necesarios 7 μM (Lee y Chuang, 1991; Whisnant y Gilman, 2002).

Inhibición con teofilina

La teofilina, ejerce su función de manera reversible. Para este inhibidor se ha reportado el valor de K_i de 100 μM (Whisnant y Gilman, 2002). Entre sus más prominentes efectos celulares están la inhibición de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y el antagonismo con los receptores de adenosina (Vendrell y Morell, 1997). Recientemente, se reportó que la inhibición de teofilina sobre la fosfatasa alcalina es de tipo no competitivo (Wang et al., 2013).

Inhibición con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)

La fosfatasa alcalina es una metaloproteína, ya que contiene 4 equivalentes de zinc por cada mol de FA; el zinc es necesario para la actividad de la enzima (McLauchlan et al., 2010; Whisnant y Gilman, 2002). Agentes quelantes, tales como EDTA, inhiben irreversiblemente a la FA mediante la eliminación del zinc del centro activo de la enzima (Whisnant y Gilman, 2002). La electroforesis capilar prueba que el uso de EDTA produce la inhibición irreversible de la fosfatasa alcalina (Whisnant y Gilman, 2002; Zhan et al., 2004).

Inhibición por beta-mercaptoetanol y el ditioneitol (DTT)

Algunos compuestos, como el ditioneitol y el mercaptoetanol, actúan como inhibidores no competitivos, esta inhibición se da a una concentración de 8 mM y 45 mM, respectivamente (Zhang et al., 2000). El efecto de la inhibición radica en su capacidad de reducir los enlaces disulfuro de las proteínas (-S-S-), a grupos sulfhidrilo (-SH), permitiendo con esto, desplegar completamente la proteína y separar las subunidades de la misma, esta inhibición es reversible y la enzima puede ser reactivada si se diluye el inhibidor (Zhang et al., 2000).

FUNCIÓN

La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra presente en diferentes organismos tanto marinos como terrestres y, dentro de estos organismos, aparece en distintos lugares anatómicos, por lo cual tiene una variedad de funciones conocidas, que van desde catalizar la transferencia de fosforilos y la hidrólisis de mono ésteres de fosfato en la presencia de aceptores de fosfato. Dicha reacción está ligada al metabolismo energético (Barford, 2011), hasta la regulación metabólica y transducción de señales (Wende et al., 2010), así como su aplicación para el diagnóstico de problemas de salud y manipulación de ADN en laboratorios (Backer et al., 2004; Hough et al., 2002). Entre las principales funciones de esta enzima, está la intervención en la catálisis de fosfomonoésteres y transfosforilación, mediante la separación de fósforo inorgánico (P) a partir de fosfato orgánico (Harris, 1989). Asimismo, se asocia con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos; incluso en el transporte de iones (Dupuis et al. 1991; Hunter, 1995). Estas reacciones intervienen en ciclos de las funciones biológicas, como la digestión de los alimentos, para obtener nutrientes antes mencionados, para el crecimiento, mantenimiento, movimiento, reproducción y defensa (Zhang et al., 2000; Zhang et al., 2001; Huai et al., 2010; Chen et al., 2011).

Fosfatasa alcalina en el sistema inmune

La respuesta inmune de los crustáceos se basa en efectores celulares, así como también humorales, los cuales actúan en conjunto para poder eliminar microorganismos potencialmente infecciosos. Durante estas reacciones conjuntas intervienen los hemocitos, los cuales constituyen la fracción celular de la hemolinfa (Olsen et al., 1991; Li et al., 2008; Pongsomboon et al., 2008; Seibert y Pinto, 2012). Las enfermedades del tipo viral y bacteriano son la principal causa de pérdidas significativas en la producción y calidad del camarón cultivado en acuicultura a nivel mundial (Pongsomboon et al., 2008; Li y Xiang, 2013). La primera línea de defensa de los crustáceos ante una invasión microbiana es su cutícula, ésta es muy fuerte y posee propiedades antimicrobianas, además de contener inhibidores contra el ataque enzimático (Wickins y Lee, 2002). Si se trata de penetrar, hay un reconocimiento inmediato de material que no es propio del organismo, mediante los hemocitos y las proteínas plas-

