

Research Article

Influencia de la alimentación sobre el ritmo circadiano de las enzimas digestivas en el cultivo de juveniles de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae)

Hernán J. Sacristán¹, Luis M. Franco-Tadic¹ & Laura S. López-Greco¹

¹Laboratorio de la Reproducción y el Crecimiento de Crustáceos Decápodos. Depto. de Biodiversidad y Biología Experimental, FCE y N. Universidad de Buenos Aires. Cdad. Universitaria. Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria - C1428EGA. IBBEA, CONICET-UBA, Argentina

RESUMEN. Se analiza en juveniles en etapa de engorde (7 g) de *Cherax quadricarinatus*, el ritmo circadiano de los niveles de proteínas totales, la actividad de las proteasas, lipasas y amilasas, y su posible modificación en función del momento de alimentación matutino (8 h) y vespertino (17 h). En general, la actividad de las enzimas digestivas de los juveniles de *C. quadricarinatus* no mostró un patrón circadiano de secreción, a excepción de las lipasas, donde se observó un incremento de actividad hacia la tarde-noche y disminución hacia las primeras horas de la mañana. Los niveles de proteína total, la actividad de proteinasas y amilasas registradas en la glándula digestiva, permanecieron prácticamente inalterados en todos los experimentos. A pesar de ello, se observó tendencia a que los niveles de actividad de proteinasas disminuyan luego del pulso de alimentación, recuperando los niveles anteriores 3 h después, independientemente del horario de alimentación. En cambio la actividad de amilasa no mostró ninguna tendencia por efecto del horario de alimentación. El estudio de los patrones de secreción de las enzimas digestivas y sus posibles modificaciones, podría ser utilizado como una herramienta para establecer los momentos del día más propicios para la alimentación de los juveniles en cultivo.

Palabras clave: enzimas digestivas, glándula digestiva, ritmo circadiano, langostas, juveniles, *Cherax quadricarinatus*.

Influence of feeding on the circadian rhythm of digestive enzymes in cultivated juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae)

ABSTRACT. We analyze in juvenile *Cherax quadricarinatus* fattening stage, the circadian rhythm of total protein levels, activity of proteases, lipases and amylases, and their possible change as a function of morning (8 h) and evening (17 h) feeding. In general, the activity of digestive enzymes of juvenile *C. quadricarinatus* showed no circadian pattern of secretion of lipases except where there was an increase towards the evening-night and a decrease towards the early hours of the morning. The total protein levels, the activity of proteinases and amylases of juveniles of *C. quadricarinatus* registered in the midgut gland remained virtually unchanged in all experiments. However, a non-significant tendency to diminish the proteinase activity levels after the feeding pulse was observed, with a return to previous enzymatic levels after 3 h. In contrast, the amylase activity did not show an observable effect by the feeding schedule. The study of the patterns of the digestive enzyme secretion and their possible changes, could be used as a tool to establish the most favorable times of the day for juveniles feeding.

Keywords: digestive enzymes, digestive gland, circadian rhythm, crayfish, juveniles, *Cherax quadricarinatus*.

Corresponding author: Laura S. López-Greco (laura@bg.fcen.uba.ar)

INTRODUCCIÓN

La langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* es una especie omnívora oportunista, nativa del norte de

Queensland (Australia) y Nueva Guinea, que posee un gran potencial para la acuicultura debido a su alta tasa de crecimiento, fácil manejo y alta productividad, entre otras características (Villarreal & Peláez, 1999;

Cortés-Jacinto *et al.*, 2003; Ghanawi & Saoud, 2012). En la actualidad se cultiva en forma intensiva y semi-intensiva en varios países incluyendo Australia, Estados Unidos, China, Ecuador, México y Argentina (Luchini, 2004; Rodgers *et al.*, 2006).

El alimento es uno de los componentes principales en los costos de operación de un emprendimiento acuícola alcanzando, en muchos casos, niveles superiores al 50% del total (Cortés-Jacinto *et al.*, 2003) por lo que su optimización es fundamental para la viabilidad de un cultivo. *C. quadricarinatus* es una especie de rápido crecimiento, donde el consumo diario de alimento, en la etapa de engorde, es muy significativo. Además de su costo, una forma inadecuada de alimentación en cantidad, calidad o momento del día, implica una pérdida del mismo con la concomitante disminución en la calidad de agua y eliminación innecesaria de nutrientes al ambiente, particularmente en sistemas semi-intensivos. Por lo tanto, es importante analizar los procesos fisiológicos que pueden afectar la capacidad de consumo y digestión del alimento en los cuales la actividad enzimática tiene significativa importancia (Dall, 1992; Molina *et al.*, 2000).

La actividad de las enzimas digestivas ha sido estudiada en varias especies de crustáceos decápodos y se ha demostrado que la actividad se ve afectada por la ontogenia, estadio del ciclo de muda, composición de la dieta, ritmos circadianos, fotoperíodo y calidad de la luz, temperatura, hábitos alimentarios e incluso el hábitat (Saoud *et al.*, en prensa).

