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

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE DESACOPLAMIENTO FISIOLÓGICO MITOCONDRIAL DE LOS CRUSTÁCEOS

Por:

Chrystian Mariana Rodríguez Armenta

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Diciembre 2018

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Chrystian Mariana Rodríguez Armenta, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias

Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Directora de Tesis

Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo
Asesor

Dr. José Ángel Huerta Ocampo
Asesor

Dra. Reina Castro Longoria
Asesor

Dr. Salvador Uribe Carvajal
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 con fines 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 requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado.

A CIAD por facilitar el uso de las instalaciones y la prestación de becas de movilidad.

Al proyecto 241670 de ciencia básica de CONACYT.

A Laura García, Héctor Galindo, Aurora Vidal, Verónica Araiza, Gerardo Reyna y Luis Conde de la Coordinación de Programas Académicos y Biblioteca, por el apoyo técnico brindo durante estos cuatro años.

A los miembros de mi comité de tesis Dr. Rogerio Sotelo, Dr. José Ángel Huerta y Dra. Reina Castro por el seguimiento, sus comentarios y apoyo durante la elaboración de la tesis.

Al Dr. Salvador Uribe por compartir sus conocimientos del tema, por recibirme en su laboratorio de Fisiología en la UNAM y tratarme como a un miembro de su equipo, y junto con su esposa abrirme las puertas de su casa, gracias por todo el apoyo brindado durante todo este tiempo.

A la Dra. Adriana Muhlia, en verdad no tengo palabras para describir todas las cosas por las que tengo que agradecerte. Empezando por aceptarme en tu laboratorio para realizar el posgrado y dirigir la tesis aun sabiendo que yo no solo iba a ser una estudiante, si no también madre y esposa, gracias por tu confianza. Gracias por tu infinito apoyo en los momentos buenos y sobretodo en los momentos malos, cuando sentía que no podía más me decías las palabras justas para subir las pilas. Gracias por tu guía, consejos y llamadas de atención durante la realización de este trabajo, pero sobre todo gracias tu amistad.

Al personal del CIBNOR Hermosillo, Dr. Arturo Sánchez, Dra. Tania Enríquez, M.C. Fernando Mendoza por todo el apoyo brindado durante los bioensayos, así como en la facilitación de equipos y materiales, y agradezco la amistad brindada durante este periodo incluso de tiempo atrás.

Al Dr. Enrique De la Re Vega por su ayuda profesional, técnica y facilidades prestadas en su Laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS-UNISON, así como el apoyo del proyecto CONACYT 252979.

Agradezco al equipo del Laboratorio 305 de Fisiología Celular de la UNAM, Dra. Mónica Rosas Lemus, Dra. Cristina Uribe Álvarez, M.C. Emilio Espinoza Simon, M.C. Norma Lilia Morales García por compartir sus conocimientos y su paciencia durante mi estancia en la UNAM y a la Dra. Natalia Chiquete Félix por la ayuda técnica brindada en esta tesis, además porque fuiste mi pedacito de Sinaloa en la Cd. de México.

Al Veterinario Gilberto Morales del laboratorio 102 oriente por la facilitación de artemias para los experimentos realizados en la UNAM.

Al Dr. Alfredo Cabrera Orefice por todas tus enseñanzas, consejos y conversaciones a distancia.

A la QB. Sandra Ruth Araujo Bernal del Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular de CIAD por todo el apoyo técnico y sugerencias brindadas en la parte de Biología Molecular del trabajo.

A la Lic. Biología Rosario Gpe. Cota Verdugo, Lic. Biología Rosario Elizabeth Cota Verdugo y Biólogo Pesquero Luis Adrián Gámez Alejo del Laboratorio de Fisiología de Invertebrados Marinos por el apoyo y facilidades técnicas prestadas para la realización de este trabajo.

Al M.C Noel Miramontes por la facilitación de organismos utilizados en los experimentos y al M.C. José Luis Niebla Larreta del DICTUS-UNISON por el apoyo en el mantenimiento de los organismos.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular, Ofelia Méndez, Cintya Nevárez, Orlando Reyes, Daniel Sastré, Sandra Araujo, María González, Erick Armenta, Martí Wilson, Jesús León, Kathya Ramírez gracias por los momentos que pasamos en el laboratorio, por su apoyo durante los interminables bioensayos, por su bromas para mitigar el cansancio del día y las divertidas convivencias fuera del trabajo.

A mis amigos de los diferentes grupos: los amanecidos, las del F, los margaros, las tres mellizas + 1, seminario forever, gracias por tantos momentos de convivencia tan agradables. A las PVRs y un café por favor, mil gracias por todo su apoyo, que sería de mi sin sus comentarios tan nutridos en diferentes aspectos de la vida.

A la familia De la Re Vega, por toda la ayuda brindada, por la paciencia y por todo el cariño hacia mi hijo y a mí, sin ustedes este proceso hubiera sido más difícil.

A mis papás Oscar y Candy, hermanos Oscar y Omar, y Geisol mi sobrina, por su cariño, compresión y apoyo. Por recibirme con los brazos abiertos después de meses de ausencia, por facilitarme las cosas en diversos aspectos de mi vida, por el amor hacia mi hijo, esposo y a mí. Por enseñarme el sentido de la responsabilidad y el respecto, siempre me dijeron que si algo se empieza hay que terminarlo. Los amo.

Enrique te agradezco todo este tiempo, porque has estado a mi lado apoyándome, en el aspecto personal y en el profesional, has sido paciente, comprensivo y cariñoso. Mateo, hijo gracias por ser el motorcito que me impulsa a seguir adelante, por tus juegos, tus cariños, por ayudarme a cuidar a las artemias y camarones que me llevaba a casa, agradezco tu paciencia por mis largos periodos de ausencia, porque haces mis días menos pesados, y por muchas cosas más, gracias. Este trabajo lo dedico a ti mi capitán tapón, te amo.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 2
AGRADECIMIENTOS 4
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABLAS 11
LISTA DE ANEXOS 12
RESUMEN 13
ABSTRACT 15
1. INTRODUCCIÓN 17
2. ANTECEDENTES 21
2.1. La Mitocondria. 21
2.2. Mecanismos de Desacoplamiento Fisiológico Mitocondrial. 24
2.2.1. Canales Inespecíficos Mitocondriales. 25
2.2.2. Enzimas Oxidorreductasas Alternas. 28
2.4. Hipoxia-Reoxigenación. 32
2.5. El Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* y *Artemia franciscana.* 33
3. HIPÓTESIS 37
4. OBJETIVOS 38
4.1. Objetivo General. 38
4.2. Objetivos Específicos. 38
5. MATERIALES Y MÉTODOS 39
5.1. Detección de Transcritos y/o Proteínas Mitocondriales Relacionadas con la Transición de la Permeabilidad en el Camarón Blanco 39
5.2. Obtención de Oganismos Experimentales de *Artemia franciscana y Litopenaeus vannamei* y Aislamiento de sus Mitocondrias 39
5.3. Evaluación del Acoplamiento Mitocondrial Mediante la Determinación de la Tasa de Consumo de Oxígeno 41
5.4. Evaluación de la Captación de Calcio Extra Mitocondrial. 42
5.5. Hinchamiento Mitocondrial. 43
5.6. Potencial Transmembranal de las Mitocondrias ($\Delta\Psi m$). 44
5.7. Determinación del Efecto de Iones, Fosfato y ATP sobre el Consumo de Oxígeno Mitocondrial. 44
5.8. Identificación de Enzimas Oxidorreductasas Alternas Mitocondriales. 45
5.9. Separación de las Proteínas Mitocondriales en Geles hrCN-PAGE y Detección de la Actividad de los Complejos Respiratorios. 46
5.10. Separación de las Proteinas Mitocondriales en SDS-PAGE e Inmunodetección de VDAC y AOX. 48

CONTENIDO (Continuación)

5.11. Análisis e Identificación de la GPDHmit Mediante Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS) y Análisis Bioinformático. 50
5.12. Bioensayo de Hipoxia-Reoxigenación. 51
5.13. Análisis Estadístico. 52

6. RESULTADOS 53
6.1. Detección de Transcritos y/o Proteínas Mitocondriales Relacionadas con la Transición de la Permeabilidad en el Camarón Blanco. 53
6.2. Evaluación del Acoplamiento Mitocondrial Mediante la Determinación de la Tasa de Consumo de Oxígeno. 54
6.3. Evaluación de la Captación de Calcio Extra Mitocondrial. 56
6.4. Hinchamiento Mitocondrial. 60
6.5. Potencial Transmembranal de las Mitocondrias ($\Delta\Psi m$). 61
6.6. Determinación del Efecto de Iones, Fosfato y ATP sobre el Consumo de Oxígeno Mitocondrial. 64
6.7. Efecto del ATP sobre la Captación de Calcio, Hinchamiento Mitocondrial y Potencial Transmembranal. 66
6.8. Identificación de Enzimas Oxidorreductasas Alternas Mitocondriales. 71
6.9. Separación de la Proteína Mitocondrial en Geles hrCN-PAGE y Detección de la Actividad de los Complejos Respiratorios. 76
6.10. Identificación de la GPDHmit Mediante LC-MS/MS y Análisis Bioinformático y de la AOX Mediante Western Blot. 79
6.11. Evaluación de la Función Mitocondrial del Camarón Blanco *L. vannamei* Expuesto a Cambios en la Concentración de Oxígeno Disuelto en el Agua. 82
6.12. Efecto del Estrés Oxidativo sobre la Captación de Calcio Exógeno en Mitocondrias de Camarón. 83
6.13. Efecto del Estrés Oxidativo sobre el Hinchamiento Mitocondrial y el Potencial Transmembranal en Mitocondrias de Camarón. 86
6.14. Detección de la AOX y GPDHmit en Mitocondrias de *L. vannamei* Expuesto a Estrés Oxidativo. 87

7. DISCUSIÓN 91

8. CONCLUSIÓN 100

9. BIBLIOGRAFÍA 101

10. ANEXOS 111

11. GLOSARIO 125

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura de la mitocondria……	21
2.	Cadena de transporte de electrones clásica y fosforilación oxidativa….	23
3.	Modelos del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM)……	26
4.	Cadena de transporte de electrones ramificada y fosforilación oxidativa……...	30
5.	Inmunodetección de VDAC mediante western blot……	54
6.	Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas de la artemia…….	55
7.	Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas del camarón……..	56
8.	Monitoreo de la captación de captación de calcio mediante la sonda Fluo-5N en mitocondrias aisladas de artemia……..	58
9.	Monitoreo de la captación de captación de calcio mediante la sonda Fluo-5N en mitocondrias aisladas de camarón……	59
10.	Monitoreo de la captación de captación de calcio mediante la sonda Fluo-5N en mitocondrias aisladas de corazón de bovino *Bos taurus*….	60
11.	Efecto del calcio sobre el hinchamiento mitocondrial de artemia, camarón y bovino…….	61
12.	Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de nauplios de *A. franciscana*……...	62
13.	Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de adulto de *A. franciscana*……..	62
14.	Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de postlarvas de *L. vannamei*……...	63
15.	Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de adulto de *L. vannamei*……..	64
16.	Efecto del ATP sobre la captación de calcio exógeno en mitocondrias de *A. franciscana y L. vannamei* …….	67
17.	Efecto del ATP sobre la captación de calcio exógeno en mitocondrias de *Artemia franciscana* ……...	68
18.	Efecto del ATP sobre la captación de calcio exógeno en mitocondrias del camarón *Litopenaeus vannamei* …….…	69

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
19.	Efecto del ATP sobre el hinchamiento mitocondrial de artemia y camarón …….…	70
20.	Efecto del ATP sobre el potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) de artemia y camarón……	70
21.	Efecto del NADH sobre el consumo de oxígeno para la identificación de la NADH deshidrogenasa alterna tipo II……	71
22.	Efecto del G3P sobre el consumo de oxígeno para la identificación de la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDHmit)……	73
23.	Identificación de la existencia de la AOX en las mitocondrias de artemia y camarón en presencia de los inhibidores OG y KCN ……	75
24.	Identificación de la existencia de la AOX en las mitocondrias de artemia y camarón en presencia de los inhibidores KCN y OG ……	75
25.	Patrón de bandeo de proteínas mitocondriales aisladas de artemia, camarón y bovino en gel hrCN-PAGE 4-12%.....	76
26.	Actividad en gel de los complejos mitocondriales I, II y GPDHmit de *B. taurus, A. franciscana* y *L. vannamei*……..	78
27.	Actividad en gel de los complejos mitocondriales IV y V de *B. taurus*, *A. franciscana* y *L. vannamei*……..	78
28.	Inmunodetección de la AOX……...	80
29.	Cadenas respiratorias de las mitocondrias de artemia y camarón……...	81
30.	Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas del camarón *L. vannamei* expuesto a estrés oxidativo…….	82
31.	Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas del camarón *L. vannamei* en estado no fosforilado…….	83
32.	Efecto del estrés oxidativo sobre la captación del calcio exógeno en el camarón…….....	85
33.	Hinchamiento mitocondrial en camarones expuestos a estrés oxidativo.	86
34.	Evaluación del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de adultos de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto……...	87
35.	Identificación de la AOX en las mitocondrias del camarón *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto ..	88
36.	Determinación de la GPDHmit en las mitocondrias del camarón *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto....	89
37.	Procesos metabólicos relacionados con la presencia de la GPDHmit en *Artemia franciscana*…….	98

LISTA DE TABLAS

Tabla **Página**

1. Identificación de la GPDHmit de *A. franciscana* mediante LC-MS/MS y búsqueda de homología en bases de datos……... 79

LISTA DE ANEXOS

Anexo		Página
A1.	Efecto del calcio (Ca^{2+}) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial…….	111
A2.	Efecto del cobre (Cu^{2+}) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial…….……	112
A3.	Efecto del potasio (K^{+}) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial ……...…….	113
A4.	Efecto del sodio (Na^{+}) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial ……..……..	114
A5.	Efecto del fosfato (Pi) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial ……..……..	115
A6.	Efecto del ATP sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial.….	116
A7.	Control de la determinación de la GPDHmit artemia y camarón……...	117
A8.	Control de la determinación de la AOX en artemia adicionando OG-KCN…….	118
A9.	Control de la determinación de la AOX en camarón adicionando OG-KCN…….	119
A10.	Control de la determinación de la AOX artemia y camarón adicionando KCN-OG…….	120
A11.	Actividad en gel de la GPDHmit en mitocondrias aisladas de *B. taurus*, *A. franciscana* y *L. vannamei*……..	121
A12.	Ubicación y corte de la banda para el análisis de la GPDHmit por MS/MS…….	121
A13.	Control de la determinación de la AOX en *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto……..	122
A14.	Control de la determinación de la GPDHmit en *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto……	123
A15.	Efecto de la adición de ATP como parte de un estado de desacoplamiento intermitente de las mitocondrias de camarón adulto.	124

RESUMEN

La mitocondria provee la energía química que requiere la célula para su mantenimiento a través de un mecanismo acoplado entre la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Este organelo cuenta con mecanismos de desacoplamiento mitocondrial (MDM) que le permiten protegerse del daño causado por las especies reactivas de oxígeno, disipando el gradiente de protones, acelerando el transporte de electrones y manteniendo el potencial transmembranal ($\Delta\Psi m$). Dentro de los MDM descritos, la transición de la permeabilidad mitocondrial (TP) es uno de los más estudiados. Este fenómeno ocurre después de la sobrecarga de calcio provocada por algún desajuste celular, incrementando la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, promoviendo el hinchamiento mitocondrial y afectando el $\Delta\Psi m$. Otro MDM son las enzimas oxidorreductasas alternas, que realizan una función alterna a alguno de los complejos respiratorios, manteniendo el flujo de electrones sin sintetizar ATP.