máticas (Vargas y Yepiz, 2000; Li y Xiang, 2013). Las reacciones de defensa características de esta especie son fagocitosis, nodulación, encapsulación, síntesis o liberación de péptidos antimicrobianos y varias inmuno proteínas (Pongsomboon et al., 2008). Los mecanismos de defensa del camarón se basan principalmente en la respuesta inmune innata, que se compone de reacciones o efectores celulares y humorales. Los hemocitos son el principal sitio de la respuesta inmune del camarón (Olsen et al., 1991; Li et al., 2008; Pongsomboon et al., 2008). El contenido enzimático de los gránulos citoplasmáticos reporta la presencia de peroxidasa, esterasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y fenoloxidasa (Hernández et al., 2006; Li y Xiang, 2013). La fosfatasa alcalina presente en los gránulos citoplasmáticos se encuentran disponible para poder intervenir en la transformación de proteína, pues tienen función como moderador del sistema inmune (Bhardwaj y Skelly, 2011). La fosfatasa alcalina interviene en el sistema inmune de organismos acuáticos, como lo expresado por Chuang (1996), donde las reacciones de fosforilación realizadas por la fosfatasa alcalina durante un ensayo *in vitro*, obtenida del hepatopáncreas del camarón, son acciones esenciales para la expresión de la actividad enzimática en los mecanismos de defensa del camarón *Penaeus japonicus*. Se ha detectado que cuando el hepatopáncreas trabaja para eliminar toxinas, se propicia una mayor actividad de la fosfatasa alcalina en este órgano (Boonyaratpalin et al., 2001; Liu et al., 2011).

Boonyaratpalin et al., (2001) detectaron que después de exponer al camarón *P. monodon* por 6 semanas a diferentes niveles de aflatoxina B1 (AFB1), hubo una correlación positiva entre la concentración de AFB1 y la actividad de la FAC, con una correlación lineal de 0.89 (r^2). Hose et al., (1984) detectaron que al exponer al camarón *P. californiensis* a *Fusarium solani*, la actividad de la FAC, entre otras enzimas evaluadas presentes en la hemolinfa, aumentaba su actividad hasta 43 U/L a medida que avanzaba la infección por *F. solani*. Mientras que Supamattaya et al., (2005) observaron un decremento en la cantidad de FAC en el suero de *P. monodon*, ante la presencia de Ocratoxina A y Deoxinivalenol. En un estudio *in vitro*, se detectó que al incubar a la FAC semipurificada del hepatopáncreas de camarón *L. vannamei*, ya sea con AFB1 (aflatoxina B1) o FB1 (fumonisina B1), solas o en mezcla, la actividad de la enzima se potenciaba (Boonyaratpalin et al., 2001; Supamattaya et al., 2005; Nha et al., 2009; Ezquerro et al., 2011). En la tabla 2 se muestran algunos de los estudios realizados a partir de la fosfatasa alcalina de camarón.

Fosfatasa alcalina en el proceso de digestión

El análisis de la digestión de proteínas comienza con la identificación de la clase, tipo y composición de las enzimas responsables de la hidrólisis de proteínas de alimentos. Para realizar el estudio en organismos, como los crustáceos decápodos, es necesario realizar una homogeneización de los órganos digestivos, para obtener una muestra de enzimas digestivas (García et al., 1997; Muhlia y García, 2002). El principal órgano del sistema digestivo del camarón es el hepa-

Tabla 2. Estudios realizados en la fosfatasa alcalina de camarón
Table 2. Studies on shrimp alkaline phosphatase.

