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

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EXPRESIÓN DE BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI* BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE SALINIDAD

Por:

María Fernanda Delgado Gaytán

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Agosto de 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María Fernanda Delgado Gaytán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias

Dra. Elisa M. Valenzuela Soto
Director de Tesis

Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez
Co-Director de Tesis

M.C. Ciria Gpe. Figueroa Soto
Asesor

Dra. Gloria Yepiz Plascencia
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 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. Pablo Wong González

Director general

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la ayuda económica otorgada para realizar estos estudios.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por permitirme ser parte de esta institución.

A la Dra. Elisa Valenzuela por haberme aceptado e integrado en el proyecto del cual deriva esta investigación. Además le agradezco por todo el conocimiento y amistad brindados en esta etapa de mi vida.

Al Dr. Jesús Alfredo Rosas por su gran disposición, asesorías y conocimientos brindados. Adicionalmente le agradezco el impulso y constancia que tuvo conmigo.

Al Dr. José Soñanez por su apoyo técnico y asesorías, pero sobre todo por estar al pendiente de mi trabajo de tesis y por bridarme su amistad, mil gracias por todo su apoyo.

A la M.C. Ciria Figueroa, por todo el tiempo que dedicó en asesorías, apoyo técnico, pero sobre todo por la atención y amistad brindada.

A la Dra. Gloria Yepiz, por su atención, disponibilidad y permitirme integrarme a su laboratorio.

A la M.C. Alma Peregrino, por el tiempo dedicado, asesorías y apoyo técnico.

A mis compañeros del laboratorio de Ciencias de la Salud en la UNISON, por hacer mucho más agradable mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular, por brindarme su apoyo y conocimientos, además de su amistad.

A las familias Rosas Rodríguez y Rosas Stephens, por todo el apoyo y amistad brindada.

A la familia Hernández Palomares por su apoyo, consejos y cariño brindado.

Un muy especial agradecimiento a mi amiga y compañera de laboratorio, Magally por haberme brindado todo su apoyo durante esta etapa y por tenerme la paciencia.

A mi amiga Aby, por todo el apoyo y amistad brindada durante este proceso.

A mi familia por todo el apoyo y confianza que han depositado en mí, que me inspira a seguir día con día.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho amor y cariño a mis padres Román Delgado y Ma. Isabel Gaytán, quienes me han apoyado incondicionalmente y sin quienes esto nunca hubiera sido posible. Con sus acciones, son mi inspiración y siempre me han impulsado a perseguir mis sueños, muchas gracias.

A mis hermanas Fátima y Blanca, porque gracias a ellas aprendí no rendirme y siempre querer ser mejor. Les agradezco todo su apoyo y cariño.

A mi sobrina Regina, por toda la alegría que me brinda.

A Gerald, por todo el amor, apoyo y conocimientos que me brindas. Porque me inspiras a crecer y ser una mejor persona.

A todos ustedes

¡Muchas gracias!

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	**ix**
LISTA DE TABLAS	**xi**
RESUMEN	**xii**
ABSTRACT	**xiv**
CAPITULO I.-INTRODUCCIÓN	**1**
CAPITULO II.-ANTECEDENTES	**3**
II.1.-Superfamilia de Aldehído Deshidrogenasas	3
II.2.-Clasificación Filogenética de las ALDHs	4
II.3.-Betaína Aldehído Deshidrogenasa: Relación Filogenética	5
II.3.1.-Estructura de la BADH	6
II.3.2.-BADH en Mamíferos	7
II.3.3.-BADH en Organismos Marinos	9
II.3.4.-BADH en la Osmoregulación de Organismos Marinos	9
II.4.-Camarón blanco *Litopenaeus vannamei*	11
II.4.1.-Morfología de Camarón Blanco *L. vannamei*	11
II.4.2.-Mecanismos de Osmoregulación de *L. vannamei*	12
JUSTIFICACIÓN	**14**
HIPÓTESIS	**15**
OBJETIVO GENERAL	**16**
OBJETIVOS PARTICULARES	**17**
CAPITULO III.-DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL cDNA DE LA BADH DE *L. VANNAMEI*	**18**
III.1.-Introducción	18
III.2.-Materiales y Métodos	19
III.2.1.-Extracción de RNA y Síntesis del cDNA	19
III.2.2.-Diseño de Oligonucleótidos	20
III.2.3.-Amplificacion por PCR y Clonación	21
III.2.4.-Análisis de la Secuencia Nucleotídica	22
III.2.5.-Análisis Filogenético	23
III.3.-Resultados y Discusión	23
III.4.-Conclusión	31
CAPITULO IV.- EXPRESIÓN TEJIDO ESPECÍFICO DE LA BADH EN CAMARÓN *L. VANNAMEI* EN CONDICIONES VARIABLES DE SALINIDAD	**32**
IV.1.-Introducción	32
IV.2.-Materiales y Métodos	33

CONTENIDO (continuación)

Página

IV.2.1.-Bioensayo..... 33
IV.2.2.-Extracción del mRNA y Síntesis de cDNA..... 34
IV.2.3.-Cuantificación del mRNA de la BADH por Tejido..... 34
IV.2.4.- Análisis Estadístico..... 35
IV.3.-Resultados y Discusión..... 36
IV.4.-Conclusión..... 40

REFERENCIAS..... 41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reacción catalizada por la BADH.....	5
2	Dominios de la subunidad de la BADH.....	7
3	Ciclo de vida de *L. vannamei*.....	11
4	Morfología externa de *L. vannamei*.....	12
5	Amplificación de los extremos 5´ y 3' de LvBADH a partir de cDNA de branquias de *L. vannamei*.....	24
6	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de LvBADH.....	25
7	Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre LvBADH y BADH de organismos marinos.....	27
8	Árbol filogenético de LvBADH con secuencias de BADHs, ALDH9 y ALDH2 de diversas especies.....	30
9	Expresión relativa de BADH en hepatopáncreas, branquias y músculo de *L. vannamei* en condiciones de salinidad normal	36
10	Expresión relativa de LvBADH en hepatopáncreas de *L. vannamei* bajo condiciones variables de salinidad.....	37

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
11	Expresión relativa de LvBADH en branquias de *L. vannamei* bajo condiciones variables de salinidad.....	**38**
12	Expresión relativa de LvBADH en músculo de *L. vannamei* bajo condiciones variables de salinidad.....	**39**

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Oligonucleótidos específicos utilizados para determinar la secuencia de LvBADH	**21**
2	Identidad de LvBADH a nivel de aminoácidos con proteínas homólogas de organismos marinos.....	**26**
3	Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de LvBADH.....	**35**

RESUMEN

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) cataliza la oxidación irreversible de betaína aldehído a glicina betaína (GB), un eficiente osmoregulador acumulado en diversos organismos. GB es acumulado en camarón *Litopenaeus vannamei* en respuesta a estrés osmótico. Sin embargo, no existen investigaciones enfocadas al estudio de la BADH en este organismo. El objetivo de este estudio fue la caracterización molecular y evaluación de la expresión de BADH en tejido de camarón *L. vannamei* bajo diferentes condiciones salinas. Se obtuvo una secuencia parcial nucleotídica del cDNA para la BADH de *L. vannamei* (LvBADH), mediante la superposición de las secuencias de dos fragmentos obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La secuencia nucleotídica de LvBADH fue de 1244 pb, con un codón de terminación en la posición 649. En LvBADH se identificaron 460 pb de la región no codificante del extremo 3' y 648 pb correspondientes al marco de lectura abierto, codificante para 216 aminoácidos. La secuencia aminoacídica deducida de LvBADH posee alta identidad con secuencias de proteínas homólogas de organismos marinos y presenta residuos involucrados en la formación del dominio catalítico y oligomerización, en las posiciones 7-164 y 176-216, respectivamente. El análisis filogenético clasifica a LvBADH en el clado de ALDH9 de invertebrados. Mediante RT-qPCR, se determinó el nivel de expresión de la BADH en los tejidos de hepatopáncreas, branquias y músculo de *L. vannamei*. El nivel de expresión de LvBADH en hepatopáncreas fue mayor, respecto branquias y músculo (2.43 y 3.16 veces respectivamente) bajo condiciones de salinidad óptima (35 ppt) ($P<0.05$). En hepatopáncreas, los niveles de transcritos de LvBADH aumentaron 2.18 y 1.87 veces en salinidad baja (25 ppt) y alta (40 ppt) respectivamente, comparado con salinidad normal ($P<0.05$). En branquias, la expresión de BADH fue 2.76 y 1.72 veces mayor en condiciones de salinidad baja y alta respectivamente, en relación al control ($P<0.05$). Por el contrario, el nivel de transcrito en músculo disminuyó 3.97 veces en salinidad baja y 13 veces en salinidad alta, comparado con la

expresión en salinidad normal ($P<0.05$). Estos resultados, demuestran que la expresión LvBADH en *L. vannamei* es regulada de manera tejido específico por variaciones en la salinidad y sugieren que está implicada en los mecanismos de regulación osmótica.

Palabras claves: Betaína Aldehído Deshidrogenasa, Glicina Betaína, caracterización molecular, *Litopenaeus vannamei*, niveles de expresión, estrés osmótico.

ABSTRACT

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) catalyzes the irreversible oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine (GB), an efficient osmoprotector accumulated in different organisms. There is an increase in GB levels in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during osmotic stress. However, there are no studies of the BADH in this organism. The aim of this study was the molecular characterization of BADH from the shrimp *L. vannamei* and tissue-specific expression under salinity variations. Two fragments were obtained by polymerase chain reaction (PCR) and were sequenced. A partial nucleotide sequence of the cDNA for BADH from *L. vannamei* (LvBADH) was obtained by overlapping two PCR fragments. The partial LvBADH sequence is 1244 bp long and the stop codon was identified at position 649. The open reading frame (ORF) is 648 pb long and encodes a predicted protein of 216 residues and a 3′ untranslated region (UTR) of 460 pb long. The LvBADH predicted amino acid sequence shares high identity with homologous sequences in marine organisms Moreover, the amino acid sequence of LvBADH possess conserved residues from catalytic and oligomerization domains at positions 7-164 and 176 a 216, respectively. Furthermore, the phylogenetic analyzes classified LvBADH in a clade that includes ALDH9 sequences from marine vertebrate and invertebrates. The expression level of BADH was determined by RT-qPCR, in hepatopancreas, gills and muscle of *L. vannamei.* In normal salinity of 35 ppt, LvBADH transcripts were 2.4-fold and 3.1-fold higher in hepatopancreas than in gills and muscle, respectively ($P<0.05$). LvBADH transcripts increased 2.2 and 1.8 fold relative to the control condition in the hepatopancreas after 7 days of low and high salinity, respectively ($P<0.05$). Similarly, LvBADH transcripts increased 2.8 and 1.8 fold in gills after 7 days at low and high salinities, respectively, compared to control salinity ($P<0.05$). In muscle, LvBADH transcripts decreased 4 and 15 fold after 7 days at low and high salinities, respectively, compared to normal salinity ($P<0.05$). The BADH expression levels in white shrimp *L. vannamei* are modulated in tissue-specific manner during

salinity variations. These results suggest that LvBADH is involved in the cellular response of *L. vannamei* to address changes in environmental salinity.

Keywords: betaine aldehyde dehydrogenase, glycine betaine, gene expression, *Litopenaeus vannamei*, molecular characterization, osmotic stress

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante su ontogenia presenta un patrón de distribución ecológica definido, el desarrollo larvario ocurre en océanos, mientras que el desarrollo postlarval se lleva a cabo en franjas costeras (estuarios y lagunas) donde alcanza la forma juvenil o adulta (Wyban et al., 1995; Samocha et al., 1998; Chong-Robles et al., 2014). Debido a esto, el camarón durante su desarrollo, se encuentra en constante exposición a cambios en los parámetros físicos del agua como salinidad, temperatura y pH (Castille y Lawrence, 1981; Samocha et al., 1998; Díaz et al., 2001; Chong-Robles et al., 2014). Las variaciones en las condiciones salinas pueden resultar en estrés osmótico (Gómez-Jiménez et al., 2004). El camarón *L. vannamei* presenta una gran capacidad de osmoregulación, lo que le proporciona resistencia y adaptación a amplios intervalos de salinidad (Castille y Lawrence, 1981; Díaz et al., 2001; Chong-Robles et al., 2014).

Un mecanismo común en diferentes organismos para el mantenimiento del volumen celular en condiciones de estrés osmótico es la acumulación de solutos orgánicos, que no intervienen con el metabolismo celular (Yancey y Somero, 1979; Pequeux, 1995; Rathinasabapathi, 2000; Jahn et al., 2006). En crustáceos y moluscos, como el camarón blanco existe un incremento en los niveles de glicina betaína (GB) en respuesta a la exposición a condiciones variables de salinidad (Dragolovich y Pierce, 1992; Deaton, 2001; De Vooys y Geenevasen, 2002; Gómez-Jiménez et al., 2004; Ray et al., 2010).

En la mayoría de los organismos, GB es el producto de dos reacciones de oxidación de colina, donde el último paso es catalizado por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH E.C. 1.2.1.8) (Weretilnyk y Hanson, 1990; Rhodes y Hanson, 1993; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). La BADH

cataliza la oxidación irreversible dependiente de $NAD(P)^+$ de betaína aldehído a GB (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008).

