

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE CATALASA DEL CAMARÓN *Litopenaeus vannamei* Y SU EXPRESIÓN EN RESPUESTA A HIPOXIA Y REOXIGENACIÓN

Por: CARLOS HUMBERTO TRASVIÑA ARENAS

TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2012

APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para revisar la tesis de Carlos Humberto Trasviña Arenas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

Dra. Gloria Yepiz Plascencia Director de tesis

M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte Asesora

Dra. María Auxiliadora Islas Osuna Asesora

Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo Asesor

Dr. José Cuadalupe SoñanezOrganis Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis confines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar **Director General**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del proyecto 98507 aprobado a la Dra. Gloria Yepiz Plascencia y a una beca para estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

A **CONACYT** por haber hecho realidad este proyecto por el apoyo económico otorgado a través de la beca de maestría y el proyecto 98507 aprobado a la Dra. Gloria Yepiz Plascencia.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.** por darme la oportunidad de formar parte de esta institución.

A la **Dra. Gloria Yepiz Plascencia** por su paciencia y exigencia en los momentos difíciles de este proyecto y en los personales, que me hicieron temblar y posibilitar una vez más, otra etapa de mi preparación profesional. ¡Realmente fue un honor ponerme la bata con usted!

A la M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte por su compañía y guía en esta aventura académica que permitió llevarnos por los caminos más seguros y accesibles, es toda una capitana en el LBMOA.

A mis asesores; Dra. María Auxiliadora Islas Osuna, Dr. Rogeeio Sotelo Mundo y Dr. José Guadalupe Soñanez Organis, por su apoyo y acertados consejos.

A mis compañeros del LBMOA **José Alfredo Martínez**, **Manuel Ochoa**, **Eduardo Guevara**, **Salvador Carrasco**, **Idania Quintero**, **Max Hernández**, **Alonso López**, **Cindy Chimeo** y **Laura Jiménez**, por hacer un compendio de aprendizaje y risas mi estancia en el laboratorio.

A mis **tíos**, **primos** y **mi abuela** que siempre están al pendiente de mis quehaceres...Gracias!

A la familia **Gutiérrez Huerta** por el apoyo que me brindaron y abrirme las puertas de su casa.

DEDICATORIA

Ante la anticipada venida en la que me sorprendes, te espero, te espero con mis defectos, con mis miedos, con mi inmadurez, pero sobre todo con ilusión, esperando tenerte en mis brazos y que determines el sentido de mis motivaciones y estando seguro que trabajaré en mis defectos para enseñarte con ejemplo, disiparé mis miedos para no contagiarte y exprimiré mi inmadurez en la manera de lo posible para que tengas un padre sobre todo lo posible. Por eso, te dedico este trabajo y logro, a ti, **mi nuevo pedazo de inocencia**.

También dedico el presente:

A los que siempre he dedicado y dedicaré cada acierto y logro que obtenga, A **mi Madre** y **mi Padre**, ya que su amor, apoyo y enseñanzas radicadas en su proceder cotidiano, me recuerda lo que quiero ser ¡que es ser como ustedes!

A **mi hermano**, "mis cejas tristes", que a pesar de ser menor yo, soy el que más te admira, en tu enfadosa y consistente terquedad por hacer bien las cosas. Te quiero y a pesar de que eres el único hermano, siempre serás mi favorito.

A mi gorda, mi princesa, mi chapetuda, mi milky way, mi primer pedazo de inocencia, y mi Dulce, que desde hace poco compartimos más que una recíproca compañía, compartimos lo que crece en tu vientre y ahora si, te hace gordita, pero me encanta.

CONTENIDO

AROBACIÓN	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL;Error! Marcador no	definido.
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
La Hipoxia como Problemática Ecológica Mundial: Dinámica e Incidencia	4
Tolerancia de Crustáceos a la Hipoxia	6
Hipoxia, Reoxigenación y Radicales Libres	
Implicaciones Biológicas de los ROS	11
Antioxidantes	
Superóxido Dismutasa	
Glutatión Peroxidasa	15
Catalasa	16
Repercusiones de la Hipoxia y Reoxigenación Correlacionada con la Catalasa y Otros Antioxidantes	; 16
JUSTIFICACIÓN	
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	
Objetivo General	
Objetivos Específicos	
MATERIALES Y MÉTODOS	
Extracción de DNA Genómico	
Diseño de Oligonucleótidos	
Caracterización de la Secuencia Genómica de Catalasa	

Construcción de Genotecas	24
Obtención y Caracterización del Promotor de Catalasa	25
Análisis Bioinformático del Promotor	
Análisis Filogenético de Catalasa	26
Bioensayo de Hipoxia y Reoxigenación	27
Extracción de RNA Total	
Limpieza del RNA Total de DNA Genómico y Síntesis de cDNA	29
Evaluación de la Expresión de Catalasa por RT-qPCR	29
Análisis Estadístico	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
El Gen de Catalasa está Interrumpido por Cuatro Intrones	
Análisis Filogenético de la Catalasa de Vertebrados e Invertebrados	
Caracterización del Promotor de Catalasa	40
La Expresión de Catalasa es Tejido Específica en Hipoxia y Reoxigenación	43
BIBLIOGRAFÍA	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 . Tolerancia de algunos crustáceos a la hipoxia	7
Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos usados para la obtención del gen de catalasa y su promotor	23
Tabla 3. Catalasas de los organismos usados en el análisis filogenético	26
Tabla 4 . Composición nucleotídica de los intrones y exones del gen de catalasa de L. vannamei	33
Tabla 5. Comparación de la longitud y número de intrones de genes de catalasa en diferentes organismos.	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y crecimiento de la hipoxia en zonas costeras a lo largo del tiempo	4
Figura 2. Distribución de zonas con hipoxia en regiones costeras y lagos del mundo	6
Figura 3. Mortalidades de crustáceos ocurridas en costas africanas atribuidas a la hipoxia	6
Figura 4. Diferentes vías de producción de ROS en condiciones de hipoxia y reoxgenación	11
Figura 5. DNA genómico extraído de músculo de <i>L. vannamei</i>	31
Figura 6. Amplicones obtenidos por PCR para la caracterización de la secuencias genómica de catalasa	32
Figura 7 . Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos del gen de catalasa del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	34
Figura 8 . Estructura de los genes de catalasa de diferentes organismos y su evolución en función de la prevalencia y ausencia de exones e intrones	36
Figura 9. Árbol filogenético resultado de análisis de secuencia deducida de aminoácidos de catalasa	38
Figura 10. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de catalasas de L. vannamei.	39
Figura 11. Digestión del gDNA de camarón con DraI	41
Figura 12 . Productos de PCR usando usando como templado la genoteca derivada de DraI	41
Figura 13. Secuencia nucleotídica caracterizada que se extiende al promotor de catalasa.	42
Figura 14. Análisis de la extracción de RNA total	43
Figura 15 . Amplicones obtenidos por PCR que se usaron para la construcción de la curva de calibración para RT-qPCR	44
Figura 16. Expresión relativa de catalasa para branquias y hepatopáncreas	47

RESUMEN

La hipoxia y la reoxigenación son condiciones recurrentes en zonas costeras donde habita el camarón blanco Litopenaeus vannamei y en condiciones de cultivo. Estas condiciones provocan un desajuste en el metabolismo oxidativo que resulta en la producción de especies reactivas de oxigeno (ROS), como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) , que pueden causar daño celular. La catalasa es una enzima antioxidante involucrada en el equilibrio redox celular, encargada de detoxificar el H_2O_2 , degradándolo a oxigeno y agua. Este trabajo se enfocó en caracterizar el gen de catalasa de camarón blanco L. vannamei (CatLv), incluyendo su región promotora y a evaluar su expresión durante hipoxia (6 y 24 h de hipoxia) y reoxigenación (1 h). Además, se analizó filogenéticamente la secuencia de amino ácidos mediante bioinformática. El gen CatLv tiene una longitud de 2974 pares de bases (pb) con 4 intrones de 821, 223, 114 y 298 pb. Interesantemente, el primer intrón tiene tres microsatélites con secuencias repetidas de GT y (T)AT(GT). Se caracterizó un fragmento de 333 pb hacia el promotor que contiene sitios putativos de regulación reconocidos por los factores SOX-5, CdxA, GATA-X y Factor de choque térmico involucrados en el desarrollo embrionario, diferenciación celular y de respuesta a estrés. CatLv es expresado de manera tejido-específica durante hipoxia y reoxigenación. En branquias se encontró una tendencia a aumentar el transcrito de CatLv en hipoxia y una inducción de 3 veces en reoxigenación comparado con normoxia, mientras que en hepatopáncreas no se detectaron diferencias. Los resultados de expresión obtenidos comparados con la actividad de CatLv en hipoxia y reoxigenación previamente reportados, indican una posible regulación a nivel mRNA. El análisis filogenético agrupa a CatLv en un subclado de crustáceos que incluye a invertebrados en general, separado claramente de vertebrados.

Palabras claves: Catalasa, *Litopenaeus vannamei*, Hipoxia, Reoxigenación, Estrés oxidativo, filogenia, gDNA, expresión de mRNA.

ABSTRACT

Hypoxia and reoxygenation are very common conditions in coastal zones where the white shrimp Litopenaeus vannamei resides and in shrimp farms. These conditions affect the oxidative metabolism resulting in production of reactive oxygen species (ROS), including hydrogen peroxide (H_2O_2) that can cause cellular damage. Catalase is an antioxidant enzyme involved in the redox equilibrium and detoxifies H₂O₂ to produce oxygen and water. This work focused in the characterization of the catalase gene from the white shrimp L. vannamei (CatLv), including its promoter region, and to evaluate its expression during hypoxia (6 and 24 h of hypoxia) and reoxygenation (1 h). Additionally, the predicted amino acid sequences from catalase was analyzed phylogenetically using bioinformatic. The CatLv gene is 2974 base pairs (bp) long and contains 4 introns of 821, 223, 114 and 298 bp. Interestingly, the first intron has three microsatellites with repeated sequences of GT and (T)AT(GT). The upstream sequence from the coding region of 333 bp, belonging to the promoter contains putative regulatory elements recognized by the transcription factors SOX-5, CdxA, GATA-X and a heat shock factor, that are described as involved in embryonic development, cell differentiation and stress responses. The CatLv gene was expressed in a tissue-specific manner during hypoxia and reoxygenation. In gills, the CatLv transcript had a tendency to increase during hypoxia and was induced three-fold during reoxygenation compared to normoxia, while in hepatopancreas there were not significant differences. The expression results contrast with the data for catalase activity previously reported during hypoxia and reoxygenation, suggesting a posttranscriptional mRNA level regulation. Phylogenetic analysis grouped the CatLv in a crustaceans subclade, including different invertebrates and having a clear separation from vertebrates.

Key words: Catalase, *Litopenaeus vannamei*, Hypoxia, Reoxygenation, Oxidative stress, Phylogeny, gDNA, mRNA expression.

INTRODUCCIÓN

La hipoxia es una condición ambiental muy recurrente en ambientes acuáticos ocasionada por un bajo suministro de oxígeno (O₂) en los hábitats, o cuando la tasa de consumo excede a la de suministro, resultando en la disminución de la concentración de oxígeno ($< 2mgO_2 L^{-1}$ en ambientes acuáticos) por debajo del punto de sustento de la mayoría de los organismos vivos (Diaz 2001). La reoxigenación por su parte, es una condición estrictamente subsecuente a la hipoxia, que se caracteriza por el restablecimiento de la concentración de oxígeno ($\approx 6 mgO_2 L^{-1}$ en hábitats acuáticos).

La hipoxia y la reoxigenación influyen en la calidad y la cantidad de los hábitats disponibles para los organismos aerobios e impactan significativamente sus procesos fisiológicos y metabólicos (Breitburg *et al.* 2009), debido a que el O₂ es el aceptor final de electrones en el metabolismo oxidativo (metabolismo energético en presencia de O₂). Por ello, los organismos aerobios se enfrentan por un lado a un déficit energético debido a que la producción de energía por la vía aerobia es 15 veces mayor que la vía anaerobia (Calderon-Montano *et al.* 2011). Por otro lado, el acoplamiento y desacoplamiento del metabolismo oxidativo durante la hipoxia y la reoxigenación en la cadena transportadora de electrones dentro de la mitocondria, ocasiona la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) o radicales libres(Turrens 2003).

Los ROS son moléculas o átomos que derivan del metabolismo del oxígeno y que tienen un electrón desapareado, por lo que son altamente reactivos y afectan la función de los constituyentes celulares como proteínas, lípidos y DNA (Yu 1994; Bandyopadhyay *et al.* 1999; Cabiscol *et al.* 2000). En mamíferos los ROS están asociados con enfermedades como cáncer, neurodegenerativas y con el envejecimiento (Barja 2004; Pelicano *et al.* 2009; Liou y Storz 2010). Dentro de los ROS más estudiados y con mayor incidencia biológica se encuentran el anión superóxido, el radical hidroxilo (OH•) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Yu 1994).

El H₂O₂ es uno de los ROS menos reactivos, sin embargo, puede reaccionar con metales de transición como el Fe²⁺ y el Cu⁺ para formar OH•, uno de los oxidantes más potentes dentro de los sistemas biológicos (Aruoma y Halliwell 1987; Rodriguez *et al.* 1997). Además, el H₂O₂ tiene una alta capacidad de difusión a través de membranas

hidrofóbicas, pudiendo afectar ambientes celulares alejados de su lugar de producción (Yu 1994). Se estima que la proporción de O_2 consumido convertido a ROS es entre el 0.1-0.2% y que conforme aumenta la tasa de consumo de O_2 , la producción de ROS aumenta proporcionalmente (Genova *et al.* 2001; Alvarez *et al.* 2003; Fridovich 2004). Es por lo anterior, que en condiciones de reoxigenación debe de aumentar la producción de ROS, mientras que en hipoxia debería de disminuir, empero, paradójicamente varios estudios han mostrado un aumento en el daño de los ROS a las células bajo esta condición. No obstante, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se producen ROS en hipoxia, varios estudios sugieren que son producidos principalmente por el complejo III de la cadena transportadora de electrones. El complejo III permite la accesibilidad del O_2 en hipoxia para captar electrones de la cadena respiratoria que está desacoplada y ocasiona la producción de anión superóxido, que finalmente es transformado a H_2O_2 por la superóxido dismutasa (Chandel *et al.* 1998; Schumacker 2002; Waypa y Schumacker 2002).

Los antioxidantes son moléculas que estabilizan la estructura electrónica de los radicales libres donando o aceptando electrones, disminuyendo de esta forma su reactividad y toxicidad (Harris 1992). Los antioxidantes por sus características químicas y catalíticas pueden ser agrupados como no enzimáticos (vitamina E, A y C, glutatión y ácido úrico) y enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y otras peroxidasas). La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima que se encuentra virtualmente en todos los organismos y lleva a cabo la dismutación del H₂O₂ para producir H₂O y O₂ (Cheng *et al.* 1981). Esta enzima comparte su función con la glutatión peroxidasa (GluPer), pero tienen diferentes afinidades por el H₂O₂ y por lo tanto, diferentes velocidades de reacción, siendo mayor la velocidad de reacción de catalasa (hasta dos órdenes de magnitud) que la de GluPer, estimándose que la catalasa es la principal enzima que degrada el H₂O₂ (Mueller et al. 1997). La catalasa es una hemoproteína y un homotetrámero, con subunidades codificadas por un solo gen en la mayoría de los eucariotas, incluyendo mamíferos (rata, ratón, cobayo y humanos), invertebrados como Drosophila melanogaster y varios hongos. Sin embargo, en el nemátodo Caenorhabditis elegans y en hongos como Cyidatropicalis, Saccharomyces cerevisiae y Aspergillus nidulans se han encontrado dos genes que codifican para catalasa (Frugoli et al. 1998).

La expresión del gen de catalasa así como de otros genes antioxidantes depende de diversos factores, incluyendo el tipo del órgano, la edad, el estadio de desarrollo y exposición a estreses (Harris 1992).