Especie	Estudios realizados	Autor
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Inhibición de la FAC para la observación de relación con el virus de la mancha blanca, aplicando métodos de ensayo como ELISA, Inmuno Blot.	Zhan et al., 2004
<i>Panadalus borealis</i>	Caracterización estructural de la FAC y su comparación con otros tipos de FA de otras especies mediante el uso de técnicas como cristalografía de rayos x	Hough et al., 2002
<i>Penaeus japonicus</i>	Se evaluó el comportamiento de la topoisomerasa del camarón para observar la actividad de la FAC midiendo las reacciones de fosforilación de desfosforilación utilizando técnicas como electroforesis, ensayo de ADN topoisomerasa, western immunoblotting.	Chuang et al., 1996
<i>Penaeus monodon</i>	Se realizó la purificación de la FAC en donde se comprobó que existían 3 isoformas en el hepatopáncreas de camarón, utilizando técnicas como electroforesis, ensayos de actividad, cromatografía.	Lee y Chuang, 1991
<i>Penaeus japonicus</i>	Se realizó una purificación de la FAC encontrando que el proceso de glicosilación se produce en esta enzima, se utilizaron técnicas como electroforesis, ensayo de actividad.	Chuang, 1990
<i>Panadalus borealis</i>	Se realizó una purificación de la FAC se observó algunos inhibidores mediante técnicas de purificación, electroforesis, ensayo de actividad, cromatografía.	Olsen et al., 1991
<i>Penaeus vannamei</i>	Se evaluó el uso de probióticos en la alimentación de camarones sobre la actividad de la FAC	Wang y He, 2009

Fuente: elaborado por J.L. Arias-Moscoso a partir de datos obtenidos de los autores en la última columna

topáncreas, el cual tiene funciones de síntesis y secreción de enzimas digestivas, así como la absorción, el mantenimiento de sustancias minerales y orgánicas, funciones metabólicas y distribución de reservas almacenadas (Janeo y Corre, 2011; Senphan y Benjakul, 2012; Mugniera et al., 2013). Las enzimas digestivas más conocidas son las lipasas, amilasas, fosfatasas y proteasas (Dupuis et al. 1991; Ziaei-Nejad et al., 2006). La enzima fosfatasa alcalina está implicada en la transfosforilación, catalizando dos tipos de reacciones en presencia de oxígeno, una de ellas es la hidroxilación de un monofenol para formar un orto-difenol, y la otra, es la subsecuente oxidación a una orto-quinona, asimismo participa en el transporte de lípidos (Coleman, 1992; Fuentes et al., 1998; Liao et al., 2005).

Los principales cambios en las enzimas responsables de la digestión se deben a los cambios fisiológicos en el estado larval, ya que en las primeras etapas de vida llevan una dieta enteramente herbívora y luego pasan a ser carnívoros, presentándose primero un sistema enzimático conformado por amilasas y luego por proteasas (Zhou et al., 2009; Niu et al., 2012). La muda en los crustáceos, implica una serie de etapas, en las que los animales pierden sus exoesqueletos para crecer. Los camarones tienen períodos de ayuno de 3-4 días, en esta etapa los organismos carecen de estructuras rígidas para manejar el alimento (Buarque et al., 2010), por lo tanto, cuando el organismo es incapaz de ingerir o cuando hay falta de alimentos, existe una disminución de actividad del aparato digestivo y, se espera un aumento de las enzimas homologas en el área intracelular (Rivera et al., 2011a).

CONCLUSIÓN

Los diferentes estudios de caracterización como RNA, PCR, cristalografía, rayos X y movilidad electroforética de la fosfatasa alcalina de origen terrestre, muestran homología con la fosfatasa alcalina de camarón, detectando similitud en cuanto a la estructura, peso molecular y constitución del sitio activo. La fosfatasa alcalina de camarón tiene potencial para ser utilizada como herramienta analítica, dando pie al desarrollo de técnicas inmuno enzimáticas para el beneficio de las ciencias biológicas.

REFERENCIAS

Araujo, B. O., Rofatto, H. K., Tararam, C. A., Farias, L. P., Oliveira, K. C., Verjovski-Almeida, S., Wilson, R. A., y Leite, L. C. 2011. *Schistosoma mansoni*: Molecular characterization of Alkaline Phosphatase and expression patterns across life cycle stages. *Experimental Parasitology*. 129: 284-291.