Seiffert (1997) y Nunes & Parsons (1999), observaron que los camarones *Farfantepenaeus paulensis* y *F. subtilis* buscan activamente y consumen las mayores cantidades de alimento a la misma hora cada día, después del amanecer y al atardecer (Casillas-Hernández *et al.*, 2006). Molina *et al.* (2000), hallaron las mayores actividades de proteasas y lipasas en camarones alimentados en el horario de 12 y 20 h, mientras que la actividad de amilasa resultó mayor a las 8 y 12 h. Estudios sobre la alimentación circadiana de *Litopenaeus schmitti* (Díaz-Granda, 1997), demostraron que el mejor horario de alimentación para su crecimiento es a las 10 h y, además, se detectaron máximos de actividad enzimática proteolítica asociados al horario de alimentación.

En la especie *C. quadricarinatus* se utiliza como protocolo habitual, el suministro diario de alimento por la tarde (Jones, 1995), considerando el mayor grado de actividad de los animales, pero ningún estudio ha evaluado si se registran ciclos de actividad de las enzimas digestivas asociados a esos momentos de alimentación. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo del presente estudio es analizar, en

juveniles de *C. quadricarinatus* en etapa de engorde, el ritmo circadiano de los niveles de proteínas totales, la actividad de las proteasas, lipasas y amilasas, y su posible modificación en función del momento de alimentación matutino y vespertino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los animales

Los juveniles de *Cherax quadricarinatus* se obtuvieron bajo condiciones de cultivo en laboratorio, a partir de un plantel de reproductores suministrado por el criadero Pinzas Rojas, Tucumán, Argentina. Cada hembra ovígera, obtenida en laboratorio, fue mantenida en acuarios individuales de 60x40x30 cm conteniendo 30 L de agua dechlorada y con aireación continua. La temperatura se mantuvo constante a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por medio de calentadores Altman (100 W, precisión 1°C), y fotoperíodo de 14:10 (L:O). Cada acuario fue provisto de un tubo de PVC (10 cm de diámetro y 25 cm de largo) como refugio (Jones, 1995). Las hembras fueron alimentadas diariamente *ad libitum* con *Elodea* sp., y con el alimento comercial Tetradiskus Tetracolor® (composición proximal: 47,5% proteína cruda mín.; 6,5% lípidos totales mín.; 6% humedad máx., 2,0% fibra cruda máx., 1,5% fósforo mín. y 100 mg kg⁻¹ ácido ascórbico mín.) de acuerdo a estudios previos (Vázquez *et al.*, 2008; Stumpf *et al.*, 2010; Tropea *et al.*, 2010). Cuando los juveniles se independizaron en el estadio III (Levi *et al.*, 1999), fueron separados de sus madres y mantenidos hasta alcanzar el peso deseado para los ensayos en las mismas condiciones anteriormente descriptas. Se seleccionaron sólo individuos en estadio de intermuda para cada ensayo.

Diseño experimental

Se realizaron dos ensayos: uno para caracterizar el ciclo circadiano basal de actividad de las enzimas digestivas (experimento 1: Ritmo circadiano) y otro, para evaluar el efecto de la alimentación suministrada por la mañana o por la tarde sobre la actividad de las enzimas digestivas (experimento 2: Pulso de alimentación). Los parámetros de calidad del agua fueron medidos una vez a la semana en el tanque de reserva de agua del laboratorio (200 L), a partir del cual se obtuvo el volumen de agua necesario para ambos experimentos. Los parámetros físicos y químicos estuvieron dentro de los rangos óptimos recomendados por Jones (1997) para *C. quadricarinatus*: oxígeno disuelto (5,4-8,0 mg L⁻¹), pH (7,3-8,4), dureza (65-95 mg L⁻¹ expresado como equivalentes de CaCO₃), nitritos (<0,05 mg L⁻¹) y temperatura (26-27°C).

Experimento 1: Ritmo circadiano

Se seleccionaron 48 juveniles en intermuda ($6,67 \pm 0,61$ g de peso promedio) que fueron asignados al azar en recipientes individuales de vidrio (13,5 cm diámetro x 13,5 cm alto) conteniendo 1,5 L de agua de clorada, aireación continua y fotoperiodo 14:10 (L:O). Posteriormente, los envases conteniendo los juveniles fueron distribuidos al azar en cuatro acuarios de vidrio de 60×40×30 cm con agua mantenida a temperatura constante de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ (Altman 100 W, precisión 1°C). Ese mismo día, los animales fueron alimentados a las 15 h con Tetracolor® al 5% de su peso. A las 8 h del día siguiente fueron alimentados al mismo porcentaje, y 4 h después fueron colocados en otros recipientes individuales de vidrio con agua limpia y en las mismas condiciones anteriormente descriptas. Bajo estas condiciones los animales fueron mantenidos sin alimentación durante 24 h (desde las 12 h de un día hasta las 12 h del día siguiente). Al cumplirse las 24 h de ayuno seis animales al azar fueron anestesiados y sacrificados, cada 3 h durante las siguientes 24 h (la cantidad total de tiempos evaluados fue ocho) (Fig. 1a).

Experimento 2: Pulso de alimentación

Para este ensayo se seleccionaron 72 juveniles en intermuda que fueron colocados al azar en recipientes de vidrio (13,5 cm diámetro x 13,5 cm alto) y asignados al azar a dos grupos: Grupo 1 ($6,89 \pm 0,52$ g; n = 36) y Grupo 2 ($6,67 \pm 0,66$ g; n = 36).