El camarón blanco *L. vannamei* es un invertebrado marino que tiene diferentes hábitos y dinámicas de distribución en los diferentes estadios de su ciclo de vida (Fenucci 1988; Barnes 1990). Lo anterior, ocasiona que el camarón blanco se enfrente a condiciones de estrés provocadas por los constantes cambios ambientales como temperatura, salinidad, disponibilidad de oxígeno disuelto (OD), exposición a diferentes depredadores y variabilidad de la disponibilidad y tipo de alimento. El OD es una de las variables ambientales con mayor importancia y variabilidad en los estuarios y zonas costeras donde se desarrolla el camarón blanco, en donde se enfrenta a condiciones de hipoxia y reoxigenación (Taylor y Spicer 1987). Es importante precisar que la hipoxia y reoxigenación no son condiciones que solo enfrentan los camarones en su hábitat natural, sino que ocurren también en granjas de cultivo derivadas de altas densidades de organismos en cultivo, sobrealimentación, circulación inadecuada de agua, fallas o mal manejo de equipos de aireación o una alta densidad de bacterias heterótrofas (Florespeña 2008).

En general, los camarones como *L. vannamei* han mostrado poder sobrevivir a la hipoxia e inclusive a la anoxia (0 mgO₂ L⁻¹) por varios días (Taylor y Spicer 1987; Racotta *et al.* 2002). Así, se ha reportado que en camarones blancos expuestos a hipoxia (1.5-2.5 mgO₂ L⁻¹) por tiempo corto (6 h) moderado (3 días) y largo (3 semanas) presentaron un ajuste metabólico dependiente del O₂ (Racotta *et al.* 2002; Soñanez-Organis *et al.* 2010; Sonanez-Organis *et al.* 2011). Este ajuste metabólico de acuerdo a lo mencionado anteriormente, debe de tener implicaciones en la producción de ROS, por lo tanto, una respuesta antioxidante específica en condiciones de hipoxia y reoxigenación.

ANTECEDENTES

La Hipoxia como Problemática Ecológica Mundial: Dinámica e Incidencia

El oxígeno es una molécula que ha moldeado la vida de los seres vivos y desde eras geológicas la vida ha sido afectada por condiciones de hipoxia, hiperoxia y anoxia. Estas condiciones han ejercido un fuerte efecto selectivo a nivel molecular, celular, fisiológico y de comportamiento en los organismos aerobios (Kasting y Siefert 2002 ; Webster 2003; Berner *et al.* 2007; Canfield *et al.* 2007). Como lo muestran evidencias geológicas, la concentración de oxígeno ha variado de manera constante, no obstante esta variación ha sido de manera gradual (Flück *et al.* 2007). Si bien las condiciones de hipoxia y anoxia han existido a lo largo de las eras geológicas, su ocurrencia en aguas costeras y estuarios ha aumentado en las últimas décadas (Figura 1) y se ha convertido en una variable cuyos cambios pone en riesgo el equilibrio de los ecosistemas costeros (Diaz 2001; Vaquer-Sunyer y Duarte 2008).



Figura 1. Incidencia y crecimiento de la hipoxia en zonas costeras a lo largo del tiempo. Fuente: Vaquer-Sunyery Duarte (2008).

La incidencia de la hipoxia en zonas costeras ha aumentado de forma exponencial con una velocidad de 5.54% año⁻¹.Además no solo ha aumentado la incidencia de la hipoxia, sino que también, en las zonas que ya han sido detectadas con esta problemática, ha ocurrido un aumento en extensión, severidad y duración de la hipoxia (Vaquer-Sunyer y Duarte 2008).

La hipoxia tiene una repercusión grave en los hábitats acuáticos debido a que el oxígeno es una molécula vital para los organismos aerobios, imprescindible para su metabolismo, por lo que un descenso en el OD menor a 2 mgO₂ L⁻¹ afecta la biodiversidad de los ecosistemas (la concentración de oxígeno en condiciones normales es de aproximadamente 6 mg O_2 L⁻¹). La hipoxia se presenta cuando la demanda biológica de oxígeno excede el proceso de oxigenación de la superficie marina y normalmente sucede cuando hay un exceso de materia orgánica (eutrificación), que permite la rápida proliferación de bacterias heterotróficas, consumiendo así el oxígeno disponible en el hábitat. Esta entrada excesiva de nutrientes a las zonas costeras ocurre por procesos naturales como surgencia (movimiento ascendente de aguas profundas hacia aguas menos profundas, que conlleva al acarreamiento de materia orgánica que estaba sedimentada) y acarreamiento por vientos y ríos. Además, se ha encontrado una fuerte correlación entre el aumento proporcional de la actividad humana, como la agricultura, en la aparición de escenarios de eutrificación (Levin et al. 2009). La hipoxia se exacerba cuando los cuerpos de agua marina están altamente estratificadas, aislándolas de su oxigenación. La estratificación resulta de grandes gradientes térmicos y de salinidad de los cuerpos de agua marina, incluyendo intercambio de agua marina con agua dulce (aguas hipersalinas y con altas temperaturas disminuyen la solubilidad del oxígeno). Esta condición de baja concentración de OD se presentan normalmente en profundidades de 100 a 1200 m (Levin et al. 2009). Esta problemática de la hipoxia tiene una ocurrencia de 30.4 millones de Km² de superficie oceánica (8% del área oceánica) y el 2% de las zonas costeras (Figura 2).

El desequilibrio que genera la hipoxia en los ecosistemas marinos es devastador, ya que por un lado ocasiona la migración de los organismos hacia aguas más oxigenadas y por otro lado ocasionan devastadoras mortalidades, repercutiendo directamente en la economía de zonas pesqueras (Figura 3).



Figura 2. Distribución de zonas con hipoxia en regiones costeras y lagos del mundo. En puntos grises se muestran las zonas afectadas por la hipoxia. Fuente: modificado de Levin *et al.* (2009).



Figura 3. Mortalidades de crustáceos ocurridas en costas africanas atribuidas a la hipoxia. Fuente: Levin *et al.* (2009).

Tolerancia de Crustáceos a la Hipoxia

Las zonas costeras son las más propensas a las variaciones del OD, ocasionando condiciones de hipoxia y reoxigenación. Los crustáceos son organismos que se desarrollan en estas zonas y se exponen diaria y anualmente a diferentes grados de hipoxia y reoxigenación. De esta forma, la variabilidad del oxígeno disuelto se ha

convertido así, en una presión evolutiva potencial que ha ocasionado que la mayoría de estos organismos puedan tolerar condiciones de hipoxia y reoxigenación e inclusive de anoxia. Por ejemplo, se han reportado sobrevivencias de por lo menos 100 h a 0.15 mgO₂L⁻¹ en especies como el cangrejo *Carcinus maenas*, el anfípodo *Gammarus oceanicus*, el isópodo *Idoteabalthica* y el camarón *Crangon crangon* (Gray *et al.* 2002). Inclusive, se conoce que el camarón *Penaeus japonicus*, que es considerado una de las especies de camarones más tolerantes a la hipoxia, puede soportar un par de horas fuera del agua durante su transporte (Chien 1992).

Tabla 1. Tolerancia de algunos crustáceos a la hipoxia. LD_{50} :dosis de OD y tiempo a la que se alcanza el 50% de las mortalidades, EAA: Efecto apenas observable y Ns, dato no reportado. Adaptado de Gray et al, 2002

Especie	Hipoxia (mgO ₂ L ⁻¹)	Duración (h)	Consecuencia	Condición Temperatura (°C) y salinidad (%)
Acartiatonsa Conépodo	0.06	228	LD ₅₀	Ns
Centropages hamatus Copépodo	0.06	228	LD ₅₀	Ns
Saduria entomon Isópodo	0.044	8	LD ₅₀	11°C , 10%
Crangoncrangon Decapodo(camarón gris)	0.044	25	LD ₅₀	18°C, 30%
Penaeus setiferus	2	1440	Ns	28°C, 15%
Decápodo (camarón blanco)	0	1440	LD ₅₀	28°C, 15%
Palaemonetes pugio Decápodo (camarón de la	0	144	LD_{50}	24°C, 14%
hierva)				
Callinectes sapidus Decápodo (cangrejo azul)	0	672	LD ₅₀	20°C, 10%
C. similis Decápodo	2.22	672	EAA	24°C, 30%
(cangrejo del golfo)				
Carcinus maenas Decápodo (cangrejo verde)	0	12	EAA	10°C, 30%
Decápodo (langosta europea)	0.88	Ns	Ns	30°C, 10%

Los crustáceos tolerantes a las variaciones de OD son oxirreguladores porque regulan su consumo de oxígeno en función de su disponibilidad, sin embargo esta característica es muy relativa ya que el cangrejo de mangle Goniopsis cruentata, es oxiconformador y oxirregulador a un mismo rango de OD, dependiendo de la temperatura (35 y 32 °C respectivamente), de la actividad física, ciclo de muda, de la cantidad de pigmentos respiratorios (hemocianina o hemoglobina), salinidad, del tamaño del organismo y presencia de diferentes factores estresores (Herreid y Clyde 1980). Para sobre llevar estas condiciones adversas, estos organismos implementan adecuaciones de comportamiento, fisiológicas, metabólicas y de regulación genética. Primeramente los crustáceos tienden a evitar áreas en hipoxia, nadando hacia zonas más oxigenadas, e inclusive algunos cangrejos salen del ambiente marino para respirar del aire (Taylor et al. 1977). Los organismos que no pueden salir de zonas hipóxicas, disminuyen su actividad física para reducir su requerimiento de oxigeno y ahorrar energía (Herreid y Clyde 1980). En condiciones de laboratorio algunas especies de camarones, como Penaeus stylirostis y L. vannamei, toman una posición invertida cerca de la superficie de los acuarios y empiezan a moverse bruscamente para oxigenar el agua por agitación (Taylor y Spicer 1987). Además, los crustáceos expuestos a la hipoxia cesan su alimentación (Herreid y Clyde 1980), posiblemente porque al consumir alimento aumenta el requerimiento de O₂ para metabolizarlo.

Las respuesta fisiológicas que realizan los crustáceos ante episodios de hipoxia se centran en aumentar la captación de oxigeno por las branquias, corazón y en el sistema circulatorio. Las branquias cambian morfológicamente generando una extensión de los pliegues branquiales para aumentar la superficie de intercambio gaseoso entre las branquias y el medio ambiente (Giomi *et al.* 2007). Además, hay un aumento en el flujo de agua a través de las branquias y de hemolinfa para captar más oxígeno (McMahon 2001) y el corazón aumenta el ritmo cardiaco para ampliar el bombeo de la sangre oxigenada y la eliminación del CO₂ y evitar la alcalinización de la hemolinfa, como se reportó en el cangrejo *Cancer magister* (Airriess y McMahon 1994); también se ha detectado un aumento en la cantidad de hemocianina en la hemolinfa en *L. vannamei* (McMahon 2001; Racotta *et al.* 2002). Concomitantemente se presenta un aumento de afinidad por el O₂ en la hemocianina en condiciones bajas de OD, mediada alostéricamente por lactato, urato y Ca⁺. Estos elementos efectores aumentan en la hemolinfa particularmente en condiciones de hipoxia, en donde el lactato se sintetiza como producto final de la glucólisis anaerobia. La mayor concentración de lactato en la hemolinfa aumenta la acidez y ocasiona descalcificación del exoesqueleto, incrementando de esta manera la concentración del Ca⁺ en circulación. Por su lado el urato se deriva de la metabolismo energético secundario que usa como sustrato purinas y aminoácidos en periodos largos de hipoxia (Mangum 1997; Giomi *et al.* 2007). Esto evidencia el alto grado de adaptación que exhiben los crustáceos y el efecto sinérgico de diferentes compuestos para poder tolerar la hipoxia.

La hemocianina es una proteína hexamérica compuesta por subunidades similares que interesantemente en *L. vannamei* como en otros crustáceos, se puede asociar en agregados de dos hexámeros para formar un dodecámero activo (Figueroa-Soto *et al.* 1997). Estudios detallados demostraron que el aumento de la afinidad de la hemocianina por el O_2 está influenciada por el tipo de subunidades que la forman (Terwilliger y Dumler 2001). Esto hace suponer que la expresión de las subunidades son reguladas a nivel genético, como se observa en la hemoglobina de la mosca de la fruta *D. melanogaster* en condiciones de hipoxia (Burmester *et al.* 2006), posiblemente por el factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1, factor de transcripción involucrado en adaptación celular en una baja concentración de oxigeno) y como se ha demostrado en la pulga de agua *Daphnia magna* (Gorr *et al.* 2004).

Los crustáceos que muestran mayor tolerancia a la hipoxia tienen más reservas de glucógeno y de fosfágenos como en el isópodo *Stenasellus virei*. Aunado a esto, en reoxigenación exhiben una mayor capacidad de gluconeogénesis y activación del metabolismo oxidativo y refosforilación de los fosfágenos (Hervant *et al.* 1997). No obstante, esta tolerancia es afectada por la dieta, ya que diferentes contenidos de carbohidratos y proteína ejercen diferencias en los periodos de adaptación metabólica ante la hipoxia (Oliveira *et al.* 2004). Además de los efectos en el metabolismo y fisiología de los crustáceos en hipoxia, se ha demostrado un efecto adverso en el sistema inmune de estos organismos. Por ejemplo en el camarón *Macrobrachium rosenbergii* infectado con *Enterococus* durante la hipoxia, se encontró una disminución en la actividad de fenoloxidasa, así como de la capacidad fagocítica de los hemocitos y de su

capacidad de producir ROS para la eliminación de parásitos (Cheng *et al.* 2002), afectando así la primer línea de acción del sistema inmune innato de los crustáceos.

Hipoxia, Reoxigenación y Radicales Libres

El oxígeno molecular en los organismos aerobios es el aceptor final de electrones durante la respiración celular para la producción de energía (ATP), resultando en la formación de 2H₂O como producto final de metabolismo energético. Esta reducción del O_2 se lleva a cabo electrón por electrón en la cadena transportadora de electrones, ocasionando así, intermitentes desacoplamientos puntuales (complejos I y III de la citocromo c oxidasa) del flujo de electrones hacia el O_2 , concomitantemente con la reducción parcial del oxígeno a anión superóxido (O_2^{-*}) (Turrens 2003). El O_2^{-*} es un radical libre (átomo o molécula que dentro de su estructura electrónica tienen un electrón desapareado) altamente reactivo y puede reaccionar con otras moléculas aledañas, afectando su funcionalidad (las repercusiones biológicas de los ROS se discuten en el siguiente apartado). Dado que los ROS se forman a partir del O_2 , principalmente el O_2^{-*} , su producción es proporcional al aumento del consumo de oxígeno, e incluso se estima que entre 0.1-0.2% del consumo de O_2 resulta en la producción de ROS (Wittenberg y Wittenberg 1989; Alvarez *et al.* 2003).

El incremento de ROS en función del consumo de O_2 hace suponer que durante condiciones de hipoxia, la producción de ROS disminuye debido a la baja concentración de O_2 , sin embargo esto no es cierto, ya que hay un paradójico aumento de los ROS en esta condición (Chandel *et al.* 1998). La producción de ROS en hipoxia es difícil de explicar, no obstante, se han propuesto modelos que involucran a la inhibición de los complejos de la citocromo oxidasa por las especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés), como el óxido nítrico que provoca un desacoplamiento en el transporte de electrones (Alvarez *et al.* 2003).

Otro modelo que se ha propuesto para la producción de ROS en hipoxia independiente de la mitocondria, son los producidos por la NADPH oxidasa, que genera lo que se conoce como explosión respiratoria (producción elevada de $O_2^{-\bullet}$), dirigida por un ambiente inflamatorio (Keisari *et al.* 1983) y como defensa ante patógenos en células fagocíticas (Linsley y Ledbetter 1993). Por otro lado, en condiciones de reoxigenación,

es más fácil explicar la producción de ROS de acuerdo a la proporcionalidad de producción de éstos, en función del consumo de oxígeno en la mitocondria, anteriormente mencionado. Pero además de este modelo también hay otro que exacerba esta producción, donde se implica la enzima xantina oxidasa (XO) (figura 4). La XO cataliza los dos últimos pasos de la degradación de purinas durante hipoxia, la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico transfiriendo electrones al oxigeno molecular produciendo O_2^{-1} y principalmente H_2O_2 (Li y Jackson 2002; Valko *et al.* 2007). Aunque como se puede notar la hipoxia y reoxigenación representan condiciones propicias para la producción de ROS bajo diferentes estímulos, eventos repetitivos de estas condiciones incrementan potencialmente el estrés oxidativo (Xu *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2004).



Figura 4. Diferentes vías de producción de ROS en condiciones de hipoxia (A) y reoxgenación (B). Modificado de Valko *et al*, 2007.