La BADH juega un papel importante en la tolerancia a condiciones de estrés abiótico, como la salinidad (Hulse y Henderson, 1980; Falkenberg y Strøm, 1990, Weretilnyk. y Hanson, 1990; Kurys et al., 1993; McCue y Hanson, 1992; Chern y Pietruszko, 1995; Wood et al., 1996; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Legaria et al., 1998; Chern y Pietruszko, 1999; Vaz et al., 2000; Valenzuela-Soto et al., 2003). En plantas, el aumento en la expresión del gen de la BADH, en paralelo con el incremento en los niveles de GB, se ha relacionado con la adaptación a condiciones de salinidad y sequía (Weretilnyk. y Hanson, 1990; McCue y Hanson, 1992; Legaria et al., 1998; Oishi y Ebina, 2005).

En organismos eucariotas, como plantas y mamíferos, existen diversos reportes de genes y de la secuencia aminoacídica de la BADH (Hulse y Henderson, 1980; Weretilnyk y Hanson, 1990; McCue y Hanson, 1992; Kurys et al., 1993; Chern y Pietruszko, 1995; Wood et al., 1996; Legaria et al., 1998; Chern y Pietruszko, 1999; Vaz et al., 2000). En cambio, en animales marinos la secuencia aminoacídica completa de la BADH, se ha determinado únicamente en 4 organismos (Johansson et al., 1998; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2012; Tatusova et al., 2013).

A pesar de la importancia de la BADH en su papel en la respuesta a estrés y producción de GB en crustáceos, no existen reportes de la regulación a nivel de genes de la BADH en crustáceos. Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la secuencia nucleotídica del cDNA y la evaluación la expresión de la BADH en tejidos de camarón blanco *L. vannamei*, sometido a condiciones variables de salinidad.

CAPITULO II. ANTECEDENTES

II.1.-Superfamilia de Aldehído Deshidrogenasas

Las enzimas que integran a la superfamilia de las aldehídos deshidrogenasas (ALDHs) (EC 1.2.1) catalizan la oxidación irreversible de compuestos aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, con la concomitante reducción del NAD^+ o $NADP^+$ (Vasiliou et al., 2000). Esta superfamilia, comprende una gran variedad de enzimas involucradas en la detoxificación de compuestos aldehído derivados de la exposición exógena o producción endógena (Lindahl, 1992; Vasiliou et al., 2000).

Los aldehídos son compuestos altamente reactivos que pueden interactuar con grupos tiol o amino de proteínas, lo que puede causar alterar funciones celulares y perturbar la homeostasis celular (Vasiliou et al., 2000). La actividad citoprotectora de las ALDHs en condiciones de estrés oxidativo, es una de las principales funciones de estas enzimas. En condiciones de estrés oxidativo, las ALDHs representan la principal ruta de detoxificación de compuestos aldehídos (Brocker et al., 2013).

Además de la función citoprotectora, la actividad de las ALDHs es requerida para la síntesis de moléculas vitales en el organismo como: el ácido retinoico, ligando de receptores nucleares involucrados en los procesos de crecimiento y desarrollo de vertebrados (Duester, 2013); el ácido γ-aminobutírico(GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio en mamíferos (Melcangic y Bowery, 1996); y la producción de folato necesario para la formación de coenzimas involucradas en mecanismos de transferencia de carbono (Strickland et al., 2011).

Algunas integrantes de la familia ALDH son capaces de realizar interacciones no catalíticas con diferentes compuestos, actuando como proteínas de unión a

hormonas y moléculas pequeñas. Dentro de la familia ALDH2 algunas proteínas se unen a acetominofeno y nitrobenceno (Reeve y Miller, 2002). En humano, el gen ALDH1A1 codifica proteínas de unión a andrógenos (Pereira et al., 1991) y en tejido ocular de bovino, a proteínas de unión a esteroles (Cenedella, 2001). Algunas proteínas ALDHs realizan la absorción de la radiación ultravioleta (UV), llevando a cabo la irradiación en la córnea actuando como cristales (Estey et al., 2007; Estey et al.; 2010).

II.2.-Clasificación Filogenética de las ALDHs

La superfamilia de ALDHs es un grupo ancestral de enzimas presente en la mayoría de los organismos, lo que resalta la importancia de la función fisiológica de estas enzimas. Los genes de ALDHs están presentes en los dominios taxonómicos de *Archaea*, *Eubacteria* y *Eukarya* (Sophos y Vasiliou, 2003; Brocker et al., 2013). En un reciente análisis en la base de datos Pfam (versión 24.0) se encontraron 16,765 secuencias de genes y proteínas de ALDHs (Finn et al., 2010).

En organismos eucariotas, los genes de ALDHs están clasificados en 24 familias diferentes de ALDHs, de acuerdo al porcentaje de identidad de una proteína con respecto a las otras. Las secuencias aminoacídicas consideradas pertenecientes a una misma familia, presentan al menos 60% de identidad entre ellas (Vasiliou et al., 1999).

Las enzimas de diferentes familias de ALDHs, pueden presentar afinidad por un cierto tipo de compuestos aldehído en específico. Debido a esto, las ALDHs se han categorizado también de acuerdo por su especificidad por sustrato como: 1) semialdehído deshidrogenasas (E.C. 1.2.1.16; E.C. 1.2.1.24; E.C. 1.2.1.27; E.C. 1.2.1.31; E.C.1.2.1.32; E.C. 1.2.1.41), 2) ALDHs no especificas (E.C. 1.2.1.3), 3) betaína aldehído deshidrogenasas (E.C.1.2.1.8), (4) gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasas (E.C. 1.2.1.9), 5) fenilacetaldehído deshidrogenasas (E.C. 1.2.1.39), (6) lactato deshidrogenasas (E.C. 1.2.1.22) y 7) proteínas ALDHs (Sophos y Vasiliou, 2003).

II.3.-Betaína Aldehído Deshidrogenasa: Relación Filogenética

Específicamente, la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) cataliza la oxidación irreversible dependiente de NAD^+ ó $NADP^+$ de betaína aldehído a GB, un eficiente osmoregulador acumulado en diversos organismos en respuesta a estrés osmótico (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008) (Figura 1). La BADH es uno de los miembros más antiguos de la superfamilia de las ALDHs y se encuentra presente en la mayoría de los reinos de la vida. En base a estudios filogenéticos se ha propuesto que la actividad de la BADH pertenece a diferentes familias de ALDHs y apareció de manera distinta en plantas, bacterias y animales (Julián-Sánchez et al., 2007).

Figura 1.-Reacción catalizada por la BADH (Muñoz-Clares y Velasco-García, 2004)

Las enzimas con actividad de BADH se encuentran principalmente en tres familias diferentes, las cuales no son filogenéticamente cercanas una de la otra (Perozich et al., 1999; Vasiliou et al., 1999; Incharoensakdi, 2000). En la familia ALDH9 se han clasificado secuencias de BADHs pertenecientes a mamíferos (Hulse y Henderson, 1980; Chern y Pietruszko, 1995; Chern y Pietruszko, 1999; Vaz et al., 2000; Gruez et al. 2004) vertebrados e invertebrados marinos (Johansson et al., 1998), proteobacterias (González-Segura et al., 2009) y del reino *Fungi*, estas secuencias presentan >90% de identidad entre ellas (Julián-Sánchez et al., 2007).

Dentro de la familia ALDH10 se incluyen secuencias de la BADH de plantas y proteobacterias que presentan >90% de identidad entre ellas (Brocker et al., 2013; Kopečný et al., 2013). Existe una tercera familia la cual no ha sido nombrada, con secuencias que poseen >70% de identidad entre ellas, dentro

de esta familia se incluyen BADHs de firmicutes, actinobacterias, proteobacterias y del hongo *Ustilago maydis* (Rosenstein et al., 1999; Vasiliou et al., 1999). Recientemente se ha identificado tres nuevas familias ALDH25, ALDH26 y ALDH27 que comprenden ortólogos de la BADH en bacterias gram positivas (Riveros-Rosas et al., 2013).

II.3.1.- Estructura de la BADH

Entre las diferentes familias de las BADH se presentan diferencias estructurales, en el estado de oligomerización. Las enzimas pertenecientes a la familia ALDH9 de mamíferos, peces y bacterias presentan una estructura tetramérica activa (Falkenberg y Strøm, 1990; Johansson et al., 1998; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Hjelmqvist et al., 2003; Valenzuela-Soto et al., 2003), con excepción de la proteína dimérica reportada en mucosa intestinal de rata (Testore et al., 1999). La mayoría de las BADHs de plantas y bacterias de la familia ALDH10 presentan una estructura activa homodimérica (Weretilnyk y Hanson, 1990; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Incharoensakdi, 2000; Livingstone et al., 2003).

A pesar de la lejanía filogenética y de las diferencias en el estado de oligomerización de las BADHs de diferentes familias, éstas presentan características estructurales conservadas por subunidad. La secuencia aminoacídica de la BADH se ha determinado principalmente a partir de los diversos reportes de genes y del cDNA de la BADH de diferentes organismos, identificándose residuos altamente conservados como: (1) los residuos catalíticos como cisteína, agente nucleofílico esencial en la catálisis de la enzima (Pietruzsko et al., 1991) (2) el glutámico catalítico y una asparagina (Johansson et al., 1998; Gruez et al., 2004; González-Segura et al., 2009); (3) El decapéptido VTLELGGKSP, altamente conservado en ALDHs y presente en todas las BADHs, implicado en el sitio de unión de NAD^+; (4) residuos de glicina, presentes en todas las secuencias ALDH9, involucradas en la formación del tetrámero (Muñoz-Clares et al., 2010).

A la fecha se han cristalizado las BADHs de hígado de bacalao *Gadus morhua* (Johansson et al., 1998), de *Escheria coli* (Gruez et al., 2004), *Pseudomona aeruginosa* (González-Segura et al., 2009) y de espinaca *Spinacia oleracea* (Díaz-Sánchez et al., 2012). La BADH presenta características de plegamiento por subunidad similares a las encontradas en enzimas ALDHs tetraméricas y/o diméricas (Cobessi et al. 1999;González-Segura et al., 2009; Gruez et al.; 2004; Brocker et al.; 2010). En las proteínas cristalizadas se distinguen tres dominios por subunidad; dominio de unión a la coenzima, dominio de oligomerización y el dominio catalítico. El dominio de unión a NAD^+ presenta una estructura α/β con un plegamiento tipo Rossman; el dominio catalítico está formado por 6 láminas β paralelas, donde al final de un túnel hidrofóbico se sitúan los residuos catalíticos; el dominio de oligomerización es una extensión del dominio de unión a la coenzima y está formado por 3 láminas β antiparalelas (Johansson et al., 1998) (Figura 2).

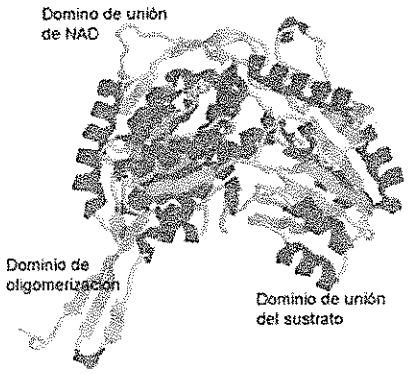

Figura 2.- Dominios de la subunidad de la BADH (Johansson et al., 1998)

II.3.2.-BADH en Mamíferos

La actividad de BADH se detectó por primera vez en el hígado de rata por Klein y Handler en 1942. En hígado de rata, la actividad de la BADH se localiza principalmente en el citosol y aproximadamente el 7% de la actividad total se encuentra en mitocondria (Pietruszko et al., 1991; Chern y Pietruszko, 1999;

Vaz et al., 2000). En este organismo se identificó la existencia de dos isoenzimas de la BADH (citosólica y mitocondrial), codificadas por el mismo gen (Chern y Pietruszko, 1999; Pietruszko et al., 2001), lo cual coincide con la presencia de una sola secuencia de la BADH en mamíferos.

En humano la actividad de la BADH está presente en hígado, riñón y músculo, principalmente en citosol. La ALDH2 isoenzima E3, en humano actualmente se sabe que es una BADH (Chern y Pietruszko, 1995). En mamíferos, la BADH ha sido nombrada de distintas maneras, debido a que presenta afinidad por diferentes sustratos aminoaldehídos. Por lo cual esta enzima se encuentra involucrada en diversas rutas del metabolismo como en: el catabolismo de poliaminas, síntesis del neurotransimisor GABA, síntesis de carnitina y metionina (Hulse y Henderson, 1980; Vaz et al., 2000).

Sin embargo, la principal función de la BADH es la formación de GB, este compuesto es compatible con las funciones celulares y no interfiere con el metabolismo. GB permite a la célula bajo condiciones de estrés osmótico, mantener una presión osmótica equivalente a la del medio externo, sin necesidad de acumular altas concentraciones de sal interna (Yancey y Somero, 1979; Rathinasabapathi, 2000). Este compuesto cuaternario de amonio, además puede desempeñar diferentes funciones. Puede actuar como un eficiente citoprotector, protegiendo a enzimas de desestabilización por altas temperaturas e inactivación por elevadas concentraciones salinas (Lou et al., 2011).