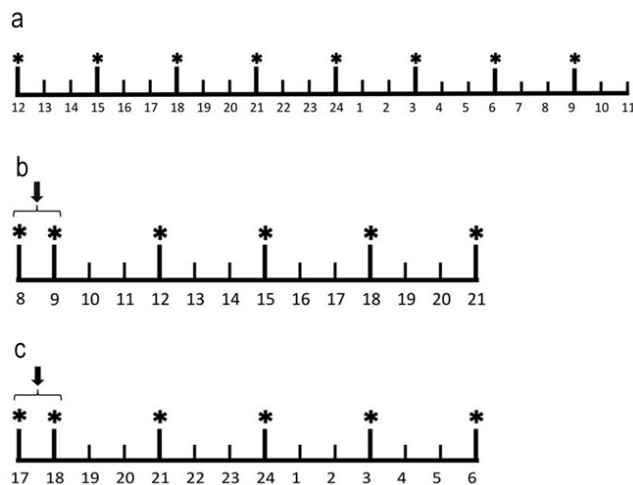


Figura 1. Esquema de los diseños experimentales luego de 24 h de ayuno. a) Ritmo circadiano, b) pulso de alimentación matutino, c) Pulso de alimentación vespertino. Los números corresponden a las horas del día, las flechas indican el momento de alimentación y los asteriscos (*) indican los tiempos a los cuales se sacrificaron los animales en cada experimento.

Para cada grupo, se acondicionaron cuatro acuarios de vidrio para colocar los envases individuales de la misma manera que en el Experimento 1. En estas condiciones los animales fueron privados de alimento por 24 h. Luego de este periodo, a cada grupo se les suministró “un pulso de alimento” Tetracolor® al 5% de su peso por 1 h: a las 8 h para el Grupo 1 (alimentación matutina) y a las 17 h para el Grupo 2 (alimentación vespertina). Se utilizaron como control de la condición enzimática inicial (antes del pulso de alimento) seis animales de cada grupo que fueron sacrificados.

A las 9 h para el Grupo 1 y a las 18 h para el Grupo 2, seis animales al azar fueron anestesiados y sacrificados cada 3 h durante las siguientes 12 h (la cantidad total de tiempos evaluados fue cinco) (Figs. 2b-2c).

Extracción de la glándula digestiva y preparación enzimática

Al finalizar los experimentos, los animales fueron anestesiados en agua fría, se disecó la glándula digestiva, se pesó (precisión 0,01 mg) y rápidamente fue congelada a -80°C hasta su posterior uso. La preparación enzimática consistió en homogeneizar la glándula digestiva en un buffer Tris HCl (50 mM, pH 7,5) en una proporción 1:4 (1 g de glándula digestiva y 4 volúmenes de Tris-HCl), y posteriormente se centrifugaron a 10.000X g por 30 min a 4°C (Fernández-Giménez *et al.*, 2008, 2009). La capa de lípidos fue removida y los sobrenadantes (extractos enzimáticos) fueron almacenados a -20°C hasta su posterior análisis.

Ensayos de actividad enzimática

Proteínas totales: la determinación de proteínas de los extractos enzimáticos de la glándula digestiva se realizó mediante el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Actividad de proteinasas: la actividad proteolítica de las muestras fue determinada, de acuerdo a García-Carreño (1992), usando azocaseína como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 20 μL de extracto, añadiendo 230 μL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,2) y 500 μL de azocaseína (0,5% en Tris-HCl). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego, se detuvo la reacción con 500 μL de ácido tricloroacético al 20% (TCA) y se clarificó por centrifugación (8500 rpm por 10 min). Se registró la absorbancia a 440 nm.

Actividad de lipasas: la actividad de lipasas de cada extracto crudo fue determinada de acuerdo a Versaw *et al.* (1989). La mezcla de reacción consistió

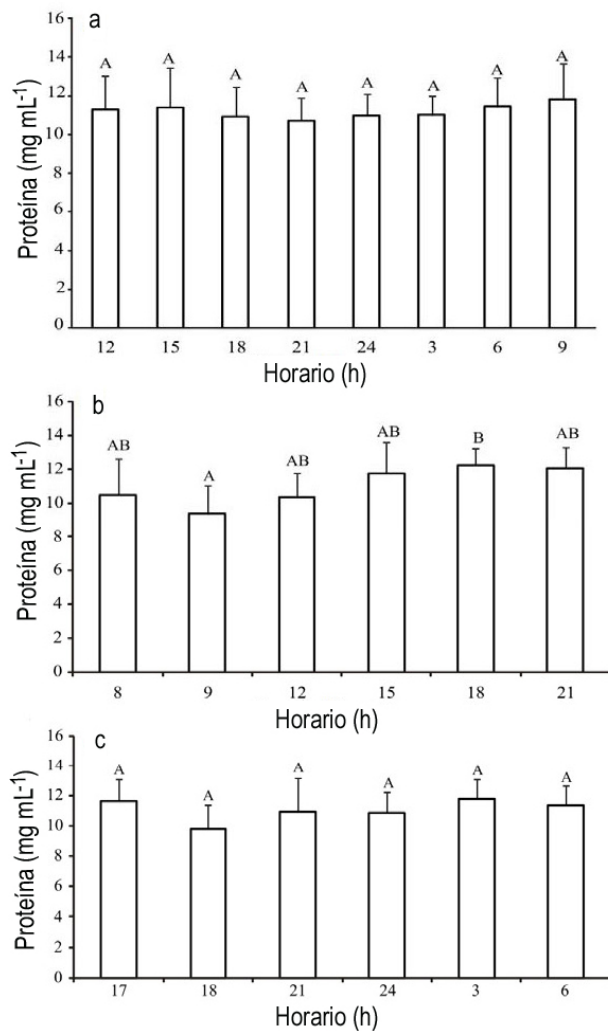


Figura 2. Niveles de proteína total en la glándula digestiva de los juveniles de *C. quadricarinatus*. a) Ritmo circadiano, b) Pulso de alimentación matutino, c) Pulso de alimentación vespertino. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las horas de cada experimento. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