Implicaciones Biológicas de los ROS

Una elevada cantidad de ROS o RNS puede llevar a graves daños celulares debido a un déficit en la producción de antioxidantes de las células. En otras palabras, el estrés oxidativo resulta de la perturbación del equilibrio oxidante/antioxidante en los organismos vivos, ocasionado tanto por factores abióticos (como la hipoxia y

reoxigenación de acuerdo a lo antes mencionando) y bióticos (Apel y Hirt 2004). Este desequilibrio ocasiona por un lado, una alta acumulación de ROS en la célula y por otro, conlleva a un alto grado de reactividad con los constituyentes celulares como lípidos, proteínas y DNA, afectando su función (Yu 1994; Bandyopadhyay *et al.* 1999; Cabiscol *et al.* 2000). Es por eso que los ROS y RNS están implicados en un alto número de enfermedades humanas.

El H_2O_2 es una molécula que se forma enzimáticamente a partir de la dismutación del O_2^{-*} y que debido a su similitud con el agua, tiene una alta difusividad a través de la membranas, ocasionando que el H_2O_2 pueda reaccionar más allá de su origen, generalmente en la mitocondria o en el peroxisoma (Yu 1994). Si bien es cierto que el H_2O_2 es uno de los ROS menos dañinos, este puede ocasionar la producción de OH•, uno de los ROS más reactivos, por vía de la reacción de Fenton o Haber-Weiss. Es así gracias a la difusividad y reactividad del H_2O_2 que puede llegar a ubicarse al OH• en escenarios celulares altamente susceptibles como el núcleo. Una vez en el núcleo el OH• puede reaccionar con el grupo guanidino del DNA formando 8-hidroxiguanosina (uno de las principales mutaciones ocasionadas por los ROS), asociada con mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Valko *et al.* 2007).

Reacción de Fenton: $\operatorname{Fe}^{2+}(\operatorname{Cu}^+) + \operatorname{H}_2\operatorname{O}_2 = \operatorname{Fe}^{3+}(\operatorname{Cu}^{1-}) + \operatorname{OH}^- + \bullet\operatorname{OH}$ **Reacción Haber-Weiss:** $\operatorname{O}_2^{-\bullet} + \operatorname{H}_2\operatorname{O}_2 = \operatorname{OH}^- + \bullet\operatorname{OH} + \operatorname{O}_2$

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en el organismo, ya sea en las células o en los tejidos (hasta 10 veces más comparado con ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos) (Davies 2005), por lo que representan probabilísticamente el principal blanco de los ROS. Aminoácidos como la arginina, cisteína y en general los aminoácidos polares, son los que presentan mayor reactividad con los ROS (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008). Cualquier reducción u oxidación de los aminoácidos de las proteínas, puede conllevar a su desnaturalización afectando su función. Por ejemplo la cisteína es un amino ácido particularmente susceptible a la oxidación por ROS y cuando el enlace disulfuro entre cisteína y cisteína es roto, ocasiona una elevada inestabilidad estructural en las proteínas que tienen este tipo de

enlace (Stadtman 2004). También los ROS pueden generar una ruptura de las uniones peptídicas ya sea por α -amidación o por oxidación de las cadenas laterales de la glutamina (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008).

Los lípidos como los ácidos grasos, son los principales constituyentes de las membranas celulares. Estos ácidos grasos tienen una extensión de 14 a 24 átomos de carbono, principalmente insaturados (tienen dobles enlaces). Estas insaturaciones dan estabilidad a la membrana celular, no obstante son los principales blancos de los ROS. Cuando esto ocurre mediante un mecanismo llamado lipoperoxidación, los ácidos grasos aglomerados en la membrana reaccionan entre sí, lo que disminuye su fluidez y permeabilidad (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008), afectando así, el control del intercambio de solutos entre la célula y el ambiente extracelular, aumentando el flujo de agua hacia la célula ocasionando que se hinche y de esta forma reviente.

A pesar del enorme peligro que representan los ROS y los RNS a las células, estas moléculas a concentraciones moderadas, están involucrados en procesos de señalización celular. Varios estudios demuestran la participación de ROS/RNS en la activación-desactivación de cinasas y fosfatasas afectando indirectamente a su vez, la activación y desactivación de un sinnúmero de procesos celulares. Por ejemplo en el caso de la hipoxia, el aumento de la producción de ROS está directamente asociado con la activación de neuroreceptores que regulan la actividad cardiaca del corazón, facilitando de esta manera una de las respuestas de tolerancia a la hipoxia (MacFarlane *et al.* 2008). Además, los ROS están implicados en la regulación de factores de transcripción que resulta en la participación activa de procesos de regulación genética (Harris 1992; Valko *et al.* 2007). Dado que los ROS tienen tanto efectos dañinos como benéficos en las funciones biológicas, no es sorprendente que la producción de ROS esté sujeta a una crítica regulación homeostática, minimizando de esta forma el daño que estos ocasionan, incluyendo su adecuada producción y remoción para un óptimo funcionamiento biológico.

Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas vitales para los seres vivos debido a que estabilizan el desequilibrio electrónico que exhiben los ROS donando o cediendo electrones y están presentes virtualmente en todos los organismos (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008). Dependiendo de su naturaleza, los antioxidantes se clasifican en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos son el ácido ascórbico (vitamina C), α tocoferoles (vitamina E), glutatión, urato, carotenoides, fenoles y flavonoides (Valko *et al.* 2007). La alimentación juega un papel importante en la abundancia de estos antioxidantes, porque es el principal aporte de éstos en los organismos. Los tocoferoles y carotenoides por ser liposolubles, tienen una particular importancia en la conservación de la funcionalidad de las membranas celulares debido a que son los únicos antioxidantes dentro de éstas, evitando la lipoperoxidación de los ácidos grasos de las membranas por efecto de los ROS (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008). El urato por su parte (forma disociada del ácido úrico), comprende el principal antioxidante circulante en la sangre y principal estabilizador de los RNS y •OH (Ames *et al.* 1981). Las limitaciones de los antioxidantes no enzimáticos son que solo pueden neutralizar un ROS por molécula, por lo que tienen que estar en altas concentraciones dentro de la célula (Apel y Hirt 2004).

Los antioxidantes enzimáticos son la principal barrera contra los ROS, a tal grado que su mal funcionamiento, está asociado en humanos con cuadros clínicos como diabetes, Alzheimer, Parkinson, artritis, cáncer, envejecimiento y muerte celular (Valko *et al.* 2007). Dentro de esta categoría de antioxidantes se ubican a enzimas que se enumeran y describen enseguida.

Superóxido Dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) cataliza la dismutación del O₂^{-•} a H₂O₂.

Reacción catalizada: $2O_2^{-} + 2H^+ = H_2O_2 + O_2$

En organismos superiores hay una familia de SODs integrada por tres miembros: dos cobre-zinc SOD (CuZnSOD) y una manganeso SOD (MnSOD). Una de las CuZnSOD (SOD1) está presente en el citoplasma, núcleo y membrana externa de la mitocondria, mientras que la MnSOD (SOD2) se ubica en la membrana interna de la mitocondria y la otra CuZnSOD (SOD3) en la membrana de la matriz extracelular (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008). Aunque la MnSOD es clásicamente una enzima mitocondrial, en camarón (Gómez-Anduro *et al.* 2006) y otros crustáceos, existe una forma citosólica llamada cMnSOD que carece del péptido señal para localización mitocondrial y que su expresión es modulada en respuesta a la hipoxia (García-Triana *et al.* 2010). Los diferentes mecanismos catalíticos y estructuras de las CuZnSOD y la MnSOD muestran un ejemplo claro de convergencia evolutiva (Benov y Fridovich 1994), donde la evolución encuentra dos caminos diferentes para solucionar un mismo problema.

Glutatión Peroxidasa

La glutatión peroxidasa (GluPer; EC 1.11.1.9) es una enzima que cataliza la destoxificación del H_2O_2 producido por la SOD usando glutatión reducido (GSH) como cofactor. Estructuralmente es un tetrámero que en cada una de sus subunidades tiene selenio como grupo prostético y se han identificado en plasma y citosol (Harris 1992).

Reacción catalizada: $H_2O_2 + 2GSH = 2GS$ (glutatión oxidado) + 2 H_2O . ROOH + 2GSH = 2GS + H_2O +ROH

Además esta enzima realiza la destoxificación de peróxidos orgánicos como hidroperóxidos (ROOH) derivados de la oxidación lipídica. Como se puede observar, el mecanismo de detoxificación de ROS de las GluPer es dependiente del GSH, por lo que su actividad es mayoritariamente atribuida a bajas concentraciones de H_2O_2 (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008), no obstante su función es dualmente importante por su efecto protector contra los ROOH.

Catalasa

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una enzima que pertenece a la familia de peroxidasas que llevan a cabo la destoxificación del H_2O_2 como la GluPer.

Reacción catalizada: $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$

A pesar de la gran cantidad de peroxidasas que hay en la célula, la catalasa, debido a su afinidad por el H_2O_2 , es considerada la principal enzima que elimina el H_2O_2 a concentraciones altas (Harris 1992). La mayoría de los vertebrados expresa solamente una catalasa localizada en el peroxisoma, pero en algunos invertebrados como en el nemátodo *C. elegans* existen tres diferentes genes que codifican a catalasas distribuidas en el citoplasma y peroxisoma (Taub *et al.* 1999). La mosca de la fruta *D. melanogaster* también tiene más de una catalasa y una de ellas es indispensable para su supervivencia (Konigsberg, 2008). La acatalasemia es un padecimiento por una deficiencia en la actividad de la catalasa derivada de la funcionalidad de los genes que codifican para esta enzima, mientras la hipocatalasemia se caracteriza porque la enzima está parcialmente activa (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008).

Repercusiones de la Hipoxia y Reoxigenación Correlacionada con la Catalasa y Otros

Antioxidantes

La hipoxia y su subsecuente reoxigenación tienen repercusiones adversas para el organismo a nivel bioquímico y fisiológico, por un lado se observa un alto grado de peroxidación lipídica y nitración proteica dentro de las células (Acosta y Li 1979; Tan *et al.* 1999), y por otro, afecta el funcionamiento de órganos completos, por daños a tejidos por necrosis (Li y Jackson 2002). Estos daños en órganos se presentan claramente en corazón de ratones expuestos a hipoxia (1 h) y reoxigenación (4 h) por isquemia y reperfusión, donde se ve un aumento en infartos de miocardio o necrosis isquémica, aunado con una disminución de la fuerza y frecuencia de contracción auricular en hipoxia, y en reoxigenación se presentan cuadros de arritmia (Chen *et al.* 1997). Varios

estudios se han realizado para dilucidar el rol de los antioxidantes como sistema protector contra los daños a nivel fisiológico, ocasionados en hipoxia y reoxigenación en diversos órganos y células de mamíferos, mostrándose que la catalasa es una de las defensas antioxidantes que más protección proporcionan, disminuyendo el daño por dichas condiciones (Kirshenbaum y Singal 1993; Chen *et al.* 1997; Negoro *et al.* 2001; Rauchova *et al.* 2005; Mihai *et al.* 2012). Además se ha observado una correlación en el grado de peroxidación lipídica, con una disminución en la actividad de catalasa y GluPer (Nakanishi *et al.* 1995), haciendo suponer que el H_2O_2 es uno de los principales ROS efectores en los daños ocasionados por la hipoxia y reoxigenación.

Las enzimas antioxidantes tienen un comportamiento tejido-específico en respuesta a la hipoxia, en mamíferos, aves, reptiles e invertebrados (Nakanishi *et al.* 1995; Lushchak *et al.* 2001; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín 2011). Esta comportamiento tejido-específica pudiera sugerir que hay una vulnerabilidad de ciertos tejidos a sufrir daños por la hipoxia y reoxigenación, como se ha demostrado en hígado de rata, que es el órgano que más daños presenta en estas condiciones (Nakanishi *et al.* 1995). No obstante, además de la influencia del órgano en la defensa antioxidante, se ha observado que el nivel de la hipoxia, así como su duración influyen en el comportamiento antioxidante (Horakova *et al.* 1997).

La mayoría de los daños en condiciones de variabilidad de oxígeno no ocurren durante la hipoxia o anoxia, sino en reoxigenación. Por lo anterior, se ha hipotetizado que el aumento de la actividad antioxidante en una baja disponibilidad de O₂, es llevada a cabo anticipadamente, para proteger en contra del estrés oxidativo que es exacerbado en reoxigenación (Hermes-Lima *et al.* 1998). Esto se ha observado en diversos órganos de especies tolerantes a hipoxia y anoxia, como en rana leopardo *Rana pipens*, serpiente liga *Thamnophis sirtalis parietalis* (Hermes-Lima y Storey 1993) y pez dorado *Carassius auratus* (Lushchak *et al.* 2001) que tuvieron aumento en la actividad de catalasa, GluPer y SOD en anoxia. Éste aumento en la actividad de enzimas antioxidantes, se muestra como una ventaja evolutiva de las especies tolerantes en hipoxia y anoxia, ya que en comparación con mamíferos que son menos tolerantes a baja disponibilidad de oxígeno, se ve una disminución en la actividad de catalasa, GluPer y SOD en periodos de hipoxia (Costa 1990). Empero no todos los organismos tolerantes a estas condiciones tienen el mismo comportamiento en su sistema antioxidante, como se observa en la tortuga de orejas rojas *Trachemys scripta elegans*, que soporta periodos de anoxia hasta por 3 meses, mostrando una elevada actividad antioxidante constitutivamente (Willmore y Storey 1997; Willmore y Storey 1997) y en el gastrópodo *Littorina littorea* que sobrevive por periodos de hipoxia de un par de semanas, con una disminución del 30 al 53% de la actividad antioxidante (catalasa, SOD, GluPer independiente de selenio, glutatión reductasa y glutatión S-transferasa) (Pannunzio y Storey 1998). Es por lo anterior que a pesar de que el sistema antioxidante es una ventaja para sobrellevar periodos restringidos de O₂, no todos los organismos tienen las mismas estrategias biológicas para sobrevivir exitosamente dicha condición.

JUSTIFICACIÓN

Los crustáceos como el camarón blanco *L. vannamei* tienen una notoria tolerancia a la hipoxia. Numerosos estudios han demostrado que esta tolerancia se debe a ajustes metabólicos y fisiológicos que permiten sobrellevar la homeostasis energética en esta condición. Además, se ha demostrado que el acoplamiento y desacoplamiento del metabolismo energético en condiciones de hipoxia y su subsecuente reoxigenación, aumentan la producción de ROS. Sin embargo poco se conoce sobre la importancia de las defensas antioxidantes ante dichos contextos. El conocimiento obtenido del estudio de antioxidantes en estas condiciones puede ayudar a entender mejor, cómo el camarón *L. vannamei* puede tolerar periodos de hipoxia y reoxigenación.

HIPÓTESIS

El gen de catalasa tiene características similares a sus homólogos de invertebrados y es inducido diferencialmente en hipoxia y reoxigenación

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la secuencia genómica de catalasa de *Litopenaeus vannamei* incluyendo su promotor y medir su expresión en condiciones de hipoxia y reoxigenación

Objetivos Específicos

- 1. Caracterizar la secuencia genómica de catalasa así como su promotor por técnicas de PCR y secuenciación.
- 2. Identificar sitios putativos de regulación del promotor del gen de catalasa mediante análisis bioinformático.
- 3. Analizar filogenéticamente la secuencia de aminoácidos de catalasa para hacer estudios de relaciones evolutivas, por medio del software MEGA.
- 4. Evaluar la expresión del gen de catalasa en condiciones de hipoxia y reoxigenación por medio de PCR en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de DNA Genómico

A pesar de que hay una amplia variedad de kits comerciales para la extracción de DNA genómico (gDNA), en camarón blanco se ha observado una particular complicación para la extracción de gDNA. Por esta razón, en el grupo de investigación de la Dra. Gloria Yepiz-Plascencia se ha usado un viejo protocolo no comercial (Yepiz-Plascencia G., comunicación personal). Este protocolo se basa en la digestión del tejido con proteinasa K para la eliminación de proteínas, purificación del gDNA con los solventes orgánicos fenol y cloroformo, seguido de la adición de etanol frio para precipitar el gDNA. En este procedimiento se usa una varilla de vidrio para recolectar el gDNA precipitado, para posteriormente determinar su concentración y pureza (Bradfield y Wyatt 1983). El gDNA obtenido se usó como templado para la caracterización de la secuencia genómica y promotor de catalasa.