Backer, M., McSweeney, S., y Hough, E. 2004. Ligand-binding and metal-exchange crystallographic studies on shrimp alkaline phosphatase. *Biological Crystallography*. 60: 1555-1561.

Barford, D. 2011. The structure and Topology of Protein Serine/Threonine Phosphatases. En Bradshaw R, (Ed.), *Transduction Mechanisms in Cellular Signaling: Cell Signaling Collection* (pp. 123-126). California: Elsevier.

Berg, J. S., Powell, B. C., y Cheney, R. E., 2001. A Millennial Myosin Census. *Molecular Biology of the Cell*. 12: 780-794.

Bhardwaj, R., y Skelly, P. J. 2011. Characterization of *Schistosoma tegumental* Alkaline Phosphatase (SmAP). *Plos Neglected Tropical Diseases*. 5: 1011-1018.

Boby, E., Lassila, J. K., Wiersma-Koch, H. I., Fenn, T. D., Lee, J. J., Nikolic-Hughes, I., Hodgson, K. O., Rees, D. C., Hedman, B., y Herschlag, D. 2012. High-Resolution Analysis of Zn²⁺ Coordination in the alkaline phosphatase superfamily by EXAFS and X-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology*. 415:1, 102-117.

Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Verakunpiriya, V., y Supraser, D. 2001. Effects of aflatoxins B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimps (*Penaeus monodon Fabricius*). *Aquaculture Research*. 32: 388-398.

Buarque, D. S., Castro, P. F., Santos, F. M., Amaral, I. P., Oliveira, S. M., Alves, K. B., Carvalho, L. B., y Bezerra, R. S. 2010. Digestive proteinases and peptidases in the hepatopancreas of the

southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) in two sub-adult stages. *Aquaculture Nutrition*. 16: 359-369.

Coleman, J. E. 1992. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 21: 441-483.

Chen, H., Xie, L., Yu, Z., y Zhang, R. 2005. Inhibition of Alkaline Phosphatase from Pearl Oyster *Pinctada fucata* by o-Phthalaldehyde: Involvement of Lysine and Histidine Residues at the Active Site. *Tsinghua Science & Technology*. 10: 414-420.

Chen, K. T., Malo, M. S., Beasley-Topcliffe, L. K., Poelstra, K., Millan, J. L., Mostafa, G., Alam, S., Ramasamy, S., Warren, H. S., Hohmann, E., y Hodin, R. A. 2011. A Role for Intestinal Alkaline Phosphatase in the Maintenance of Local Gut Immunity. *Digestive Diseases and Sciences*. 56: 1020-1027.

Chuang, N. N. 1990. A Heat-Stable Alkaline-Phosphatase from *Penaeus Japonicus* Bate (*Crustacea, Decapoda*) - a Phosphatidylinositol-Glycan Anchored Membrane-Protein. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 95: 165-169.

Chuang, N. N., Lin, C. L., y Chen, H. K. 1996. Modification of DNA topoisomerase I enzymatic activity with phosphotyrosyl protein phosphatase and alkaline phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (*Crustacea: Decapoda*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 114: 145-151.

Chuang, N. N., y Shih, S. L. 1990. Purification and some properties of alkaline phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (*Crustacea: Decapoda*). Division of Biochemistry and Molecular Science. Institute of Zoology, Taipei, Republic of China, pp. 1-7.

Delgado, A., Minguillon, C., y Joglar, J., 2002. Introducción a la Química Terapéutica. 77-78.

Dupuis, Y., Tardivel, S., Porembska, Z., y Fournier, P. 1991. Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *International Journal of Biochemistry*. 23, 175-180.

Ezquerro, J. M., Farias, S., Torres-Arreola, W., y Burgos-Hernández, A. 2011. In vitro studies of the effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 250: 399-410.