Las especies de crustáceos *Artemia franciscana* y *Litopenaeus vannamei* son capaces de sobrevivir a cambios en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, presentando un ajuste metabólico regulando su función mitocondrial. El objetivo de este estudio fue determinar en las mitocondrias de ambas especies, la presencia de MDM como la TP y/o las enzimas alternas en dos estadios del ciclo de vida y en condiciones de estrés oxidativo. La TP se evaluó en mitocondrias aisladas de cada especie utilizando diferentes iones como inductores sobre el consumo de oxígeno mitocondrial, se determinó la captación de calcio exógeno, hinchamiento mitocondrial y el $\Delta\Psi m$.

Para detectar la presencia de enzimas alternas en la cadena respiratoria de ambas especies se evaluó la actividad en gel de los complejos respiratorios, el consumo de oxígeno mitocondrial, un análisis western blot y se analizaron mediante LC-MS/MS para confirmar su identidad.

Los resultados confirman que las mitocondrias de ambas especies no manifiestan un estado de TP, pues tienen la habilidad de captar gran cantidad de calcio y otros iones, no se observó hinchamiento mitocondrial y el $\Delta\Psi m$ no colapsó; lo anterior sugiere una

característica adaptativa de sobrevivencia a condiciones ambientales cambiantes. Además, se detectaron una glicerol fosfato deshidrogenasa en las mitocondrias de nauplios y adultos de artemia, y una oxidasa alterna en la etapa de nauplio. En el camarón no se detectaron enzimas alternas en ningún estadio evaluado, ni por efecto de la hipoxia-reoxigenación. Esto sugiere que la artemia presenta diferentes mecanismos adaptativos para sobrellevar los cambios en la concentración de oxígeno ambiental durante su ciclo de vida.

Palabras clave: cadena respiratoria mitocondrial, crustáceos, enzimas oxidorreductasas alternas, hipoxia, mecanismo de desacoplamiento mitocondrial, mitocondria reoxigenación, transición de la permeabilidad mitocondrial.

ABSTRACT

Mitochondria provide the chemical energy required by the cell to cover its functions through a mechanism coupled between the electron transport chain and oxidative phosphorylation. This organelle also has mitochondrial decoupling mechanisms (MDM) that allow it to protect itself from the damage caused by the formation of reactive oxygen species, dissipating the gradient of protons, accelerating the electrons transport and maintaining transmembrane potential ($\Delta\Psi m$). Inside the MDM described, the mitochondrial permeability transition (PT) is one of the most studied. This phenomenon occurs after the calcium overload caused by some cellular imbalance, increasing the permeability of the internal mitochondrial membrane, promoting the mitochondrial swelling, and affecting the $\Delta\Psi m$. Another MDM is the presence of mitochondrial alternative enzymes, which perform an alternating function to one of the respiratory complexes, maintaining the flow of electrons without synthesizing ATP.

The species of crustaceans *Artemia franciscana* and *Litopenaeus vannamei* are able to survive important changes in the concentration of dissolved oxygen in the water, presenting a metabolic adjustment and mechanisms that regulate their mitochondrial function. The objective of this study was to identify and characterize in the mitochondria of both species, the presence of MDM as the PT and/or the alternative enzymes in two stages of the life cycle and in conditions of oxidative stress. The PT was evaluated in mitochondria isolated from each species using different ions as inducers on the mitochondrial consumption oxygen, was determined the capture of exogenous calcium, mitochondrial swelling, and $\Delta\Psi m$.

To detect the presence of alternative enzymes in the respiratory chain of both species, the in-gel activity of the respiratory complexes, the consumption of mitochondrial oxygen, and western blot analysis were evaluated and analyzed by mass spectrometry proteins to confirm their identity.

The results confirm that the mitochondria of both species do not enter a state of PT because they have the ability to capture large amounts of calcium and other ions, no

mitochondrial swelling was observed, and the ΔΨm not collapsed; the previous thing suggests an adaptive survival characteristic to environmental conditions changes. In addition, a glycerol phosphate dehydrogenase was detected in nauplii and adults of artemia mitochondria, and an alternating oxidase in the nauplii stage. In the shrimp, no alternate enzymes were detected at any stage evaluated, nor by an effect of hypoxia-reoxygenation. This suggests that artemia presents different adaptive mechanisms to cope with changes in the concentration of ambient oxygen during its life cycle.

Key words: alternative enzymes, crustaceans, hypoxia, mitochondria, mitochondrial permeability transition, mitochondrial respiratory chain, mitochondrial uncoupling mechanisms, reoxygenation.

1. INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un organelo de la célula eucariota que está formado por una membrana externa y otra interna separadas por un espacio intermembranal y en su interior una matriz mitocondrial (Nicholls y Ferguson, 2003). La mitocondria realiza múltiples funciones metabólicas, entre ellas la más importante es una reacción acoplada de la cadena de transporte de electrones (CTE) y la fosforilación oxidativa (FO) para la síntesis de ATP. La cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria clásica), está constituida por cuatro complejos respiratorios que se encuentran integrados a la membrana interna mitocondrial y se encargan de mantener el flujo de electrones para finalmente reducir el oxígeno a agua. Los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal, generando un gradiente de protones que será utilizado por el complejo V o ATP-sintasa para la síntesis de ATP (Nicholls y Ferguson, 2003).

Bajo ciertas circunstancias, la cadena de transporte de electrones se desacopla de la fosforilación oxidativa a través de mecanismos de desacoplamiento, impidiendo que los protones bombeados al espacio intermembranal sean utilizados para la síntesis de ATP. Dos de los mecanismos de desacoplamiento mitocondrial ya estudiados en varias especies, son los canales inespecíficos mitocondriales y las enzimas oxidorreductasas alternas (Guerrero-Castillo et al., 2011). Los canales inespecíficos mitocondriales se han reportado en vertebrados, en donde están representados por el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM). El término transición de la permeabilidad (TP) fue acuñado por Haworth y Hunter (1979), refiriéndose al incremento de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (MIM) que permite el paso de iones y solutos con masas moleculares de hasta 1.5 kDa. Algunos autores reportan que la función del PTPM está relacionada con la regulación del potencial electroquímico y este juega un papel importante en la apoptosis (Tornero, 2002).

El PTPM es un canal no selectivo formado por varias proteínas que forman un complejo que atraviesa la MIM, y la membrana mitocondrial externa (MEM) y está en contacto

con la matriz mitocondrial (Crompton y Costi, 1990). Se ha propuesto que en condiciones fisiológicas normales el PTPM se abre y se cierra de manera intermitente para mantener un estado estable del gradiente de protones y el potencial de membrana. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, cuando se elevan los niveles de calcio, ADP y Pi, como cuando se presenta un evento de isquemia-reperfusión y/o hipoxia-reoxigenación, se produce un desbalance en los niveles de Ca^{2+} citosólico promoviendo que la TP se presente de manera continua, estado que se mantiene hasta culminar en la muerte celular o apoptosis (Crompton y Costi, 1990).

A pesar de que la existencia, estructura y función del PTPM ha sido tema de debate en los últimos años, existen estudios en vertebrados que han aportado información relevante sobre la estructura y función del mismo (Crompton, 2000; Bernardi, 2013; Giorgio et al., 2013; Halestrap et al., 2014; von Stockum et al., 2015). A su vez, algunos autores han reportado que la transición de la permeabilidad no se presenta en las mitocondrias de crustáceos como el branquiópodo *Artemia franciscana*, el camarón fantasma *Lepidophthalmus louisianensis*, el camarón del norte *Crangon crangon* y el langostino *Palaemon serratus* por efecto de una sobrecarga de calcio, sugiriendo que la activación del PTPM no está regulada por este catión (Menze et al., 2005; Holman y Hand, 2009; Konrad et al., 2012).

Por otro lado, las enzimas oxidorreductasas alternas representan otro mecanismo de desacoplamiento reportado en las mitocondrias de ciertas especies y son proteínas que se encuentran en la MIM formando parte de una cadena respiratoria ramificada (Nicholls y Ferguson, 2003). Estas enzimas cumplen la función alterna de alguno de los complejos respiratorios de la cadena tradicional, permiten recibir y ceder los electrones a través de ellas, por lo que participan en el control de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS). Estas enzimas forman parte de los mecanismos de desacoplamiento mitocondrial ya que no participan en la formación de potencial transmembranal ($\Delta\Psi m$), puesto que no bombean protones disminuyendo así la síntesis de ATP.

Una de estas enzimas es la NADH deshidrogenasa II, que utiliza NADH como sustrato respiratorio y es alterna al complejo I o NADH deshidrogenasa I (Duarte et al., 2003). También se ha reportado la enzima oxidasa alterna (AOX), que cumple la función alterna al complejo IV o citocromo oxidasa, reduciendo ½ O_2 a agua. Otra enzima

reportada como parte de una cadena respiratoria ramificada es la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDHmit) que tiene como sustrato respiratorio el glicerol-3-fosfato (G3P), y permite el paso de los electrones a la ubiquinona para reducirlo a ubiquinol (Nicholls y Ferguson, 2003). Si bien, a la fecha se ha reportado la presencia de enzimas oxidorreductasas alternas en algunas especies de invertebrados marinos como los moluscos, la información sobre la existencia de estas enzimas en los crustáceos es aún nula (McDonald y Vanlerberghe, 2004).

Se sabe que en los procesos metabólicos asociados con la obtención de energía y el crecimiento, el oxígeno es una molécula importante ya que es el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria y del cual depende la síntesis de energía para realizar un trabajo (Mathews, 2003). Por lo anterior, la disminución en la concentración de oxígeno ambiental genera un bajo aporte de oxígeno a la célula y a la mitocondria (Scheffler, 1999; Gnaiger et al., 2000).

Es bien sabido que la mitocondria es un mediador importante de la muerte celular cuando los tejidos son sometidos a condiciones de hipoxia (Lemasters et al., 1998). El ambiente marino contiene treinta veces menos oxígeno por litro de agua y la difusión de este es ocho mil veces más lenta que en el aire (Schmidt-Nielsen, 1975). Además, se sabe que tanto en los cuerpos de agua someros en donde se da la crianza de las larvas de camarón, como en los estanques de cultivo, los niveles de oxígeno disuelto en el agua varían drásticamente en un rango de 24 h, presentando niveles de aproximadamente 1 mg O_2/L durante la noche, aumentando a 8 mg O_2/L durante el día, derivado de la reoxigenación del agua (Puente-Carreón, 2009). Se ha reportado que el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es capaz de sobrevivir a estas variaciones en la concentración de oxígeno disuelto, presentando un ajuste metabólico que está relacionado directamente con la función mitocondrial (Pérez-Rostro et al., 2004; Martínez-Cruz et al., 2012; Jiménez-Gutiérrez et al., 2014).

Por otro lado, *Artemia franciscana* es un crustáceo capaz de sobrevivir en condiciones ambientales extremas, desde agua dulce hasta la hipersalinidad, haciendo uso de moléculas como la trehalosa y el glicerol que le permiten mantener la osmorregulación en condiciones de anoxia durante años, pues su supervivencia se atribuye a que los embriones enquistados presentan un estado de represión metabólica llamada

quiescencia. Sin embargo, cuando se presentan las condiciones ambientales optimas, la artemia eclosiona del quiste enfrentándose a un aumento drástico en la concentración de oxígeno del agua (Clegg et al., 1997; Abatzopoulos et al., 2002).

El efecto de la reoxigenación ha sido estudiado en organismos vertebrados, observando que la mitocondria es el principal organelo que actúa para prevenir y contrarrestar los daños generados por el aumento del oxígeno, activando el sistema antioxidante mitocondrial, promoviendo la homeostasis de iones y protones a través de mecanismos de desacoplamiento mitocondrial (Ernster, 1988; Nicholls y Ferguson, 2003; Mailloux y Harper, 2012).