Para el aislamiento de gDNA se homogenizaron 2 g de músculo de L. vannamei en un mortero estéril frío con 3 ml de buffer de homogenización frío (SDS 0.5%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, pH 8), se agregó 200 µL de proteinasa K (200 µg/ml) y se incubó a 55 °C por 2 h. Posteriormente se centrifugó para remover el material insoluble a 800 g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se extrajo con 5 ml de fenol y 5 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y centrifugó a 800 g por 10 min, se colectó la fase superior acuosa y este procedimiento se realizó dos veces. El sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 25 ml de etanol frío y al mismo tiempo se mezcló suavemente y se enredaron las fibras de DNA en una varilla de vidrio. Posteriormente, se transfirió la varilla conteniendo el DNA y se resuspendió en 5 ml de NaCl 20 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, y se colocó a 65 °C hasta que se disolvieron las hebras. Luego se agregó un volumen de RNasa A, libre de DNasa, teniendo una concentración final de 100 μ g/ml y se dejó incubar a 60°C durante 30 min. Se agregó después SDS al 0.5% y proteinasa K (100 µg/ml) y se incubó a 55°C durante 1 h. Posteriormente se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:48:2), se mezcló, se centrifugó durante 10 min a 800 g a temperatura ambiente y se removió la fase acuosa superior a un tubo limpio. El sobrenadante se colocó en un tubo

conteniendo dos volúmenes de etanol al 95 %, repitiéndose el paso de enredar el DNA en la varilla para ulteriormente lavar el pellet de DNA en 3 ml de etanol frio al 70% y por último resuspenderlo en 1.5 ml de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0. La concentración se determinó por absorbancia a 260 nm y la pureza por la relación de absorbancia 260/280 nm. Este DNA genómico se utilizó como templado en el PCR para la caracterización del gen de catalasa y en la construcción de las genotecas para la caracterización del promotor.

Diseño de Oligonucleótidos

Para la caracterización del gen de catalasa se diseñaron oligonucleótidos usando el programa OligoCalc (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html), basándose en el DNA complementario (cDNA por sus siglas en ingles) de catalasa reportado para *L. vannamei* (No. de acceso a GenBank AY518322.1) (Tavares-Sánchez *et al.* 2004) y tomando en cuenta las siguientes consideraciones: 1) que las Tms (temperatura de fusión, siglas en inglés) fueran lo más cercano a 58°C; 2) que contuvieran un 40 a 60% de guanina-citocina; y 3) que tuvieran una longitud entre 18 a 22 pares de bases (pb). Estos oligonucleótidos al igual que los usados en la caracterización del promotor de catalasa se sintetizaron comercialmente en Integrated DNA Technologies (IDT): sus secuencias se muestran en la Tabla 2.

La caracterización del promotor se hizo de acuerdo al kit comercial GenomeWalker (ClonTech, Mountain View, CA, USA) y siguiendo las especificaciones del proveedor. Brevemente, el protocolo de GenomeWalker se basó en la construcción de genotecas usando gDNA digerido por enzimas de restricción para posteriormente ligar un adaptador (secuencia de DNA conocida) al extremo de cada fragmento derivado de la digestión. Finalmente, el promotor fue obtenido por PCR usando como templado la genoteca y oligonucleótidos reversos específicos para catalasa y oligonucleótidos sentidos correspondientes al adaptador.

Se diseñaron los oligonucleótidos reversos GSP1 y GSP2 siguiendo las recomendaciones del proveedor y con base a la secuencia genómica de catalasa obtenida en este trabajo. Los oligonucleótidos GSP1 y GSP2 se ubican a 123 y 59 pb,

22

respectivamente, corriente abajo del codón de inicio del gen de catalasa en el primer exón.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos usados para la obtención del gen de catalasa y su promotor. Posición de acuerdo al cDNA de catalasa de *L. vannamei* (GenBank: AY518322.1) (Tavares-Sánchez *et al.* 2004)

Nombre de los Oligonucleotidos	Secuencia 5'-3'	Localización	Fragmento obtenido	
CatGenFw5	CTTCAAGATGCCGCGTGAC	1-19	167	
CatGenRv3	GATCCCTGATGAAGAAAATGGG	510-418	407	
FwCatRT	GTGAAGTTTTACACAGAAGAAGG	395-417	1027	
CatCBRTRv3	AGGGGTTCCTCTGTCAGAG	1431-1413	1057	
CaGenFw1	GGATTGTGACATGTTTTGGGAC	1344-1365	761	
CatGenRv1	GATTGCGGTCAAAAGTAAGACG	2107-2086	704	
CatGenFw4	CGTCTTACTTTTGACCGCAATC	2086-2107	512	
CatGenRv2	CTGGTAGTTCCTTGTACGGG	2598-2579	515	
CatCBRTFw2	CCCGTACAAGGAACTACCAG	2579-2598	200	
CatUTRRV3	GTTAAGTTTTAGATGAAGCCTGG	2968-2946	390	
L8F2	TAGGCAATGTCATCCCCATT	334-3532	166	
L8R2	TCCTGAAGGGAGCTTTACACG	500-480	100	
GSP1	ACCTACAGTCAGGGAATTAAGCTTGTC	97-123		
GSP2	GGAGCCGTCTGTTGTTGTTTCTTGAAGTC	34-59		

Caracterización de la Secuencia Genómica de Catalasa

El gen de catalasa fue obtenido por PCR usando diferentes combinaciones de oligonucleótidos para que los fragmentos de PCR obtenidos se traslaparan entre sí y obtener de esta forma la secuencia genómica completa de catalasa. El volumen final de la reacción fue de 35 μ l, conteniendo 50 ng de gDNA, 1 μ l de cada oligonucleótido (20 μ M) y 32 μ l de platinum PCR SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones del PCR para cada reacción fueron las siguientes: 75 °C por 10 min y 94 °C por 5 min (1 ciclo); 94 °C por 30 s, 58 °C por 1 min y 72 °C por 2 min (40 ciclos); 72 °C por 5 min. El resultado de los PCRs se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el plasmido pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA)

siguiendo lo recomendado por el protocolo. Este vector tiene las características de que en el extremo 3' tiene extensiones de timina que facilitan la ligación, varios sitios de restricción y un origen de replicación. También contiene flanqueando los sitios de ligación, los promotores de la RNA polimerasa SP6 y T7, el gen de resistencia a ampicilina y el de β -galactosidasa.

Los clones (colonias) que tenían el fragmento deasado se cultivaron en medio LB (15% w/v) para finalmente purificar el DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell 2001). Los plásmidos recombinantes fueron secuenciados por el método de terminación de la cadena con dideóxidos (Sanger 1977) en el Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core en la Universidad de Arizona.

Construcción de Genotecas

Se construyeron cuatro genotecas diferentes, cada una derivadas de la digestión de gDNA con una enzima de restricción diferente (*Dra* I, *Pvu* II, *Stu* I y *EcoR* V). La digestión se llevó a cabo usando 2.5 μ g de gDNA, 8 μ l de enzima de restricción (10 unidades/ μ l), 10 μ l de buffer de restricción (10X) y 57 μ l de agua desionizada. Cada mezcla se incubó a 37°C por 2 h. La digestión se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 0.6%, teñido con GelRed.

El gDNA digerido se purificó agregando un volumen igual (95 μ l) de fenol, se homogenizó y se centrifugó brevemente para separar la fase acuosa de la fase orgánica. La fase acuosa (fase superior) se transfirió a otro tubo de 1.5 ml y se le agregó un volumen igual de cloroformo al 100%, se homogenizó, se centrifugó brevemente a temperatura ambiente y se transfirió nuevamente la fase acuosa a otro tubo. A cada tubo se le añadió dos volúmenes de etanol frio al 95 % (190 μ l), 1/10 de volumen (9.5 μ l) de acetato de socio 3 M (pH 4.5) y 20 μ g de glucógeno. Esta mezcla se homogenizó y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente a la centrifugación, el sobrenadante se decantó y se lavó el pellet en 100 μ l de etanol frio al 80% y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el pellet se disolvió en 20 μ l de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 100 mM, pH 7.5) La ligación del adaptador se hizo usando 4 μ l del gDNA digerido, 1.9 μ l de adaptador GenomeWalker (25 μ M), 1.6 μ l de buffer de ligación 10X y 0.5 μ l de T4 DNA Ligasa (6 unidades/ μ l). Esta mezcla se incubó a 4°C por toda la noche y se detuvo incubando a 70 °C por 5 min. A cada reacción se le añadió 72 μ l de buffer TE.

Obtención y Caracterización del Promotor de Catalasa

El promotor de catalasa se obtuvo por PCR usando las genotecas antes descritas como templado. Las reacciones del primer PCR se llevaron a cabo usando 40 μ l de agua desionizada, 5 μ l de buffer Advantage 2 PCR 10X, 2 μ l de dNTP (10 mM), 1 μ l de oligonucleótido AP1 (con alineación en el adaptador, 10 μ M), 1 μ l de mezcla de polimerasa Advantage2 50X, 1 μ l de GSP1 (10 μ M) y 1 μ l de genoteca. Las condiciones del primer PCR fueron las siguientes: 94 °C por 25 s y 72 °C por 3 min (7 ciclos); 94 °C por 25 s y 67 °C por 3 min (32 ciclos); 67 °C por 7 min. Al finalizar el primer PCR se analizaron 5 μ l de producto en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed.

Posteriormente se realizó un segundo PCR usando los oligonucleótidos AP2 + GSP2, 1 μ l del primer PCR (diluido 1:50 en agua desionizada), 40 μ l de agua desionizada, 5 μ l de buffer Advantage 2 PCR 10X, 9 μ l de dNTP (10 μ M) y 1 μ l de mezcla de polimerasa Advantage2 50X. Las condiciones del segundo PCR fueron las siguientes: 95 °C por 25 s y 72 °C por 3 min (5 ciclos); 94 °C por 25 s y 67 °C por 3 min (20 ciclos); 67 °C por 7 min. Se analizaron 5 μ l de cada reacción de PCR en un gel de Agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Los amplicones que presumiblemente contenían el promotor de catalasa fueron cortados del gel de agarosa, purificados en columnas de GFX (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) y clonados en pGEM-T Easy Vector System.

Análisis Bioinformático del Promotor

El análisis de las características del promotor de catalasa se realizó usando herramientas bioinformáticas disponibles en servidores web. Para identificar las secuencias ricas en CpG, características de los promotores, se hizo un diagrama de islas de CpG usando el software de EMBOSS CpGplot disponible en http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/ (Institute 2011). Las secuencias CpG de los promotores son regiones susceptibles a metilación, que estando metiladas no permiten la interacción de proteínas reguladoras (como factores de transcripción) con estos elementos de respuesta, regulando así la expresión génica. Para ubicar sitios putativos de regulación por factores de transcripción se usó la plataforma web de TFSEARCH (Akiyama 1998) (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html).

Análisis Filogenético de Catalasa

El análisis filogenético se realizó con la secuencia completa de aminoácidos de catalasa de vertebrados e invertebrados. Para esto se partió de un alineamiento múltiple de secuencias usando ClustalW (Thompson *et al.* 1994). Las secuencias de catalasas analizadas se muestran en la tabla 3, usando *Escherichia coli* para enraizar el árbol.

Nombro comán	Nombro diont/fing	No. de acceso a				
Nombre comun	Nombre cienuiico	GenBank				
Vertebrados						
Pez cebra	Danio rerio	NP_570987.1				
Chimpancé	Pan troglodytes	XP_001147928.1				
Carpa hervíbora	Ctenopharyngodon idella	ACL99859				
Humano	Homo sapiens	AAK29181				
Carpa plateada	Hypophthalmichthys molitrix	ADJ67807				
Carpa de cabeza grande	Hypophthalmichthys nobilis	ADK27719				
Cotorro australiano	Melopsittacus undulatus	AAO72713				
Ratón	Mus musculus	AAA66054				
Pez pico de rayas	Oplegnathus fasciatus	AAU44617				
Cobia	Rachycentron canadum	ACO07305				
		Continua				

 Tabla 3. Catalasas de los organismos usados en el análisis filogenético

Rata	Rattus norvegicus	NP_036652
Salmón	Salmo salar	ACN11170
Pez globo	Takifugu obscurus	ABV24056
rana	Xenopus laevis	ABK62836
ciervo	Cervus nippon	AEK69407
	Invertebrados	
camarón blanco	Litopenaeus vannamei	AAR99908
camarón oriental	Fenneropenaeus chinensis	ABW82155
anémona	Anemonia viridis	AAZ50618
almeja	Argopecten irradians	ADD71945
rotífero	Brachionus plicatilis	BAH28837
almeja	Chlamys farreri	ABI64115
ostra japonesa	Crassostrea gigas	ABS18267
ostión de Hong Kong	Crassostrea hongkongensis	ADZ76134
madre perla	Cristaria plicata	ADM64337
pulga de agua	Daphnia magna	ACU81116
caracol marino	Haliotis discus discus	ABF67505
hormiga saltadora	Harpegnathos saltator	EFN78714
madre perla	Pinctada fucata	ADW08700
cangrejo azúl	Portunus trituberculatus	ACI13850
cangrejo de fango	Scylla paramamosain	ACX46120
mosca de la fruta	Drosophila melanogaster	NP_536731.1
nemátodo	Caenorhabditis elegans	CAA57665.1
	Bacteria	
E. coli	Escherichia coli	ZP_07590342.1

El método para el análisis filogenético fue el de Neighbor-joining, basado en la matriz de Jones-Taylor-Thornton usando el software MEGA versión 5 y 1000 réplicas como base de cálculo para el árbol filogenético (Tamura *et al.* 2007).

Bioensayo de Hipoxia y Reoxigenación

Para evaluar el efecto de la hipoxia y reoxigenación sobre la expresión del gen de catalasa en branquias y hepatopáncreas de camarón blanco, se utilizaron 20 organismos donados por el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la

Universidad de Sonora (DICTUS), unidad bahía de Kino. El bioensayo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología de Invertebrados del CIAD, por el Dr. Antonio García Triana como parte de su proyecto doctoral. Los camarones fueron aclimatados por 14 días a 28°C, 37 ppt y aireación constante. La alimentación se llevó a cabo *ad libitum*, dos veces por día con alimento comercial (camaronina 35 [®]Adribrands Purina, México). Una tercera parte del agua se cambió diariamente y las partículas de alimento no consumidas junto con las heces fueron removidas diariamente. Se seleccionaron al azar camarones sanos en estadio de intermuda y se colocaron en 5 acuarios de fibra de vidrio de 150 L y con agua de mar (37 ppt de salinidad) a temperatura controlada de 28 °C.

Las condiciones a las que se sometieron los camarones fueron: a) normoxia (6 mg/L de OD), b) hipoxia (1.5 mg/L de OD) y c) reoxigenación, aplicadas en cinco tratamientos: 1) normoxia por 6 h (Nor), 2) 6 h de hipoxia (6Hip), 3) 6 h de hipoxia y seguido por 1 h de reoxigenación (6HipReo), 4) 24 h de hipoxia (24Hip) y por último, 5) 24 h de hipoxia y 1 h de reoxigenación (24HipReo). La regulación de la concentración de OD entre hipoxia y reoxigenación se llevó a cabo por suministro de nitrógeno gaseoso para disminuir la concentración de O₂ y aireación para aumentarla. Se colectaron muestras de branquias y hepatopáncreas (n=4) al final de cada uno de los tratamientos, e inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido con Trizol (Invitrogen) y se almacenaron a -80 °C (García-Triana *et al.*, 2010) para posteriormente ser analizadas.

Extracción de RNA Total

El RNA total se extrajo a partir de 200 mg de tejido que se colocaron en microtubos. La extracción se realizó usando el reactivo de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que inactiva RNasas, permitiendo mantener la integridad del RNA. La extracción se realizó siguiendo las especificaciones del proveedor, haciendo las modificaciones que se describen a continuación. El tejido se homogenizó por sonicación (usando 10 pulsos de 5 segundos en hielo) en 1 mL de TRIzol mas 200 μ L de 1-bromo-3-cloropropano. Este homogenizado se incubó por 5 min y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Posteriormente se separó la fase acuosa (superior) y se volvió agregar TRIzol (500 μ L), se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente y se agregaron 200 μ L de 1-bromo-3-

cloropropano. Después las muestras se centrifugaron a 12,000 x g por 15 min a 4 °C y se separó de nuevo la fase acuosa, teniendo especial cuidado de no tomar la interfase que contiene el DNA. La concentración y pureza del RNA total se determinó por la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 V3.2. Una vez cuantificado, se evaluó la integridad del RNA total por electroforesis en gel de agarosa al 1%, cuidando y limpiando el material utilizado de contaminación con RNasa utilizando RNasaZap (Invitrogen).