Fuentes, X., Castiñeiras, M. J., y Queraltó, J. M. 1998. Capítulo 56 Alteraciones hepatobiliares. Pages 540 in A. ERS, ed. *Bioquímica clínica y patología molecular*, vol. 2. Barcelona.

García, F.L., Ezquerro, J. M., y Haard, N. F. 1997. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry*. 21: 401-419.

Harper, H. A. 2001. *Bioquímica de Harper*. 28th ed. México. 77-78

Harris, H. 1989. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta*. 186, 133-150.

Helland, R., Larsen, R. L., y Asgeirsson, B. 2009. The 1.4 Å crystal structure of the large and cold-active *Vibrio* sp. alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1794, 297 - 308.

Hernández, D., Bécquer, U., Montalbán, M., y Espinosa, G. 2006. Patrones electroforéticos de proteínas durante el desarrollo del camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. *Revista de Investigaciones Marinas*. 27, 147 - 152.

Holtz, K. M., Stec, B., Myers, J. K., Antonelli, S. M., Widlanski, T. S., y Kantrowitz, E. R. 2000. Alternate modes of binding in two crystal structures of alkaline phosphatase-inhibitor complexes. *Protein Science*. 9: 907-915.

- Hose, J. E., Lightner, D. V., Redman, R. M., y Danald, D. A. 1984. Observations on the pathogenesis of the imperfect fungus, *Fusarium solani*, in the California brown shrimp, *Penaeus californiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 44: 292-303.
- Hough, E., de Backer, M., McSweeney, S., Rasmussen, H. B., Riise, B. W., y Lindley, P. 2002. The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase. *Journal of Molecular Biology*. 318: 1265-1274.
- Huai, M. Y., Liu, Y. J., Tian, L. X., Deng, S. X., Xu, A. L., Gao, W., y Yang, H. J. 2010. Effect of dietary protein reduction with synthetic amino acids supplementation on growth performance, digestibility, and body composition of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 18: 255-269.
- Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell Biology International*. 80: 225-236
- Ivancic, I., Fuks, D., Radic, T., Lyons, D. M., Silovic, T., Kraus, R., y Precali, R. 2010. Phytoplankton and bacterial alkaline phosphatase activity in the northern Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*. 69: 85-94.
- Janeo, R. L., y Corre, V. L. 2011. Bacterial Change in the Gut and Hepatopancreas of Tiger Shrimp Reared in Bioaugmented System. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42: 863-872.
- Koodalingam, A., Mullainadhan, P., y Arumugam, M. 2011. Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*. 118: 27-36.
- Koutsoulis, D., Lyskowski, A., Mäki, S., Guthrie, E., Feller, G., Bouriotis V., y Heikinheimo, P. 2010. Coordination sphere of the third metal site is essential to the activity and metal selectivity of alkaline phosphatases. *Protein Science*. 19:1, 75-84.
- Kwon, H., Oh, S., y Yang, H. S. 2011. Ecological significance of alkaline phosphatase activity and phosphatase-hydrolyzed phosphorus in the northern part of Gamak Bay, Korea. *Marine Pollution Bulletin*. 62: 2476-2482.
- Lee, A. C., y Chuang, N. N. 1991. Characterization of Different Molecular Forms of Alkaline-Phosphatase in the Hepatopancreas from the Shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 99: 845-850.
- Li, E. C., Chen, L. Q., Zeng, C., Yu, N., Xiong, Z. Q., Chen, X. F., y 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: 80-86.
- Li, F., y Xiang, J. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental & Comparative Immunology*. 39: 11-26.