en 100 μ L de taurocolato de sodio (100 mM), 920 μ L TRIS HCl (50 mM, pH 8), 10 μ L del extracto enzimático y 10 μ L β -naftil caprilato como sustrato (100 mM en dimetil sulfoxide (DMSO)). La mezcla se incubó a 25°C por 30 min. Luego, se agregó 10 μ L Fast Blue BB (100 mM en DMSO) y la mezcla se incubó a la misma temperatura por 5 min. Se detuvo la reacción con 100 μ L TCA (0,73 N), se clarificó con 1,350 mL de acetato de etilo: etanol (1:1 V/V) y se registró la absorbancia a 540 nm. Los tubos de referencia fueron preparados de manera similar, pero el extracto crudo fue agregado posteriormente a la solución de TCA.

Actividad de amilasas: la actividad de amilasas de cada extracto crudo fue determinada de acuerdo a Vega-Villasante *et al.* (1993), con modificaciones. La mezcla de reacción consistió en agregar 500 μ L TRIS HCl (50 mM, pH 7,5), 5 μ L extracto enzimático, y 500 μ L de una solución de almidón (1% en TRIS HCl, 50 mM, pH 7,5). Se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La actividad de amilasa se determinó cuantificando de la producción de azúcares reductores resultante de la hidrólisis del almidón; inmediatamente después de la incubación, se agregaron a la mezcla de reacción 200 μ L de Na CO₃ (2 N) y 1,5 mL del reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) y se hirvió a baño María por 15 min. Se ajustó el volumen a 10 mL con agua destilada y la solución coloreada se leyó a 550 nm. Los tubos de referencia fueron preparados de manera similar pero el extracto crudo fue agregado posteriormente a la solución del reactivo DNS.

La actividad específica de proteinasas, lipasas y amilasas se expresó como el número de unidades de enzima por miligramo de proteína por minuto (U mg proteína⁻¹ min⁻¹). Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar por minuto 0,01 unidades de densidad óptica a 440 nm (López-López *et al.*, 2005). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2011 a través del análisis de la varianza (ANOVA de un factor), seguido de comparaciones *a posteriori* de medias entre los diferentes tiempos para un mismo grupo (test de Tukey). Además, para los dos experimentos se comparó el estado inicial (24 h de ayuno) y se analizaron los resultados del Grupo 1 y Grupo 2 en función a las horas de post- alimentación. Previamente, se verificaron los supuestos del ANOVA y se aplicaron transformaciones de datos cuando fue necesario (Sokal & Rohlf, 1995). El nivel de significancia en todos los análisis fue de 0,05.

RESULTADOS

Los niveles de proteínas totales de la glándula digestiva de los juveniles del experimento de ritmo circadiano no variaron significativamente ($P > 0,05$) a lo largo de 24 h (Fig. 2a). Del mismo modo, tampoco se registraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los animales pertenecientes al Grupo 2 (pulso de alimentación vespertino) (Fig. 2c). En cambio en el Grupo 1 (pulso de alimentación matutino) se registró un incremento significativo entre las 9 y 18 h (Fig. 2b).

Los niveles de actividad de proteinasas registradas en los extractos enzimáticos para el Grupo 1, Grupo 2 y ritmo circadiano, no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los distintos horarios ensayados. Dichos niveles fluctuaron entre 0,57 y 2,74 U mg proteína⁻¹ min⁻¹; 0,72 y 3,06 U mg proteína⁻¹ min⁻¹; y 0,77 y 2,90 U mg proteína⁻¹ min⁻¹ respectivamente (Fig. 3). Tampoco se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre el Grupo 1 y Grupo 2 en función de las horas de post-alimentación, ni entre la actividad enzimática inicial (24 h de ayuno) para los tres experimentos.

La actividad de lipasas en el experimento de ritmo circadiano mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) a las 15 y 18 h donde se alcanzan los máximos valores

de actividad (155,03 y 150,74 U mg proteína⁻¹ min⁻¹ respectivamente) con respecto al tiempo de 12 h (78,53 U mg proteína⁻¹ min⁻¹), mientras que no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los otros horarios (Fig. 4a).

En los animales a los que se les suministró el pulso de alimentación matutino, se registraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la hora final de alimentación y el resto de los tiempos (Fig. 4b) alcanzando a las 9 h un valor promedio de 142,64 U mg proteína⁻¹ min⁻¹. Los niveles de actividad en este tratamiento fluctuaron entre un mínimo de 16,67 y un máximo de 186,68 U mg proteína⁻¹ min⁻¹. Se observó una tendencia al aumento de la actividad de lipasas hacia la 21 h, aunque no fue significativa ($P > 0,05$).