Limpieza del RNA Total de DNA Genómico y Síntesis de cDNA

A pesar de que el protocolo utilizado para la síntesis de cDNA incluye un paso de eliminación de gDNA, éste no fue suficiente, por lo que se procedió a una eliminación de gDNA usando una DNasa I (Roche, Indianapolis, NI, USA). La limpieza se realizó calculando que la concentración final de RNA total fuera de 250 ng/µL, usando 5 unidades de DNasa, en una reacción que se llevó a cabo por 10 min a 37 °C. Para parar la reacción se agregó 0.8 µL de EDTA (0.2 M) y se calentó a 75°C por 10 min. Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA de cada tejido usando el QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), 500 ng de RNA total y oligo-dT (1 µM) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La síntesis de cDNA se realizó por duplicado para cada muestra de branquias y hepatopáncreas.

Evaluación de la Expresión de Catalasa por RT-qPCR

Para la evaluación de la expresión de catalasa por PCR en tiempo real se usaron los oligonucleótidos FwCatRT y CatCBRTRv3 ubicados en la posición 460-678 de Cat*Lv* y que amplifican un producto de 218 pb. Las condiciones de PCR para la amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 min; 95 °C por 1 min, 59 °C por 1 min y 72 °C por 1 min (35 ciclos); 72 °C por 10 min. Además, se amplificó un fragmento de 166 pb del gen que codifica para la proteína ribosomal L8, como un control estándar para normalizar los datos de la expresión de catalasa, usando los oligonucleótidos L8F2 y L8R2 (Gómez-Anduro *et al.* 2006). Los fragmentos de catalasa y L8, obtenidos a partir de cDNA, fueron purificados usando el kit de GFX PCR y Gel Band Purification kit (GE Healthcare), clonados y secuenciados para corroborar la secuencia de catalasa y L8 de *L*.

vannamei. A partir de los fragmentos de PCR purificados se realizó una curva de calibración usando diluciones seriadas de $5x10^{-3}$ a $5x10^{-8}$ ng/µL.

La cuantificación de la expresión del gen de catalasa y L8 de branquias y hepatopáncreas de cada cDNA fue evaluado por duplicado (n=16), en un termociclador iQ5 Real-Time PCR Detection System (BioRad, DF, México). Para la reacciones se usó un volumen final de 20 μ L mezclando 1 μ L (equivalentes a 50 η g de RNA total), 0.5 μ L de cada oligonucleótido (10 μ M) y 18 μ L de iQ SYBR Green Supermix (BioRad). Las condiciones de amplificación y detección de los amplicones fueron las siguientes: 95 °C por 5 min; 95 °C por 30 s, 60 °C por 35 s y 72 °C por 55 s (40 ciclos) con una única medición de fluorescencia. Las curvas de L8 y catalasa fueron usadas como controles positivos, mientras que reacciones usando como templado RNA total tratado con DNasa I (50 ng/ μ L) y reacciones sin oligonucleótidos fueron normalizados a L8 y reportados como valores de expresión relativa (Catalasa/L8).

Análisis Estadístico

El diseño estadístico fue un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Para verificar la normalidad de los datos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para evaluar diferencias entre cada tratamiento se usó la prueba de comparación múltiple de Duncan a un nivel de probabilidad del 95%, usando el software estadístico NCSS (2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Gen de Catalasa está Interrumpido por Cuatro Intrones

La extracción de gDNA resultó en una preparación con una concentración de 130 ng/ μ L y una relación 260/280 de 1.8, confirmando de esta forma su pureza. Este DNA fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se observó una banda tenue mayor a 12000 pb, que corresponde al gDNA. El DNA fue usado como templado para la caracterización de la secuencia genómica de catalasa y construcción de las genotecas.



Figura 5. DNA genómico extraído de músculo de *L. vannamei*, analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed. Se analizaron 250 ng de DNA. Anotaciones: M corresponde al marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, 1 al gDNA extraído.

El cDNA de catalasa de *L. vannamei* fue reportado anteriormente por nuestro grupo de investigación (No. de acceso de GenBank AY518322.1) y tiene una longitud de 1515 pb considerando solo la región codificante y corresponde a una proteína de 505 aminoácidos (Tavares-Sánchez *et al.* 2004). La secuencia del gDNA de catalasa (Cat*Lv*) se obtuvo por PCR, clonación y secuenciación usando oligonucleótidos diseñados en base al cDNA de *L. vannamei*. Los tamaños de los fragmentos y la combinación de oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 2. Los amplicones obtenidos por PCR se muestran en la Figura 6, los cuales se traslapan para conformar el gen de catalasa en su totalidad.



Figura 6. Amplicones obtenidos por PCR para la caracterización de la secuencias genómica de catalasa. Anotaciones: M corresponde al marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; Números mezcla de oligonucleótidos y reacciones, 1, CatGenFw5+CatGenRv3; 2, FwCatRT+CatCBRTRv3; 3, CatGenFw1+CatGenRv1; 4, CatGenFw4+CatGenRv2; 5, CatCBRTFw2+CatUTRRv3; (-) controles negativos de cada reacción.

La secuencia de Cat*Lv* tiene una longitud de 2974 pb (No. GenBank JX162772) y está formado por cinco exones y cuatro intrones, los cuales fueron deducidos por comparación directa con la secuencia nucleotídica del cDNA (Figura 7). La longitud de los intrones es de 821, 223, 114 y 298 pb ubicados consecutivamente del extremo 5´ al 3´. La composición de bases es diferente entre los intrones y los exones. El contenido de adenina mas timina es mayor al 60 % en la mayoría de los intrones, con excepción del intrón 1 que es de 59.8 % (Tabla 4), esta característica de alto porcentaje de adeninas y timina es común en estas regiones no codificantes. Todos los intrones contienen secuencias conservadas en los extremos 5´-GT-AG-3´ y la secuencia intermedia CURAY, que son importantes para el corte y empalme correcto del RNA mensajero durante su procesamiento.

Intronos	Tamaño	% de	% de	% de	% de	% de
muones	(pb)	Adeninas	Timinas	Guaninas	Citosinas	A+T
1	821	25.4	34.4	22.6	17.6	59.8
2	223	23.8	47.1	16.6	12.6	71.9
3	114	21.9	49.1	14.9	14.0	71.1
4	298	35.6	35.6	18.5	10.4	71.2
Promedio		26.67	41.55	18.15	13.65	68.5
Exones						
1	519	25.8	25	25	24.2	50.9
2	197	27.9	25.9	22.3	23.9	53.8
3	118	28.8	25.4	23.7	22	44.2
4	138	29	26.1	21.7	23.2	45.1
5	546	25.8	24.5	23.8	25.8	45.4
Promedio		27.4	25.3	23.3	23.8	47.8

Tabla 4. Composición nucleotídica de los intrones y exones del gen de catalasa de *L*. *vannamei*

Los intrones son regiones no codificantes, ausentes en los transcritos maduros, presentes en la mayoría de los genes eucariotas y a los cuales se les han atribuido relevancia en la evolución del genoma, en la estructura de la cromatina y en la regulación genética. Actualmente existe incertidumbre y teorías controvertidas sobre el origen de los intrones. Por un lado se postula que son elementos del genoma que siempre han existido y por otro que han surgido al aumentar la complejidad de los organismos (Logsdon 1998; Roy y Gilbert 2006). La longitud de los genes de catalasa y el contenido de intrones de algunos organismos se muestra en la Tabla 5. Es notorio que la longitud de los genes de catalasa y números de intrones varia entre cada especie y que el número aumenta en paralelo con la complejidad. Esta correspondencia entre el tamaño de los genes y número de intrones en función de la complejidad es una excepción en las levaduras, ya que sus intrones son largos comparado con el tamaño de su genoma (Vinogradov 1999).

M P R D K C A E O T, N D F K K O O T A P D N T, T T S H G 1 -7 cttcaagATGCCGCGTGACAAGTGTGCAGAGCAATTGAATGACTTCAAGAAACAACAGCGGCTCCCGATAACCTGACCACGAGCCATGG >>>>CatGenFw5>>>> C P L A D K L N S L T V G P R G P I L L O D I O L L D E M A 29 GTGCCCACTTGCGGACAAGCTTAATTCCCTGACTGTAGGTCCAAGGGGCCCCATCCTCCTGCAGGACATTCAACTCCTTGATGAGATGGC 84 H F D R E R I P E R V V H A K G A G A F G Y F E V T H D I S 59 174 89 KYCKAALFSEIGKRTPIAVRYSTVGGESGS 264 T D T A R D P R G F A V K F Y T E E G N W D L V G N N T P I 119 354 >>>>>FwCatRT>>>>>> <<<<< 149 F F I R D P I L F P S FI H T Q K R N P A T H L K TTTCTTCATCAGGGATCCTATTCTGTTCCCATCCTTCATCACCGCAGAAGAGGAATCCTGCAACTCATCTAAAGgtactccgtgtgtg 444 <<CatGenRv3<<<<< 534 624 714 804 894 aatttgagtatatgttaagtagttaccaggttttacattttatttttcttcattttatgctttgaggaaataaaagaaaatgcagctgg 984 atttgaaactctctgtttttctcatcttttttttcaataggtgtccctcacaagatcttggagattattaatgtttaattattatcaaag 1074 cccctataaaggaaaacacttttaatttttcccatatccttatcatataagaatgcccaacaatttggaatgatcttcattttcttccca1164 174 D 1254 >>> C D M F W D F I S L R P E T T H Q V S F L F S D R G T P D G 175 TGTGACATGTTTTGGGACTTCATTAGTTTGCGACCAGAAACAACAACAACACCAAGTGTCATTCCTCTTCTCTGACAGAGGAACCCCTGATGGC 1344 >>>CatGenFw1>>>>> <<<<CaTCBRTRv3<<<< R H M N G Y G S R T S K L V N E K G E A V Y C K F H Y K 205 TATCGTCACATGAATGGCTATGGTTCTCGTACTTCCAAGCTTGTCAATGAAAAGGGAGAGGCCGTCTACTGCAAGTTCCATTACAAGACG 1434 235 DOGTK 1524 1614 ggaccctaccattaaaatgttctttgtcataaaacatgccagtcactgaggatataagtatttcctttgaaatgacttctgaataatttt240 CLSSKKADELA $1714 \quad \texttt{ttattaatttatgattgtatttaagatgatttatggctttttccactttttcttt} \\ \underline{agGT} \\ \underline{GT} \\ \underline{GT}$ G S D P D Y A T R D L Y N A I S S G D Y P S Y T M C I Q 251 1794 1884 279 V M T F E E A E K W K F N P F D LT K V W P H G 303 E F P T, T P V G R T, T F D R N P K N Y F A F. ${\tt GGAATTCCCACTCATCCCAGTAGGCCGTCTTACTTTTGACCGCAATCCAAGAATTACTTTGCTGAGqtaacaacaatttttctttqata$ 2064 2154 2244 tggtctgatattgtaaatacagagcatttatagaaaatatgacaaggttgaggaaattaccataattttgcctgtaatataaaaacatctg2344 tgagtagtgtacattagtaggaaagaggatcacaaaactcagaatgcaaggtgttgaggttcatatttataagttttctctttttaacaaV E Q I A F S S A N M V P G I E A S P D K M L Q G R L F accagGTGGAGCAGATTGCGTTCTTTTTCTGCCAACATGGTGCCGGGTATTGAGGCTTCCCCTGACAAAATGTTGCAAGGTCGCCTCTTTT 325 2424 ND THRHRI, GANY TO TPVN CPYRAR TRNY 353 S Y 2514 <<<<<CatGenRv2<<< >>>>CatCBRTFw2>>> Q R D G P M C V D G N Q E S A P N Y F P N S F S G P Q D C R 383 2604 AGAGAGATGGCCCCATGTGTGTGTGATGGCAATCAGGAAAGTGCTCCTAACTACTTCCCCAACAGCTTTAGTGGCCCCACAGGACTGCAGGA << >> K H T A P K F S V S A D V D R Y N S A D E D N F T Q V G I F 413 2694 AACACACTGCTCCTAAATTTTCTGTTTCTGCTGATGTTGATCGCTACAACAGTGCTGATGAGGACAACTTTACCCAAGTTGGCATTTTCT Y R O V L N E A E R O R L V E N I A G H M V G A O E F 443 TOD ATCGTCAGGTGCTGAATGAGGCAGAACGTCAGCGTTTGGTGGAGAACATTGCTGGTCACATGGTTGGAGCCCCAAGAGTTCATCCAGGATC 2784 473 RAIKNFTOADPEYGANIRRAIDKIKMSOAS 2874 GAGCAATCAAAAAACTTTACCCAGGCTGATCCAGAATATGGTGCTAACATCCGGCGTGCGATTGACAAGATAAAGATGAGCCAGGCTTCAT <<<<< 503 SКТ* 2964 CTAAAACTTAAC <CatUTRRv3<<

Figura 7. Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos del gen de catalasa del camarón blanco *L. vannamei*. La posición de los oligonucleótidos se muestra con (>>>>>) para los sentidos y (<<<<<) para los antisentidos. La secuencia codificante se muestra en mayúsculas, los intrones en minúsculas, los extremos GT-AG de lo intrones se muestran subrayados, el codón de terminación con asterisco y los codones divididos sombreados en gris.

En la Figura 8 se muestra la evolución de diferentes genes de catalasa en función de la prevalencia y ausencia de exones e intrones entre diferentes especies, incluyendo desde el humano hasta la mosca, donde se puede observar que gran parte de los intrones son conservados entre las especies con respecto a la posición y que han aumentado o disminuido en longitud dependiendo de la especie. En el caso de la comparación de los intrones de *CatLv*, el intrón 2 y 3 se pueden relacionar con intrones de abeja, pez cebra, rana, chimpancé y humano; el intrón 1 solo se relaciona con el intrón 4 de abeja y el intrón 4 de *CatLv* con el intrón 3 del nemátodo *C. elegans* y el 2 de la mosca de la fruta *D. melanogaster*. La mayoría de los intrones de *CatLv* no interrumpen codones, solo el intrón 3 interrumpe un codón que codifica para la lisina 244 (figura 8), además ninguno de sus intrones 4 de humano, chimpancé y rana y 3 de pez cebra, que interrumpen uno de los dominios de interface de tetrámero.

Organismo	Número de intrones	Longitud del gen (pb)	ID del transcrito del servidor Ensamble Genome Browser
Drosophila melanogaster Mosca de la fruta	2	5092	FBtr0075058
Caenorhabditis elegans Nemátodo	3	2633	Y54G11A.6
L. vannamei Camarónblanco	4	2973	JX162772 (GenBank)
Apis mellifera	7	10682	443552 (GeneID)
Danio rerio Pezcebra	11	7700	ENSDART00000149152
Xenopus tropicalis Rana	12	12041	ENSXETT00000016468
Pan troglodytes	12	32836	ENSPTRT00000006587
Homo sapiens Humano	12	32266	ENST00000241052

Tabla 5. Comparación de la longitud y número de intrones de genes de catalasa en diferentes organismos



Figura 8. Estructura de los genes de catalasa de diferentes organismos y su evolución en función de la prevalencia y ausencia de exones e intrones. Anotaciones: Rectángulos correspondes a exones; líneas continuas, intrones que no interrumpen codones; líneas punteada, intrones que interrumpen codones;•, intrón que interrumpe el dominio de interface de tetrámero; flechas, homología de intrones interespecies; números se refiere a la numeración de los intrones en cada gen. Una cuestión a resaltar es que el gen de catalasa de pez cebra es el único que prescinde del exón 1 que corresponde a los 130 pb del primer exón de *CatLv*, es decir que no contiene los primeros 43 aminoácidos comparado con la mayoría de las catalasas, lo que sugiere que no es una región importante para la función de la catalasa, ya que además de su ausencia en este gen, no se ubica ningún dominio importante en este exón.

Interesantemente el primer intrón de CatLv tiene tres regiones conocidas como microsatélites, que son secuencias cortas de DNA que se repiten de manera consecutiva. Dos de los microsatélites tienen motivos de GT con extensiones de 36 y 15 pb y otro microsatélite está conformado por secuencias interrumpidas de (T)AT(GT) donde la secuencia mononucleotídica de timina tiene una longitud de cuatro a seis bases y la secuencia dinucleotídica GT tiene una longitud de cuatro a onces bases. El dinucleótido GT ya ha sido identificado antes en nuestro grupo de investigación en intrones del gen de Selenoproteína M de *L. vannamei* (datos no publicados).