Se ha demostrado que GB actúa como una importante fuente de metilos, debido a que GB reacciona con homocisteína en una reacción catalizada por la enzima betaína homocisteína metil transferasa (BHMT) formando dimetilglicina y metionina, la que es después convertida a S-adenosilmetionina (SAM), el principal donador de metilos que utilizan las metilasas las cuales adicionan estos grupos al DNA, RNA, lípidos y proteínas (Niculescu y Zeisel, 2002; Lever y Slow, 2010).

II.3.3.-BADH en Organismos Marinos

La primera caracterización cinética de la BADH respecto a organismos marinos, se realizó a partir de tejido mitocondrial de corazón de cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*). En *L. polyphemus*, la actividad de la BADH se encuentra exclusivamente en mitocondrias y presenta alta especificidad para betaína aldehído con una K_m de 133 μM (Dragolovich y Pierce, 1994). De la misma manera, en la ostra (*Crassostrea virginica*), la actividad de la BADH se encontró principalmente en la matriz mitocondrial de tejido de branquias, con una mayor afinidad por betaína aldehído (K_m 360 μM) (Perrino y Pierce, 2000a). En hígado de bacalao, la BADH presenta valores bajos de K_m para betaína aldehído (140 μM) y K_{cat} elevada, similares a los encontrados en la BADH de humano (Johansson et al., 1998).

La secuencia aminoacídica completa de la BADH se ha determinado únicamente en 4 organismos marinos: de bacalao *Gadus morhua* (Johansson et al., 1998; GenBank No. P56533.1), de la bacteria marina *Sneathiella glosssodoripedis* (Tatusova et al., 2013; GenBank No. WP_025899561.1), del pez del arroz *Oryza latipes* (Wang et al., 2007; GenBank No. NP_001098318.1) y de la ostra *Crassostrea gigas* (Zhang et al., 2012; GenBank No. XP_011430866.1). En los organismos marinos estudiados, el monómero de la BADH es de ~500 aminoácidos (Johansson et al., 1998; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2012; Tatusova et al., 2013).

II.3.4.-BADH en la Osmoregulación de Organismos Marinos

Los animales marinos se encuentran constantemente expuestos a condiciones variables de salinidad, especialmente aquellos que viven cerca de la costa debido a la proximidad a los estuarios y ríos (Negro et al., 2011; Tomanek, 2011). La mayoría de estos organismos tienen una alta capacidad de regulación osmótica en los tejidos, basado principalmente en el transporte de sales para evitar perturbaciones osmóticas (Pequeux, 1995).

Uno de los principales mecanismos de adaptación en respuesta a estrés osmótico de diferentes organismos, es la acumulación de osmolitos orgánicos,

los cuales no interfieren con el metabolismo celular. Los más comunes son aminoácidos libres como glicina, alanina, prolina, y compuestos cuaternarios de amonio como dimetilsulfoniopropionato y GB (Yancey y Somero, 1979; Rathinasabapathi, 2000).

En animales marinos, no existen reportes de la capacidad de la BADH de utilizar diferentes sustratos aminoaldehídos como en el caso de homólogos en mamíferos (Dragolovich y Pierce, 1994; Chern y Pietruszko, 1995; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Perrino y Pierce, 2000a). La única función descrita de la enzima en estos organismos es la de síntesis de GB (Dragolovich y Pierce, 1994; Johansson et al., 1998; Perrino y Pierce, 2000a).

Existen diversos reportes, en crustáceos y moluscos del mantenimiento del volumen celular por la acumulación de GB, principalmente en tejidos expuestos a estrés hiperosmótico (Dragolovich y Pierce, 1992; Deaton, 2001; De Vooy y Geenevasen, 2002; Jahn et al., 2006). En tejido de músculo de la almeja *Mytilus galloprovincialis,* se presentó un incremento del 87.2% en el nivel de GB, en respuesta a estrés hiperosmótico (De Vooys y Geenevasen, 2002). En tejido de branquias, del molusco *Geukensia demissa* se encontró un rápido incremento en los niveles de GB (de 45 a150 mmol/ gr de peso seco) después de ser sometido a estrés hiperosmótico, por un periodo de 12 hr. (Deaton, 2001).

Estudios previos reportan un aumento en los niveles de GB en ostra (*C. virginica),* sometida a procesos de aclimatación a estrés hipoosmótico (Pierce et al., 1995).

En el tejido cardiaco de cangrejo *L. polyphemus*, la síntesis de GB en mitocondria, es regulada por la taza de captación de colina del medio externo (Dragolovich y Pierce, 1994). En ostra *C. virginica,* se demostró que las características cinéticas de la BADH, explican las diferencias en la tasa de síntesis de GB de dos poblaciones (Perrino et al., 2000a; Perrino et al., 2000b). La BADH de la población de *C. virginica* del Atlántico presenta una afinidad 3 veces mayor por betaína aldehído, comparado con la enzima de la población de la Bahía de Cheseepeake (Perrino et al., 2000a). Estos resultados coinciden

con la acumulación 3 veces mayor de GB en ostra del Atlántico (Perrino et al., 2000a).

II.4.-Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco *L. vannamei*, es un crustáceo decápodo marino, nativo de la costa oriental del Océano Pacifico. Durante su desarrollo el camarón peneido presenta patrones de distribución ecológica definidos; el desarrollo larvario ocurre en océanos, mientras que el desarrollo postlarval se lleva a cabo en franjas costeras (estuarios y lagunas) donde alcanza la forma juvenil o adulta (Chong-Robles et al., 2014). El camarón en su ambiente estuario natural, se encuentra expuesto a considerables cambios de salinidad, debido al patrón de distribución diverso durante la ontogenia (Figura 3).

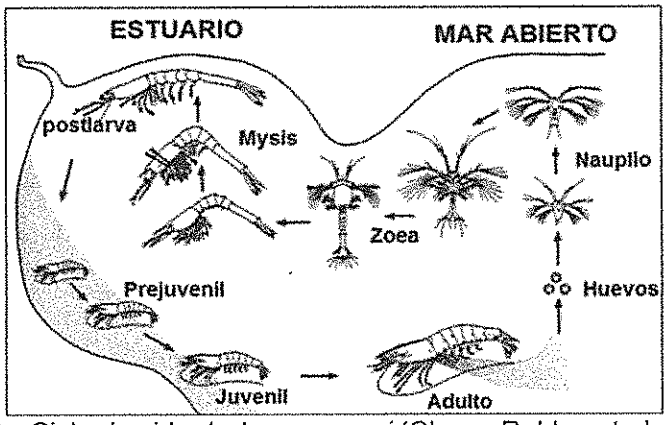

Figura 3.- Ciclo de vida de *L. vannamei* (Chong-Robles et al., 2014)

II.4.1 Morfología de Camarón Blanco *L. vannamei*

En el camarón se distinguen 3 segmentos principales: el cefalotórax, el abdomen y el telson. Los apéndices del cefalotórax son las anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereiópodos. El abdomen está constituido por seis segmentos y en cada uno hay un par de apéndices llamados pleópodos cuya función es natatoria. En el telson se encuentran los urópodos, que sirven también para la natación. La mayoría de los órganos que tienen alta actividad metabólica se encuentran en el cefalotórax, encontrándose también aquí, las

extremidades que utilizan para su movimiento (periópodos), además del sistema respiratorio, sistema nervioso y sistema digestivo (Martínez-Córdova, et al., 2009) (Figura 4).

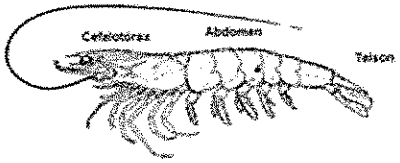

Figura 4.- Morfología externa de *L. vannamei* (Martínez-Córdova, et al., 2009)

La capacidad de osmoregulación de *L. vannamei* se ha relacionado con rasgos interactivos asociados con las condiciones fisiológicas del camarón blanco. El músculo es el tejido más abundante, necesario para los movimientos del cuerpo que son realizados por medio de contracciones y durante los cuales, se utiliza energía en forma de ATP. Por su parte, las branquias son un tejido altamente permeable y son consideradas el principal sitio de regulación osmótica y/o iónica (Ponce-Palafox et al., 1997; Álvarez et al., 2004). Este tejido posee células especializadas en el transporte activo de iones y aproximadamente el 75% de la actividad de la ATPasa se localiza en branquias (Palacios et al., 2004). El hepatopáncreas se encuentra involucrado en diversos procesos metabólicos, como síntesis, absorción y almacenamiento de nutrientes, además está involucrado en la síntesis de hemocianina la principal proteína en la hemolinfa (Yepiz-Plascencia et al., 2000). Se ha demostrado que este tejido se encuentra involucrado en la regulación del volumen del líquido corporal, la concentración de solutos orgánicos y/o iones divalentes (Morris y Edwards, 1995; Jahn et al. 2006).

II.4.2. Mecanismos de Osmoregulación de *L. vannamei*

El camarón *L. vannamei* puede llevar a cabo distintos mecanismos de regulación osmótica y/o iónica; con tolerancia a amplios intervalos de salinidad de 0.5 a 45 ppt, considerándose un intervalo de salinidad ideal para su

desarrollo de 7-34 ppt (Chong-Robles et al., 2014). Los crustáceos acuáticos, como el camarón blanco poseen diferentes estrategias adaptativas para mantener la hemolinfa de acuerdo al medio ambiente donde se encuentran (Charmantier et al., 1988). En la mayoría es común un mantenimiento de la concentración de iones en el plasma sanguíneo, dado por un equilibrio pasivo con el medio exterior (Palacios y Raccota, 2007).

En *L. vannamei* un mecanismo de osmoregulación es la acumulación de osmolitos en compartimentos intracelulares (Gómez-Jiménez et al., 2004). Estos compuestos reducen el gradiente osmótico a través de la membrana, reestablecen el volumen celular y estabilizan a las macromoléculas biológicas. En camarón *L. vannamei* expuesto a condiciones variables de salinidad existe un incremento en los niveles de trimetilamina-N-oxido (TMAO) y GB (Gómez-Jiménez et al., 2004; Ray et al., 2010).

Recientemente, Muñoz-Bacasehua (2014) detectó la actividad de la BADH en branquias, hepatopáncreas y músculo de camarón. Además, en una búsqueda en la base de datos GenBank se encontraron dos secuencias nucleotídicas parciales de camarón blanco, identificados como ALDH9 (Valverde et al., 1994; GenBank No. FE049019.1143 y FE049020.1). A pesar de esto, en *L. vannamei* no existen reportes de los mecanismos de regulación de la BADH. Por todo lo anteriormente descrito, el objetivo del presente trabajo fue identificar la secuencia nucleotídica del cDNA y evaluar la expresión tejido-específico de la BADH de *L. vannamei* bajo diferentes condiciones salinas.

JUSTIFICACIÓN

Dado que la BADH es una importante proteína involucrada en los mecanismos de osmoregulación, la determinación de la secuencia nucleotídica del cDNA de la BADH permitirá determinar sus características moleculares, las cuales son importantes en la función y regulación de la enzima. En crustáceos, no existen reportes enfocados en la regulación de la expresión de la BADH por condiciones de salinidad, por lo que el análisis de la expresión en tejido de camarón *L. vannamei*, permitirá generar conocimientos básicos sobre el rol de la BADH en los mecanismos de regulación osmótica en crustáceos.

HIPÓTESIS

La secuencia nucleotídica del cDNA de la betaína aldehído deshidrogenasa de camarón blanco *L. vannamei* es similar a la BADH de organismos marinos y posee dominios localizados en regiones equivalentes. La expresión del gen de la BADH del camarón *L. vannamei* es inducida por variaciones en la salinidad de manera tejido específico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la secuencia nucleotídica del cDNA y evaluar la expresión del gen de la betaína aldehído deshidrogenasa en tejido de camarón blanco *L. vannamei* bajo condiciones variables de salinidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar oligonucleótidos específicos para la secuencia nucleotídica de la BADH de camarón blanco *L. vannamei*.
- Obtener la secuencia nucleotídica del cDNA para la BADH.
- Caracterizar molecularmente la secuencia codificante obtenida mediante análisis bioinformático.
- Cuantificar el mRNA de la BADH en los tejidos de hepatopáncreas, branquias y músculo de camarón *L. vannamei*, bajo condiciones de salinidad variable.

CAPITULO III DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL cDNA DE LA BADH DE *L. VANNAMEI*

III.1.-Introducción

La BADH es una oxido-reductasa que cataliza la reducción de betaína aldehído a GB en presencia de $NAD(P)^+$ (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008). Las BADHs pertenecen a la superfamilia de las ALDHs, la cual incluye diversas enzimas evolutivas y estructuralmente relacionadas, presentes en eucariotas y en procariotas desde levaduras hasta mamíferos (Lindahl, 1992; Vasiliou et al., 2000; Sophos y Vasiliou, 2003; Finn et al., 2010).

En animales, como rata *Rattus novergicus* se ha reportado la presencia de dos isoenzimas de la BADH, que se diferencian principalmente por su localización subcelular. La BADH citosólica y mitocondrial provienen de un solo gen específico ALDH9A1 (Chern y Pietruszko 1999; Pietruszko y Chern, 2001). En mamíferos existe una sola secuencia nucleotídica de la BADH que va de 1480 a 1500 pb, que codifica para enzimas con subunidades de ~52 kDa. En mamíferos la BADH se expresa en hígado, riñón y músculo, principalmente en citosol (Hulse y Henderson, 1980; Chern y Pietruszko 1995; Chern y Pietruszko, 1999; Vaz et al., 2000).