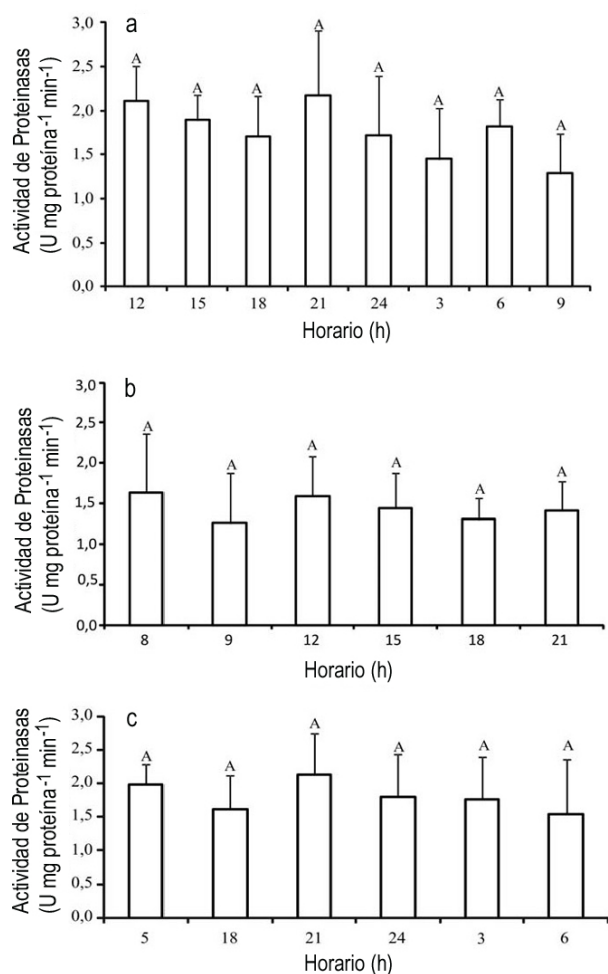


Figura 3. Niveles de actividad de proteinasas en la glándula digestiva de los juveniles de *C. quadricarinatus*. a) Ritmo circadiano, b) pulso de alimentación matutino, c) pulso de alimentación vespertino. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las horas de cada experimento ($P < 0,05$). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

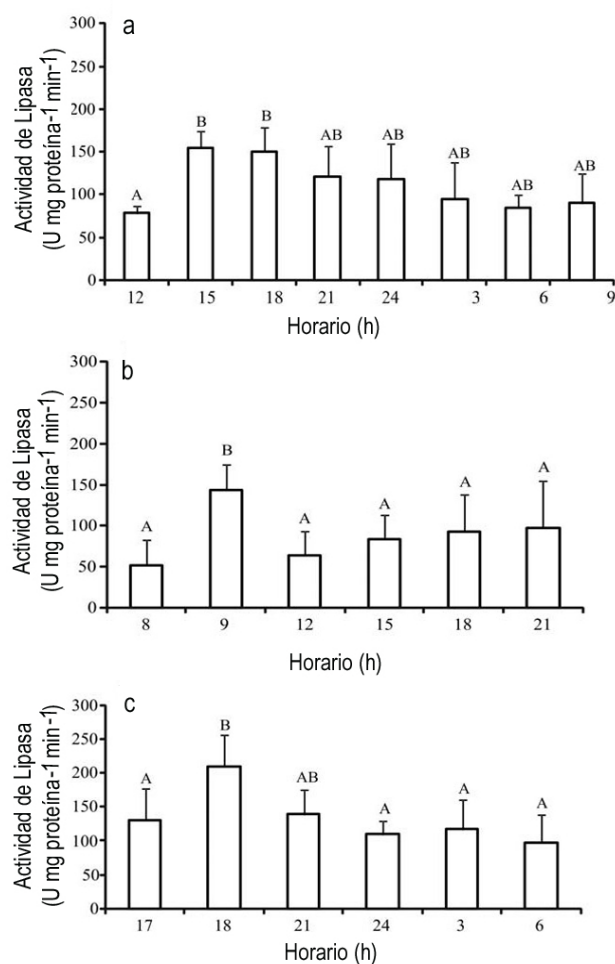


Figura 4. Niveles de actividad de lipasas en la glándula digestiva de los juveniles de *C. quadricarinatus*. a) Ritmo circadiano, b) pulso de alimentación matutino, c) pulso de alimentación vespertino. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las horas de cada experimento ($P < 0,05$). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

En los juveniles alimentados con el pulso de alimento vespertino, la actividad de lipasa fue significativamente mayor a las 18 h ($138,50 \text{ U mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$) con respecto a las 18, 24, 3 y 6 h (Fig. 4c). Los niveles de actividad en este experimento variaron entre un mínimo de $51,35$ y un máximo de $250,25 \text{ U mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$. También se observó una tendencia a que la actividad de lipasas disminuya hacia las 6 h.

Al analizar los niveles de actividad de lipasas del Grupo 1 y del Grupo 2, en función de las horas de post-alimentación, sólo se registraron diferencias significativas ($P < 0,05$) a las 3 h (12 y 21 h respectivamente), siendo mayor la actividad registrada para el Grupo 2. A su vez, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la actividad enzimática inicial entre los tres experimentos.