Si bien se han realizado estudios en especies marinas que analizan los efectos de la hipoxia-reoxigenación, a la fecha son pocos los estudios de los mecanismos de desacoplamiento mitocondrial en los crustáceos cuando están expuestos a cambios en la concentración de oxígeno disuelto. A la fecha existen varios estudios que han sugerido que las mitocondrias de los crustáceos no entran en un estado de transición de la permeabilidad (Menze et al., 2005; Holman y Hand, 2009; Konrad et al., 2012), sin embargo surgen varias preguntas como: ¿las mitocondrias de los crustáceos cuentan con algún mecanismo de desacoplamiento mitocondrial?, y de ser así, ¿cuál es el mecanismo de desacoplamiento de los crustáceos?, ¿en las mitocondrias de los crustáceos la transición de la permeabilidad podría estar regulada por otros iones o compuestos diferentes al calcio? ¿se podrá evidenciar el fenómeno de transición en diferentes estadios del ciclo de vida ó como consecuencia de la hipoxia y reoxigenación en las mitocondrias de artemia y del camarón?

Por todo lo anterior, el presente trabajo abordó el estudio de los mecanismos de desacoplamiento de la mitocondria del camarón *L. vannamei* y de *Artemia franciscana*, a través de la evaluación de la transición de la permeabilidad, y de las enzimas oxidorreductasas alternas, en condiciones de estrés oxidativo y en diferentes estadios del ciclo de vida. Los resultados permiten explicar cómo enfrentan los organismos las variaciones de oxígeno ambientales y de una manera muy básica, la adaptación mitocondrial de estos organismos a condiciones adversas.

2. ANTECEDENTES

2.1. La Mitocondria.

La mitocondria es un organelo que se encuentra dentro de las células eucariotas llevando a cabo funciones metabólicas como la β-oxidación lipídica, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Mathews, 2003). La mitocondria está formada por un sistema de doble membrana, una externa y otra interna separadas por un espacio intermembranal. La estructura mitocondrial permite y facilita la selección entre las moléculas que van hacia la matriz mitocondrial o las que se dirigen al espacio intermembranal mediante complejos proteínicos transmembranales, como las traslocasas de la membrana interna y traslocasas de la membrana externa (TIM y TOM por sus siglas en inglés) (Neupert, 1997).

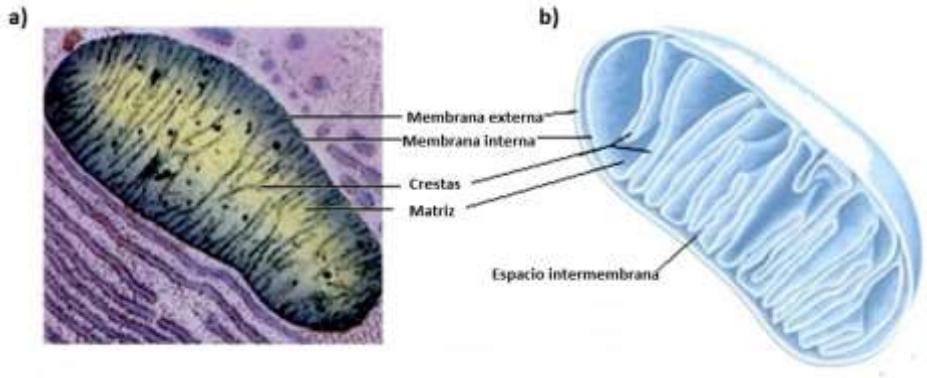


Figura 1. Estructura de la mitocondria. a) Microfotografía electrónica de una mitocondria tomada de K.R. Porter/foto Resaerchers, INC. b) Diagrama del corte de una mitocondria (Voet, 2006).

La MEM es permeable al paso de moléculas con pesos menores a 6 kDa como los iones y algunos metabolitos, además contiene proteínas integrales de membrana que sirven de

porinas permitiendo la difusión libre de moléculas con un peso de hasta 10 kDa. La MIM se pliega formando crestas y los espacios intercrestales convergen con los espacios intermembrana de la mitocondria (Figura 1). La MIM es permeable a O_2, CO_2 y H_2O; y cuenta además con proteínas que controlan el flujo de metabolitos como el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (DePierre, 1977). Dentro de la MIM se encuentra la matriz mitocondrial que se caracteriza por ser un semifluido que contiene enzimas solubles involucradas en el metabolismo oxidativo. Además, contiene el ADN mitocondrial, que es circular y contiene sólo genes cuyos transcritos son traducidos a proteínas por los ribosomas mitocondriales y son utilizadas por la propia mitocondria (Lodish, 2005).

En la MIM también se encuentran las proteínas que conforman la CTE y la FO, como parte de una cadena respiratoria "clásica" (Figura 2). La cadena de transporte de electrones está formada por los complejos respiratorios I, II, III y IV, estos permiten el paso de los electrones de un complejo a otro para generar la fuerza protón motriz necesaria para la síntesis del ATP, mediante la fosforilación oxidativa (Nicholls y Ferguson, 2003).

El complejo I o NADH deshidrogenasa I, es un complejo multimérico que recibe los electrones de la oxidación del NADH que proviene de la matriz mitocondrial, mientras que el complejo II o succinato deshidrogenasa es un complejo que recibe los electrones del succinato proveniente del ciclo de Krebs. Ambos, ceden los electrones a la ubiquinona para reducirla a ubiquinol, y posteriormente el ubiquinol reduce al complejo III también conocido como citocromo b reductasa. Al oxidarse el complejo III, dona los electrones al citocromo C y este a su vez los cede al complejo IV o citocromo c oxidasa reduciéndolo.

El complejo IV es el último aceptor de electrones de la CTE, y al mismo tiempo utiliza ½ O_2 para reducirlo a agua. Junto con el paso de electrones a través de la CTE, los complejos respiratorios transmembranales I, III y IV bombean protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, esto para generar un gradiente electroquímico de protones también conocido como potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\Psi m$) (Mitchell, 1961). El $\Delta\Psi m$ generado es la fuerza protón motriz que requiere la ATP sintasa para sintetizar ATP, ya que los protones serán utilizados para

darle fuerza a los rotores F_0 y F_1 de la enzima, son translocados de regreso a la matriz mitocondrial y con ellos se promueve la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (Hatefi et al., 1962; Mitchell, 1966; Mathews, 2003; Nicholls y Ferguson, 2003).

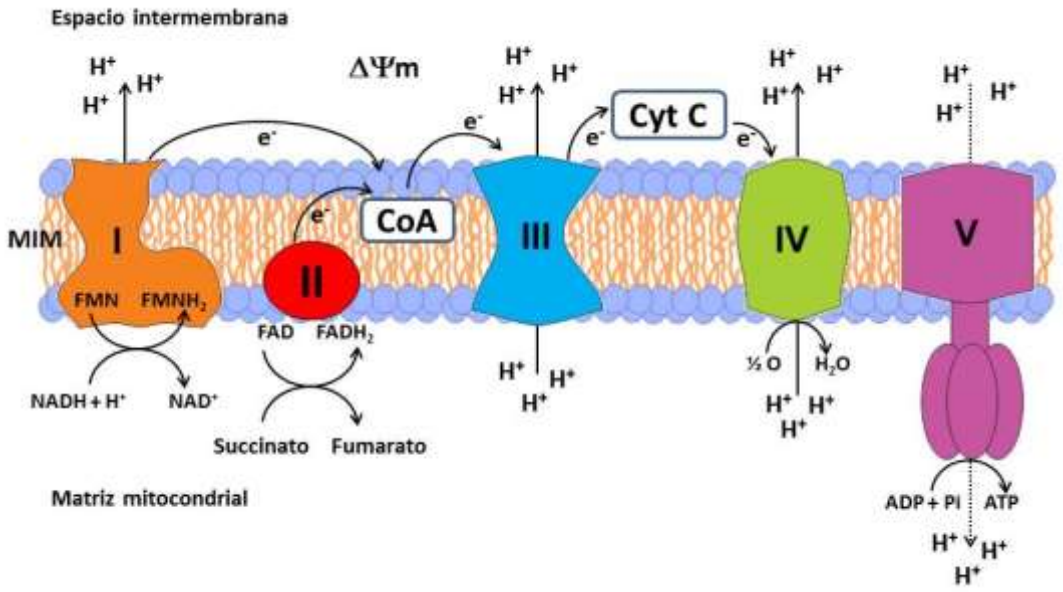


Figura 2. Cadena de transporte de electrones clásica y fosforilación oxidativa. I: NADH deshidrogenasa I. II: Succinato deshidrogenasa. III: Citocromo b reductasa. IV: Citocromo c oxidasa. V: ATP sintasa. CoA: Ubiquinona. Cyt C: Citocromo C. ΔΨm: Potencial transmembranal mitocondrial. MIM: Membrana interna mitocondrial.

Cuando la CTE funciona de manera simultánea con la fosforilación oxidativa y el ΔΨm generado es utilizado por la F0 para la síntesis de ATP, se dice que estos dos mecanismos se encuentran acoplados. Sin embargo, se ha observado que bajo ciertas circunstancias ocurre una disminución en la síntesis del ATP, lo que genera una disminución de la actividad de la CTE y los protones acumulados en el espacio intermembranal no son utilizados por la ATP sintasa para la síntesis de ATP y la mitocondria entra en un estado de desacoplamiento mitocondrial (Nicholls y Ferguson, 2003). Lo anterior ocasiona que se acumulen los protones en el espacio intermembranal y debido a que los complejos I, III y IV funcionan más lento se promueve la generación de EROS (Rottenberg et al., 2009). Si bien las EROS participan en la señalización

celular, una sobreproducción de estas puede generar daño a nivel de membranas y ADN, afectando a la célula y desencadenando un desequilibrio en el sistema (Nicholls y Ferguson, 2003).

Se ha reportado que una de las formas en que la mitocondria evita la sobreproducción de EROS, es activando los mecanismos de desacoplamiento mitocondrial (MDM). A la fecha se sabe que los MDM se clasifican de acuerdo a la función que estos realizan en la mitocondria (Guerrero-Castillo et al., 2011). La presencia de estos mecanismos se ha reportado en mamíferos, peces, hongos, moluscos, parásitos, y levaduras; sin embargo, la información disponible sobre la existencia de los mecanismos de desacoplamiento en crustáceos aún es muy escasa (Haworth y Hunter, 1979; Elthon et al., 1989; McDonald et al. 2009; Guerrero-Castillo et al., 2011; Shiba et al., 2013; Cabrera-Orefice et al., 2014a).

2.2. Mecanismos de Desacoplamiento Fisiológico Mitocondrial.

Los mecanismos de MDM se han clasificado en extrínsecos (disipadores de protones) e intrínsecos (proteínas que no bombean protones). Un MDM extrínseco son las proteínas desacoplantes (UCPs), que son proteínas localizadas en la MIM y permiten la fuga de los protones desde el espacio intermembranal a la matriz mitocondrial para mantener el equilibrio electroquímico dentro de la mitocondria (Kowaltowski et al., 1998; Ricquier, 2005). Otro MDM se conoce como slipping, este es un mecanismo intrínseco que permite la disminución de la eficiencia de las bombas de protones, como la citocromo c oxidasa y la ATP sintasa generando variaciones estequiométricas entre protones y electrones, lo cual resulta en cambios en la síntesis de ATP (Pietrobon et al., 1981; Azzone et al., 1985; Frank y Kadenbach 1996; Kadenbach, 2003; Feniouk et al., 2005). Dentro de la clasificación de los MDM también se encuentran los canales inespecíficos mitocondriales, así como las enzimas alternas oxidorreductasas, de los cuales se profundizará a continuación.

2.2.1. Canales Inespecíficos Mitocondriales.

Los canales inespecíficos mitocondriales se clasifican dentro de los MDM extrínsecos, y han sido reportados en levaduras como canales inespecíficos mitocondriales (MUCs), mientras que en los vertebrados se les conoce como el PTPM. El MUC y/o PTPM es un canal no específico que sirve de transportador a través de las dos membranas mitocondriales. Esta estructura permite que bajo ciertas circunstancias se presente el fenómeno de la transición de la permeabilidad mitocondrial (Haworth y Hunter, 1979).

El término de transición de la permeabilidad fue introducido por Haworth y Hunter (1979), refiriéndose de manera específica al incremento de la permeabilidad de la MIM a iones y solutos con masas moleculares de hasta 1500 Da. Ambos autores observaron y caracterizaron este fenómeno en las mitocondrias del corazón de humano, en donde observaron la apertura reversible de un poro proteínico en la MIM (Haworth y Hunter, 1979). De manera específica en los vertebrados, a lo largo del tiempo se han propuesto varios modelos del PTPM y se han sugerido varias hipótesis sobre la estructura del poro y las proteínas que lo conforman y regulan su apertura.

Uno de estos modelos sugiere que en los vertebrados, al menos tres proteínas conforman parte del poro incluyendo ANT, la ciclofilina D (CyP-D) y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). Este modelo sugiere que las proteínas se encuentran desagregadas en condiciones fisiológicas estables, ya que la CyP-D se encuentra unida a la ciclosporina A que funciona como inhibidor de esta proteína y se sabe que existen varios factores que permiten que CyP-D se separe de su inhibidor permitiendo que CyP-D se una a ANT y a su vez ambas se alineen con VDAC para inducir la apertura del PTPM (Figura 3a; Crompton et al., 1998; Crompton, 2000).

En otros estudios se ha reportado que la transición de la permeabilidad en las mitocondrias puede suceder sin la presencia de ANT y VDAC, es por esto que se sugirió un segundo modelo, en donde la CyP-D es capaz de unirse a la proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP), proteína que se encuentra en el tallo lateral de la ATP sintasa, inhibiendo parcialmente la activación de esta última. La unión de estas dos proteínas, junto con la presencia de calcio, inducen un cambio conformacional en la

fracción F0 de la ATP sintasa, la cual se une a otra fracción F0 de un complejo adyacente para formar dímeros de ATPasa, formando así un poro que permite la transición de la permeabilidad inducida por el aumento en las concentraciones de calcio citosólico (Bernardi, 2013; Giorgio et al., 2013; von Stockum et al., 2015).