En cuanto a animales marinos, solo existe información de la expresión del gen de la BADH, en la ostra *C. gigas* y el pez *O. latipes*. El transcrito de la BADH, en *O. latipes* se detectó principalmente en cerebro, branquias, corazón, hígado y riñón (Wang et al., 2007). Además, existen reportes de la actividad enzimática de la BADH en mitocondria del crustáceo cacerola (*L. polyphemus*) (Dragolovich y Pierce, 1994), de bacalao (*G. morhua)* (Johansson et al., 1998), ostra (*C. virginica)* (Perrino y Pierce, 2000a) y mantarraya (*Leucoraja ocellata*) (Treberg y Driedzic, 2007). En animales marinos, la información sobre los

genes, transcritos y estructura de la BADH son limitados. La secuencia aminoacídica completa de la BADH, se ha determinado únicamente en 4 organismos. El cDNa de la BADH del pez *O. latipes* es de 1602 pb y codifica para 506 aminoácidos (Wang et al., 2007; GenBank No. NP_001098318.1); en la bacteria marina *S. glossodoripedis* es de 1464 pb, codificante para 490 aminoácidos (Tatusova et al., 2013; GenBank No. WP_025899561.1) y en ostra *C. gigas* es de 1437 pb codificante para 477 aminoácidos (Zhang et al., 2012; GenBank XP_011430866.1). La secuencia aminoacídica de la BADH de bacalao *G. morhua* es de 494 aminoácidos (Johansson et al., 1998).

En crustáceos, solo hay reportes de secuencias nucleotídicas parciales o de ESTs de la BADH. En *L. vannamei*, se identificaron en la base de datos GenBank dos ESTs de secuencias de ALDH9, pero no han sido identificados como BADH (Valverde et al., 1994; GenBank No. FE049019.1143 y FE049020.1). Por ello uno de los objetivos del presente trabajo fue identificar la secuencia nucleotídica del cDNA de la BADH de camarón *L. vannamei*, con el fin de identificar residuos conservados que pueden estar implicados en la función, evolución y características estructurales de la BADH.

III.2.-Materiales y Métodos

III.2.1.- Extracción de RNA y Síntesis del cDNA

El RNA total se extrajo a partir de 0.2 g de muestras de tejido de hepatopáncreas, branquias y músculo de *L. vannamei*, en condiciones normales de temperatura (28-30°C) y salinidad (35 ppt). La extracción se realizó usando el reactivo de TRIzol (Invitrogen), que inactiva RNasas, permitiendo mantener su integridad. La extracción se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante, haciendo las modificaciones que se describen a continuación. Los tejidos congelados se homogenizaron usando un Polytron® Pt 10-35 GT (Kinematica) se aplicaron 10 pulsos de 5 segundos (en hielo) en 0.5 mL de TRIzol más 100 µL de cloroformo. 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) en un tubo nuevo, teniendo especial cuidado de no tomar la interfase que contiene el DNA, se le agregó 250 µL de isopropanol frio y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Finalmente, la pastilla formada fue lavada con 500 µL etanol frio al 75% y resuspendida en 50 µL de agua tratada con DEPC.

La concentración de cada una de las muestras se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm; a la par se determinó la pureza de las muestras mediante la relación de las absorbancias 260/280 nm. Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado utilizando 1 µl de muestra en el espectrofotómetro de gota Nanodrop ND2000c ™ (Thermo Scientific). Además, se verificó la integridad del RNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, en cada una de las muestras se eliminó el DNA genómico por digestión utilizando el kit comercial DNasa I (Roche). La limpieza se realizó calculando que la concentración final de RNA total fuera de 100 ng/µL, utilizando 5 unidades de DNasa, en una reacción que se llevó a cabo por 15 min a 37°C. Para detener la reacción se agregó 2 µL de EDTA (0.2 M) y se calentó a 75°C por 10 min. Posteriormente, se usó 1 µg de RNA total como templado para la síntesis del cDNA, utilizando 1 µL Oligo dT (50 µM) y el kit comercial QuantTitect Reverse Transcription (QIAGEN) y se siguieron las recomendaciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó individualmente para cada muestra de tejido de camarón.

III.2.2.-Diseño de Oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos específicos se realizó utilizando el programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu) (Rozen y Skaletsky, 2000) en base a dos marcadores de secuencias expresadas (EST por sus siglas en ingles) de *L. vannamei* (Valverde et al., 1994; GenBank No. FE049019.1143 y FE049020.1). Para el diseño de los oligonucleótidos se tomaron las siguientes consideraciones: 1) temperatura de fusión (Tm) de 58 a 60°C; 2) 50% de

guaninas (G) y citosinas (C); 3) un tamaño de 18 a 21 nucleótidos y 4) que no formaran estructuras secundarias. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados de manera comercial por el IBT (Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México) e IDT (Integrate DNA Technologies), las secuencias se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Oligonucleótidos específicos utilizados para determinar la secuencia de LvBADH

Nombre del oligonucleótido	Secuencia nucleotídica (5´-3´)	GenBank No.
AH9LvR2	GGGTGCATCTGTTTTGTGT	FE049020.1
AH9LvFw	CGAGTGCAGTCTAATCCA	FE049019.1143
LvBADHR2	CTACTCTAATCCCTGGTAAG	FE049020.1
LvBADHR4	CCTGCTTCAATGGCGTTAGC	FE049020.1
LvBADHR3	ACACAAAACAGATGCACCC	FE049020.1

III.2.3.-Amplificación por PCR y Clonación

La amplificación del cDNA de la BADH se realizó por PCR convencional con oligonucleótidos específicos, en un termociclador Veriti® 284 (Applied biosystem). La estrategia general consistió en obtener por PCR dos fragmentos que se traslapen en una pequeña región. Para obtener el fragmento 3´, se realizó la amplificación por PCR en un volumen de 25 µl, utilizando como templado 3 µl de cDNA de branquias (100 ng/µl), 12.5 µL de SuperMix Platinum PCR (Invitrogen) y 1 µl de los oligonucleótidos LvBADHF1 (20 µM) y AH9LvFw (20 µM). Las condiciones del PCR fueron 3 minutos a 94°C, 36 ciclos (94°C, 30s; 55°C, 1 min y 72°C, 2 min) y 5 minutos a 72°C. Posteriormente, para obtener el fragmento 5´, se utilizaron oligonucleótidos específicos (LvBADHR2, LvBADHR4 y LvBADHR3) y el kit comercial DNA Walking SpeepdUPTM Premix Kit (Seegene), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos de

PCR se almacenaron a 4°C para analizarse en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-SAFE (Invitrogen).

Se clonaron los productos de PCR obtenidos, provenientes de reacciones de amplificación con la enzima *Taq* ADN polimerasa en el vector de clonación TOPO Cloning® (Invitrogen). La clonación se inició con una reacción de ligación utilizando como templado el fragmento 5´ del cDNA de la BADH. La ligación se lleva a cabo debido a que el producto de PCR con una adenina en 3´ se une al nucleótido timina en 5´ del vector linearizado y unido covalentemente a la enzima Topoisomerasa I del virus *Vacccina*.

Posteriormente se realizó la transformación en células competentes de *E. coli* TOP10 siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Las colonias se analizaron por PCR para identificar el fragmento de interés, utilizando los oligonucleótidos universales M13 sentido y M13 antisentido. Las colonias positivas se resembraron en 5 ml de caldo LB con 5 µL de ampicilina (100 µg/ml), se incubaron de 12-18 h a 37°C. Posteriormente el caldo LB con el inoculo se centrifugó a 13 500 xg por 5 min. Se recolecto el pellet bacteriano para el aislamiento del DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

Los plásmidos recombinantes se purificaron utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) de acuerdo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración del DNA plasmídico purificado por absorbancias a 260 y 280 nm.

III.2.4.-Análisis de la Secuencia Nucleotídica

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar por el método de terminación de cadena de dideóxidos (Sanger et al., 1997), en un secuenciador automático Perkin Elmer ABI3730 en el IBT. La deducción de la secuencia aminoacídica se realizó en el sitio de internet http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/translate/ and aligned. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se compararon con bases de datos de proteínas y ESTs de BADH y ALDHs, usando los programas

ClustalW y BLAST N/X (Altschul et al., 1990) del Nacional Center for Biotechnology Information Bethesda, MD (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). En este programa se realizaron alineamientos múltiples de la secuencia nucleotídica del cDNA de la BADH respecto a ALDHs y BADHs.

III.2.5.-Análisis Filogenético

Se analizó la cercanía filogenética de LvBADH a nivel de aminoácidos, utilizando el programa MEGA (Version 6.02), utilizando el método de Neighbor-Joining y el modelo Jones–Taylor–Thornton, en un análisis de máxima verosimilitud. Para realizar un amplio análisis filogenético, se incluyó la secuencia aminoacídica de LvBADH y algunas secuencias cercanas a las BADHs como la TMBA-DH. Un grupo adicional de proteínas de la familia ALDH2 fue incluido, debido a que existen diversas proteínas caracterizadas que presentan características estructurales conservadas con las BADHs (Hjelmqvist et al., 2003). La secuencia de Gamma-aminobutiraldehído deshidrogenasa de *E. coli* fue incluida en el análisis como un grupo control externo.

III.3.-Resultados y Discusión

A partir del cDNA de branquias sintetizado con el oligo dT y utilizando los oligonucleótidos AH9LVR2 y AH9LvFw y las condiciones de PCR anteriormente descritas, se obtuvo un fragmento de ~1000 pb que corresponde a la región 3´ del cDNA (Figura 5A). Este fragmento se intentó clonar en el vector TOPO 2.1 pero no se tuvo éxito. En el análisis de 21 colonias no se encontró ninguna con el inserto de interés, por lo que se optó por obtener mayor cantidad de DNA del amplicon por PCR, el cual se purificó por columna GFX según las recomendaciones del fabricante y se secuenció directamente. Al analizar la secuencia de este fragmento, se encontró, que este presentaba identidad con proteínas homólogas de BADHs en organismos marinos.

Posteriormente, se obtuvieron dos fragmentos de ~350 pb correspondientes al extremo 5´, utilizando como templado el cDNA de branquias sintetizado con el

oligo dT y se utilizaron los oligonucleótidos específicos (LvBADHR2, LvBADHR4 y LvBADHR3) y los del kit comercial DNA Walking SpeepdUPTM Premix Kit (Seegene), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 5B). Estas bandas se clonaron usando el vector TOPO 2.1 y se analizaron 13 colonias de las cuales 5 fueron positivas. El DNA plasmídico se aisló y purifico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) y se secuencio con los oligonucleótidos universales M13F y M13R. La secuencia obtenida fue analizada y presentó identidad con proteínas homólogas de la BADH en animales marinos.

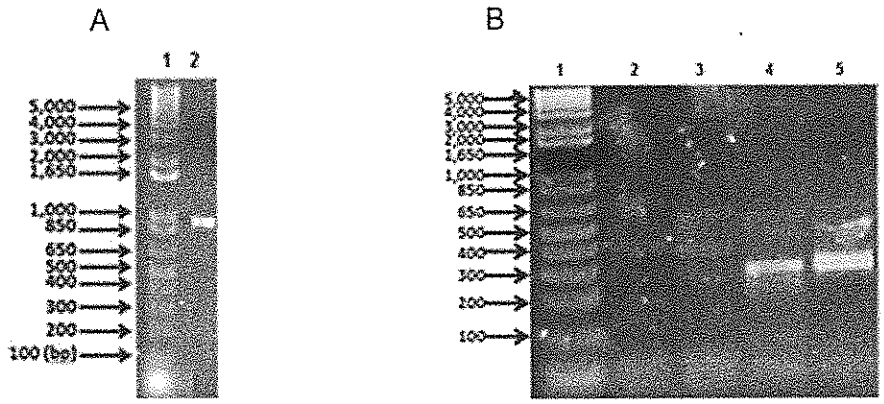

Figura 5.-Amplificación de los extremos 5´ y 3' de LvBADH a partir de cDNA de branquias de *L. vannamei.* Panel A: en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder y en el carril 2 se muestra el fragmento amplificado correspondiente al extremo 3´. Panel B: en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder y en el carril 4 y 5 se observan los fragmentos amplificados correspondientes al extremo 5´.