Por otro lado, los niveles de actividad de amilasas de la glándula digestiva en los juveniles de *C. quadricarinatus*, no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en los experimentos de ritmo circadiano, pulso de alimentación matutino y vespertino entre los diferentes tiempos ensayados (Fig. 5). En cambio, la actividad de amilasa, luego de 24 h de ayuno en el Grupo 1, fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que en el Grupo 2. Esta diferencia entre ambos grupos, también fue significativa una hora post-alimentación (9 h para el Grupo 1 y 18 h para el Grupo 2).

DISCUSIÓN

La actividad de las enzimas digestivas de los juveniles en etapa de engorde de *C. quadricarinatus* no mostraron un patrón circadiano de secreción a excepción de las lipasas, donde se observó un incremento de actividad hacia la tarde-noche. La ausencia de un patrón bifásico de las enzimas digestivas se contrapone con Vega-Villasante *et al.* (1999), en *Callinectes arcuatus*, que observaron un ritmo bifásico de la actividad de proteasas, lipasas y amilasas durante las primeras horas de la noche y después del amanecer.

Al analizar la actividad de proteinasas en presente estudio, los niveles fueron similares tanto en los animales alimentados con el pulso de alimento matutino como vespertino, es decir, independiente del horario de alimentación.

También se observó que el pulso de alimentación provoca, 1 h después del período de alimentación, un máximo de la actividad de lipasas, independiente que el pulso sea matutino o vespertino. Mientras que en los animales alimentados con el pulso de alimentación

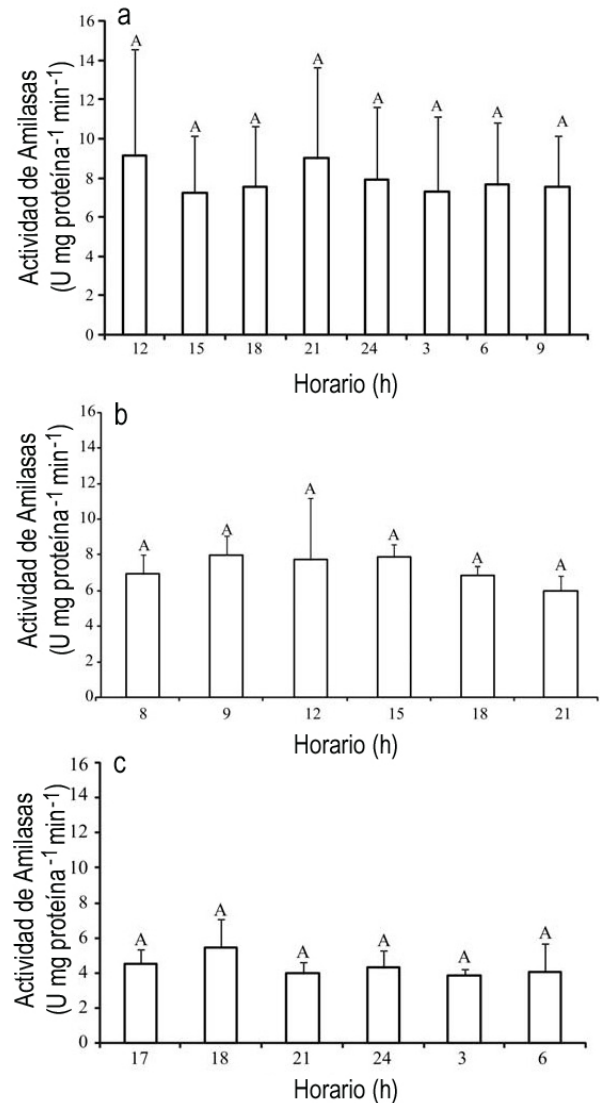


Figura 5. Niveles de actividad de amilasas en la glándula digestiva de los juveniles de *C. quadricarinatus*. a) Ritmo circadiano, b) pulso de alimentación matutino, c) pulso de alimentación vespertino. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las horas de cada experimento ($P < 0,05$). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

matutino se observó una recuperación de los niveles de actividad hacia valores iniciales, y su posterior aumento hacia las horas nocturnas con el pulso de alimentación vespertino, la tendencia fue disminuir dicha actividad hacia las primeras horas de la mañana. Ambas tendencias también fueron observadas en el ritmo circadiano. De esta manera, los picos máximos de actividad post-alimentación son una clara respuesta al estímulo alimenticio. En términos de valores absolutos, el presente análisis mostró que la actividad de lipasas fue mucho mayor que la de proteinasas y

amilasas, en los tres experimentos. En este sentido, estos resultados concuerdan con los trabajos anteriores realizados en *C. quadricarinatus* (López-López *et al.*, 2005; Pavasovic, 2008). A su vez, al analizar la actividad de amilasas los juveniles presentaron mayores niveles de actividad por la mañana que por la tarde.

Por otro lado, los niveles de proteína total registrada en la glándula digestiva, permanecieron prácticamente inalterados en los tres experimentos por lo que se puede concluir que, un período de ayuno de 24 h y un pulso de alimentación de 1 h no modifica el contenido de proteína total dentro de dicha glándula. La ausencia de modificaciones significativas en el nivel de proteínas, sugeriría que las proteínas no son las primeras moléculas utilizadas durante las etapas de ayuno. Barclay *et al.* (1983), trabajando con el camarón tigre *Penaeus esculentus*, propone que son los lípidos la fuente principal de energía utilizada durante el ayuno y la muda; la rápida respuesta de las lipasas al pulso de alimentación apoyaría también esta hipótesis para los juveniles de *C. quadricarinatus*.