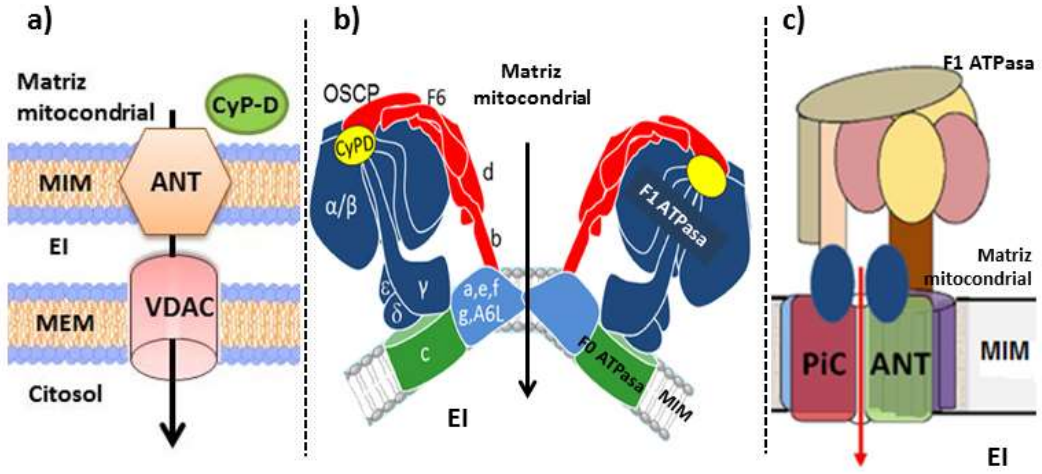


Figura 3. Modelos del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM). VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje. ANT: translocador de nucleótidos de adenina. CyP-D: Ciclofilina–D. OSCP: Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina. PiC: Acarreador de fosfatos. F_0 ATPasa: Fracción F_0 de la ATP sintasa. F_1 ATPasa: Fracción F_1 de la ATP sintasa. MIM: Membrana interna mitocondrial. MEM: Membrana externa mitocondrial. EI: Espacio intermembranal. (Imágenes modificadas de Bernardi, 2013; Halestrap et al., 2014).

Otro grupo de trabajo reportó que la transición de la permeabilidad ocurre con la participación del acarreador de fosfatos (PiC), por lo que sugirió un tercer modelo en el cual se sugiere que esta proteína forma parte de los componentes del PTPM en ratas, mostrando evidencia de que ANT y PiC interaccionan entre ellas cuando se asocian con la ATP sintasa, formando el súper complejo “ATP-sintasoma” y que estos componentes junto con el anillo c de la subunidad F0 de la ATP sintasa forman parte importante en la estructura del PTPM (Figura 3c; Chen et al., 2004; Leung et al., 2008; Halestrap et al., 2014).

Si bien son varios los modelos sugeridos sobre la estructura del PTPM, a la fecha no se ha confirmado de manera definitiva la identidad de todas las proteínas que conforman el

poro y su estructura. Sin embargo, si se han estudiado algunos factores que permiten que se presente la TP, así como sus consecuencias bioquímicas y fisiológicas.

Se ha reportado que la TP se puede presentar en condiciones de estrés causadas por patologías, accidentes cerebrovasculares y también por eventos de isquemia-reperfusión (Tornero et al., 2002). Se sabe que cuando hay altas concentraciones de calcio citoplasmático (como resultado de la falta oxígeno o hipoxia), la actividad de la CTE y la porción F0 de la ATP sintasa disminuyen por ausencia del oxígeno, la célula activa su metabolismo anaerobio que como consecuencia provoca una disminución en la síntesis de ATP, disminuye el pH citoplasmático por efecto de la disociación del ácido láctico y el retículo endoplásmico (RE) libera grandes cantidades de calcio al citosol (Gnaiger et al., 2000; Hand y Menze, 2008). Una vez que se restablecen los niveles de oxígeno (como resultado de la reperfusión ó reoxigenación), la actividad de los sustratos respiratorios reinicia, activando la CTE y re-energizando a la mitocondria; se restablece el pH celular y en este punto la mitocondria capta grandes cantidades del calcio citosólico que se acumularon durante la hipoxia. Así mismo la mitocondria entra en un estado de estrés oxidativo debido a un incremento en la producción de EROS causada por la presencia de un exceso oxígeno. Así, tanto la combinación de las EROS con altas concentraciones de calcio dentro de la mitocondria, como la disminución de la síntesis de ATP, generan las condiciones óptimas para que se presente la transición de la permeabilidad (Turrens, 2003; Hand y Menze, 2008).

Cuando se presenta la TP, la permeabilidad de la MIM aumenta dejando pasar moléculas de bajo masa molecular, estas se acumulan en la matriz y como consecuencia la mitocondria se hincha sin que haya ruptura de la MIM debido a que las crestas mitocondriales permiten su expansión. Cuando la entrada de calcio a la mitocondria continúa y se rompe la membrana externa mitocondrial y/o el PTPM permanece abierto, hay una salida de moléculas del espacio intermembranal hacia el citoplasma como el citocromo C, que juega un papel importante en la pre-apoptosis; en estas condiciones la MIM se vuelve altamente permeable a H^+ provocando que el gradiente de protones se pierda y generando un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Lo anterior tiene como consecuencia que se inhiba la síntesis de ATP y que en ciertas condiciones, la ATP sintasa se convierta en una ATPasa hidrolizando el ATP existente. Así, a medida

que la TP persiste, estos eventos seguirán ocurriendo generando un daño irreversible en la célula provocando muerte por necrosis y/o apoptosis (Halestrap et al., 1998; Crompton, 1999).

Estudios previos han demostrado que el PTPM se puede abrir y cerrar de manera intermitente en condiciones normales, sin que en la célula se induzca la apoptosis y únicamente con el objetivo de mantener en estado estable el gradiente de protones y el potencial de membrana. Lo anterior se corroboró cuando el PTPM abierto fue tratado con EGTA (ácido tetra acético etilenglicol) para quelar el calcio, observándose que el poro inmediatamente se cierra atrapando el EGTA en la matriz mitocondrial. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo y más puntualmente durante la reoxigenación o reperfusión, se produce un desbalance en los niveles de Ca^{2+} citosólico promoviendo la apertura del PTPM, estado que se mantiene hasta culminar en la muerte celular o apoptosis (Crompton y Costi, 1990). Lo anterior confirma que la frecuencia de la apertura transitoria del PTPM está determinada por las concentraciones de calcio citosólico y que la captación mitocondrial de este catión, es un mecanismo de protección para amortiguar la sobrecarga celular (Al-Nasser y Crompton, 1986).

2.2.2. Enzimas Oxidorreductasas Alternas.

Las enzimas oxidorreductasas alternas se clasifican dentro de los MDM intrínsecos, y son proteínas monoméricas que se encuentran en la MIM formando parte de una cadena respiratoria ramificada (Figura 4). Cada una de estas proteínas son componentes alternos a alguno de los complejos respiratorios de la cadena respiratoria clásica, favorecen el desacoplamiento mitocondrial debido a que permiten mantener el flujo de los electrones, sin que haya bombeo de protones hacia el espacio intermembranal, por lo que no contribuyen a la formación de $\Delta\Psi m$, disminuyendo la síntesis de ATP y evitando la sobreproducción de EROS (Nicholls y Ferguson, 2003).

La enzima alterna NADH deshidrogenasa tipo II (NADH2) se puede encontrar ubicada tanto en la cara externa como interna de la MIM. La NADH2 es una enzima

complementaria al complejo I, utiliza como sustrato el NADH proveniente del citosol (NADH2 externa), o de la matriz mitocondrial (NADH2 interna), oxidándolo para ceder los electrones a la ubiquinona para reducirla a ubiquinol. La actividad de esta enzima es dependiente de calcio, ya que en su estructura contiene los dominios EF-hand que son de unión a calcio y su actividad no es inhibida por la flavona, que es el inhibidor de la NADH deshidrogenasa I (Bonner y Vos, 1961; Rasmusson et al., 1999; Juárez et al., 2004; Kerscher et al., 2008).

Se ha observado que la NADH2 se puede encontrar activa al mismo tiempo que el complejo I o en ausencia de este, también puede expresarse en conjunto con otras proteínas desacoplantes como la AOX o las UCPs como se ha reportado en *Arabidopsis thaliana*, (Clifton et al., 2005). La NADH2 también se ha reportado en otros organismos como los hongos *Yarrowia lipolytica* y *Ustilago maydis*, así como en *Neurospora crassa*, cuya proteína tiene una masa molecular de 64 kDa, así como los dominios EF-hand (Melo et al., 1999; Veiga et al., 2003; Juarez et al., 2004). Por su parte, en las mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encontraron tres NADH2 que funcionan en ausencia del complejo I; mientras que por el contrario en la levadura *Debaryomyces hansenii* se reportó la presencia de la NADH2 al mismo tiempo que la NADH deshidrogenasa I (de Vries y Grivell, 1988; Kerscher et al., 2008; Cabrera-Orefice et al., 2014a).

La enzima glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDHmit) es una proteína que también puede formar parte de las cadenas respiratorias ramificadas aún sin ser alterna a uno de los compuestos respiratorios. Esta enzima se encuentra en la MIM y usa como sustrato al glicerol-3-fosfato (G3P) que proviene del citosol, ya que este es impermeable a la MIM (Klimgenber, 1970; Figura 4). El G3P es deshidrogenado a dihidroxiacetona fosfato por la GPDHmit, reduciendo el FAD^+ a $FADH_2$ y cediendo los electrones a la ubiquinona para reducirla a ubiquinol, manteniendo activa la CTE pero sin aportar protones a la formación de $\Delta\Psi m$ (Yeh et al., 2008).

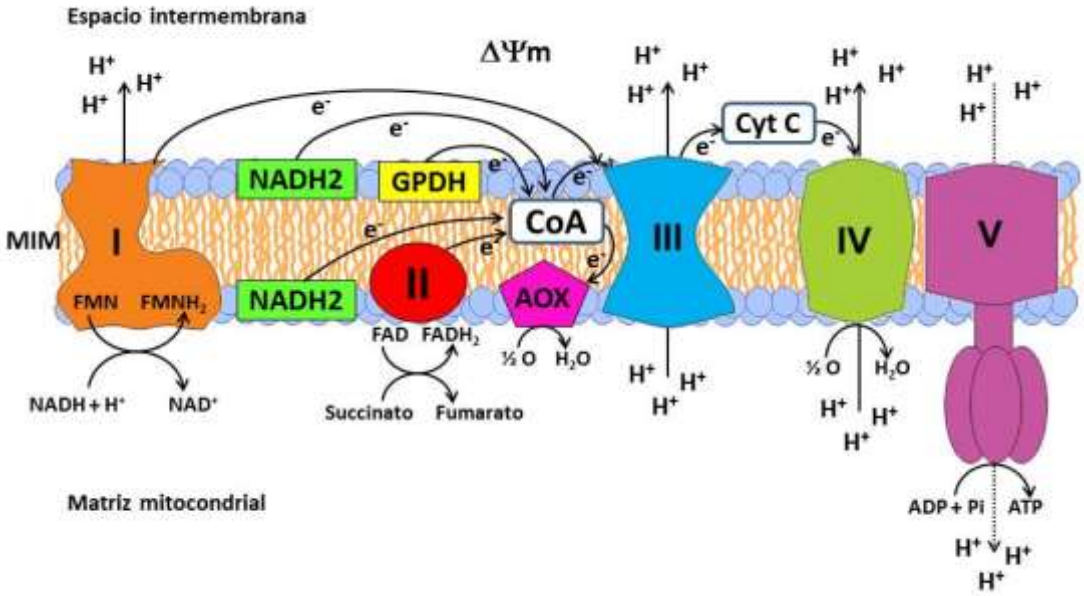


Figura 4. Cadena de transporte de electrones ramificada y fosforilación oxidativa. I: NADH deshidrogenasa I. II: Succinato deshidrogenasa. III: Citocromo b reductasa. IV: Citrocromo c oxidasa. V: ATP sintasa. NADH2: NADH deshidrogenasa tipo II. GPDH: Glicerol fosfato deshidrogenasa. AOX: Oxidasa alterna. CoA: Ubiquinona. Cyt C: Citocromo C. ΔΨm: Potencial transmembranal mitocondrial. MIM: Membrana interna mitocondrial.

La GPDHmit tiene una isoenzima que se localiza en el citosol (GPDHcit) que cataliza la conversión de G3P a 1,3 bifosfoglicerato en la vía de la glucólisis. La GPDHmit se puede distinguir de la GPDHcit por su masa molecular, ya que se ha reportado en la levadura *S. cerevisiae* que la GPDHcit es de ≈ 42 kDa, mientras que la GDPHmit es de ≈ 69 kDa, y sus secuencias de nucleótidos no presentan similitud entre ellas (Albertyn et al., 1992; Albertyn et al., 1994); mientras que en la rata *Rattus norvegicus* se observó que la GPDHcit (GenBank NP_071551.2) tiene una masa molecular de ≈ 42 kDa y la GPDHmit (GenBank NP_036868.1) de ≈ 80.9 kDa y tampoco hay similitud entre ellas. Se ha reportado que la diferencia en el tamaño entre una enzima y la otra se debe a que la GPDHmit funciona como un dímero, ya que gran parte de los aminoácidos de la proteína son hidrofóbicos y al adoptar la estructura terciaria se forma el sitio de unión al FAD^+, y al unirse de forma dimérica se forma el sitio de unión al G3P y a la ubiquinona. También se ha demostrado que la GPDHmit contiene los dominios EF-hand de unión al calcio, por lo que funciona en presencia de este catión (Yeh et al., 2008).