Se han realizado varios estudios respecto a la identificación de microsatélites en *L. vannamei*, identificándose una amplia variedad (Garcia *et al.* 1996; Meehan *et al.* 2003; Alcivar-Warren *et al.* 2006; Garcia y Alcivar-Warren 2007). En estos estudios el dinucleótido GT se ha encontrado no solo en *L. vannamei* sino también en el camarón tigre *Penaeus monodon*, el protozoario *Paramecium falciparum*, abeja, humano, porcinos y bacalao del atlántico (Tassanakajon *et al.* 1998; Alcivar-Warren *et al.* 2006). De todos estos motivos de GT los más extensos son los que pertenecen a la familia de los *Penaeus*, con más de 30 bases de longitud. En lo que respecta al motivo de (T)AT(GT), solo se ha identificado otro similar en *L. vannamei* con secuencia de (GT)AT(GT) (Meehan *et al.* 2003).

La abundancia de microsatélites y su inherente potencial de variación han sido usados como marcadores moleculares en muchas especies y el interés en los mismo ha aumentado porque se han relacionado con enfermedades en humanos como desórdenes neurodegenerativos y cáncer (Jarne y Lagoda 1996). Dos modelos se han propuesto para explicar el origen de los microsatélites: i) que se originan por errores de la DNA polimerasa en la duplicación y recombinación desigual y ii) y derivados de microsatélites ubicados en elementos transponibles (Toth *et al.* 2000; Temnykh *et al.* 2001).

Análisis Filogenético de la Catalasa de Vertebrados e Invertebrados

El análisis filogenético de 31 secuencias deducidas de aminoácidos de catalasas de vertebrados e invertebrados, incluyendo la de *L. vannamei*, resultó en un árbol con una buena topología y una alta puntuación de arranque, como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Árbol filogenético resultado de análisis de secuencia deducida de aminoácidos de catalasa. El método utilizado fue el de Neighbor Joining con una matriz de Jones-Taylor-Thornton, usando 1000 réplicas.

La catalasa de camarón fue agrupada en un gran clado que incluye a insectos y crustáceos, separado de los vertebrados con un 64% de soporte. La catalasa de *L. vannamei* fue incluida en un subclado con el 100% de soporte que agrupa a crustáceos como *F. chinensis, P. trituberculatus* y *Scylla paramamosain*, mientras que el crustáceo

D. magna y los moluscos bivalvos *C. hongkongensis* y *C. gigas* se encuentran en un subclado diferente, indicando una mayor distancia filogenética. En el clado de los vertebrados interesantemente se presenta una clara separación en dos subclados, en donde se apartan vertebrados acuáticos (peces) y terrestres con un 99 y 51% de soporte respectivamente. Klotz y colaboradores hicieron un análisis filogenético compilando secuencias de catalasa de bacterias, hongos, animales y plantas, en el que se distinguen claramente clados de cada uno de los reinos analizados (Klotz *et al.* 1997).

A nivel de proteína, la catalasa de *L. vannamei* es muy cercana a catalasas de vertebrados de humanos, rana y de pez cebra con aproximadamente 65% de identidad. Comparado con otros invertebrados, la catalasa de *L. vannamei* tiene un alta identidad de 96% con la del camarón *F. chinensis* (Figura 10). En este alineamiento se observó un alto grado de conservación en dominios importantes de la enzima como los son los dominios de interface del tetrámero, sitios de unión a NADPH y al grupo hemo. Estos resultados indican que a pesar de las distancias taxonómicas entre vertebrados, invertebrados y bacterias, la catalasa es una enzima muy conservada, dando evidencia de su importante función en el equilibrio redox.

L.vannamei	MPRDKCAEQLNDFKKQOTAPDNLTTSHGCPLADKLNSLTVGPRGPILLODIOLLDE 56	
F.chinensis	MPRDKCAEOLTDFKK00TAPDNLTTSHGCPLSDKLNSLTVGPRGPILLODIOLLDE 56	
H.sapiens	MADSRDPASDOMOHWKEORAAOKADVLTTGAGNPVGDKLNVITVGPRGPLLVODVVFTDE 60	
X.laevis	MADKRDNAADQMKLWKNGRGSQKPDVLTTGGGNPISDKLNLLTVGPRGPLLVQDVVFTDE 60	
D.rerio	MADDREKSTDQMKLWKEGRGSQRPDVLTTGAGVPIGDKLNAMTAGPRGPLLVQDVVFTDE 60	
C.gigas	MST-RDKATEOLNEFKLSHATPEOCTTGTGAPIGLKTATMTAGPLGPVLVODFVFNDE 57	
D.melanogaster	MAG-RDAASNOLIDYKNSO-TVSPGAITTGNGAPIGIKDASOTVGPRGPILLODVNFLDE 58	
	*. *: .::*: :* . **. * *:. * *.** *:*:	
	+	
	t t d h	
L.vannamei	MAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDISKYCKAALFSEIGKRTPIAVRYSTVGGES 11	6
F.chinensis	MAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYCKAAMFSEIGKQTPIAVRYSTVGGES 11	6
H.sapiens	MAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFEHIGKKTPIAVRFSTVAGES 12	0
X.laevis	MAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITKYSKAKVFENIGKRTPIAVRFSTVAGEA 12	0
D.rerio	MAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVFEHVGKTTPIAVRFSTVAGEA 12	0
C.gigas	MAHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFECTHDISKYTKAKPFESVGKKTPVGVRFSTVGGES 11	7
D.melanogaster	• MSHFDRERIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITQYCAAKIFDKVKKRTPLAVRFSTVGGES 11	8
	*:*************************************	
	tt tt + n +ttttt t tttttt	
L.vannamei	GSTDTARDPRGFAVKFYTEEGNWDLVGNNTPIFFIRDPILFPSFIHTQKRNPATHLKDCD 17	6
F.chinensis	GSADTARDPRGFAVKFYTEEGNWDLVGNNTPIFFIRDPILFPSFIHTQKRNPATHLKDAD 17	6
H.sapiens	GSADTVRDPRGFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDPILFPSFIHSQKRNPQTHLKDPD 18	О
X.laevis	GSSDTVRDPRGFAVKMYTEDGNWDLTGNNTPVFFIRDAMLFPSFIHSQKRNPQTHLKDPD 18	0
D.rerio	GSSDTVRDPRGFAVKFYTDEGNWDLTGNNTPIFFIRDTLLFPSFIHSQKRNPQTHLKDPD 18	С
C.gigas	GSADTARDPRGFAVKMYTEDGNWDIVGNNTPIFFIRDPILFPSFIHTQKRNPRTHLKDPD 17	7
D.melanogaster	GSADTARDPRGFAVKFYTEDGVWDLVGNNTPVFFIRDPILFPSFIHTQKRNPQTHLKDPD 17	8

	tt nnnn n nn	
L.vannamei	MFWDFISLRPETTHQVSFLFSDRGTPDGYRHMNGYGSRTSKLVNEKGEAVYCKFHYKTDQ 23	6
F.chinensis	MFWDFISLRPETTHQVSFLFSDRGTPDGYRHMNGYGSHTFKLVNAKGEAVYCKFHYKTDQ 23	6
H.sapiens	MVWDFWSLRPESLHQVSFLFSDRGIPDGHRHMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFHYKTDQ 24	С
X.laevis	MVWDFWSLRPESLHQVSFLFSDRGIPDGHRHMNGYGSHTFKLVHAKDEAVYCKFHYKTDQ 24	С
D.rerio	MUNDEWCI DDECI HOVCET ECOD CI DDCVDUMNCVCCUEEVI VNA OCODVVCVEUVVENO 244	С
	MVWDrWSLKPESLRQVSrLrSDKGIPDGIRnMNGIGSnirkLVNAQGQPVICKrHIKINQ 240	
C.gigas	MFWDFWSLRPESINGVSFLFSDRGIPDGIRNMNGIGSHIFLLVNAQGEVICKFHINING 24 MFWDFISLRPETTHQVSFLFSDRGIPDGYRRMNGYGSHIFKLVNKDDKPVFCKFHFKTDQ 23	7
C.gigas D.melanogaster	MFWDFWSIRFESIRGVFILFSDRGTPDGYRRMNGYGSHTFKLVNAGGGVICFFILING 24 MFWDFLTLRPESAHQVSTLFSDRGTPDGYRRMNGYGSHTFKLINAKGEPIYAKFHFKTDQ 23	7 3

L.vannamei F.chinensis H.sapiens X.laevis D.rerio C.gigas D.melanogaster	t t tt t t t t t t t t t t t t t t t t	296 296 300 300 300 297 298
L.vannamei F.chinensis H.sapiens X.laevis D.rerio C.gigas D.melanogaster	nnn t tt t t t t t t t t t t t t t t t	356 356 360 360 360 357 358
L.vannamei F.chinensis H.sapiens X.laevis D.rerio C.gigas D.melanogaster	P EA EAE EE	414 414 418 418 418 418 416 418
L.vannamei F.chinensis H.sapiens X.laevis D.rerio C.gigas D.melanogaster	n nn tt t t t TAPKFSVSADVDRYNSAD-EDNFTQVGIFYRQVLNEAERQRLVENIAGHMVGAQE IQDR TAPKFSVSADVDRYNSAD-EDNFTQVGIFYRQVLNEAERQRLVENIAGHMIGAQE IQDR LEHSIQYSGEVRFNTAN-DDNVTQVRAFYVNVLNEEQRKRLCENIAGHLKDAQIFIQKR REHRFQVSADVARYNSSD-EDNVSQVRDFYVKVLSEEQRLRLCENIAGHLKGAQLFIQKR LESKCKVSPDVARYNSAD-DDNVTQVRTFFTQVLNEAERERLCQMMAGHLKGAQLFIQKR ESCPFTTTGECRRYNSVD-EDNFSQVGIFWNQVLKPEERDRLVENIGNHLINTOKIIRDR LSSCCPVTGDVYRYSSGDTEDNFGQVTDFWVHVLDKCAKKRLVQNIAGHLSNASQFLQER :: *::::::::::::::::::::::::::::::::::	473 473 477 477 477 475 475 478
L.vannamei F.chinensis H.sapiens X.laevis D.rerio C.gigas D.melanogaster	AIKNFTQADPEYGANIRRAIDKIKMSQASSKT 505 AIKNFTQADPEYGANIRRALDKIKMAQASSKTHHIQALAASSNGAKL 520 AVKNFTEVHPDYGSHIQALLDKINAE-KPKNAIHTFVQSGSHLAAREKANL 527 AVKNFTDVHPEYGARIQALLDKINAE-KPKNAIHTFVQSGSHLAAREKANL 528 MVQNLMAVHSDYGNRVQALLDKHNAE-GKKNTVHVYSRGGASAVAAASKM- 526 AVKNFGRADPEFGRKLQAHLDSVSNVSKINVVLNGVKMSDK 516 AVKNFTQVHADGRMLTEELN-LAKSSKF 506	

Figura 10. Alineamiento de secuencia de aminoacidos de catalasas de *L. vannamei* (AAR99908), *F. chinensis* (ABW82155), *H. sapiens* (AAK29181), *X. leavis* (ABK62836), *D. rerio* (NP_570987.1), *C. gigas* (ABS18267) y *D. melanogaster* (NP_536731.1). Los dominios de la catalasa están indicados con minúsculas con una t y gris fuerte para la interface con el tetrámero; n y gris tenue para el sitio de unión para el NADPH; h y negro para el sitio de coordinación para el grupo hemo, con un + para los aminoácidos catalíticos y con una d y p para las histidinas distales y proximales respectivamente.

Caracterización del Promotor de Catalasa

Para la caracterización del promotor se partió de la construcción de cuatro genotecas donde se inició con la digestión de gDNA con diferentes enzimas de restricción por separado (*Eco*RV, *Dra*I, *Pvu*II y *Stu*I). En la Figura 11 se muestra la digestión del gDNA con DraI, que fue la única genoteca que aportó información para la

caracterización del promotor de catalasa, mostrándose una ligera disminución de tamaño comparado con el gDNA sin digerir.

Los productos del primer PCR usando como templado la genoteca derivada de la digestión con DraI fueron de aproximadamente 250, 500 y hasta 2000 pb (Figura 12). En el segundo PCR usando como templado el producto del primer PCR (diluido 1:50) se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 400 y 500 pb, las cuales fueron purificadas a partir de gel, clonadas y secuenciadas.



Figura 11. Digestión del gDNA de camarón con *Dra*I, analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed. Se analizaron 250 ng de DNA. Anotaciones: M corresponde al marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; 1 a gDNA sin digerir: 2 gDNA digerido con *Dra*I.



Figura 12. Productos de PCR usando como templado la genoteca derivada de *Dra*I. Anotaciones: M, marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder; 1, primer PCR; 2, segundo PCR.

El análisis de la secuencia demuestra que el amplicón de 400 pb corresponde a catalasa, y que además, se extiende 333 pb corriente arriba del codón de inicio (Figura 13). Por medio de análisis bioinformático se identificaron diferentes sitios putativos de

regulación con secuencia, TTAACAATCG, CTTTATA, AGATAAAATAA, a 46, 189 y 209 pb, respectivamente, corriente arriba del codón de inicio. Estas secuencias son elementos reconocidos por los factores de transcripción SOX-5,CdxA y GATA-X, respectivamente, implicados en la regulación de genes durante el desarrollo embrionario y diferenciación celular (Frumkin *et al.* 1994; Pevny y Lovell-Badge 1997; Patient y McGhee 2002; Phochanukul y Russell 2010). También se predicen elementos reconocidos por el factor de choque térmico (HSF por sus siglas en ingles) con secuencia AGAAT a 153 pb corriente arriba del codón de inicio.

El HSF es muy importante en la inducción de genes en respuesta a estrés y se descubrió inicialmente por la respuesta a altas temperaturas e inactivación a temperaturas normales (37 °C) por la asociación a proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés). Cuando la temperatura se eleva (hasta 42 °C) las HSP son desnaturalizadas y liberan a HSF para ser traslocado hacia el núcleo e iniciar su función de regulación de genes (Rabindran *et al.* 1991). Estudios han demostrado que HSF también puede ser activado por otros estreses como exposición a metales pesados, toxinas, agentes oxidantes e infecciones por bacterias y virus (Morimoto 1993; Shamovsky y Nudler 2008). Además, se ha reportado que en ratas, los ROS producidos durante la hipoxia y reoxigenación actúan como agentes oxidantes que liberan por desnaturalización al HSF del HSP induciendo su actividad (Nishizawa *et al.* 1996; Nishizawa *et al.* 1999).





Es preciso mencionar, que los sitios putativos de regulación inferidos por herramientas de bioinformática pueden o no, ser regiones reguladoras y tienen que ser determinados experimentalmente. Un ejemplo son los ensayos de interacción DNA- proteína entre la región reguladora putativa y el factor de transcripción de interés o ensayos de genes reporteros (Wasserman y Sandelin 2004). Interesantemente para el presente estudio, ya se ha identificado en levadura que HSF regula positivamente la expresión de catalasa (Wieser *et al.* 1991), lo que es un soporte adicional para la información obtenida.

La Expresión de Catalasa es Tejido Específica en Hipoxia y Reoxigenación

Para la cuantificación de la expresión de catalasa en condiciones de hipoxia y reoxigenación se inició con la extracción de RNA total de acuerdo al protocolo mencionado previamente. Los resultados de la extracción se muestran en la Figura14, donde se pueden observar los diferentes RNA ribosomales 28S, 18S y 5S. Las muestras de branquias tienen bandas más fuertes y definidas que las de hepatopáncreas, aunque en ambas hay bandas de alto peso molecular. Este tipo de bandeo diferencial por tejido ha sido continuamente detectado en nuestro laboratorio y posiblemente resulta por la gran cantidad y variedad de RNAs mensajeros. Este RNA se limpió de gDNA y se utilizó como templado para la síntesis de cDNA para posteriormente evaluar la expresión de catalasa y L8.



Figura 14. Análisis de la extracción de RNA total, evaluado por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Anotaciones: M, marcador molecular para RNA 0.5-10 Kb RNA Ladder; 1-8 RNA extraído de hepatopáncreas; 9-14 RNA extraído de branquias.

En la cuantificación de la expresión de CatLv se usó un amplicón de 218 pb y como gen constitutivo se amplificó un fragmento de 166 pb del gen de la proteína ribosomal L8 (No. de acceso de GeneBankDQ316258.1). En el caso de CatLv para discriminar una posible contaminación con gDNA, el tamaño de los amplicones obtenidos a partir de gDNA o cDNA es diferente por la presencia de intrones en el gen (Figura 15).