Los resultados sobre crecimiento en *Litopenaeus vannamei* realizados por Robertson *et al.* (1993) sugieren que la alimentación durante las horas de luz, sería mejor que la alimentación nocturna. A su vez, Pontes & Arruda (2005) demostraron que *L. vannamei* accede a las bandejas de alimento e inicia un consumo rápido mostrando un mayor contenido en el tracto digestivo durante las horas de luz, por lo tanto estos resultados indican que el alimento debe ser ofrecido en la fase de luz, y en mayor proporción 7 h después del amanecer (Pontes *et al.*, 2006).

A su vez, Casillas-Hernández *et al.* (2006) analizando los horarios de alimentación y variación circadiana de las enzimas proteolíticas en *L. vannamei*, proponen que el alimento debe ser ofrecido 2 h antes del máximo de actividad, ya que genera mayores tasas de crecimiento, biomasa y sobrevivencia. Estos mismos autores analizaron la variación circadiana de la actividad proteolítica en camarones de diferentes tallas (5, 10, 25 y 30 g), en condiciones de fotoperiodo natural y ayuno (24 h), y observaron que el patrón de actividad de los ejemplares de 5 y 10 g fue muy similar, del mismo modo que entre los individuos de 25 y 30 g.

Nolasco-Soria & Vega-Villasante (2000), demostraron que en camarones peneidos, a pesar de contar con un ritmo de actividad enzimática, generalmente bifásico, es posible ejercer una estimulación exógena a través de los diferentes horarios de alimentación y, de esta manera, ajustar tales actividades a la programación de la alimentación del estanque. Sin embargo, no está claro si la modificación de los ritmos fisiológicos de alimentación puede influenciar negativamente en el crecimiento o salud de los organismos (Casillas-Hernández *et al.*, 2006).

En función de la actividad enzimática de las lipasas determinada en este estudio, se podría sugerir que lo más conveniente para *C. quadricarinatus* sería alimentarles por la tarde-noche. De todas formas, más estudios de esta índole se requerirán para corroborar estas observaciones. Analizando los trabajos de alimentación en *C. quadricarinatus*, sobre nutrición de juveniles, Jones (1995), utilizó en su protocolo de experimentación la alimentación por la tarde, basándose exclusivamente en su mayor actividad locomotora. A su vez, Cortés-Jacinto *et al.* (2003), en su estudio del efecto de la frecuencia alimenticia en el crecimiento y sobrevivencia de juveniles tempranos de *C. quadricarinatus*, recomienda alimentar con una frecuencia de cuatro veces al día, aunque estos estudios no se basan en el análisis de la actividad enzimática digestiva.

Considerando los antecedentes señalados, el siguiente paso sería evaluar, en función del patrón de actividad enzimática digestiva caracterizado para los juveniles en etapa de engorde, si lo más conveniente es suministrar el alimento en el horario donde se evidencia el máximo de actividad de lipasas o momentos antes o después de dicho máximo, para mejorar la eficiencia alimentaria de *C. quadricarinatus*. También se requieren otros estudios para ampliar el conocimiento sobre el ritmo circadiano y su posible modificación, de acuerdo a diferentes horarios de alimentación. En particular, trabajos con tiempos más cortos a los ensayados en el presente análisis serán necesarios, para detectar la presencia de pequeñas fluctuaciones intermedias que podrían ser claves para mejorar la eficiencia en el uso de alimento en juveniles, para su producción sustentable.

Finalmente, es importante destacar que *C. quadricarinatus* es de tipo omnívoro-oportunista y proviene de ambientes de agua dulce, donde la disponibilidad de alimento puede ser fluctuante y escasa (Jones, 1995; Calvo *et al.*, 2012). Por esta razón, no puede descartarse que la ausencia de ritmos circadianos de actividad enzimática digestiva se vincule con una fisiología enzimática diferente a la observada en camarones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2007, proyecto 01187), CONICET (PIP 2009-2011, proyecto 129) y UBACYT (proyectos X458 y 20020100100003) que financiaron esta investigación.