La GPDHmit se ha reportado en mamíferos como el ratón *R. norvergicus* y el bovino *B. taurus* con masas moleculares de ≈ 80.9 y 80.7 kDa, respectivamente. Así mismo esta proteína sido reportada en la levadura *D. hansenii* con un tamaño de ≈ 72.5 kDa, misma que se sabe está involucrada en la respuesta osmorreguladora de esta levadura (Zimin et al., 2009; Mráček et al., 2014; Cabrera-Orefice et al., 2014a).

Otra proteína que se considera como parte de una cadena respiratoria ramificada es la AOX. Esta proteína es alterna al complejo IV o citocromo oxidasa, se localiza en la cara interna de la MIM, recibe los electrones de la ubiquinona y reduce media molécula de oxígeno a agua (Moore y Siedow, 1991; Figura 4). Se ha reportado que la AOX es una enzima insensible al cianuro a diferencia del complejo IV, pero si es inhibida por el ácido salicilhidroxámico (SHAM), el propil galato (PG) y octil galato (OG) (Siedow y Umbach, 1995). En 2013 se publicó la estructura cristalográfica de la AOX de *Trypanosoma brucei*, se sabe que esta proteína es monomérica, cuenta con un sitio activo formado por centros dihierro, cuatro ácidos glutámicos y dos histidinas que coordinan el centro dihierro. El sitio de unión a la ubiquinona no está bien establecido, sin embargo se cree que la Tyr198 es la responsable de su unión. Se observó además que la cavidad que une al inhibidor está localizada entre las hélices alfa 1 y 4 (Shiba et al., 2013).

La presencia de las AOX se ha reportado principalmente en los hongos como por ejemplo, en *Neurospora crassa* con una masa molecular de 41.37 kDa (GenBank No. AAC37481.1), mientras que en *Aspergillus niger* se ha reportado con una masa de 40.18 kDa (GenBank No. BAA32033.2). En los invertebrados se ha reportado la AOX del parásito *T. brucei* (GenBank No. AAB46424.2) con una masa de 37.59 kDa, mientras que la AOX del molusco *Crassostrea gigas* (GenBank No. ACL31211.1) es de 38.19 kDa (Chaudhuri et al., 1996; Kirimura et al., 1999; Tanton et al., 2003).

Debido a que la AOX no bombea protones no contribuye a la formación de ΔΨm, por lo que en presencia esta enzima la síntesis de ATP disminuye como se ha reportado en plantas (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Sin embargo, al parecer la función de AOX varía por especies pues se ha reportado que en los hongos como *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia homeocarpa*, la inhibición de la AOX genera un colapso inmediato en el ΔΨm provocando la

disminución de la síntesis de ATP, lo que indica que la AOX funciona de forma contraria a lo reportado en plantas (Mizutani et al., 1996; Joseph-Horne et al., 1998). La expresión de la AOX también depende de la etapa de desarrollo del organismo como se ha reportado en el caso de *Trypanosoma brucei*, cuando el parásito se encuentra en forma procíclica en el intestino de la mosca tse-tse, las mitocondrias de éste cuentan con una respiración dependiente de la citocromo c oxidasa, pero cuando el organismo es depositado en la sangre de los humanos, el complejo IV se pierde y en su lugar se expresa la AOX (Chaudhuri et al., 2006).

2.4. Hipoxia-Reoxigenación.

El oxígeno es esencial para los procesos metabólicos asociados con la obtención de energía y el crecimiento, ya que es el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, de él depende la síntesis de ATP y por ende, la cantidad de energía disponible para realizar un trabajo biológico (Mathews, 2003). Además se sabe que la mitocondria es un mediador importante de la muerte celular cuando los tejidos son sometidos a condiciones de hipoxia y más aún cuando son reoxigenados.

Así, la reducción en la concentración de oxígeno ambiental (hipoxia) produce un efecto paralelo en el animal, disminuyendo la cantidad de moléculas de oxígeno que entran a la célula y que quedan disponibles para ser utilizados por la mitocondria (Scheffler, 1999; Gnaiger et al., 2000). Un evento similar a la hipoxia-reoxigenación es la isquemia-reperfusión, fenómeno que ocurre durante un paro cardíaco en los vertebrados. La isquemia consiste en la baja de la presión sanguínea y como consecuencia una baja disponibilidad de oxígeno en los tejidos (hipoxia). Durante la isquemia se activa la glucólisis anaerobia, lo que conlleva al aumento en la concentración ácido láctico y promueve la disminución del pH intracelular (Halestrap et al., 1998). En estas condiciones, la célula no es capaz de activar los canales de Na^+/H^+ para restaurar el pH debido a que la Na^+/K^+ ATP-sintasa se encuentra inhibida por la falta de ATP, sin embargo, para contrarrestar este efecto se activan los canales de Na^+/Ca^{2+} por lo que los

iones de calcio entran a la célula pudiendo mantener por un corto periodo la homeostasis celular. Aunado a esto se degradan nucleótidos de adenina provocando un aumento en la cantidad de fosfato libre lo que sensibilizará al PTPM. La persistencia de todos estos eventos durante un periodo prolongado puede causar daño celular irreversible (Silverman y Stern, 1994).

Por su parte, durante la reperfusión se restablece el flujo sanguíneo y por lo tanto la irrigación de oxígeno a los tejidos, sin embargo esta puede exacerbar los daños producidos por la isquemia, observándose cambios en la morfología celular y necrosis. Con el aumento en concentración de oxígeno, la mitocondria es capaz de regenerar la respiración y el potencial de membrana para sintetizar ATP, sin embargo esto provoca a su vez una rápida sobrecarga de calcio hacia la mitocondria. De manera adicional, durante la reperfusión los niveles de oxígeno suben abruptamente por lo que la eficiencia de la cadena de transporte de electrones se observa disminuida ya que no es capaz de reducir todo el O_2 a agua, esto provoca que la mitocondria genere EROS rápidamente (Silverman y Stern, 1994). Lo anterior junto con la sobrecarga de calcio inducirá la formación del PTPM y su apertura, aumentando la permeabilidad de la MIM y provocando que la célula entre en estado apoptótico como se describió anteriormente.

2.5. El Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* y *Artemia franciscana.*

A lo largo de su historia evolutiva, los crustáceos han logrado invadir una amplia diversidad de hábitats, para lo cual han tenido que desarrollar estrategias de adaptación fisiológica y/o de comportamiento con el objetivo de sobrevivir a condiciones ambientales cambiantes (Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003). La temperatura, salinidad, contaminación del ambiente, el contenido de nutrientes en el medio y las fluctuaciones en la concentración de oxígeno disuelto en el agua marina, son factores determinantes de la sobrevivencia y adaptación de estas especies al medio, teniendo como resultado en algunos casos, efectos negativos en la salud de los organismos y

llegando a ser la causa de altas tasas de mortalidad (Lightner et al., 1998; Kautsky et al., 2000).

El ambiente marino presenta gran variabilidad en las concentraciones de oxígeno disuelto, ya que el agua contiene treinta veces menos O_2 por litro y la difusión de este es ocho mil veces más lenta que en el aire (Schmidt-Nielsen, 1975). Se sabe que en estanques de cultivo camaronícola los niveles de oxígeno presentan una variación diurna generando condiciones de normoxia e hipoxia en un rango de 24 h. Estudios previos han reportado que durante el día, la concentración de oxígeno disuelto puede llegar hasta 8 mg/L, atribuyéndole principalmente este aumento a la producción de O_2 por la actividad fotosintética de las microalgas. En la noche, los niveles de oxígeno pueden descender hasta 1 mg/L debido a que no se produce O_2 por fotosíntesis, al consumo de oxígeno del camarón, fitoplancton y otros organismos y a las reacciones de oxidación de la materia orgánica (Le Moullac et al., 1998; Grecay et al., 2002; Puente-Carreón, 2009).

Se ha reportado que el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es capaz de sobrevivir a concentraciones de oxígeno disuelto tan bajas como 0.2 mg/L, mientras que el camarón tigre asiático *Penaeus monodon* a 0.9 mg/L (Pérez-Rostro et al., 2004). Investigaciones previas han demostrado que los camarones presentan un ajuste metabólico frente a una baja de oxígeno disponible, el cual está relacionado directamente con la función mitocondrial (Martínez-Cruz et al., 2012; Jiménez-Gutiérrez et al., 2014).

Por otro lado *Artemia franciscana* es un crustáceo capaz de sobrevivir en condiciones ambientales extremas como hipersalinidad y cambios en la concentración de oxígeno disuelto en el agua (Abatzopoulos et al., 2002). Además, es capaz de modificar su reproducción dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre. Si las condiciones son óptimas para este organismo, presenta reproducción ovovivípara y los embriones saldrán en estado de nauplios; sin embargo, si las condiciones no son favorables el desarrollo será ovíparo y la hembra expulsará al embrión en forma de gástrula enquistada y entrará en un estado de diapausa o dormancia obligada (Jackson y Clegg et al., 1996).

En la etapa de quiste, el embrión se encuentra en anoxia (ausencia de oxígeno) y puede sobrevivir durante años en esa condición, es por esto que la mayoría de los estudios en artemia han sido realizados bajo estas condiciones. Se ha reportado que los quistes de

artemia al encontrarse en anoxia presentan un arresto energético ya que disminuyen drásticamente su metabolismo, así como la utilización y síntesis de ATP (Hand y Hardewig, 1996; Clegg et al., 1997). Además se ha observado que se acumulan carbohidratos dentro del quiste, lo que les permiten modular la osmorregulación (Clegg y Conte, 1980), disminuyen la degradación de proteínas regulando la ubiquitinación (Anchordouguy y Hand, 1995), contienen importantes proteínas de estrés como las chaperonas de HSP70 y HSP90 (Clegg et al., 2000), y cuentan además con una proteína llamada "artemin" que previene la agregación proteínica (Chen et al., 2007).

Cuando el ambiente cambia y se presentan las condiciones óptimas de temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto en agua, los quistes eclosionan permitiendo liberar al nauplio al ambiente marino, en donde tendrá que enfrentarse a cambios ambientales extremadamente bruscos, especialmente en la concentración de oxígeno disuelto (Clegg y Conte, 1980).

Algunos estudios en otras especies de invertebrados marinos han analizado los efectos de la reoxigenación después de un periodo de hipoxia, encontrando mecanismos de adaptación mitocondrial para reducir el gasto energético celular y contrarrestar el efecto de la elevada producción de EROS (Abele et al., 2007).

Hasta la fecha, se han realizado pocos estudios de los mecanismos de desacoplamiento mitocondrial en los crustáceos. Se ha reportado que la transición de la permeabilidad no es inducida por sobrecargas de calcio en las mitocondrias de los branquiópodos *Artemia fransciscana* y los camarones *Lepidophthalmus louisianensis, Crangon crangon* y *Palaemon serratus*, así los autores relacionan la supervivencia de estas especies en condiciones de estrés oxidativo con un PTPM no regulado por calcio (Menze et al., 2005; Holman y Hand, 2009; Konrad et al., 2012).

Respecto a la presencia de enzimas oxidorreductasa alternas en invertebrados marinos se han reportado en especies como el ostión *C. gigas*, la babosa de mar *Aplysia californica*, y la almeja *Mercenaria mercenaria* (McDonald y Vanlerberghe, 2004), sin embargo, en los crustáceos estas enzimas no han sido reportadas.

Con base en lo establecido anteriormente surgen varias interrogantes cuyas respuestas aportarán información para entender cómo el camarón blanco *L. vannamei* es capaz de sobrevivir a condiciones severas de hipoxia, y cómo el efecto de la reoxigenación puede

afectar la función mitocondrial, tanto en el camarón como en la artemia. Así, las preguntas científicas planteadas en este estudio son:

1) ¿Las mitocondrias de los crustáceos, cuentan con algún mecanismo de desacoplamiento?

2) ¿Las mitocondrias del camarón *L. vannamei* cuentan con las proteínas que se cree participan en la transición de la permeabilidad?

3) ¿Existe la transición de la permeabilidad en las mitocondrias de *L. vannamei*?

4) ¿Las mitocondrias del camarón y de la artemia cuentan con enzimas deshidrogenasas y oxidasas alternas que les permitan desacoplarse?

3. HIPÓTESIS

Si las mitocondrias de los crustáceos no cuentan con un mecanismo de desacoplamiento fisiológico como la transición de la permeabilidad, entonces existirán otros mecanismos como las enzimas alternas que desacoplan la fosforilación oxidativa, permitiéndoles controlar su gasto energético y sobrevivir en condiciones de estrés oxidativo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Determinar la existencia del fenómeno de la transición de la permeabilidad en las mitocondrias del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, y evaluar la presencia de deshidrogenasas y oxidasas alternas en las mitocondrias de *A. franciscana y L. vannamei.*

4.2. Objetivos Específicos.

1. Identificar las posibles proteínas involucradas en el mecanismo de la transición de la permeabilidad mitocondrial de *L. vannamei*.
2. Determinar la presencia del fenómeno de transición de la permeabilidad en las mitocondrias del camarón blanco *L. vannamei.*
3. Caracterizar la actividad de la cadena respiratoria en las mitocondrias de *A. franciscana* y *L. vannamei* en presencia de diferentes sustratos e inhibidores.
4. Determinar la presencia y actividad de las enzimas alternas mitocondriales y la transición de la permeabilidad en diferentes estadios del ciclo de vida y durante la hipoxia y reoxigenación de *A. franciscana* y *L. vannamei*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Detección de Transcritos y/o Proteínas Mitocondriales Relacionadas con la Transición de la Permeabilidad en el Camarón Blanco

Se realizó una búsqueda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei,* de las proteínas hasta ahora identificadas con posible participación en la transición de la permeabilidad mitocondrial de acuerdo a los trabajos previos realizados en otras especies y se realizó el análisis bioinformático correspondiente. Se identificaron secuencias tanto de transcritos, como de proteínas reportadas en la base de datos del Genbank (Altschull et al., 1990), así como en el transcriptoma del camarón blanco *L. vannamei* reportado por Gaffhari y colaboradores (2014). La búsqueda incluyó a las siguientes proteínas: ANT, OSCP, PiC, ATPc, CyP-D, VDAC, y la ATPasa mitocondrial del camarón.