Figura 15. Amplicones obtenidos por PCR que se usaron para la construcción de la curva de calibración para RT-qPCR, analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Anotaciones: M, marcador molecular 1 Kb plus DNA ladder; 1 amplicón de catalasa usando cDNA como templado; 2, amplicón de catalasa usando gDNA como templado; 3 amplicón de L8 usando como templado cDNA.

La expresión relativa de CatLv en branquias y hepatopáncreas se muestra en la Figura 16. En ella se puede observar un comportamiento tejido-específico, debido a que en branquias cambia la concentración del trascrito de CatLv por las condiciones de hipoxia (1.5 mgO₂/L por 6 y 24 h) y reoxigenación (1 h de reoxigenación después de cada periodo de hipoxia) comparada con el control de normoxia (6 mgO₂/L), sin embargo en hepatopáncreas esta influencia no resulta en diferencias significativas (p>0.05). En branquias se detectó un aumento significativo (p<0.05) de 3.77 y 3.23 veces en camarones expuestos a 1 h de reoxigenación después de 6 y 24 h de hipoxia, respectivamente comparados con normoxia. Aunque en branquias de camarones expuestos a hipoxia (6 y 24 h) no se detectaron diferencias significativas con respecto al control, se puede observar un aumento en la expresión de CatLv. Estos resultados sugieren que la hipoxia y reoxigenación induce la expresión de CatLv de manera tejidoespecífica. Esta inducción en branquias puede estar dada por el factor de transcripción HSF, debido a que se identificó un sitio putativo de regulación en el promotor de catalasa de *L. vannamei* y que ya se ha comprobado su rol de inducción de genes en condiciones de hipoxia y reoxigenación (Nishizawa *et al.* 1996; Nishizawa *et al.* 1999)

Previamente en nuestro grupo de investigación se evaluó la actividad enzimática de catalasa en los mismos tejidos de camarones derivados del mismo bioensayo (Trasviña-Arenas 2010). En este trabajo también se detectó un comportamiento tejido-específico; no obstante en branquias hubo una mayor actividad enzimática de catalasa en condiciones de hipoxia que en reoxigenación, comparadas con normoxia, mostrando diferencias entre la expresión y la actividad enzimática en este tejido. En hepatopáncreas no se detectaron diferencias significativas en la actividad de catalasa, habiendo una concordancia con los datos obtenidos en los niveles de expresión de Cat*Lv*. La incongruencia encontrada entre la expresión y la actividad por la estabilidad del RNA mensajero de catalasa, se conoce que hay otros RNAs mensajeros que son afectados por condiciones de variación de oxígeno como hipoxia e hiperoxia (Clerch y Massaro 1992; Kim *et al.* 2001; Paulding y Czyzyk-Krzeska 2002). Además la secuencia nucleotídica del cDNA de Cat*Lv* en la región UTR-3^{-/} (región no traducida del cDNA) no está completa, pues carece de la cola poli-A.

El conocer la secuencia completa del UTR-3' de CatLv podría ser útil para predecir regulación por medio de la estabilidad del RNA mensajero, ya que en esta región se pueden ubicar la secuencia AUUUA que es característica de la inestabilidad del RNA mensajero. El cDNA de catalasa de *F. chinensis* (No. de acceso del GenBank ABW82155) tiene la secuencia AUUUA de inestabilidad de RNA mensajero en la región UTR-3' en la posición 1769-1773. Con base a esta información y a que la identidad del UTR-3' de catalasa de *F. chinensis* con su correspondiente de CatLv es del 78.6 %, se puede suponer que la región UTR-3' de CatLv le pudiera confiere inestabilidad al RNA mensajero de este gen

La expresión del RNA mensajero y actividad enzimática tejido-específica de catalasa, puede ser relacionada con la función fisiológica y la sensibilidad al oxígeno. El hepatopáncreas tiene varias funciones fisiológicas como digestión, endócrinas y

destoxificación. La función principal de las branquias es el intercambio de gases entre el camarón y el medio acuático, por lo tanto, es el primer tejido relacionado bioquímica y fisiológicamente con el oxígeno y podría ser más sensible a las variaciones de oxígeno (Dall *et al.* 1990).

La hipoxia afecta el metabolismo en *L. vannamei* (Racotta *et al.* 2002; Soñanez-Organis *et al.* 2010; Sonanez-Organis *et al.* 2011). Estos cambios metabólicos tienen influencia en la producción de ROS y por ende, podría afectar los niveles de sus antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, como se ha observado en vertebrados (Chang y O'Connor 1983).

En crustáceos hay poca información disponible relacionada con la hipoxia y reoxigenación y su efecto en el sistema antioxidante (de Oliveira *et al.* 2005; Zenteno-Savín *et al.* 2006; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín 2011). En respuesta a hipoxia (1 mgO₂/L por 24 h) y 1 h de reoxigenación aumentó la actividad de catalasa en hepatopáncreas de *L. vannamei* (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín 2011). En nuestro grupo de investigación se ha estudiado la actividad enzimática de peroxidasas totales y concentración de H₂O₂ en los mismos tratamientos analizados en el presente trabajo (García-Triana *et al.* 2010), detectando un comportamiento tejido-específico en branquias y hepatopáncreas. Lo anterior sugiere que no solo el comportamiento de catalasa es tejido-específica, sino la actividad de peroxidasas totales se comportan similarmente. No obstante, la catalasa es una enzima con una baja afinidad por su sustrato, por lo tanto su función antioxidante está asociado con una alta concentración de H₂O₂ y consecuentemente indispensable para la respuesta ante el estrés oxidativo (Konigsberg-Fainstein y Aguilar-Maldonado 2008).



Figura 16. Expressión relativa de catalasa para branquias y hepatopáncreas. Los tratamientos están mostrados de la siguiente manera: Normoxia (Nor), 6 h de hipoxia (6Hip), 6 h de hipoxia y 1 h de reoxigenación (6HipReo), 24 h de hipoxia (24Hip) y 24 h de hipoxia y 1 h de reoxigenación (24HipReo). Las barras representan la media \pm errores estándar. La literales diferentes denotan diferencias significativas (ANOVA p<0.05).

En invertebrados como crustáceos, la catalasa se ha usado como biomarcador bioquímico en aplicaciones ecotoxicológicas en diferentes estreses (Mourente y Diáz-Salvago 1999; Correia et al. 2003; Barata et al. 2005; Barata et al. 2007; Jemec et al. 2010). De acuerdo con nuestros resultados de hipoxia y reoxigenación, diversos estudios demuestran que diferentes estreses inducen la expresión de la catalasa. En hemocitos del camarón F. chinensis infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca se demostró que el gen de catalasa es inducido después de 14 h post infección (Zhang et al. 2008). Otros estresores como la baja salinidad, exposición a luz UV-B y cadmio mostraron una similar regulación de catalasa en branquias del cangrejo Portunus trituberculatus y en D. magna (Kim et al. 2010; Xu y Liu 2011). No obstante, no todas las condiciones de estrés afectan de la misma forma la expresión de catalasa y otros genes antioxidantes, como se ha mostrado en altas densidades de cultivo del copépodo Paracyclopina nana (Lee et al. 2012). Kim y colaboradores (2010) también observaron que a diferencia de la baja salinidad, la alta salinidad tiene un efecto atenuante en la expresión del gen de catalasa. Estos resultados denotan que no todos los estresores pueden repercutir en el mismo sentido en el perfil de la expresión de catalasa, como la hipoxia y reoxigenación

Como resumen de resultados y conclusiones se tiene que la secuencia genómica de catalasa tiene una longitud de 2974 pb, su estructura está constituida por 5 exones y 4 intrones. El tamaño de los intrones son de 821, 223, 114 y 298 pb, donde interesantemente el primer intrón además de ser el más grande, contiene tres microsatélites; dos de ellos contienen motivos de GT y otro con secuencia de (T)AT(GT). La CatLv es una molécula estrechamente relacionada filogenéticamente a sus homólogos de insectos y más distante a la de vertebrados, pero a pesar de estas diferencias filogenéticas, las catalasas de diferentes organismos tienen una identidad mayor al 60 %, evidenciando su importante función en el equilibrio redox. La extensión del promotor caracterizado de 333 pb de CatLv, contiene sitios putativos de regulación por factores de transcripción activados durante el desarrollo embrionario y en respuestas a estrés, como en el caso del factor de choque térmico. CatLv es expresado de manera tejido-especifica durante hipoxia y reoxigenación, mostrando una inducción en

branquias, mientras que en hepatopáncreas no se fue afectada. Comparando la expresión de catalasa con su actividad enzimática previamente obtenida durante hipoxia y reoxigenación, sugiere una regulación a nivel post-transcripcional. Además la inducción del gen de catalasa en hipoxia y reoxigenación en branquias puede estar dada por el factor de choque térmico, que es un factor implicado en la regulación de genes en condiciones estresoras.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, D. and C. P. Li (1979). "Injury to primary cultures of rat heart endothelial cells by hypoxia and glucose deprivation." <u>In Vitro Cellular and Developmental</u> <u>Biology-Plant</u> **15**(11): 929-934.
- Airriess, C. and B. McMahon (1994). "Cardiovascular adaptations enhance tolerance of environmental hypoxia in the crab *Cancer magister*." <u>Journal of Experimental</u> <u>Biology</u> **190**(1): 23-41.
- Akiyama, Y. (1998). TFSEARCH http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html, Real World Computing Partnership, Japan.
- Alcivar-Warren, A., D. Meehan-Meola, Y. Wang, X. Guo, L. Zhou, J. Xiang, S. Moss, S. Arce, W. Warren and Z. Xu (2006). "Isolation and mapping of telomeric pentanucleotide (TAACC) n repeats of the Pacific whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*, using fluorescence in situ hybridization." <u>Marine Biotechnology</u> 8(5): 467-480.
- Alvarez, S., L. B. Valdez, T. Zaobornyj and A. Boveris (2003). "Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity." <u>Biochemical and Biophysical</u> Research Communications **305**(3): 771-775.
- Ames, B. N., R. Cathcart, E. Schwiers and P. Hochstein (1981). "Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences USA</u> 78(11): 6858.
- Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." <u>Annual Reviews of Plant Biology</u> **55**: 373-399.
- Aruoma, O. I. and B. Halliwell (1987). "Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?" <u>Biochemical Journal</u> 241(1): 273.
- Bandyopadhyay, U., D. Das and R. K. Banerjee (1999). "Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis." <u>Current Science</u> **77**(5): 658-666.
- Barata, C., J. Damasio, M. A. López, M. Kuster, M. L. De Alda, D. Barceló, M. C. Riva and D. Raldúa (2007). "Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field." <u>Environmental Toxicology and Chemistry</u> 26(2): 370-379.
- Barata, C., I. Varo, J. C. Navarro, S. Arun and C. Porte (2005). "Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part C</u> 140(2): 175-186.
- Barja, G. (2004). "Free radicals and aging." Trends Neuroscience 27(10): 595-600.
- Barnes, R. (1990). <u>Zoología de los Invertebrados</u>. Mexico, DF., Editorial Interamericana.
- Benov, L. T. and I. Fridovich (1994). "Escherichia coli expresses a copper-and zinccontaining superoxide dismutase." Journal of Biological Chemistry 269(41): 25310-25314.

- Berner, R. A., J. M. Vandenbrooks and P. D. Ward (2007). "Oxygen and evolution." Science **316**: 557–558.
- Bradfield, J. and G. Wyatt (1983). "X-linkage of a vitellogenin gene in *Locusta* migratoria." Chromosoma **88**(3): 190-193.
- Breitburg, D. L., D. W. Hondorp, L. A. Davias and R. J. Diaz (2009). "Hypoxia, nitrogen, and fisheries: integrating effects across local and global landscapes." <u>Annual Review of Marine Science</u> 1: 329-349.
- Burmester, T., J. Storf, A. Hasenjäger, S. Klawitter and T. Hankeln (2006). "The hemoglobin genes of Drosophila." <u>FEBS Journal</u> 273(3): 468-480.
- Cabiscol, E., J. Tamarit and J. Ros (2000). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." International Microbiology **3**(1): 3-8.
- Calderon-Montano, J. M., E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, J. Salvador, R. A. and M. Lopez-Lazaro (2011). "Role Of The Intracellular PH In The Metabolic Switch Between Oxidative Phosphorylation And Aerobic Glycolysis - Relevance To Cancer." <u>WebmedCentral</u>: 1-10.
- Canfield, D. E., S. W. Poulton and G. M. Narbonne (2007). "Late-Neoproterozoic deepocean oxygenation and the rise of animal life." <u>Science</u> **315**: 92–94.
- Clerch, L. B. and D. Massaro (1992). "Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA." Journal of Biological Chemistry **267**(5): 2853-2855.
- Correia, A. D., M. H. Costa, O. J. Luis and D. R. Livingstone (2003). "Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 289(1): 83-101.
- Costa, L. E. (1990). "Hepatic cytochrome P-450 in rats submitted to chronic hypobaric hypoxia." <u>American Journal of Physiology-Cell Physiology</u> **259**(4): C654-C659.
- Chandel, N., E. Maltepe, E. Goldwasser, C. Mathieu, M. Simon and P. Schumacker (1998). "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences USA</u> 95(20): 11715.
- Chang, E. and J. O'Connor (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. <u>The Biology of Crustacea</u>. Academic Press, New York. **5:** 263-287.
- Chen, Y., A. Yu, J. T. Saari and Y. J. Kang (1997). "Repression of hypoxiareoxygenation injury in the catalase-overexpressing heart of transgenic mice." Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 216: 112-116.
- Cheng, L., E. Kellogg III and L. Packer (1981). "Photoinactivation of catalase." <u>Photochemistry and Photobiology</u> **34**(1): 125-129.
- Cheng, W., C.-H. Liu, J.-P. Hsu and J.-C. Chen (2002). "Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*." <u>Fish and Shellfish Immunology</u> 13(5): 351-365.
- Chien, Y. H. (1992). <u>Water quality requirements and management for marine shrimp</u> <u>culture</u>. Los Angeles, USA, Wyban.
- Dall, W., B. J. Hill, P. C. Rothlisberg and D. J. Staples (1990). The Biology of the Penaeidae. Vol. 27. Australia, Academic Press. Marine Biology. Blaxter, J.H.S. and Southward: 21-37.

- Davies, M. J. (2005). "The oxidative environment and protein damage." <u>Biochimica et</u> <u>Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics</u> **1703**(2): 93-109.
- de Oliveira, U. O., A. S. da Rosa Araujo, A. Bello-Klein, R. S. da Silva and L. C. Kucharski (2005). "Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part B</u> 140(1): 51-57.
- Diaz, R. J. (2001). "Overview of hypoxia around the world." Journal of Environmental Quality **30**(2): 275-281.
- Fenucci, J. L. (1988). <u>Manual para la cría de Camarones Peneidos</u>, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: 1-15.
- Figueroa-Soto, C. G., A. M. Calderon-de la Barca, L. Vaazquez-Moreno, I. Higuera-Ciapara and G. Yepiz-Plascencia (1997). "Purification of hemocyanin from white shrimp (*Penaeus vannamei* Boone) by immobilized metal affinity chromatography." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part B</u> **117**(2): 203-208.
- Florespeña, F. (2008). "Oxígeno molecular y su interacción homeostática en un sistema de producción acuícola." <u>Industria Acuícola</u> **4**(4): 30-31.
- Flück, M., K. A. Webster, J. Graham, F. Giomi, F. Gerlach and A. Schmitz (2007). "Coping with cyclic oxygen availability: evolutionary aspects." <u>Integrative and Comparative Biology</u> 47(4): 524-531.
- Fridovich, I. (2004). "Mitochondria: are they the seat of senescence?" <u>Aging Cell</u> **3**(1): 13-16.
- Frugoli, J. A., M. A. McPeek, T. L. Thomas and C. R. McClung (1998). "Intron loss and gain during evolution of the catalase gene family in angiosperms." <u>Genetics</u> 149(1): 355-365.
- Frumkin, A., G. Pillemer, R. Haffner, N. Tarcic, Y. Gruenbaum and A. Fainsod (1994).
 "A role for CdxA in gut closure and intestinal epithelia differentiation." <u>Development</u> 120(2): 253-263.
- García-Triana, A., T. Zenteno-Savín, A. B. Peregrino-Uriarte and G. Yepiz-Plascencia (2010). "Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in Litopenaeus vannamei: Effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity." <u>Developmental and Comparative Immunology</u> 34(11): 1230–1235.
- Garcia, D. K. and A. Alcivar-Warren (2007). "Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping." <u>The Journal of Shellfish Research</u> 26(4): 1203-1216.
- Garcia, D. K., A. K. Dhar and A. Alcivar-Warren (1996). "Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in Penaeus vannamei." <u>Molecular Marine Biology and Biotechnology</u> **5**(1): 71-83.
- Genova, M. L., B. Ventura, G. Giuliano, C. Bovina, G. Formiggini, C. G. Parenti and G. Lenaz (2001). "The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2." <u>FEBS Letters</u> 505(3): 364.