A partir de la superposición de la secuencia de los dos fragmentos de PCR obtenidos y mediante un análisis bioinformático, se determinó la secuencia de nucleótidos parcial del cDNA para la BADH de camarón *L. vannamei,* la cual se nombró LvBADH (Figura 6). La secuencia obtenida fue de 1244 pb y el codón de terminación se identificó en la posición 649. En la secuencia nucleotídica de LvBADH no se identificó el codón de inicio ATG (Met) y la región no codificante el extremo 5´ (5´UTR por sus siglas en ingles). En LvBADH se identificaron 648 pb correspondientes al marco de lectura abierto deducido, codificante para 216

aminoácidos. Además, se identificaron 460 pb correspondientes al 3´UTR, sin embargo la cola poliadenilada tampoco se identificó.

```
1      V  A  K  V  R  F  D  S  N  G  T  R  V  F  V  H  R  S  I  M  A  E  F
1      GGKSSSRGGGTCAGGTTTGACTCCAATGGAACRCGAGTGTTTGTTCATAGAAGTATTRCTGCCGAGTTC
24     L  K  Q  L  V  T  A  T  E  K  L  K  I  G  D  P  F  A  E  D  T  T  V
70     CTCAAACAACTTGTAACTGCAACTGAAAAGCTGAAGATTGGTGACCCCTTTGCTGAAGACACAACTGTG
47     G  A  T  I  H  E  D  H  A  R  K  V  L  S  Y  V  D  S  A  K  Q  E  G
139    GGGGCAACCATCCATGAGGACCATGCTAGAAAAGTGTTGAGTTACGTTGACAGTGCCMGGCAAGAGGGT
70     A  S  V  L  C  G  G  E  R  V  L  L  K  G  K  L  A  G  G  W  Y  L  S
208    GCATCTGTTTTGTGTGGAGGAGAAAGGGTRTTGCTGAAGGGAAAGTTGGCTGGAGGATGGTACCTTTCA
93     P  A  V  L  T  D  C  R  D  D  M  K  V  V  Q  E  E  V  F  G  S  V  A
277    CCTGCAGTCCTTACAGATTGCCGAGATGATATGAAGGTAGTGCAAGAGGAAGTTTTTGGCTCTGTTGCC
116    S  V  L  E  F  D  T  E  E  E  A  V  K  R  A  N  D  T  K  F  G  L  A
346    TCCGTGYTAGAGTTTGATACTGAAGAAGAAGCCGTTAAGAGAGCAAATGATACGAAGTTTGGACTAGCT
139    G  A  V  F  T  K  D  I  Q  R  G  H  R  V  A  N  A  I  E  A  G  T  V
415    GGTGCTGTTTTTACAAAGGACATTCAAAGGGGACACCGAGTAGCTAACGCCATTGAAGCAGGAACTGTC
162    W  I  N  T  Y  N  L  Y  P  T  E  V  P  F  G  G  Y  K  Q  S  G  I  G
489    TGGATTAATACCTACAACTTATATCCAACTGAGGTTCCCTTTGGTGGTTACAAACAGAGTGGAATTGGC
185    R  E  N  G  L  T  A  V  D  Y  F  T  Q  T  R  T  I  Y  V  E  M  G  D
558    CGAGAAAATGGATTAACAGCTGTTGATTACTTTACGCAGACACGCACCATCTATGTAGAAATGGGTGAT
208    V  D  C  G  L  L  Y  Q  D  *
627    GTTGACTGCGGATTACTTTACCAGGATTAGAGTAGTCTATTTTCATTATATGCTGATAGATTGAAAGGC
696    CACATATATTTTGTGCTGTTTTGTTATAAACTCTATATGAAATATTTTTATACTTTCATAGATGTATAC
765    AGTATAGTTTAAGATTAAAGTGAACCTTGTATCTCATACTTTTTCTTCATTTATTTTCATTTATGTATA
834    AAGAAAATAAGTGAAAATCAGTTAGAAATTTAGTAATAAATCATGTGCCATATTTTAGTGTAATTTACA
903    TAAATGAATTAAGGAGAAAGTCTGGATATCACTGCTAAGGTGAAAGCTCAGTGGTGAGGAATATGTCCG
972    AGAAATGGAGTTAAATTTTTCAACGTGCAATAAGGGAGATACTTGTGAAAATATCAGATTTTAACCGAA
1041   AGTGGATGTGGGTCTGTGTGTAATCGGTACTGACAGTAGGATAWGRGTTGGATTAGAMTGCACYCSYCT
1110   TWWRTCAAGACTGAATATTAGTCTTGTTTGTTATGGGTTTTCTCAGTATATTTGACATTCCTTTTCTTG
1179   TTATTGTTTTCTTTACTATTTAATGTGCATGTTATGTTAATGTGAAGATTTTAATAAATATTAAT
```

Figura 6. - Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de LvBADH. La secuencia deducida de aminoácidos se muestra sobre la secuencia de nucleótidos de LvBADH. El codón de terminación se muestra con un asterisco (*)

La secuencia aminoacídica deducida se comparó con bases de datos de ESTs y proteínas, utilizando los programas BLAST X/N (Altschull et al., 1990). La proteína deducida presento una identidad de entre 57% y 52 %, con secuencias de homólogas de vertebrados e invertebrados marinos (Knudsen et al., 2006; Van-Zee et al., 2007; Freeman et al., 2008; Leong et al., 2010; Zhang et al., 2012; Tatusova et al., 2013) (Tabla 2).

Tabla 2. Identidad de LvBADH a nivel de aminoácidos con proteínas homólogas de organismos marinos

Identidad	Secuencia	Organismo	GenBank No.
57%	ALDH putativa	*Ixoxedes scapularis*	XP_002410773.1
57%	ALDH9A1-1	*Salmo salar*	NP_001133574.1
55%	TMBA-DH	*Aplysia californica*	XP_005091798.1
55%	ALDH9A1-A	*Saccoglosssus kowalevskii*	XP_002736595.1
54%	BADH	*Crassostrea gigas*	EKC23610.1
52%	BADH	*Sneathiella glossodoripedis*	WP_025899561.1

La secuencia aminoacídica parcial de LvBADH de 216 aminoácidos, corresponde al ~40% de la secuencia completa, comparada con los reportes de las BADHs en animales marinos de bacalao *G. morhua* de 509 aminoácidos (Johansson et al., 1998), de la bacteria marina *S. glossodoripedis* de 490 aminoácidos (Tatusova et al., 2013), del pez del arroz *O. latipes* de 506 aminoácidos (Wang et al., 2007) y ostra *C. gigas* de 477 aminoácidos (Zhang et al., 2012).

En organismos marinos la única BADH cristalizada hasta el momento es la de bacalao (Johansson et al., 1998). La secuencia aminoacídica de LvBADH no presenta alta identidad con la BADH de bacalao. Sin embargo, la proteína deducida de la LvBADH corresponde a la región cercana a C-terminal. Para examinar con detalle y poder identificar residuos y estructuras secundarias conservadas, se comparó LvBADH con el 50% de la secuencia aminoacídica de

la BADH de *G. morhua* hacia la región C-terminal. La proteína deducida de LvBADH, presenta una similitud del 55% a partir del residuo Thr-297 de la BADH de bacalao (Johansson et al., 1998).

Se realizó un alineamiento de la secuencia aminoacídica de LvBADH con BADHs de organismos marinos (Johansson et al., 1998; Wang et al., 2007; Freeman et al., 2008; Zhang et al., 2012). A partir, del cual en LvBADH se identificaron residuos conservados involucrados en el dominio catalítico y de oligomerización (Figura 7).

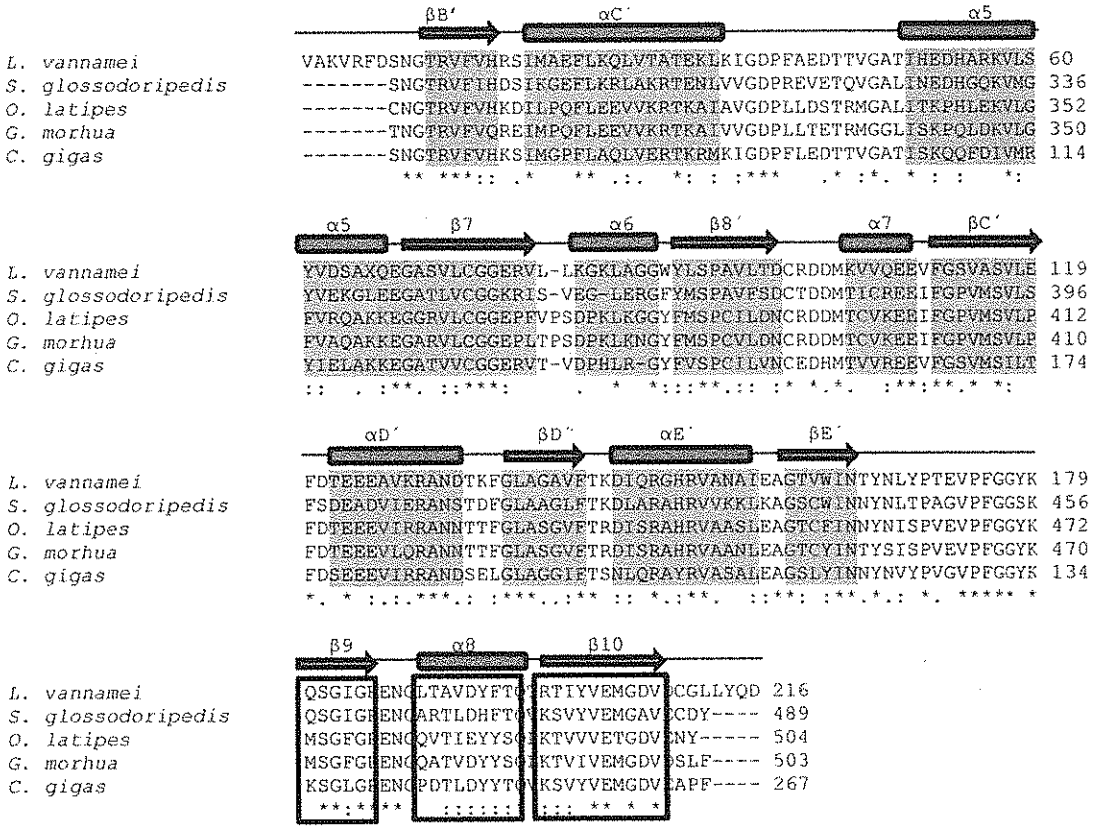

Figura 7.- Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre LvBADH y BADHs de organismos marinos. Los asteriscos (*) representan los aminoácidos idénticos de las BADHs de los diferentes organismos, mientras que los dos puntos (:) representan a los reemplazos conservados y un punto (.) los reemplazos semiconservados. En secuencia, los dominios de láminas β y hélices α, están marcados por una flecha y recuadro negro por encima de la secuencia determinada, respectivamente. Los residuos involucrados en dominio catalítico y de oligomerización están marcados en gris y con un recuadro, respectivamente.

La proteína deducida de LvBADH presenta estructuras secundarias conservadas en posiciones equivalentes en comparación con las BADHs de animales marinos (Johansson et al., 1998; Wang et al., 2007; Freeman et al., 2008; Zhang et al., 2012).

En LvBADH se identificaron 158 residuos implicados en la formación del dominio de unión al sustrato aldehído, a partir del residuo 7 al 164. En LvBADH se detectaron residuos conservados de 5 láminas β del dominio catalítico, en posiciones equivalentes con las otras secuencias de las BADHs en animales marinos (Johansson et al., 1998; Wang et al., 2007; Freeman et al., 2008; Zhang et al., 2012). En la proteína deducida de LvBADH, en la región entre las láminas βB´ y βC´, se identificó entre los residuos 16-135, una estructura secundaria de 100 residuos de dominios irregulares, que contiene una horquilla de láminas β y dos regiones largas de hélices α, tal como se ha descrito en otras BADHs cristalizadas (Johansson et al., 1998; Cobessi et al., 1999; Gruez et al., 2004; González-Segura et al., 2009).

En la secuencia de LvBADH, los aminoácidos involucrados en el dominio de oligomerización están localizados en la posición 176 a 216. Se identificó en LvBADH la última lamina β del dominio de oligomerización, en los residuos ^{201}RTIYVEMG^{205}, con dos sustituciones de Arg-201 por Lys-491 y Tyr-203 por Ile-493 comparado con la secuencia de BADH de bacalao (Johansson et al., 1998). En las BADHs cristalizadas, la última lamina β del dominio de oligomerización es altamente conservada y se encuentra involucrada en la formación de enlaces con el dominio catalítico por puentes de hidrogeno (Johansson et al., 1998; Cobessi et al., 1999; Gruez et al., 2004; González-Segura et al., 2009).

La presencia en LvBADH de residuos involucrados de los dominios catalíticos y de oligomerización, en posiciones equivalentes a BADHs de organismos marinos, indica que efectivamente la secuencia parcial obtenida corresponde a la BADH de camarón *L. vannamei*. Las regiones codificantes de las BADHs presentan baja tasa de divergencia de la secuencia aminoacídica en las

regiones importantes para la actividad catalítica, tales como los que forman el dominio catalítico.

El porcentaje de aminoácidos conservados en LvBADH que forman el dominio catalítico y de oligomerización de la enzima, sugieren una función y estructura similar a la descrita en BADHs de organismos marinos (Johansson et. al., 1998; Dragolovich y Pierce, 1994; Perrino y Pierce, 2000a; Treberg et al., 2007). En animales marinos, la BADH se encuentra como un homotetrámero con alta especificidad para betaína aldehído y la única función descrita de la enzima es la síntesis de GB (Johansson et al., 1998; Dragolovich y Pierce, 1994; Perrino y Pierce, 2000a; Treberg y Driedzic., 2007).