De todas las proteínas anteriores, solo el VDAC no pudo ser detectado en el camarón por su transcrito, por lo que se procedió a confirmar su existencia por medio de un Western-blot detectando la proteína como se describe en el apartado 5.10.

5.2. Obtención de Oganismos Experimentales de *Artemia franciscana y Litopenaeus vannamei* y Aislamiento de sus Mitocondrias

Para cubrir los objetivos 2, 3 y 4 de este trabajo fue necesario aislar las mitocondrias tanto de *A. franciscana*, como del camarón *L. vannamei*. Para esto, se adquirieron quistes deshidratados de *Artemia franciscana* de la compañía Brine Shrimp Direct, Inc. (Utah, USA) y se colocaron en condiciones óptimas para la eclosión de los nauplios de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Se colocó 1 g de quistes dentro de un recipiente de plástico de forma cónica, el cual contenía 1 L agua a marina (25 ppm) con

aireación, temperatura (25 °C), y luz constante durante 24 h. Posteriormente los nauplios de *A. franciscana* fueron separados del corion desprendido y de los quistes no eclosionados mediante sifoneo y filtración. Los nauplios de artemia se mantuvieron durante 30 días en las mismas condiciones hasta su estado adulto. Los organismos fueron alimentados dos veces al día con una solución de alga *Spirulina plantensis* en polvo disuelta en agua marina (dilución 1:50 [p/v]). Ambos estadios de la artemia, nauplio y adulto, fueron utilizados para aislar las mitocondrias y hacer los experimentos descritos más adelante en este trabajo.

Las postlarvas y adultos del camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei* se obtuvieron de granjas acuícolas y libres de patógenos. El peso promedio de las postlarvas fue de 0.6 g, mientras que en los camarones adultos fue de 12 g. Los organismos fueron aclimatados durante siete días en condiciones de laboratorio antes ser sometidos a los ensayos en diferentes condiciones. El mantenimiento se realizó en tinas con agua marina (35 ppm), temperatura de 25 °C y 5 mg/L de oxígeno disuelto. Los organismos fueron alimentados a saciedad dos veces al día con alimento pelletizado comercial.

Las tinas de mantenimiento tanto de artemia, como de camarón, se sifonearon diariamente para eliminar los residuos de alimento y desechos fecales y se hizo un recambio del 70% del agua cada dos días. Se utilizó un corazón de bovino donado por el rastro municipal de Hermosillo, y se procesó de forma inmediata para obtener mitocondrias aisladas como sistema control en los experimentos subsecuentes.

El aislamiento de las mitocondrias de artemia y camarón, en los dos estadios de crecimiento se realizó mediante centrifugación diferencial según la metodología descrita por Rodriguez-Armenta et al. (2018). Se utilizó toda la masa corporal para aislar las mitocondrias de los nauplios de artemia, artemia adulta y las postlarvas de camarón, mientras que se disectaron los pleópodos del camarón adulto para la preparación del extracto mitocondrial. Los animales o el tejido fresco se colocaron en 5 volúmenes de buffer de extracción 1 frío, el cual contenía sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, EGTA 1 mM, KCl 150 mM, albúmina sérica de bovino (BSA) 0.5% [p/v] y K-HEPES 20 mM, a pH 7.5. Las muestras se homogenizaron utilizando un homogenizador Dounce, y el homogenizado se centrifugó a 5000 rpm durante 10 seg a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue

descartado y el pellet se resuspendió en dos volúmenes de buffer de extracción 2 frío (sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, EGTA 0.025 mM, KCl 150 mM, BSA 0.5% [p/v] y K-HEPES 20 mM, a pH 7.5). Se realizó un tercer paso de centrifugación a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y este finalmente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. El pellet se recuperó y se disolvió en 1 volumen de buffer de extracción 2 frío.

Las mitocondrias de corazón de bovino se aislaron por el método de centrifugación diferencial reportado por Pallotti (2007) con algunas modificaciones. El corazón de bovino (250 g) fue cortado en cubos pequeños y homogenizado en una licuadora con 5 volúmenes de buffer de extracción 3 frío (sacarosa 250 mM, KCl 150 mM, EGTA 1 mM, trizma-base 10 mM, BSA 0.1% [p/v], PMSF 1 mM, a pH 7.4). Posteriormente el homogenizado fue filtrado a través de tres capas de tela de gasa de algodón y la mezcla recuperada se centrifugó como se describió para las mitocondrias de artemia y camarón, utilizando únicamente el buffer de extracción 3 para la resuspención de las mitocondrias de bovino. La cuantificación de la proteína mitocondrial soluble para artemia, camarón y bovino se realizó mediante el método de Bradford (1976), y la absorbancia se determinó una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (iMark Microplate Reader Bio-Rad).

5.3. Evaluación del Acoplamiento Mitocondrial Mediante la Determinación de la Tasa de Consumo de Oxígeno.

Inmediatamente después de aislar las mitocondrias de ambas especies, se evaluó el consumo de oxígeno mitocondrial en un oxímetro acoplado a un electrodo tipo Clark (Strathkelvin instruments model 782, Scotland), en el cual se colocó el buffer de respiración que contenía, sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM y K-HEPES 20 mM, a pH 7.5. Además se agregó $MgCl_2$, buffer de tris-fosfato (Pi) a una concentración final de 1 mM y 10 mM, respectivamente y 200 μg de proteína mitocondrial. Se determinó el estado acoplado de las mitocondrias aisladas utilizando

succinato 10 mM como sustrato respiratorio en un estado no fosforilante (IV) en ausencia de ADP y posteriormente se agregó ADP 0.1 mM para evaluar el estado fosforilante (III). Finalmente se utilizó el agente desacoplante CCCP (carbonil cianida m-clorofenil hidrazona) 0.6 μM para inducir el estado desacoplado de las mitocondrias. Se calculó el control respiratorio (CR) como el radio de consumo de oxígeno en nanoátomogramo de oxígeno por mg de proteína mitocondrial por minuto (natgO / mg de proteína·minuto) en el estado III/estado IV (Cabrera-Orefice et al., 2014b). Esta metodología permitió evaluar si las mitocondrias se encontraban intactas, respirando y en su estado acoplado.

5.4. Evaluación de la Captación de Calcio Extra Mitocondrial.

Para determinar la presencia del fenómeno de transición de la permeabilidad en las mitocondrias de la artemia y el camarón, la primera prueba experimental realizada fue la captación de calcio extra mitocondrial, mismo que se evaluó utilizando la sonda fluorescente Fluo-5N como lo reportaron Menze et al. (2005), con el fin de identificar si la sobrecarga de calcio induce este fenómeno en las dos especies y sus etapas larvales ó adultas; como control de utilizaron las mitocondrias de corazón de bovino.

Se utilizaron mitocondrias energizada y no energizadas, así como un control sin mitocondrias. Las reacciones se realizaron en microplacas oscuras para fluorescencia y las mezclas de reacción incluían el buffer de respiración, sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM y K-HEPES 20 mM, a pH 7.5, además de tris-fosfato (Pi) 10 mM, rotenona 5 μM, oligomicina 5 μM, la sonda Fluo-5N 5 μM y 200 μg de proteína mitocondrial en un volumen final de 200 μL.

Las mitocondrias energizadas se evaluaron en presencia de succinato 10 mM como sustrato respiratorio. Una vez realizada la mezcla de reacción se tomó la lectura de fluorescencia desde 0 μM con adiciones de 5, 50 y de 100 hasta 1000 μM de calcio, registrando los cambios en la fluorescencia entre cada adición a una longitud de onda de 485 nm (excitación) y 535 nm (emisión) usando un lector de microplaca Varioskan™

LUX multimode. Los resultados se reportaron como porcentaje de fluorescencia máxima (%Fmax) utilizando la fórmula F=(K*X*Fmax)/(1+K*X), reportada por Menze et al. (2005), donde se despejó la Fmax que corresponde a la fluorescencia máxima, F es la fluorescencia detectada, K es la constante de unión estequiométrica del calcio a la sonda. K= 1/kd, donde kd es la constante de disociación estimada en aproximadamente 100 μM.

De manera adicional, también se evalúo el efecto del ATP sobre la captación de calcio extramitocondrial, para determinar si la presencia de éste promueve la transición de la permeabilidad. Se utilizaron mitocondrias no energizadas y energizadas con succinato 10 mM y la mezcla de reacción se realizó como se mencionó anteriormente; la captación de calcio se evaluó desde 0 μM y se agregaron 100 μM de calcio, seguidos de esto una adición de ATP 2 mM y nuevamente 100 μM de calcio. Se agregó un control con sólo dos adiciones de 100 μM de calcio sin ATP. Entre cada adición se registró el cambio de la fluorescencia emitida y los resultados se reportaron en unidades de fluorescencia relativa (UFR).

5.5. Hinchamiento Mitocondrial.

El hinchamiento mitocondrial se evaluó para determinar si en presencia de calcio y ATP las mitocondrias de los crustáceos entrarían en un estado de transición de la permeabilidad. Este fenómeno se determinó espectrofotométricamente midiendo la dispersión de la luz después de la adición de calcio y ATP en las mitocondrias de artemia, camarón y bovino. La reacción se realizó en una microplaca transparente y la mezcla de reacción incluyó sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM y K-HEPES 20 mM, a pH 7.5, tris-fosfato (Pi) 10 mM, succinato 10 mM, rotenona 5 μM, y 200 μg de proteína mitocondrial en un volumen de 200 μL.

Para inducir el hinchamiento se agregó $CaCl_2$ 250 μM o ATP 2 mM, transcurridos 4 min de lectura se adicionó el ionóforo de calcio A23187 (4-Bromo-calcimicina) 0.8 μM, para iniducir el hinchamiento de las mitocondrias. Los cambios en la densidad óptica (ΔDO)

fueron detectados a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplaca Varioskan™ LUX multimode (Menze et al., 2005).

5.6. Potencial Transmembranal de las Mitocondrias (ΔΨm).

Las mitocondrias al entrar en un estado de transición de la permeabilidad sufren el abatimiento del potencial transmembranal (ΔΨm), por lo cual este se determinó utilizando la safranina-O, siguiendo los cambios en la fluorescencia a longitudes de onda de 495 nm de excitación y 586 nm de emisión usando un lector de microplaca Varioskan™ LUX multimode (Figueira et al., 2011). El ΔΨm se evaluó en las mitocondrias de artemia y camarón en etapas larvales y adultas. Se utilizaron microplacas oscuras para medir las reacciones que incluían el buffer de respiración sacarosa 0.125 M, sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM y K-HEPES 20 mM, a pH 7.5, tris-fosfato (Pi) 10 mM, succinato 10 mM, safranina-O 10 μM y 5 mg/mL de proteína mitocondrial en un volumen final de 200 μL. El abatimiento del potencial transmembranal se indujo agregando CCCP 1.5 μM (control positivo), o adicionando $CaCl_2$ 250 μM o ATP 2 mM. Los resultados se reportaron en unidades de fluorescencia relativa (UFR).

5.7. Determinación del Efecto de Iones, Fosfato y ATP sobre el Consumo de Oxígeno Mitocondrial.

Otra prueba experimental realizada para inducir la transición de la permeabilidad en las mitocondrias de la artemia y el camarón fue evaluar el efecto de la adición, no sólo de calcio (Ca^{2+}), sino de otros iones y compuestos como el cobre (Cu^{2+}), potasio (K^{+}), sodio (Na^{+}), fosfato (Pi) y ATP sobre el consumo de oxígeno mitocondrial con el fin de

evidenciar si alguno de estos compuestos, de manera individual induce la apertura del PTPM.

En cada reacción se utilizó buffer de respiración y se agregó succinato 10 mM como sustrato respiratorio, $MgCl_2$ 1 mM y en su caso, el Pi 10 mM sólo se agregó al hacer la evaluación de Ca^{2+}, Cu^{2+}, K^+, Na^+ y ATP.

El efecto del calcio y el cobre sobre el consumo de oxígeno se evaluó haciendo adiciones de $CaCl_2$ 3 μM y $CuCl_2$ 3 μM, mientras que la evaluación del efecto del K^+ y Na^+ se hizo con adiciones de KCl 10 mM y NaCl 10 mM. Para determinar el efecto del Pi se agregaron de manera independiente varias concentraciones (0.5, 5 y 10 mM), mientras para el ATP se hicieron adiciones de ATP (0.5 mM). Al final de todas las adiciones de los diferentes compuestos se indujo el desacoplamiento mitocondrial con CCCP (0.6 μM) como un control positivo. Todos los trazos se hicieron agregando 1 mg/mL de proteína mitocondrial en un volumen final de 200 μL y cada ensayo se realizó por triplicado.

5.8. Identificación de Enzimas Oxidorreductasas Alternas Mitocondriales.

Se determinó la posible presencia de diferentes enzimas alternas en las mitocondrias de la artemia y el camarón por oximetría. Para detectar deshidrogenasa alterna NADH2, se usó NADH 1 mM como sustrato respiratorio adicionado junto con el buffer de respiración, $MgCl_2$ y Pi. Se agregaron 200 μg de proteína mitocondrial y para acelerar el consumo de oxígeno se utilizó ADP 0.1 mM. Por su parte, la posible presencia de una GPDH mitocondrial se evaluó utilizando glicerol-3-fosfato 10 mM como sustrato respiratorio, se agregó la proteína mitocondrial y posteriormente se agregó el CCCP 0.6 μM para acelerar el consumo de oxígeno, de manera adicional se adicionaron los inhibidores rotenona 50 μM y antimicina A 5 μM para inhibir los complejos I y III, respectivamente y finalmente se agregó el cianuro (KCN) 100 μM para inhibir el complejo IV (Cabrera-Orefice et al., 2014a).