REFERENCIAS

- Barclay, M.C., W. Dall & D.M. Smith. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the molting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 68: 229-244.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-253.
- Calvo, N., C. Tropea, K. Anger & L.S. López Greco. 2012. Starvation resistance in juvenile freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Aquat. Biol.*, 16: 287-297.
- Casillas-Hernández, R., F. Magallón-Barajas, G. Portillo Clark & F. Páez-Osuna. 2006. Nutrient mass balances in semi-intensive shrimp ponds from Sonora, México using two feeding strategies: trays and mechanical dispersal. *Aquaculture*, 258: 289-298.
- Cortés-Jacinto, E., H. Villarreal-Colmenares, R. Civera-Cerecedo & L. Martínez-Córdova. 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Aquacult. Nutr.*, 9: 207-213.
- Dall, W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. In: G. Allan & W. Dall (eds.). *Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop*. Australia, pp. 57-63.
- Díaz-Granda, A.E. 1997. Horarios de alimentación del camarón *Penaeus schmitti* en condiciones de cultivo semi-intensivo. Tesis de Maestría en Biología, Universidad de la Habana, La Habana, 120 pp.
- Fernández-Giménez, A.V., A.C. Díaz, S.M. Velurtas, A.M. Petriella & J.L. Fenucci. 2008. Effects of different dietary vitamin A levels in the red shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate, 1888) (Decapoda, Solenoceridae). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 43(3): 483-490.
- Fernández-Giménez, A.V., A.C. Díaz, S.M. Velurtas & J.L. Fenucci. 2009. Partial substitution of fishmeal by meat and bone meal, soybean meal, and squid concentrate in feeds for the prawn, *Artemesia longinaris*: Effect on digestive proteinases. *Israeli J. Aquacult. Bamidgeh*, 61(1): 48-56.
- García-Carreno, F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, Decapoda): their partial characterization, and the effect of fed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 103: 575-578.
- Ghanawi, J. & P. Saoud. 2012. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868). *Aquaculture*, (358-359): 183-195.
- Jones, C.M. 1995. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Von Martens) (Decapoda, Parastacidae) II. Juvenile nutrition and habitat. *Aquaculture*, 138: 239-245.
- Jones, C.M. 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Department of Primary Industries, Queensland. Information Series, Q190028. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane, 109 pp.
- Levi, T., A. Bark, G. Hulata & I. Karplus. 1999. Mother-offspring relationships in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *J. Crust. Biol.*, 19: 477-484.
- López-López, S., H. Nolasco, H. Villarreal-Colmenares & R. Civera-Cerecedo. 2005. Digestive enzyme response to supplemental ingredients in practical diets for juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquacult. Nutr.*, 11: 79-85.
- Luchini, L. 2004. Algo más sobre el cultivo de la red claw (*Cherax quadricarinatus*). [<http://www.minagri.gov.ar/site/pesca/acuicultura/01=cultivos/01-especies/index.php>] Reviewed: 16 October 2012.
- Molina, P.C., E. Cadena & F. Orellana. 2000. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. In: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa, & R. Civera-Cerecedo (eds.). *V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Mérida, Yucatán, pp. 358-380.
- Nolasco-Soria, H. & F. Vega-Villasante. 2000. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. In: R. Civera-Cerecedo, C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie & L.E. Cruz-Suárez (eds.). *Avances en nutrición acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. La Paz, B.C.S., pp. 149-165.
- Nunes, A.J.P. & G.J. Parsons. 1999. Feeding levels of the southern brown shrimp *Penaeus subtilis* in response to food dispersal. *J. World Aquacult. Soc.*, 30: 331-348.
- Pavasovic, A. 2008. Evaluation of the nutritional requirements of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Ph. D. Thesis. Queensland University of Technology, Queensland, 165 pp.
- Pontes, C.S. & M. de F. Arruda. 2005. Acesso ao alimento artificial e enchimento do trato digestivo de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) durante as fases claras e escuras do período de 24 horas. *Rev. Bras. Zool.*, 22: 1039-1043.
- Pontes, C.S., M.D.F. Arruda, A.A. De Lara-Menezes & P.P. De Lima. 2006. Daily activity pattern of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931)

- juveniles under laboratory conditions. *Aquacult. Res.*, 37(10): 1001-1006.
- Robertson, L., A. Lawrence & F.L. Castille. 1993. Effect of feeding frequency and feeding time in growth of the *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquacult. Fish. Manage.*, 24: 1-6.
- Rodgers, L.J., P.I. Saoud & D.B. Rouse. 2006. The effects of monosex culture and stocking density on survival, growth and yield of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in earthen ponds. *Aquaculture*, 259: 164-168.
- Saoud, I.P., A. Garza de Yta & J. Ghanawi. 2012. A review of nutritional biology and dietary requirements of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868). *Aquacult. Nutr.*, 18(4): 349-368.
- Seiffert, Q.W. 1997. Efeito do horário de distribuição de alimento sobre o consumo de mátria seca no cultivo do camarão "rosa" *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967). Tesis Maestre Acuicultura, Universidad Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 85 pp.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1995. *Biometry: The Principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman New York, 937 pp.
- Stumpf, L., N., Calvo, S. Pietrokovsky & L.S. López-Greco. 2010. Nutritional vulnerability and compensatory growth in early juveniles of the "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 304: 34-41.
- Tropea, C., Y. Piazza & L.S. López-Greco. 2010. Effect of long-term exposure to high temperature on survival, growth and reproductive parameters of the "redclaw" crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 302: 49-56.
- Vázquez, F.J., C. Tropea & L.S. López Greco. 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Invertebr. Biol.*, 127: 433-443.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco & R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 106: 547-550.
- Vega-Villasante, F., I. Fernández, M. Oliva, M. Preciado & H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway, 1863. *Bull. Mar. Sci.*, 65: 1-9.
- Versaw, K.W., L.S. Cupper, D.D. Winters & E.L. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food. Sci.*, 54(6): 1557-1568.
- Villarreal, H. & J. Peláez. 1999. *Biología y cultivo de langosta de agua dulce, Cherax quadricarinatus*. Manual de producción. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y Acuacultivos Santo Domingo, La Paz, B.C.S., 150 pp.

Received: 13 June 2012; Accepted: 18 October 2012