El análisis filogenético mostro que la proteína deducida LvBADH se encuentra en el clado de la familia ALDH9, con un 99% de soporte para este nodo (Figura 8). La LvBADH se agrupa con 66% de soporte en el clado de vertebrados e invertebrados marinos, que incluye secuencias como: ALDH9a1a de *S. kowalevskii* (Freeman et al., 2008; GenBank No. XP_002736595.1); ALDH9a1a de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Valverde et al., 1994; GenBank No. XP_011676578.1); BADH de ostra *C. gigas* (Zhang et al., 2012; GenBank No. XP_011430866.1) y TMBA-DH de *A. califórnica* (Knudsen et al., 2006; GenBank No. XP_005091798.1). Por otra parte, la LvBADH se encuentra separada del grupo ALDH2 de animales y bacterias.

Los resultados del análisis filogenético de LvBADH concuerdan, con la alta identidad encontrada a nivel de aminoácidos con secuencias de animales marinos y con los reportes en animales donde se sabe que la BADH pertenece a la familia ALDH9 (Hulse y Henderson 1980; Chern y Pietruszko 1995; Chern y Pietruszko 1999; Vaz et al., 2000; Gruez et al. 2000). La LvBADH presenta una mayor cercanía a secuencia de vertebrados e invertebrados marinos, lo que sugiere que la aparición del gen de la BADH pudo ser de manera distinta en mamíferos y organismos marinos.

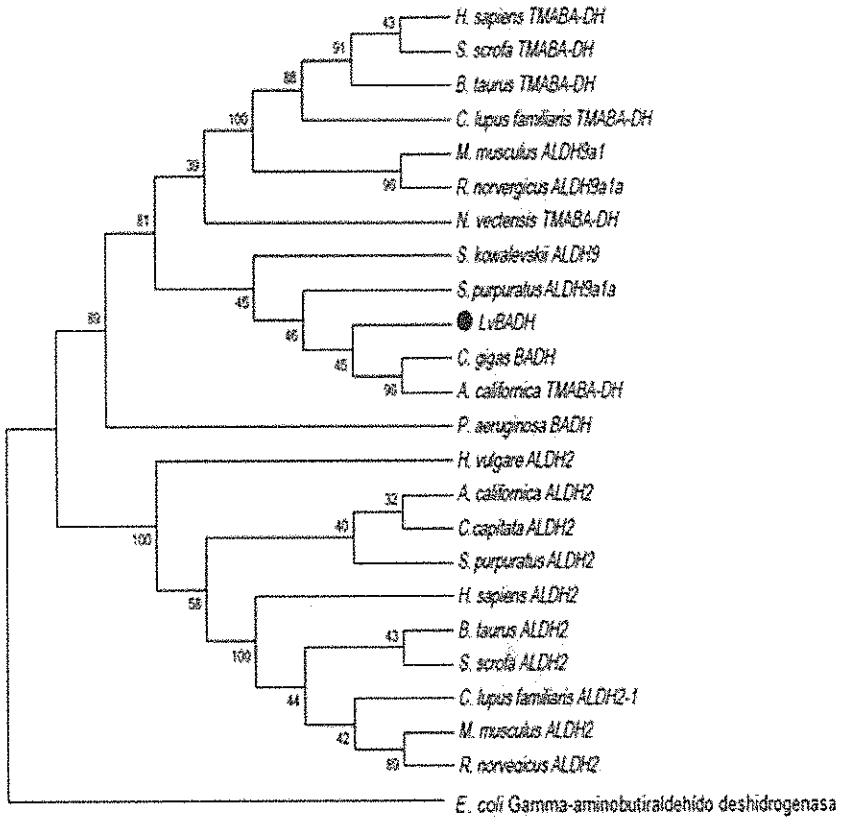

Figura 8.-Árbol filogenético de LvBADH con secuencias de BADHs, ALDH9 y ALDH2 de diversas especies. El árbol se obtuvo utilizando el programa MEGA versión 4.0 por el método de Jones-Taylor-Thornton.

III.4.-Conclusión

Se obtuvo una secuencia parcial nucleotídica del cDNA de la BADH de *L. vannamei* (LvBADH). La LvBADH presenta características estructurales conservadas y alta identidad con proteínas homólogas de organismos marinos.

CAPITULO IV EXPRESIÓN TEJIDO ESPECÍFICO DE LA BADH EN CAMARÓN *L. VANNAMEI* EN CONDICIONES VARIABLES DE SALINIDAD

IV.1.-Introducción

La enzima BADH es una proteína de respuesta a estrés que radica su actividad en la síntesis del osmolito GB, uno de los osmolitos mayoritariamente acumulados en diversos organismos para brindar protección contra las condiciones hipertónicas de la célula o tejido (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008). Para lograrlo, utiliza la coenzima NAD^+ y el sustrato betaína aldehído, siendo este último el que es transformado al osmolito.

Las investigaciones enfocadas en el estudio de la regulación del gen de la BADH, son principalmente en plantas. En plantas, el aumento en la expresión la BADH en paralelo con el incremento de GB, se ha descrito como un mecanismo de adaptación a condiciones de salinidad variables (Weretilnyk. y Hanson, 1990; McCue y Hanson, 1992; Legaria et al., 1998; Oishi y Ebina, 2005). En hojas de piñon (*Jarthopa curcas)*, los niveles de mRNA de la BADH se incrementaron 79%, después de 7 días de ser sometidas a tratamientos de salinidad alta (300 mM NaCl) (Zhang et al., 2008).

Plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabaccum*) con el gen de la BADH, presentaron acumulación de GB y una mayor tolerancia a ambientes salinos (Holmström et al., 2000). Además, el gen que codifica para la BADH se ha identificado en el genoma de algunas plantas, incapaces de acumular GB y se ha propuesto que la enzima desempeña una función en la detoxificación de compuestos aldehído en lugar de un papel en la respuesta osmótica (Missihoun et al., 2011).

En animales marinos, como *C. gigas* el gen de la BADH es expresado cuando el organismo es expuesto a condiciones de estrés abiótico como: salinidad y

temperatura (Zhang et al., 2012). Sin embargo, en el pez del arroz *O. latipes* la expresión de la BADH, se da de forma constitutiva principalmente en cerebro, branquias, corazón, hígado y riñón (Wang et al., 2007). En el pez del arroz, la BADH se encuentra involucrada en el metabolismo de detoxificación de aldehídos (Wang et al., 2007).

En camarón blanco la actividad de la BADH se detectó en los tejidos de hepatopáncreas, branquias y músculo (Muñoz-Bacasehua, 2014). Además, en *L. vannamei* existe un incremento en los niveles de GB condiciones variables de salinidad (Ray et al., 2010). Actualmente en crustáceos, no hay estudios enfocados en los mecanismos de regulación de gen de la BADH por las condiciones salinas. Por lo cual, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones salinas, en la expresión de BADH en los tejidos de hepatopáncreas, branquias y músculo de camarón *L. vannamei.*

IV.2.-Materiales y Métodos

IV.2.1.-Bioensayo

36 camarones *L. vannamei* de ~12 g, en fueron proporcionados por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Los camarones se mantuvieron en aclimatación durante 7 días en 3 acuarios plásticos de 60 L (cada uno con 12 camarones) con agua de mar (35 ppt) filtrada y esterilizada por UV. Los organismos se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial (Camaronina 35, purina) dos veces al día. Los restos de alimento y las excretas se retiraron por sifoneo. Una vez transcurrido este periodo, gradualmente se modificó la salinidad de un par de acuarios. La salinidad de los tanques fue monitoreada utilizando un refractómetro portátil. En un acuario se adicionó agua dulce hasta alcanzar una salinidad de 25 ppt, mientras que en el otro, el agua de mar se evaporó hasta alcanzar una salinidad de 40 ppt. Lo camarones se mantuvieron en estas condiciones durante 7 días, y al finalizar el ensayo se

realizó la disección de hepatopáncreas, branquias y músculo, los cuales fueron rápidamente congelados por inmersión en nitrógeno líquido y almacenados para los análisis posteriores a -80°C

IV.2.2.-Extracción del mRNA y Síntesis de cDNA

La extracción de RNA total se realizó a partir de 0.5 g de tejido colocados en microtubos. De los diferentes tratamientos se realizaron nueve alícuotas por cada uno de los tejidos (hepatopáncreas, branquias y músculo). Cada alícuota contenía 0.5 g, con tres porciones de 0.16 g de un mismo tejido, (hepatopáncreas, branquias y músculo). Posteriormente, el RNA total se extrajo de cada una de las alícuotas utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del proveedor y haciendo las modificaciones anteriormente descritas. A partir de 100 ng de RNA total se sintetizo cDNA por medio de transcripción reversa utilizando el oligo dT y el kit comercial QuantTitect Reverse Transcription (QIAGEN).

IV.2.3.-Cuantificación del mRNA de la BADH por Tejido

Se cuantificó la expresión de LvBADH y el gen constitutivo L8 por RT-qPCR en un termociclador StepOne Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). Para evaluar la expresión de LvBADH, se utilizaron los oligonucleótidos específicos diseñados en base a la secuencia parcial obtenida (LvBADHF3 y LvBADHR4). Los oligonucleótidos L8F2 y L8R1 se usaron para la amplificación del gen L8 y se utilizó como un estándar interno para normalizar los datos de expresión de la BADH (Tabla 3).

Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de LvBADH

Nombre del oligonucleótido	Secuencia nucleotídica (5´-3´)	GenBank No.
LvBADHF3	GGATGGTACCTTTCACCTGC	FE049020.1
LvBADHR4	CCTGCTTCAATGGCGTTAGC	FE049020.1
L8R1	TAGGCAATGTCATCCCATT	ABC48600.1
L8F2	TCCTGAAGGAAGCTTTACACG	ABC48600.1

Las reacciones de PCR se prepararon para tener un volumen final de 20 µL conteniendo 2 µL de cDNA (equivalente a 200 ng de RNA total), 0.5 µL de cada uno de los oligonucleótidos (20 µM) y 10 µL de Supermix SYBR ® green (Sigma-Aldrich). Las condiciones de amplificación y detección de los amplicones fueron las siguientes: 94°C por 10 min; 94°C por 15 seg, 60°C por 1 min (40 ciclos) con una única medición de fluorescencia y finalmente la curva de fusión disminuyendo 0.3°C cada 20 s de 95 a 60°C.

Para determinar la eficiencia de la amplificación, se utilizó el cDNA como templado y se realizaron curvas estándares de BADH y L8 utilizando diluciones de 5^{-4} a 5^{-8} ng μL^{-1}. Las curvas de BADH y L8 fueron usadas como controles positivos, mientras que las reacciones sin templado y solo con los oligonucleótidos fueron usadas como control negativo. El nivel de expresión de la BADH (ng/µL) fue normalizado a L8 y reportado como valor de expresión relativa (BADH/L8).

IV.2.4.-Análisis Estadístico

El diseño estadístico fue un diseño completamente al azar para cada uno de los tratamientos de salinidad (25 ppt, 35ppt y 40 ppt). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Para verificar la normalidad de los datos, éstos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para evaluar diferencias entre cada uno de los tratamientos, se usó la prueba de comparación múltiple de Tuckey a un nivel de probabilidad del 95%, usando el programa Origin Pro 0.9 (OriginLab).

IV.3.-Resultados y Discusión

Mediante RT-qPCR y utilizando los oligonucleótidos específicos LvBADHF3 y LvBADHR4, se evaluó la expresión de LvBADH en los tejidos de hepatopáncreas, branquias y músculo de camarón *L. vannamei*, sometido a tres concentraciones de salinidad (25, 35 y 40 ppt). El transcrito de LvBADH se detectó en los tres tejidos analizados de camarón blanco *L. vannamei* (Figura 9). En condiciones de salinidad normal (35 ppt), el nivel de expresión de LvBADH en hepatopáncreas fue 2.43 y 3.16 veces mayor, respecto al nivel de expresión en branquias y músculo respectivamente (P>0.05).

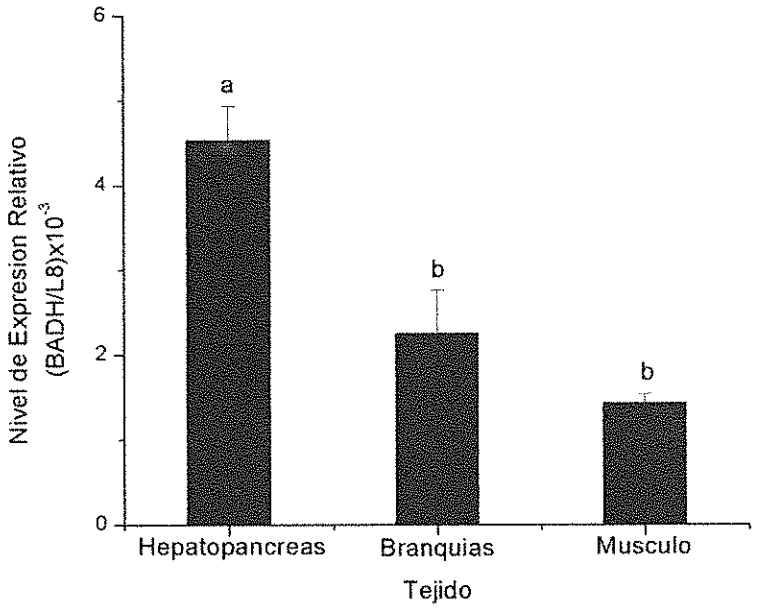

Figura 9.- Expresión relativa de LvBADH en hepatopáncreas, branquias y músculo de *L. vannamei* en condiciones de salinidad control. Las barras representan la media ± error estándar, n=9. Literales diferentes indican diferencias significativas (ANOVA P<0.05).