- Liao, Z. R., Qiu, J. H., Meng, X. G., Zhu, L., Wang, Z. M., y Yu, K. B. 2005. Crystal structures and polyphenol oxidase activities of dinuclear copper (II) and cobalt (II) complexes with N,N,N,N-tetrakis (2'-benzimidazolylmethyl)-1,4-diethylene amino glycol ether (EGTB). *Polyhedron*. 24: 1617-1623.
- Liu, X., Ye, J., Wang, K., Kong, J., Yang, W., y Zhou, L. 2011. Partial replacement of fish meal with peanut meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 43: 745-755.
- Martínez, L. R. 1999. Capítulo 6 Nutrición. En S.A. AGTE (Ed.), Cultivo de camarones *peneidos* principios y prácticas (pp. 290). México.
- Menzorova, N. I., Ivleva, A. D., Sibirtsev, Y. T., y Rasskazov, V. A. 2008. Phosphatases and Phosphodiesterases Isolated from the Red King Crab (*Paralithodes camtschatica*) Hepatopancreas. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44: 106-110.
- Mugniera, C., Justoua, C., Lemonnier, H., Patrois, J., Ansquera, D., Goarant, C., y Lecoz, J. 2013. Biological, physiological, immunological and nutritional assessment of farm-reared *Litopenaeus stylirostris* shrimp affected or unaffected by vibriosis. *Aquaculture*. 388-391: 105-114.
- Muhlia, A., y García, F. L. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 133: 383-394.
- McDonald, A. G. y Tipton, K. F. 2012. Enzymes: Irreversible Inhibition. eLS.
- McLauchlan, C., Hooker, J., Jones, M., Dymon, Z., Backhus, E., Greiner, B., Dorner, N., Youkhana, M., y Manus, L. 2010. Inhibition of acid, alkaline, and tyrosine (PTP1B) phosphatases by novel vanadium complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 104: 274-281.
- Nha, V. V., Hoa, D. T., y Khoa, L. V. 2009. Black gill disease of cage-cultured ornate rock lobster *Panulirus ornatus* in central Vietnam caused by *Fusarium* species. *Aquatic animal health*. 14: 35-37.
- Nilsen, I. W., Overbo, K., y Olsen, R. L. 2001. Thermolabile alkaline phosphatase from Northern shrimp (*Pandalus borealis*): protein and cDNA sequence analyses. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 129: 853-861.
- Niu, J., Lina, H., Jianga, S., Chena, X., Wua, K., Tianb, L., y Liu, Y. 2012. Effect of seven carbohydrate sources on juvenile *Penaeus monodon* growth performance, nutrient utilization efficiency and hepatopancreas enzyme activities of 6-phosphogluconate dehydrogenase, hexokinase and amylase. *Animal Feed Science and Technology*. 174: 86-95.
- Olsen, R. L., Overbo, K., y Myrnes, B. 1991. Alkaline-Phosphatase from the Hepatopancreas of Shrimp (*Pandalus-Borealis*): A dimeric enzyme with catalytically active subunits. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 99: 755-761.
- Pongsomboon, S., Wongpanya, R., Tang, S., Chalorsrikul, A., y Tassanakajon, A. 2008. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 485-493.
- Puttige, K., y Nooralabettu, K. P. 2012. Effect of homogenization speed and time on the recovery of alkaline phosphatase from the hepatopancreatic tissues of shrimps. *Food Science and Biotechnology*. 21, 461-466.
- Rader, B., Kremer, N., Apicella, M., Goldman, W., y McFall-Ngaia, M. 2012. Modulation of Symbiont Lipid A Signaling by Host Alkaline Phosphatases in the Squid-Vibrio Symbiosis. *Journal mBio*, 3, 96-112.
- Rédei, G. P. 2008. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics, Springer, Columbia.
- Rivera, C., del Toro, M. D., y García, F. 2011a. Purification and characterization of an intracellular lipase from pleopods of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 158: 99-105.