Para identificar la presencia de una AOX se agregó succinato 10 mM como sustrato al buffer de respiración, se agregó la proteína mitocondrial y después se aceleró el consumo de oxígeno con CCCP 0.6 μM. Posteriormente se utilizó octil galato 50 μM como inhibidor específico de la AOX y KCN 100 μM como inhibidor del complejo IV (Guerrero-Castillo et al., 2009). Todos los trazos se hicieron por triplicado agregando 1 mg/mL de proteína mitocondrial en un volumen final de 200 μL.

5.9. Separación de las Proteínas Mitocondriales en Geles hrCN-PAGE y Detección de la Actividad de los Complejos Respiratorios.

La actividad de los complejos respiratorios y las enzimas NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo C oxidasa (COX), ATP sintasa y la lanzadera de electrones glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDHmit) se evaluó en geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución (hrCN-PAGE). Se utilizaron las mitocondrias aisladas de nauplios de artemia, pleópodos de camarón adulto y corazón de bovino (control). Se prepararon geles hrCN-PAGE de gradiente del 4-12% como lo reportaron Wittig et al. (2007). La mezcla para el gel separador al 4% contenía 290 μL de acrilamida (mezcla de acrilamida 48.5% y bis-acrilamida 1.5%), 1170 μL de buffer 3X nativo (ácido aminocaproico 1.5 M, imidazol 75 mM, a pH 7.0 ajustado con HCl), 250 μL de glicerol al 80%, 1770 μL de agua, 6 μL de TEMED y 18 μL de persulfato de amonio (APS) al 10%. La mezcla para el gel separador al 12% contenía 870 μL de la mezcla de acrilamida, 1170 μL de buffer 3X nativo, 1 mL de glicerol al 80%, 440 μL de agua, 6 μL de TEMED, 18 μL de APS al 10%. La mezcla para el concentrador, contenía 250 μL de la mezcla de acrilamida, 1 mL de buffer 3X nativo, 1750 μL de agua, 6 μL de TEMED y 18 μL de APS al 10%.

Las mitocondrias aisladas de las tres especies se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C y el pellet fue resuspendido en 100 μL de buffer de lavado (sorbitol 250 mM, imidazol 25 mM, a pH 7.0). Se realizó una segunda centrifugación a 14,000 rpm por 10

min a 4 °C y el pellet se resuspendió en 50 μL de buffer sin sal (sacarosa 250 mM, trizma base 10 mM, a pH 7.0). Posteriormente a las mitocondrias lavadas se les agregó 1 g de dodecil-D-maltósido (LM) o digitonina por gramo de proteína y fueron solubilizadas en un vortex durante 1 h a 4 °C.

Después de la solubilización las mitocondrias se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 h a 4 °C, recuperando el sobrenadante y se cuantificó la proteína mitocondrial soluble mediante el método de Bradford (1976).

Un total de 250 μg de proteína mitocondrial se separaron en un gel hrCN-PAGE de gradiente del 4-12%. Para la electroforesis se utilizó un buffer cátodo que contenía tricina 50 mM, imidazol 7.5 mM, dodecil-D-maltósido 0.01% y deoxicolato de sodio 0.05%, mientras que el buffer anódo contenía imidazol 25 mM, a pH 7.0 (Wittig et al., 2007). Una vez separadas las proteínas mitocondriales se detectó de manera independiente la actividad en gel de los complejos respiratorios y enzimas de interés.

Para detectar la actividad de enzimas deshidrogenasas, los geles se incubaron en una solución que contenía trizma base 10 mM, a pH 7.0, bromuro de nitro azul tetrazolio (NBT) a una concentración de 5 mg/mL, y los sustratos para cada enzima. Para la actividad de NADH deshidrogenasa (complejo I) se utilizó como sustrato NADH 1 mM, mientras que para la actividad de succinato deshidrogenasa (complejo II) se agregó succinato 5 mM, a pH 7.4 como sustrato, por último para detectar la actividad de la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial se utilizó glicerol-3-fosfato 5 mM, a pH 7.0 como sustrato (Zerbetto et al., 1997).

La actividad de citocromo C oxidasa se detectó incubando el hrCN-PAGE en una mezcla de buffer de fosfatos 50 mM, a pH 7.4, 10 mg de citocromo C reducido disuelto en 1 mL de buffer de fosfatos 50 mM y diaminobencidina a una concentración de 1 mg/mL (Wittig y Schägger, 2007).

La actividad en gel de la ATPasa se evaluó incubando el gel hrCN-PAGE en el buffer de incubación (glicina 270 mM, trizma base 35 mM, a pH 8.4) durante 1 h y posteriormente se incubó en el buffer de actividad (glicina 270 mM, trizma base 35 mM, a pH 8.4, ATP 6 mM, $MgSO_4$ 14 mM, $Pb(NO_3)_2$ 0.2%) durante 24 h (Wittig et al. 2007). Todos los geles se agitaron constantemente a temperatura ambiente hasta que se desarrolló la reacción de color, y para detener la reacción el gel se colocó en agua.

5.10. Separación de las Proteinas Mitocondriales en SDS-PAGE e Inmunodetección de VDAC y AOX.

La presencia de la proteína VDAC en las mitocondrias de camarón (apartado 5.1) y la AOX en el extracto mitocondrial de artemia se determinó mediante un ensayo western blot. La proteína mitocondrial de camarón y artemia fue solubilizada con digitonina al 5% en un buffer de ácido 6-aminocaproico 750 mM, imidazol 25 mM, a pH 7. La muestra se mezcló vigorosamente en un vortex durante 40 min a 4 °C y el sobrenadante fue recuperado. Un total de 1 mg de proteína mitocondrial se desnaturalizaron a 96 °C durante 5 min en un buffer de dodecilsulfato sódico (SDS 5X) que contenía trizma base 60 mM a pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.01%. Como marcador de masa molecular se utilizó el Prestained SDS-PAGE estándar Broad Range (BioRad).

La separación de la proteína mitocondrial se llevó a cabo por duplicado en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. El gel separador contenía 3.3 mL de agua, 4 mL de acrilamida (mezcla de acrilamida y bis-acrilamida al 30%), 2.5 mL de buffer trizma base 1.5 M, a pH 8.8, 100 μL de SDS al 10%, 100 μL de persulfato de amonio (APS) al 10% y 4 μL de TEMED. El gel concentrador se realizó mezclando 1.4 mL de agua, 330 μL de acrilamida al 30%, 250 μL de buffer trizma base 1.5 M, a pH 6.8, 20 μL de SDS al 10%, 20 μL de APS al 10% y 2 μL de TEMED.

Un total de 250 μg de proteína se cargaron en cada carril y se corrió la electroforesis durante 2 h a 120 volts. Posteriormente uno de los geles se tiñó con azul de Commassie y visualizada la correcta separación de las proteínas, el segundo gel se transfirió a una membrana de PVDF utilizando buffer de transferencia (glicina 39 mM, trizma base 48.12 mM, etanol 19.8% y SDS 0.038) en un Trans-Blot Semi-Dry Transfer cell (BioRad) a 25 volts durante 15 min (Towbin et al., 1979). La membrana se lavó dos veces durante 5 min con buffer TBS (trizma base 0.05 M, NaCl 0.15 M, Tween 20 2%, a pH 7.2) y se bloqueó con 5% de leche libre de grasa diluida en buffer TTBS (trizma base 0.05 M, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.05%, a pH 7.2), durante toda la noche a 4 °C. Después la membrana se lavó dos veces durante 5 min con buffer TTBS y

posteriormente se incubó con un anticuerpo policlonal anti-VDAC1 de conejo (Santa Cruz Biotechnology) utilizando una dilución 1:1000 (v/v) en buffer TBS por 2 h a temperatura ambiente. Después la membrana se lavó dos veces con buffer TTBS durante 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:2000 (v/v) en buffer TBS por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó dos veces con buffer TTBS y se hizo un último lavado con buffer TBS sin Tween 20 (trizma base 0.02 M, NaCl 0.05 M, a pH 7.6). Finalmente la membrana se incubó con una solución en fresco de 10 mg de diaminobencidina disuelta en 15 mL de buffer TBS y 12 μL de peróxido de hidrógeno para desarrollar el color producto de la reacción de la peroxidasa.

Para la inmunodetección de la AOX se utilizaron mitocondrias aisladas de nauplios de *A. franciscana*, y como controles positivos se usaron las mitocondrias del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, mango *Mangifera indica* y huitlacoche *Ustilago maydis*. La proteína mitocondrial se solubilizó en buffer RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, a pH 7.5, EDTA 1mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%), suplementado con los inhibidores de fosfatasas Na_3VO_4 1 mM, NaF 10 mM, PMSF 1 mM y un coctel de inhibidores de proteasas de Santa Cruz Biotechnology.

Las muestras fueron lisadas en un multi-Vortex V-32 (Biosan, Riga, Latvia) durante 30 min a 4 °C, y después centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y el contenido de proteína soluble se determinó mediante el método de Bradford (1976). Se diluyeron 100 μg de proteína solubilizados en un buffer 4X (trizma base 500 mM, a pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10%, 2-mercaptoetanol 0.05%, azul de bromofenol 0.01%), se desnaturalizaron a 96 °C durante 5 min y posteriormente se colocaron en hielo. En un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% se cargó el volumen total de las muestras y una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF usando un buffer con fosfato de potasio 25 mM, fosfato de sodio 25 mM, trizma base 12 mM, glicina 192 mM, y metanol 20%, a pH 7.0 (Towbin et al., 1979).

La membrana se bloqueó con 5% de BSA en buffer TTBS (trizma base 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, a pH 7.6) durante 1 h a 4 °C y después se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-AOX de *Sauromatum guttatum* (voodoo lily) a una dilución 1:100, con agitación durante toda la noche a 4 °C (Elthon et al., 1989). Posteriormente la

membrana se lavó con buffer TTBS y se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano durante 1 h a 37 °C. Finalmente la membrana se lavó y la detección de las bandas se realizó mediante quimioluminiscencia usando el kit ECL kit (Amersham Biosciences, GE, Healthcare).

5.11. Análisis e Identificación de la GPDHmit Mediante Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS) y Análisis Bioinformático.

Para confirmar la presencia de la proteína GPDHmit en las mitocondrias aisladas de *A. franciscana*, se separó el extracto de proteína soluble en geles hrCN-PAGE como se describió anteriormente y se tiñó con azul de Coomassie al 0.2%. En los geles utilizados para detectar las proteinas con actividad específica de deshidrogenasas (apartado 5.9), la GPDHmit se identificó por su masa molecular, posteriormente se ubicó la posición de la banda que corresponde a la masa molecular y actividad de la GPDHmit en el gel teñido con azul de Commassie y se cortó individualmente. La banda cortada del gel teñido se digirió en gel, para lo cual se destiño la proteína y se redujo con DTT 10 mM disuelto en bicarbonato de amonio 25 mM, seguido de la alquilación de proteínas con iodoacetamida 55 mM. La proteína se digirió con tripsina grado espectrometría de masas (Promega, Madison, WI, USA) durante toda la noche a 37 °C.

Los péptidos obtenidos de la digestión en gel se analizaron mediante LC-MS/MS empleando un cromatógrafo de líquidos nanoACQUITY UPLC System (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido SYNAPT HDMS Q-TOF (Waters) bajo las condiciones reportadas por Joaquin-Ramos et al. (2014) con una modificación: los datos de masa se obtuvieron mediante Adquisición Dependiente de Datos (DDA), alternando la energía de colisión para la fragmentación de los iones precursores. En el modo de baja energía se emplearon 3 eV, mientras que en el de alta energía se empleó una rampa de voltaje de 15-45 eV durante 3 s de integración.

Las proteínas se identificaron por homología con secuencias previas reportadas en bases de datos, por lo que los resultados del análisis LC-MS/MS se emplearon para generar

archivos con extensión .PKL utilizando el programa Protein Lynx Global Server v 2.4 (Waters, Milford MA). Las proteínas se identificaron con los datos de los archivos con extensión .PKL y la ayuda del motor de búsqueda PEAKS Studio v8.0 (Bioinformatics Solutions Inc. Ontario, CAN) utilizando una base de datos generada con las secuencias de proteínas de branquiópodos obtenida de la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI (600,199 secuencias, Enero 2017), además de 1085 secuencias de proteínas correspondientes GPDHs mitocondriales obtenidas del NCBI y 247 secuencias de contaminantes obtenidas del Max Plank Institute of Biochemistry. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: tripsina como proteasa específica, permitiendo la omisión de un sitio de corte; la tolerancia de masa para los iones precursores y para sus iones fragmento fue de 20 ppm y 0.1 Da, respectivamente; carbamidometilación de cisteína como modificación fija y oxidación de metionina como modificación variable. Las identificaciones se consideraron satisfactorias al obtener al menos dos péptidos con scores significativos (>20) y un valor de FDR (False Discovery Rate, por sus siglas en inglés), menor al 0.1%. Indicando identidad o extensa homología.

5.12. Bioensayo de Hipoxia-Reoxigenación.

Con el objetivo de evaluar la presencia del fenómeno de transición de la permeabilidad en las mitocondrias de camarones expuestos a condiciones de estrés oxidativo, se realizó un bioensayo de normoxia, hipoxia y reoxigenación. Se utilizaron un total de 144 organismos de la especie *L. vannamei* en estadio de intermuda, con un peso promedio de 12.5 ± 5 g. Los camarones se aclimataron durante 7 días en condiciones de laboratorio, salinidad de 35 ppm, temperatura de 25 °C, 5 mg O_2/L y alimentados dos veces con alimento pelletizado comercial. Para mantener la calidad del agua, las tinas fueron sifoneadas diariamente y se hizo un recambio del 70% del agua cada dos días.