La presencia del transcrito de LvBADH en los tejidos de camarón blanco en condiciones de salinidad normal, coincide con lo descrito en el pez *O. latipes* por Wang y colaboradores (2000), donde la expresión de la BADH se detectó

en la mayoría de los tejidos de este organismo de manera constitutiva. Además, sugiere que la BADH en *L. vannamei*, puede estar involucrada en otras rutas del metabolismo y en los procesos de detoxificación de compuestos aldehído como se ha descrito el pez del arroz y mamíferos (Vaz et al., 2000; Hulse y Henderson, 1980; Wang et al., 2000).

En hepatopáncreas, los niveles de transcritos de LvBADH aumentaron 2.18 y 1.87 veces en salinidad baja (25 ppt) y alta (40 ppt) respectivamente, comparado con el grupo control (35 ppt) (Figura 10). El análisis de expresión de LvBADH muestra que la mayor cantidad de transcrito se encontró en el tejido de hepatopáncreas en las tres condiciones salinas evaluadas.

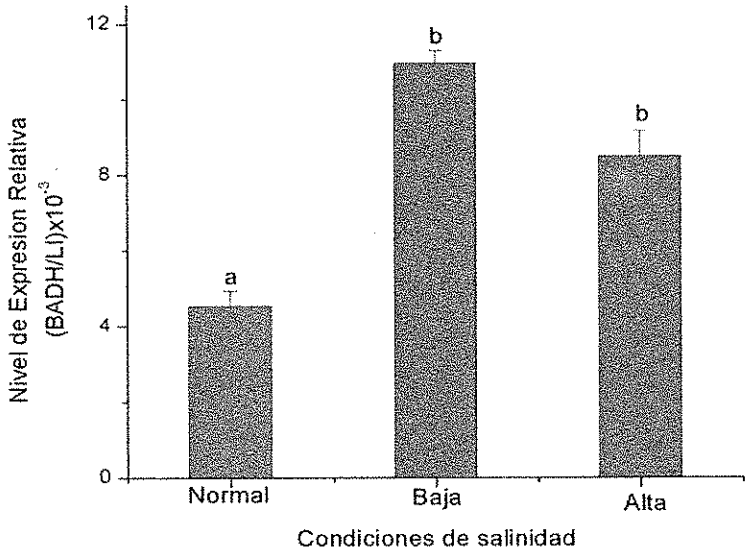

Figura 10.- Expresión relativa de LvBADH en hepatopáncreas de *L. vannamei* bajo condiciones variables de salinidad. Las barras representan la media ± error estándar, n=9. Literales diferentes indican diferencias significativas (ANOVA $P<0.05$).

En crustáceos como *L. vannamei*, el hepatopáncreas presenta un incremento en el metabolismo de lípidos y carbohidratos como parte de la respuesta osmótica para satisfacer las demandas energéticas (Gibson y Barker, 1979; Morris y Edwards, 1995; Yepiz-Plascencia et al., 2000; Jahn et al. 2006). Por lo cual, requiere de mecanismos de protección a macromoléculas en condiciones

de estrés osmótico, para contrarrestar la acumulación de agentes desnaturalizantes tóxicos como el amoniaco (Chen y Chen, 2000). Los altos niveles de expresión de LvBADH en hepatopáncreas pueden estar relacionados con la necesidad de la síntesis de GB, necesario para los mecanismos de osmoregulación e integridad proteica (Kumar, 2009; Auton et al., 2011).

En branquias, la expresión de BADH fue 2.76 y 1.72 veces mayor en condiciones de salinidad baja y alta respectivamente, con respecto al control (P>0.05) (Figura 11).El incremento del transcrito de LvBADH en branquias de *L. vannamei*, coincide con la función de osmoregulación descrita para branquias en éste organismo (Ponce-Palafox et. al., 1997, Álvarez et. al., 2004; Freire et al., 2008).

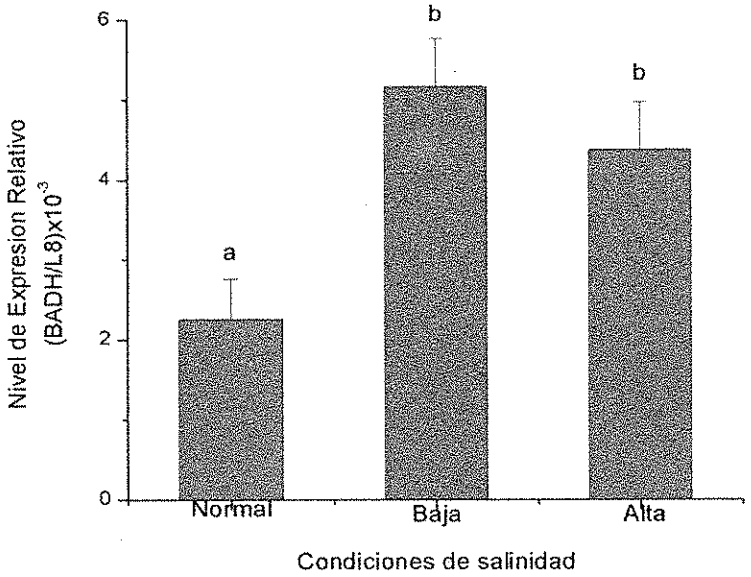

Figura 11.- Expresión relativa de LvBADH en branquias de *L. vannamei* bajo condiciones variables de salinidad. Las barras representan la media ± error estándar, n=9. Literales diferentes indican diferencias significativas (ANOVA P<0.05).

En el mismo sentido, en branquias de ostra *C. gigas* sometida a condiciones de salinidad variable (5-40ppt) durante 7 días, el transcrito de la BADH es detectado (Zhang et al., 2012). Además, existen diversos reportes del aumento en los niveles de GB en tejido branquial de crustáceos y moluscos en respuesta a estrés osmótico (Dragolovich y Pierce, 1992; Neufeld y Wright, 1996; Perrino

y Pierce, 2000a; Jahn et al., 2006). Estos resultados sugieren que la BADH está implicada en el mantenimiento del equilibrio en el medio intracelular en respuesta al estrés osmótico.

Por otra parte, la disminución de la expresión de LvBADH en condiciones de salinidad alta, sugiere una regulación hiperosmótica en periodos prolongados (días) en branquias de camarón blanco a través de mecanismos de transporte activo de iones (Lucu y Towle, 2003; Freire et al., 2008; Freire et al., 2013).

La expresión de LvBADH en músculo disminuyó 3.97 y 13 veces en camarones bajo condiciones de salinidad alta y baja respectivamente, en contraste al control (Figura 12).

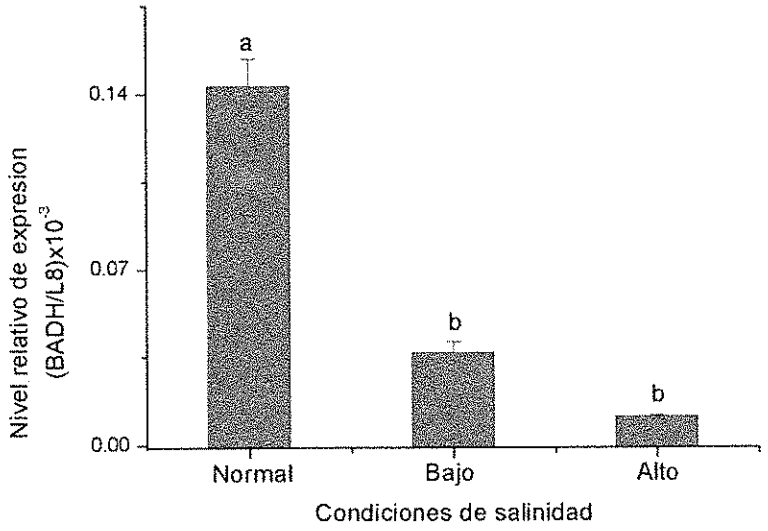

Figura 12.- Expresión relativa de LvBADH en músculo de *L. vannamei* bajo condiciones variables de salinidad. Las barras representan la media ± error estándar, n=9. Literales diferentes indican diferencias significativas (ANOVA P<0.05).

A pesar, de que se detectó una disminución en la expresión de LvBADH en tejido muscular de *L. vannamei*, no se puede descartar la acumulación de GB en este tejido. Por otra parte, crustáceos y moluscos se ha descrito que la actividad de proteínas transportadoras de GB, es regulada por las condiciones de osmolaridad (Petty y Lucero, 1999; Wright et al., 1992; Freire et al., 2013). Por lo cual, en músculo de camarón blanco, la acumulación de GB puede

involucrar mecanismos de transporte en lugar de la síntesis *in situ*, como se ha descrito en otros organismos marinos (Petty y Lucero, 1999; Wright et al., 1992; Freire et al., 2013).

IV.4.-Conclusión

En *L. vannamei* la expresión de la BADH es regulada de manera tejido específico, por las variaciones en las condiciones de salinidad. Los mayores niveles del transcrito de la BADH, se detectaron en los tejidos de hepatopáncreas y branquias, los cuales son los principales tejidos involucrados en la regulación osmótica.

REFERENCIAS

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.

Álvarez, A. L., Racotta, I. S., Arjona, O. y Palacios, E. (2004). Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*,237(1), 237-249.

Auton, M., Rösgen, J., Sinev, M., Holthauzen, L.M.F. y Bolen, D.W. (2011). Osmolyte effects on protein 324 stability and solubility: A balancing act between backbone and side-chains. *Biophysical chemistry*, 159, 90-99.

Brocker, C., Lassen, N., Estey, T., Pappa, A., Cantore, M., Orlova, V. V. y Vasiliou, V. (2010). Aldehyde dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) is a novel enzyme involved in cellular defense against hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18452-18463.

Brocker, C., Vasiliou, M., Carpenter, S., Carpenter, C., Zhang, Y., Wang, X. y Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*, 237(1), 189-210.

Castille F. L. y Lawrence, A. L. (1981). "The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology,* 68(1): 75-80.

Cendella, R. J. (2001). Specific Labeling of Lens Aldehyde Dehydrogenase Class 1 from 3H-Cholesterol or Its Derivatives. *Ophthalmic Research*, 33(4), 210-216.

Charmantier, G. (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invertebrate Reproduction & Development*, *33*(2-3), 177-190.

Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Bouaricha, N., Thuet, P., Trilles, J. P. y Aiken, D. E. (1988). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *The Biological Bulletin*, 175(1), 102-110.

Chen, J.M. y Chen, J.C. (2000). Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia. *Aquatic Toxicology,* 50, 27-37.

Chern, M. K. y Pietruszko, R. (1995). Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 213(2), 561-568.

Chern, M. K. y Pietruszko, R. (1999). Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochemistry and Cell Biology*, 77(3), 179-187.

Chong-Robles, J., Charmantier, G., Boulo, V., Lizárraga-Valdéz, J., Enríquez-Paredes, L. M. y Giffard-Mena, I. (2014). Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. *Aquaculture*, 422, 261-267.

Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. y Aubry, A. (1999). Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans. Journal of Molecular Biology*, 290(1), 161-173.

Deaton, L. E. (2001). Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 260(2), 185-197.

De Vooys, C. G. N. y Geenevasen, J. A. J. (2002). Biosynthesis and role in osmoregulation of glycine-betaine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* LMK. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(2), 409-414.

Diaz, F., Farfan, C., Sierra, E. y Re, A. D. (2001). Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine & Freshwater Behaviour & Physiology*, *34*(2), 93-104.

Díaz-Sánchez, Á. G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Rudiño-Piñera, E., Montiel, C., Martínez-Castilla, L. P. y Muñoz-Clares, R. A. (2012). Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine. *Plant Physiology*, *158*(4), 1570-1582.

Dragolovich, J. y Pierce, S.K. (1992). Comparative time courses of inorganic and organic osmolyte accumulation as horseshoecrabs crabs (*Limulus*

polyphemus) adapt to high salinity. Comparative Biochemistry and Physiology 102A, 79–84.

Dragolovich, J. y Pierce, S. K. (1994). Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *Journal of Experimental Zoology*, *270*(5), 417-425.

Duester, G. (2013). Retinoid signaling in control of progenitor cell differentiation during mouse development. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24(10), 694-700

Estey, T., Cantore, M., Weston, P. A., Carpenter, J. F., Petrash, J. M. y Vasiliou, V. (2007). Mechanisms involved in the protection of UV-induced protein inactivation by the corneal crystallin ALDH3A1. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(7), 4382-4392.

Estey, T., Chen, Y., Carpenter, J. F. y Vasiliou, V. (2010). Structural and functional modifications of corneal crystallin ALDH3A1 by UVB light. *PLoS One*, *5*(12), e15218-e15218.

Falkenberg, P. y Strøm, A. R. (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1034*(3), 253-259.

Finn R. D., Mistry J., Tate J., Coggill P., Heger A., Pollington J. E., y Bateman A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, *38* (suppl1), D211-D222.

Freeman, R. M., Wu, M., Cordonnier-Pratt, M. M., Pratt, L. H., Gruber, C. E., Smith, M. y Kirschner, M. (2008). cDNA sequences for transcription factors and signaling proteins of the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii*: efficacy of the expressed sequence tag (EST) approach for evolutionary and developmental studies of a new organism. *The Biological Bulletin*, *214*(3), 284-302.