- Rivera, C., García, F. L., y Saborowski, R. 2011b. Purification and Biochemical Characterization of Digestive Lipase in Whiteleg Shrimp. *Marine Biotechnology*, 13: 284-295.
- Sasajima, Y., Iwasaki, R., Tsumoto, K., Kumagai, I., Ihara, M., y Ueda, H. 2010. Expression of antibody variable region-human alkaline phosphatase fusion proteins in mammalian cells. *Journal of Immunological Methods*. 361: 57-63.
- Segel, I. H. 1993. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems* (Wiley Classics Library), Wiley Classics Library Edition Published 1993, United States of America.
- Seibert, C. H., y Pinto, A. R. 2012. Challenges in shrimp aquaculture due to viral diseases: distribution and biology of the five major penaeid viruses and interventions to avoid viral incidence and dispersion. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43: 857-864.
- Senphan, T., y Benjakul, S. 2012. Compositions and yield of lipids extracted from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by prior autolysis. *Food Chemistry*. 134: 829-835.
- Smyth, T. P. 2004. Substrate variants versus transition state analogues as noncovalent, reversible enzyme inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 12: 4081-4088.
- Supamattaya, K., Sukrakanchana, N., Boonyaratpalin, M., Schatzmayr, D., y Chittiwat, V. 2005. Effects of ochratoxin A and deoxynivalenol on growth performance and immunophysiological parameters in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Science and Technology*. 27: 91-99.
- Vargas, F., y Yepiz, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. 191: 13-21.
- Vendrell, M., y Morell, F. 1997. Teofilinas de liberación sostenida de 12 y 24 horas. Estudio comparativo. *Arch Bronconeumol*, 33: 365-366.
- Wang, J. X., Wang, X. W., Xu, W. T., Zhang, X. W., Zhao, X. F., y Yu, X. Q. 2009. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*. 27: 556-562.
- Wang, Y. B., y He, Z. L. 2009. Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds. *Aquaculture*. 287: 94-97.
- Wang, S., Su, P., Huang, J., Wu, J., y Yang, Y. 2013. Magnetic nanoparticles coated with immobilized alkaline phosphatase for enzymolysis and enzyme inhibition assays. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 1749-1754.
- Wende, A., Johansson, P., Vollrath, R., Dyll-Smith, M., Oesterhelt, D., y Grininger, M. 2010. Structural and Biochemical Characterization of a Halophilic Archaeal Alkaline Phosphatase. *Journal of Molecular Biology*. 400: 52-62.
- Whisnant, A. R., y Gilman, S. D. 2002. Studies of reversible inhibition, irreversible inhibition, and activation of alkaline phosphatase by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 307: 226-234.
- Whitehouse, J., Riggle, K., Purpi, D., Mayer, A., Pritchard, K., Oldham, K., y Gourlay, D. 2010. The Protective Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Surgical Research*. 163: 79-85.
- Wickins, J. F., y Lee, D. O. 2002. *Crustacean Farming Rearing and Culture*. Blackwell Science Ltd, Iowa.
- Zalatan, J., Herschlag, D., y Fenn, T. 2008. Comparative Enzymology in the Alkaline Phosphatase Superfamily to Determine the Catalytic Role of an Active-Site Metal Ion. *Journal of Molecular Biology*. 384: 1174-1189.
- Ziaei-Nejad, S., Habibi, M., Azari, G., Lovett, D., Mirvaghefi, A., y Shakouri, M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*. 252: 516-524.
- Zhan, W., Wang, X., Chen, J., Xing, J., y Fukuda, H. 2004. Elimination of shrimp endogenous alkaline phosphatase background and development of enzyme immunoassays for the detection of white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*. 239: 15-21.
- Zhang, R., Chen, Q., Xiao, R., Xie, L., Zeng, X., y Zhou, H. 2001. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase by zinc ions: a new type of complexing inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1545: 6-12.
- Zhang, R., Chen, Q., Zheng, W., Lin, J., Zhuang, Z., y Zhou, H. 2000. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 32: 865-872.
- Zhisheng, L., Wentao, C., Rui, L., Xiaojian, H., y Yu, D. 2010. A novel method for high-level production of psychrophilic TAB5 alkaline phosphatase. *Protein Expression and Purification*. 74: 217-222.
- Zhou, X., Wang, Y., y Li, W. 2009. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture*. 287: 349-353.

Anexo Abreviaciones: FA, Fosfatasa alcalina; FAC, fosfatasa alcalina de camarón