- Giomi, F., S. Raicevich, A. Ferrarese, F. Pranovi, P. Di Muro and M. Beltramini (2007). "Structural and functional heterogeneity of hemocyanin: intra- and inter-specific comparison in four species of portunid crabs (Crustacea: Portunidae)." <u>Marine Biology</u> **151**(4): 1237-1247.
- Gómez-Anduro, G. A., C. V. Barillas-Mury, A. B. Peregrino-Uriarte, L. Gupta, T. Gollas-Galván, J. Hernández-López and G. Yepiz-Plascencia (2006). "The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression." <u>Developmental and Comparative Immunology</u> **30**(10): 893-900.
- Gorr, T. A., J. D. Cahn, H. Yamagata and H. F. Bunn (2004). "Hypoxia-induced synthesis of hemoglobin in the crustacean *Daphnia magna* is hypoxia-inducible factor-dependent." Journal of Biological Chemistry 279(34): 36038-36047.
- Gray, J. S., R. S. Wu and Y. Y. Or (2002). "Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment." <u>Marine Ecology Progress Series</u> 238: 249-279.
- Harris, E. D. (1992). "Regulation of antioxidant enzymes." <u>The FASEB Journal</u> **6**(9): 2675-2683.
- Hermes-Lima, M., J. M. Storey and K. B. Storey (1998). "Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part B</u> 120(3): 437-448.
- Hermes-Lima, M. and K. B. Storey (1993). "Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes." <u>American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology</u> 265(3): R646-R652.
- Herreid, I. and F. Clyde (1980). "Hypoxia in invertebrates." <u>Comparative Biochemistry</u> <u>and Physiology Part A</u> **67**(3): 311-320.
- Hervant, F., J. Mathieu and G. Messana (1997). "Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery." <u>Comptes Rendus de l'Académie des Sciences</u> <u>- Series III Sciences de la Vie</u> **320**(2): 139-148.
- Horakova, L., Z. Chromíková, A. Pekárová and L. Derková (1997). "Mechanisms of hippocampal reoxygenation injury. Treatment with antioxidants." <u>Neuropharmacology</u> 36(2): 177-184.
- Institute, E. B. (2011). EMBOSS CpGplot http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/.
- Jarne, P. and P. J. Lagoda (1996). "Microsatellites, from molecules to populations and back." <u>Trends in Ecology and Evolution</u> **11**(10): 424-429.
- Jemec, A., D. Drobne, T. Tišler and K. Sepčić (2010). "Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione Stransferase and cholinesterase in two crustacean species." <u>Environmental Science</u> <u>and Pollution Research</u> 17(3): 571-581.
- Kasting, J. F. and J. Siefert (2002). "Life and the evolution of earth's atmosphere." <u>Science</u> **296**: 1066–1068.
- Keisari, Y., L. Braun and E. Flescher (1983). "The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli." <u>Immunobiology</u> **165**(1): 78-89.
- Kim, C. H., H. Choi, Y. S. Chun, G. T. Kim, J. W. Park and M. S. Kim (2001). "Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium." <u>European Journal of Physiology</u> 442(4): 519-525.

- Kim, J., S. Kim, K. W. An, C. Y. Choi, S. Lee and K. Choi (2010). "Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part C</u> **152**(3): 263-269.
- Kirshenbaum, L. A. and P. K. Singal (1993). "Increase in endogenous antioxidant enzymes protects hearts against reperfusion injury." <u>American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology</u> **265**(2): H484-H493.
- Klotz, M. G., G. R. Klassen and P. C. Loewen (1997). "Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases." <u>Molecular Biology and Evolution</u> **14**(9): 951-958.
- Konigsberg-Fainstein, K. and B. Aguilar-Maldonado (2008). Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. México, DF, Ed. Manual Moderno: 97-118.
- Lee, K. W., J. S. Rhee, J. Han, H. G. Park and J. S. Lee (2012). "Effect of culture density and antioxidants on naupliar production and gene expression of the cyclopoid copepod, *Paracyclopina nana*." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part A</u> 161(2): 145-152.
- Levin, L., W. Ekau, A. Gooday, F. Jorissen, J. Middelburg, W. Naqvi, C. Neira, N. Rabalais and J. Zhang (2009). "Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos." <u>Biogeosciences Discussions</u> 6: 3563-3654.
- Li, C. and R. M. Jackson (2002). "Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury." <u>American Journal of Physiology-Cell Physiology</u> **282**(2): C227-C241.
- Linsley, P. S. and J. A. Ledbetter (1993). "The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen." <u>Annual Review of Immunology</u> **11**(1): 191-212.
- Liou, G. Y. and P. Storz (2010). "Reactive oxygen species in cancer." <u>Free Radical</u> <u>Research</u> 44(5): 479-496.
- Logsdon, J. M., Jr. (1998). "The recent origins of spliceosomal introns revisited." <u>Current Opinion in Genetics and Development</u> **8**(6): 637-648.
- Lushchak, V. I., L. P. Lushchak, A. A. Mota and M. Hermes-Lima (2001). "Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation." <u>American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and</u> Comparative Physiology **280**(1): R100-107.
- MacFarlane, P., J. Wilkerson, M. Lovett-Barr and G. Mitchell (2008). "Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia." <u>Respiratory Physiology and Neurobiology</u> **164**(1-2): 263-271.
- Mangum, C. P. (1997). "Adaptation of the oxygen transport system to hypoxia in the blue crab, *Callinectes sapidus*." <u>American Zoologist</u> **37**(6): 604-611.
- McMahon, B. R. (2001). "Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans." <u>Respiration Physiology</u> **128**(3): 349-364.
- Meehan, D., Z. Xu, G. Zuniga and A. Alcivar-Warren (2003). "High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) vannamei [Crustacea:Decapoda]." <u>Marine Biotechnology</u> 5(4): 311-330.
- Mihai, L. G., N. Mitrea, R. Ioana and P. A. I. Badarau (2012). "Dynamic and activity of some antioxidant enzynes in primary culture of neurons under hypoxia and ischemia." <u>Farmacia</u> **60**(1): 49-57.
- Morimoto, R. I. (1993). "Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes." <u>Science</u> **259**(5100): 1409-1410.

- Mourente, G. and E. Diáz-Salvago (1999). "Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part B</u> **124**(4): 405-416.
- Mueller, S., H. D. Riedel and W. Stremmel (1997). "Direct evidence for catalase as the predominant H_2O_2 -removing enzyme in human erythrocytes." <u>Blood</u> **90**(12): 4973-4978.
- Nakanishi, K., F. Tajima, A. Nakamura, S. Yagura, T. Ookawara, H. Yamashita, K. Suzuki, N. Taniguchi and H. Ohno (1995). "Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats." <u>The Journal of Physiology</u> 489(Pt 3): 869-876.
- Negoro, S., K. Kunisada, Y. Fujio, M. Funamoto, M. I. Darville, D. L. Eizirik, T. Osugi, M. Izumi, Y. Oshima and Y. Nakaoka (2001). "Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase." <u>Circulation</u> 104(9): 979-981.
- Nishizawa, J., A. Nakai, T. Higashi, M. Tanabe, S. Nomoto, K. Matsuda, T. Ban and K. Nagata (1996). "Reperfusion causes significant activation of heat shock transcription factor 1 in ischemic rat heart." <u>Circulation</u> **94**(9): 2185-2192.
- Nishizawa, J., A. Nakai, K. Matsuda, M. Komeda, T. Ban and K. Nagata (1999). "Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart." <u>Circulation</u> **99**(7): 934-941.
- Oliveira, G. T., P. Eichler, I. C. Rossi and R. S. M. Da Silva (2004). "Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets." Journal of Experimental Zoology Part A 301A(3): 240-248.
- Pannunzio, T. M. and K. B. Storey (1998). "Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 221(2): 277-292.
- Parrilla-Taylor, D. P. and T. Zenteno-Savín (2011). "Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation." <u>Aquaculture</u> 318(379-383).
- Patient, R. K. and J. D. McGhee (2002). "The GATA family (vertebrates and invertebrates)." <u>Current Opinion in Genetics and Development</u> **12**(4): 416-422.
- Paulding, W. and M. Czyzyk-Krzeska (2002). "Hypoxia-induced regulation of mRNA stability." Advances in Experimental Medicine and Biology **475**: 111-121.
- Pelicano, H., W. Lu, Y. Zhou, W. Zhang, Z. Chen, Y. Hu and P. Huang (2009). "Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species imbalance promote breast cancer cell motility through a CXCL14-mediated mechanism." <u>Cancer</u> <u>Research</u> 69(6): 2375-2383.
- Pevny, L. H. and R. Lovell-Badge (1997). "Sox genes find their feet." Current Opinion in Genetics and Development **7**(3): 338-344.
- Phochanukul, N. and S. Russell (2010). "No backbone but lots of Sox: Invertebrate *Sox* genes." <u>The International Journal of Biochemistry and Cell Biology</u> **42**(3): 453-464.
- Rabindran, S. K., G. Giorgi, J. Clos and C. Wu (1991). "Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1." <u>Proceedings of the National</u> <u>Academy of Sciences USA</u> 88(16): 6906.

- Racotta, I. S., E. Palacios and L. Méndez (2002). "Metabolic response to shoert ans long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*)." <u>Marine</u> <u>and Freshwater Behavior Physiology</u> 35(4): 269-275.
- Rauchova, H., M. Vokurkova and J. Koudelova (2005). "Developmental changes of erythrocyte catalase activity in rats exposed to acute hypoxia." <u>Physiological Research</u> 54(5): 527.
- Rodriguez, H., G. P. Holmquist, R. D'Agostino Jr, J. Keller and S. A. Akman (1997).
 "Metal ion-dependent hydrogen peroxide-induced DNA damage is more sequence specific than metal specific." <u>Cancer Research</u> 57(12): 2394-2403.
- Roy, S. W. and W. Gilbert (2006). "The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress." <u>Nature Genetics</u> **7**(3): 211-221.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). <u>Molecular cloning: Laboratory manual</u> Cold Spring Harvor, New York, Cold Spring Harvor Lavoratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences USA</u> **74**(12): 5463-5467.
- Schumacker, P. T. (2002). "Hypoxia, anoxia, and O₂ sensing: the search continues." <u>American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology</u> **283**(5): L918-L921.
- Shamovsky, I. and E. Nudler (2008). "New insights into the mechanism of heat shock response activation." <u>Cellular and Molecular Life Sciences</u> **65**(6): 855-861.
- Sonanez-Organis, J. G., A. B. Peregrino-Uriarte, R. R. Sotelo-Mundo, H. J. Forman and G. Yepiz-Plascencia (2011). "Hexokinase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and regulation via HIF-1 in response to hypoxia." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part B</u> **158**(3): 242-249.
- Soñanez-Organis, J. G., I. S. Racotta and G. Yepiz-Plascencia (2010). "Silencing of the hypoxia inducible factor 1 –HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **393**: 51-58.
- Stadtman, E. R. (2004). "Role of oxidant species in aging." <u>Current Medicinal</u> <u>Chemistry</u> **11**(9): 1105-1112.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007). "MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0." <u>Molecular Biology and Evolution</u> **24**(8): 1596-1599.
- Tan, S., F. Zhou, V. G. Nielsen, Z. Wang, C. L. Gladson and D. A. Parks (1999). "Increased injury following intermittent fetal hypoxia-reoxygenation is associated with increased free radical production in fetal rabbit brain." <u>Journal of</u> <u>Neuropathology and Experimental Neurology</u> 58(9): 972.
- Tassanakajon, A., A. Tiptawonnukul, P. Supungul, V. Rimphanitchayakit, D. Cook, P. Jarayabhand, S. Klinbunga and V. Boonsaeng (1998). "Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*." <u>Molecular Marine Biology and Biotechnology</u> 7: 55-61.
- Taub, J., J. F. Lau, C. Ma, J. H. Hahn, R. Hoque, J. Rothblatt and M. Chalfie (1999). "A cytosolic catalase is needed to extend adult lifespan in C. elegans daf-C and clk-1 mutants." <u>Nature</u> 399(6732): 162-166.

- Tavares-Sánchez, O. L., G. A. Gómez-Anduro, X. Felipe-Ortega, M. A. Islas-Osuna, R. R. Sotelo-Mundo, C. Barillas-Mury and G. Yepiz-Plascencia (2004). "Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part B</u> 138(4): 331-337.
- Taylor, A. and J. Spicer (1987). "Metabolic responses of the prawns *Palaemon elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia." <u>Marine Biology</u> **95**(4): 521-530.
- Taylor, E., P. Butler and A. Al-Wassia (1977). "Some responses of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) to progressive hypoxia at different acclimation temperatures and salinities." Journal of Comparative Physiology B 122(3): 391-402.
- Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour and S. McCouch (2001). "Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa L.*): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential." <u>Genome Research</u> 11(8): 1441-1452.
- Terwilliger, N. and K. Dumler (2001). "Ontogeny of decapod crustacean hemocyanin: effects of temperature and nutrition." Journal of Experimental Biology **204**(5): 1013-1020.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." <u>Nucleic Acids Research</u> 22(22): 4673-4680.
- Toth, G., Z. Gaspari and J. Jurka (2000). "Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis." <u>Genome Research</u> **10**(7): 967-981.
- Trasviña-Arenas, C. (2010). <u>Evaluación de la actividad enzimática de catalasa de</u> camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en condiciones de hipoxia y reoxigenación. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Biotecnólogo, Instituto Tecnológico de Sonora.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." <u>The Journal</u> <u>of Physiology</u> **552**(2): 335-344.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007).
 "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." <u>The International Journal of Biochemistry and Cell Biology</u> **39**(1): 44-84.
- Vaquer-Sunyer, R. and C. M. Duarte (2008). "Thresholds of hypoxia for marine biodiversity." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences USA</u> 105(40): 15452.
- Wasserman, W. W. and A. Sandelin (2004). "Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements." <u>Nature Reviews Genetics</u> **5**(4): 276-287.
- Waypa, G. B. and P. T. Schumacker (2002). "O₂ sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens." <u>Respiratory Physiology and Neurobiology</u> **132**(1): 81-91.
- Webster, K. A. (2003). "Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia." <u>The Journal of Experimental Biology</u> **206**: 2911–2922.
- Wieser, R., G. Adam, A. Wagner, C. Schüller, G. Marchler, H. Ruis, Z. Krawiec and T. Bilinski (1991). "Heat shock factor-independent heat control of transcription of

the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biological Chemistry **266**(19): 12406-12411.

- Willmore, W. and K. Storey (1997). "Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle *Trachemys scripta elegans*." <u>Molecular and Cellular</u> <u>Biochemistry</u> 170(1): 177-185.
- Willmore, W. G. and K. B. Storey (1997). "Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles." <u>American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology</u> 273(1): R219-R225.
- Wittenberg, B. A. and J. B. Wittenberg (1989). "Transport of oxygen in muscle." <u>Annual</u> <u>Review of Physiology</u> **51**(1): 857-878.
- Xu, Q. and Y. Liu (2011). "Gene expression profiles of the swimming crab *Portunus trituberculatus* exposed to salinity stress." <u>Marine Biology</u>: 1-12.
- Xu, W., L. Chi, B. Row, R. Xu, Y. Ke, B. Xu, C. Luo, L. Kheirandish, D. Gozal and R. Liu (2004). "Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea." <u>Neuroscience</u> 126(2): 313-323.
- Yu, B. P. (1994). "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species " <u>Physiological Reviews</u> 74: 139-162.
- Yuan, G., G. Adhikary, A. A. McCormick, J. J. Holcroft, G. K. Kumar and N. R. Prabhakar (2004). "Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells." <u>The Journal of Physiology</u> 557(3): 773-783.
- Zenteno-Savín, T., R. Saldierna and M. Ahuejote-Sandoval (2006). "Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp." <u>Comparative Biochemistry and Physiology Part C</u> 142(3-4): 301-308.
- Zhang, Q., F. Li, X. Zhang, B. Dong, J. Zhang, Y. Xie and J. Xiang (2008). "cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*." <u>Fish and Shellfish Immunology</u> 24(5): 584-591.