Freire, C.A., Onken, H. y McNamara, J.C. (2008). A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 272-304.

Freire, C.A., Souza-Bastos, L.R., Amado, E.M., Prodocimo, V. y Souza, M.M., (2013). Regulation of Muscle Hydration Upon Hypo- or Hyper-Osmotic Shocks: Differences Related to Invasion of the Freshwater Habitat by Decapod Crustaceans. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* , 319, 297-309.

Gibson, R. y Barker, P.L. (1979). The decapod hepatopancreas. *Oceanography Marine Biology*, 17, 285–346.

Gómez-Jiménez S., Urías-Reyes A.A., Vázquez-Ortiz F. y Hernández-Watanabe G. (2004). Ammonia efflux rates and free amino acid levels in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during sudden salinity changes. *Aquaculture*, *233*(1), 573-581.

González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Muñoz-Clares R. A. y Horjales E. (2009). The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP+ and a novel cation binding site. *Journal of Molecular Biology*, *385*(2), 542-557

Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomoni, A., Valencia, C., Campanacci, V. y Cambillau, C. (2004). Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology*, *343*(1), 29-41.

Guzmán-Partida A. M. y Valenzuela-Soto E. M. (1998). Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*,*119*(3), 485-491.

Hjelmqvist, L., Norin, A., El-Ahmad, M., Griffiths, W. y Jörnvall, H. (2003). Distinct but parallel evolutionary patterns between alcohol and aldehyde dehydrogenases: addition of fish/human betaine aldehyde dehydrogenase divergence. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *60*(9), 2009-2016.

Hjelmqvist, L., Norin, A., El-Ahmad, M., Griffiths, W. y Jörnvall, H. (2003). Distinct but parallel evolutionary patterns between alcohol and aldehyde dehydrogenases: addition of fish/human betaine aldehyde dehydrogenase divergence.*Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*,*60*(9), 2009-2016.

Holmström, K. O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T. E. y Welin, B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany*,*51*(343), 177-185.

Hulse J. D. y Henderson L. M. (1980). Carnitine biosynthesis. Purification of 4-N'-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver. *Journal of Biological Chemistry*, *255*(3), 1146-1151.

Incharoensakdi, A., (2000) "Overproduction of spinach betaine aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*."*European Journal of Biochemistry*, 267.24 7015-7023.

Jahn, M. P., Cavagni, G. M., Kaiser, D. y Kucharski, L. C. (2006). Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *334*(1), 1-9.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnnvall, H. y Eklund, H. (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 A resolution. Protein Science, 7, 2106-2117.

Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L. P., Velasco-García, R y Muñoz-Clares, R. A. (2007). Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, *13*, 64-76.

Klein, J. R. y Handler, P. (1942). Effect of diphosphopyridine nucleotide on the rate of oxidation of betaine aldehyde. *Journal of Biological Chemistry*, *144*(2), 537-539.

Knudsen, B., Kohn, A. B., Nahir, B., McFadden, C. S. y Moroz, L. L. (2006). Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the sea-slug, *Aplysia californica*: conservation of the gene order in Euthyneura. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *38*(2), 459-469.

Kopečný, D., Končitíková, R., Tylichová, M., Vigouroux, A., Moskalíková, H., Soural, M. y Moréra, S. (2013). Plant ALDH10 Family identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(13), 9491-9507.

Kumar, R. (2009). Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 491, 1-6.

Kurys G., Shah P. C., Kikonygo A., Reed D., Ambroziak W. y Pietruszko R. (1993). Human aldehyde dehydrogenase. cDNA cloning and primary structure of the enzyme that catalyzes dehydrogenation of 4-aminobutyraldehyde. *European Journal of Biochemistry*, *218*(2), 311-320

Legaria J., Rajsbaum R., Munoz-Clares R. A., Villegas-Sepulveda N., Simpson, J. y Iturriaga G. (1998). Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene*,*218*(1), 69-76.

Leong, J. S., Jantzen, S. G., Von-Schalburg, K. R., Cooper, G. A., Messmer, A. M., Liao, N. Y. y Koop, B. F. (2010). *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC genomics*, *11*(1), 279.

Lever, M. y Slow, S. (2010). The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical biochemistry*, *43*(9), 732-744.

Lindahl, R. (1992). Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *27*(4-5), 283-335.

Livingstone, J. R., Maruo, T., Yoshida, I., Tarui, Y., Hirooka, K., Yamamoto, Y. y Hirasawa, E. (2003). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *Journal of Plant Research*, *116*(2), 133-140

Lou, P. J., Zhu, H. J., Ding, H. y Niu, H. (2011). Synthesis and properties of a double-ester Gemini quaternary ammonium fabric softener .*Textile Auxiliaries*, *5*, 006.

Lucu, Č. y Towle, D.W. (2003). Na^+ + K^+-ATPase in gills of aquatic crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 135, 195-214.

Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M. y Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial:¿actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *25*(3), 181-196.

McCue K. F. y Hanson A. D. (1992). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Molecular Biology*, *18*(1), 1-11.

Melcangic, M. y Bowery, N. G. (1996). GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends in Pharmacological Sciences*, *17*(12), 457-462.

Missihoun, T.D., Schmitz, J., Klug, R., Kirch, H.-H. y Bartels, D., (2011). Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta*, 233, 369-382.

Morris, S. y Edwards, T. (1995). Control of osmorregulation via regulation of Na+/K+-ATPase activity in the amphibious purpleshore crab *Leptograpsus variegatus*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 112 (2), 129–136.

Muñoz-Bacasehua, C. (2014). Purificación de la Betaína Aldehído Deshidrogenasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).*Tesis de Licenciatura*. Universidad de Sonora, Navojoa, Sonora.

Muñoz-Clares, R. A., Díaz-Sánchez, Á. G., González-Segura, L. y Montiel, C. (2010). Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *493*(1), 71-81.

Muñoz-Clares, R. A. y Valenzuela-Soto, E. M. (2008). Betaine aldehyde dehydrogenases: evolution, physiological functions, mechanism, kinetics, regulation, structure, and stability. *Advances in Protein Physical Chemistry*, 279-302.

Muñoz-Clares, R. A. y Velazco-García, R. (2004). Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. *Mensaje Bioquímico*, *28*.

Negro, L., Senkman, E., Montagna, M. y Collins, P. (2011). *Freshwater decapods and pesticides: an unavoidable relation in the modern world*. Open Access Publisher.

Neufeld, D. S. y Wright, S. H. (1996). Salinity change and cell volume: the response of tissues from the estuarine mussel *Geukensia demissa*. *The Journal of Experimental Biology*, *199*(7), 1619-1630.

Niculescu, M. D. y Zeisel, S. H. (2002). Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *The Journal of Nutrition*, *132*(8), 2333S-2335S.

Oishi, H. y Ebina, M. (2005). Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *Journal of Plant Physiology*, *162*(10), 1077-1086.

Palacios, E., Bonilla, A., Pérez, A., Racotta, I. S. y Civera, R. (2004). Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *299*(2), 201-215.

Palacios, E. y Racotta, I. S. (2007). Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. *Aquaculture*, *268*(1), 123-135.

Pequeux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, 1-60.

Pereira, F., Rosenmann, E., Nylen, E., Kaufman, M., Pinsky, L. y Wrogemann, K. (1991). The 56 kDa androgen binding protein is an aldehyde

dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,*175*(3), 831-838.

Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B. C., Lindahl, R. y Hempel, J. (1999). Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Science*, *8*(1), 137-146.

Perrino, L.A. y Pierce, S.K. (2000a). Betaine aldehyde dehydrogenase kinetics partially account for oyster population differences in glycine betaine synthesis. *Journal Experimental Zoology*, 286, 238–249.

Perrino, L.A. y Pierce, S.K. (2000b). Choline dehydrogenase kinetics contribute to glycine betaine regulation differences in Chesapeake Bay and Atlantic oysters. *Journal Experimental Zoology,* 286, 250–261.

Petty, C.N. y Lucero, M.T. (1999). Characterization of Na^+-dependent betaine transporter with Cl^- channel properties in squid motor neurons. *Journal Neurophysiology,* 81, 1567–1574.

Pierce, S. K., Rowland-Faux, L. M. y Crombie, B. N. (1995). The mechanism of glycine betaine regulation in response to hyperosmotic stress in oyster mitochondria: a comparative study of Atlantic and Chesapeake Bay oysters.*Journal of Experimental Zoology*, *271*(3), 161-170.

Pietruszko, R., Blatter, E., Abriola, D. P. y Prestwich, G. (1991). Localization of cysteine 302 at the active site of aldehyde dehydrogenase. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism,* 3, 19-30.

Pietruszko, R. y Chern, M. K. (2001). Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix. *Chemico-Biological Interactions*, *130*, 193-199.

Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C. A. y Ross, L. G. (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, *157*(1), 107-115.

Rathinasabapathi, B. (2000). Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, *86*(4), 709-716.

Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L. y Leffler, J. W. (2010). Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*, *299*(1), 89-98.

Reeve, I. T. y Miller, M. G. (2002). 1, 3-Dinitrobenzene metabolism and protein binding. *Chemical Research in Toxicology*, *15*(3), 352-360.

Rhodes, D. y Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, *44*(1), 357-384.

Riveros-Rosas, H., González-Segura, L., Julián-Sánchez, A., Díaz-Sánchez, Á. G. y Muñoz-Clares, R. A. (2013). Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*,*202*(1), 51-61.

Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D. y Götz, F. (1999). The Choline-Converting Pathway inStaphylococcus xylosus C2A: Genetic and Physiological Characterization. *Journal of bacteriology*, *181*(7), 2273-2278.

Rozen, S. y Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols*, 365-386.

Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Samocha, T. M., Guajardo, H., Lawrence, A. L., Castille, F. L., Speed, M., McKee, D. A. y Page, K. I. (1998). A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, *165*(3), 233-242.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1997). DNA sequencing with chain terminating inhibitiors. *Proceedings of the National Acedemy of Sciences of the United States of America*, 74, 5436-5467.

Sophos, N. A. y Vasiliou, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chemico-Biological Interactions*, *143*, 5-22.

Strickland, K. C., Holmes, R. S., Oleinik, N. V., Krupenko, N. I. y Krupenko, S. A. (2011). Phylogeny and evolution of aldehyde dehydrogenase-homologous folate enzymes. *Chemico-Biological Interactions*, *191*(1), 122-128.

Tatusova, T., Ciufo, S., Fedorov, B., O'Neill, K. y Tolstoy, I. (2013). RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic acids research*, 1274.

Testore, G., Cravanzola, C. y Bedino, S. (1999). Aldehyde dehydrogenase from rat intestinal mucosa: purification and characterization of an isozyme with high affinity for γ-aminobutyraldehyde. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *31*(7), 777-786.

Tomanek L. (2011). Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants,

infection, symbiosis, and development. *Annual Review of Marine Science*, *3*, 373-399.

Treberg, J. R., y Driedzic W. R. (2007). The accumulation and synthesis of betaine in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *147*(2), 475-483.

Valenzuela-Soto, E. M., y Muñoz-Clares, R. A. (1994). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, *143*(2), 145-152.

Valenzuela-Soto, E. M., Velasco-Garcí, R., Mújica-Jiménez, C. y Muñoz-Clares, R. A. (2003). Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chemico-Biological Interactions*, *143*, 139-148.

Valverde, J. R., Marco, R. y Garesse, R. (1994). A conserved heptamer motif for ribosomal RNA transcription termination in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(12), 5368-5371.

Van-Zee, J. P., Geraci, N. S., Guerrero, F. D., Wikel, S. K., Stuart, J. J., Nene, V. M. y Hill, C. A. (2007). Tick genomics: the *Ixodes* genome project and beyond. *International Journal for Parasitology*, *37*(12), 1297-1305.

Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K. F. y Nebert D. W. (1999). Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics and Genomics*, *9*(4), 421-434.

Vasiliou, V., Pappa, A. y Petersen, D. R. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, *129*(1), 1-19.

Vaz F. M., Fouchier S. W., Ofman R., Sommer M. y Wanders, R. J. (2000). Molecular and biochemical characterization of rat γ-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(10), 7390-7394.

Wang, X., Zhu, S., Khan, I. A. y Dasmahapatra, A. K. (2007). Ethanol attenuates Aldh9 mRNA expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *146*(3), 357-363.

Weretilnyk, E. A. y Hanson, A. D. (1990). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(7), 2745-2749.

Wood, A. J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R. J. y Goldsbrough, P. B. (1996). Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum (molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiology*, *110*(4), 1301-1308.

Wright, S. H., Wunz, T. M., y Silva, A. L. (1992). Betaine transport in the gill of a marine mussel, *Mytilus californianus. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *263*(2), R226-R232

Wyban, J., Walsh, W. A., y Godin, D. M. 1995. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, *138*(1), 267-279.

Yancey, P. H. y Somero, G. N. (1979). Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochemestry Journal*, *183*, 317-323.

Yepiz-Plascencia, G., Galván, T.G., Vargas-Albores, F. y García-Bañuelos, M. (2000). Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β-glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. *Marine Biotechnology* 2, 485-492.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F. y Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, *490*(7418), 49-54.

Zhang, F. L., Niu, B., Wang, Y. C., Chen, F., Wang, S. H., Xu, Y. y Jia, Y. J. (2008). A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Science*, *174*(5), 510-518.