Después de la aclimatación los organismos fueron distribuidos al azar en 4 tinas de 120 L, colocando 36 camarones en cada una. Una tina se mantuvo en condiciones de normoxia (5 mg O_2/L) durante todo el bioensayo como grupo control. Las 3 tinas

restantes se utilizaron para evaluar las condiciones de hipoxia (1.5 mg O_2/L por 12 h) y reoxigenación (4 mg O_2/L por 12 h). La concentración de oxígeno disuelto en el agua se monitoreó constantemente con un oxímetro digital sumergible. Todos los organismos fueron ayunados 24 h antes de iniciar el experimento. La toma de muestra inicial se realizó colectando 12 camarones de cada tina en condiciones de normoxia, posteriormente las piedras aireadoras se retiraron de las 3 tinas experimentales y se inyectó nitrógeno gaseoso para para desplazar al oxígeno disuelto en el agua hasta alcanzar 1.5 mg O_2/L (hipoxia). Después de 12 h de hipoxia se colectaron 12 camarones tanto de las tinas experimentales como la del grupo control, e inmediatamente después se reoxigenó el sistema colocando nuevamente las piedras aireadoras en las tinas para reoxigenar el agua hasta 4 mg O_2/L. Transcurridas 12 h de reoxigenación, se colectaron 12 camarones de cada tina. Después de cada muestreo los camarones fueron puestos en hielo para desensibilizarlos y posteriormente disectar los pleópodos para el aislamiento mitocondrial. La respuesta mitocondrial de cada grupo experimental de camarones se evaluó con los métodos descritos en los apartados 5.3, 5.4, 5.5, 5.6 y 5.8.

5.13. Análisis Estadístico.

El diseño experimental del ensayo fue completamente al azar. Para el análisis estadístico se evaluó la distribución normal de los datos con la pueba de Kurtosis, y se utilizó un análisis de varianza una vía (ANOVA), y las diferencias significativas entre las medias de los experimentos se evaluaron mediante la prueba de Tukey-Kramer con un intervalo de confianza del 95% (nivel de significancia $p<0.05$), utilizando el paquete estadístico NCSS 7.0.

6. RESULTADOS

6.1. Detección de Transcritos y/o Proteínas Mitocondriales Relacionadas con la Transición de la Permeabilidad en el Camarón Blanco.

Como resultado de la búsqueda realizada de las proteínas que se han reportado como parte del fenómeno de transición de la permeabilidad en vertebrados, se encontraron en el camarón *L. vannamei:*

1) Un transcrito del ANT (GenBank No. JN182810; Yin et al., 2012); la expresión de dicho transcrito fue confirmada y evaluada en el Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular (LBGM) por Armenta-Castro (2017).

2) El reporte de la secuencia completa del transcrito de la subunidad ATPc (GenBank No. EU185331.1) que forma el anillo de subunidades c de la fracción F0 de la ATPasa (Muhlia-Almazan et al., 2008).

3) Los transcritos que codifican al PiC y a la OSCP, en el transcriptoma de *L. vannamei* (Ghaffari et al., 2014).

4) La secuencia completa del transcrito que codifica a la CyP-D en varios tejidos del camarón (Wilson, 2017).

5) La existencia confirmada de la formación de dímeros activos de la ATPasa mitocondrial del camarón (Chimeo, 2017).

De manera particular, los transcritos del VDAC no se pudieron detectar en los tejidos del camarón blanco *L. vannamei*, sin embargo se logró detectar la proteína por western blot mediante el uso de un anticuerpo anti-VDAC. La figura 5 muestra la inmunodetección de la proteína VDAC en las mitocondrias aisladas y solubilizadas de los pleópodos de camarón y las de artemia como control positivo. Las proteínas VDAC del camarón y la artemia se pueden observar en bandas alrededor de los 32 kDa que corresponden a las masas moleculares reportadas previamente para la proteína (Cesura et al., 2003). También se observaron bandas con tamaños mayores a 50 kDa, y para descartar falsos

positivos por reacciones cruzadas entre los anticuerpos, se incluyeron varios controles negativos (Figura 5).

Con estos resultados se confirma que las mitocondrias del camarón si cuentan con todas las proteínas que pudieran ser parte del poro de la transición según se ha reportado en los varios modelos establecidos a la fecha.

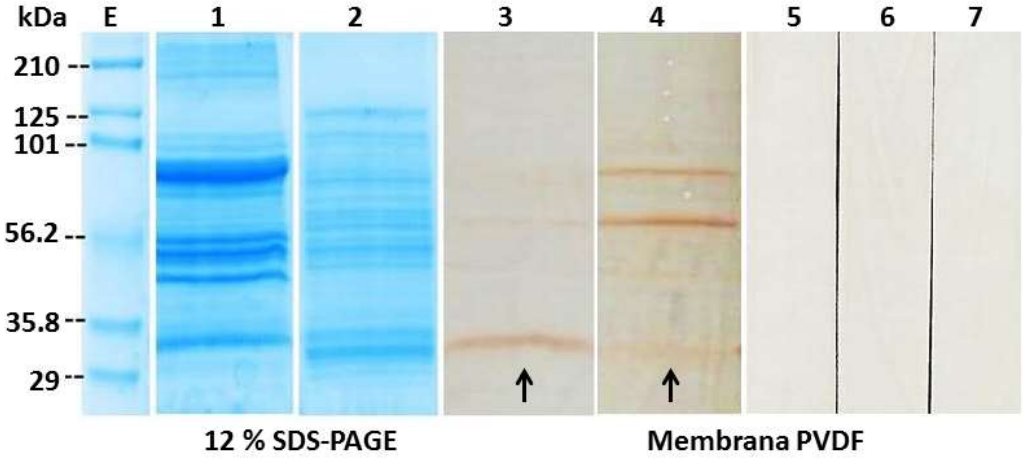


Figura 5. Inmunodetección de VDAC mediante western blot. E: Prestained SDS-PAGE estándar Broad Range. Carril 1) Proteína mitocondrial de pleópodos de *L. vannamei* (SDS-PAGE); 2) Proteína mitocondrial de nauplios de *A. franciscana* (SDS-PAGE); 3) Proteína mitocondrial de pleópodos de *L. vannamei* (membrana PVDF); 4) Proteína mitocondrial de *A. franciscana* (membrana PVDF). Controles: Carril 5) Proteína mitocondrial de pleópodos de *L. vannamei* + anticuerpo primario anti-VDAC; 6) Proteína mitocondrial de pleópodos de *L. vannamei* + anticuerpo secundario; 7) Anticuerpo primario anti-VDAC + anticuerpo secundario.

6.2. Evaluación del Acoplamiento Mitocondrial Mediante la Determinación de la Tasa de Consumo de Oxígeno.

El consumo de oxígeno mitocondrial se evaluó para confirmar si las mitocondrias aisladas de ambas especies se encontraban intactas, respirando y en su estado acoplado. Las figuras 6 y 7 muestran los trazos que representan la tasa del consumo de oxígeno en los estados respiratorios III, IV y en el estado desacoplado de las mitocondrias de los

nauplios y adultos de artemia (Figuras 6a y 6b), así como las de postlarvas y pleópodos de camarones adultos (Figuras 7a y 7b).

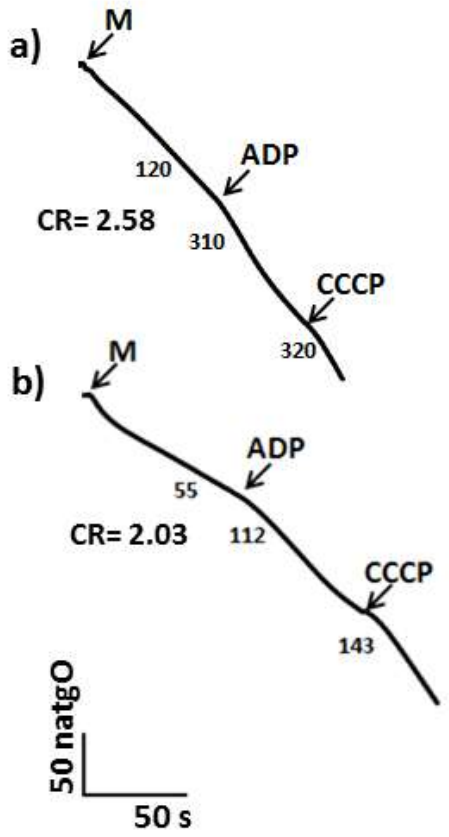


Figura 6. Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas de la artemia. a) Mitocondrias aisladas de nauplios de *A. franciscana*, b) Mitocondrias aisladas de adultos de *A. franciscana*. Sustrato respiratorio: succinato (10 mM). M: proteína mitocondrial (1 mg/mL en cada trazo). Los números indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades de natgO / mg de proteína·min. CR: control respiratorio (estado III/ estado IV). Los valores representan las medias de los triplicados.

Al agregar las mitocondrias se observó la tasa respiratoria basal (estado IV) y un aumento al agregar el ADP en el estado fosforilante (estado III), en presencia del desacoplante CCCP se detectó un incremento de la velocidad del consumo de oxígeno. En los valores del control respiratorio se observó que las mitocondrias de artemia presentan, en promedio, una velocidad de consumo de oxígeno mayor que las del camarón. Respecto a los estadios evaluados de cada especie, a diferencia de lo

observado en las artemias, en donde el estadio temprano presenta mayor tasa de consumo de oxígeno, en el camarón adulto la tasa respiratoria fue mayor que en las postlarvas. Estos resultados confirman que las mitocondrias de ambos crustáceos se aislaron de manera adecuada pues estaban intactas y acopladas.

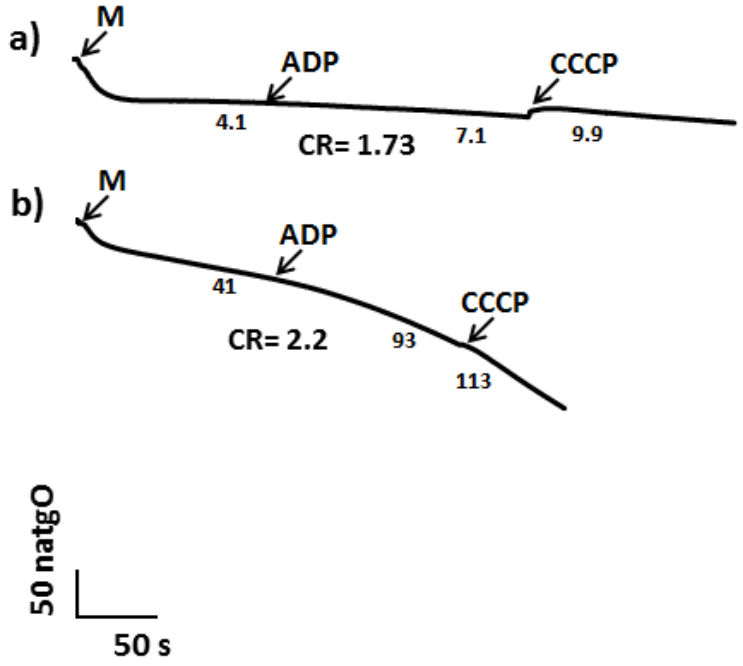


Figura 7. Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas del camarón. a) Mitocondrias aisladas de postlarvas de *L. vannamei*, b) Mitocondrias aisladas de pleópodos de *L. vannamei* adulto. Sustrato respiratorio: succinato (10 mM). M: proteína mitocondrial (1 mg/mL en cada trazo). Los números indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades de natgO / mg de proteína·min. CR: control respiratorio (estado III/ estado IV). Los valores representan las medias de los triplicados.

6.3. Evaluación de la Captación de Calcio Extra Mitocondrial.

El efecto de la adición de calcio exógeno a las mitocondrias de *A. franciscana* en la etapa de nauplio y adulto, y en las postlarvas de *L. vannamei* y adulto, se evaluó usando la sonda fluorescente Fluo-5N. Las membranas mitocondriales son impermeables a la sonda, por lo que el resultado de %Fmax indica la unión de la sonda con el calcio

exógeno que no ha sido captado por la mitocondria. De acuerdo a los resultados de las figuras 8 y 9 de las mitocondrias aisladas de nauplios de artemia (Figura 8a), artemia adulta (Figura 8b), postlarvas de camarón (Figura 9a) y camarones adultos (Figura 9b), el %Fmax basal, detectado a 0 μM de calcio, es resultado de posibles residuos de calcio en las soluciones o recipientes utilizados. Se observó que él %Fmax después de cada adición de calcio fue significativamente menor en las mitocondrias energizadas comparadas con las mitocondrias no energizadas ($p<0.05$), ya que como se ha sugerido estas últimas no tienen la habilidad de captar calcio (Nicholls y Ferguson, 2003; Menze et al., 2005). Por su parte, los controles negativos que no contenían mitocondrias mostraron un incremento continuo en la fluorescencia hasta alcanzar la saturación de la sonda.

De manera particular, en las mitocondrias energizadas y no energizadas de los camarones adultos no se encontraron diferencias significativas en la fluorescencia después de las adiciones de 800, 900 y 1000 μM de calcio (Figura 9b), esto es probablemente el resultado de que a estas concentraciones la sonda se saturó impidiendo detectar probables cambios en la fluorescencia.

La figura 10 muestra la captación de calcio exógeno de las mitocondrias de corazón de bovino que se utilizaron como control positivo y el punto en donde se observó el fenómeno de la transición de la permeabilidad. Después de las adiciones de 0 a 300 μM de calcio, la fluorescencia de las mitocondrias energizadas fue significativamente menor que la de las mitocondrias no energizadas ($p<0.05$); sin embargo, al agregar 500 μM de calcio se observó un incremento significativo del %Fmax en las mitocondrias energizadas ($p<0.05$), mismo que indica que la mitocondria está expulsando el calcio como resultado de la transición de la permeabilidad en la MIM. En las adiciones posteriores no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$; Figura 10). Estos resultados sugieren que las mitocondrias de los crustáceos cuentan con una capacidad importante para almacenar calcio dentro de su matriz y que este catión no induce la transición de la permeabilidad en mitocondrias de artemia y camarón, como sucede en las mitocondrias de bovino a 500 μM de calcio.

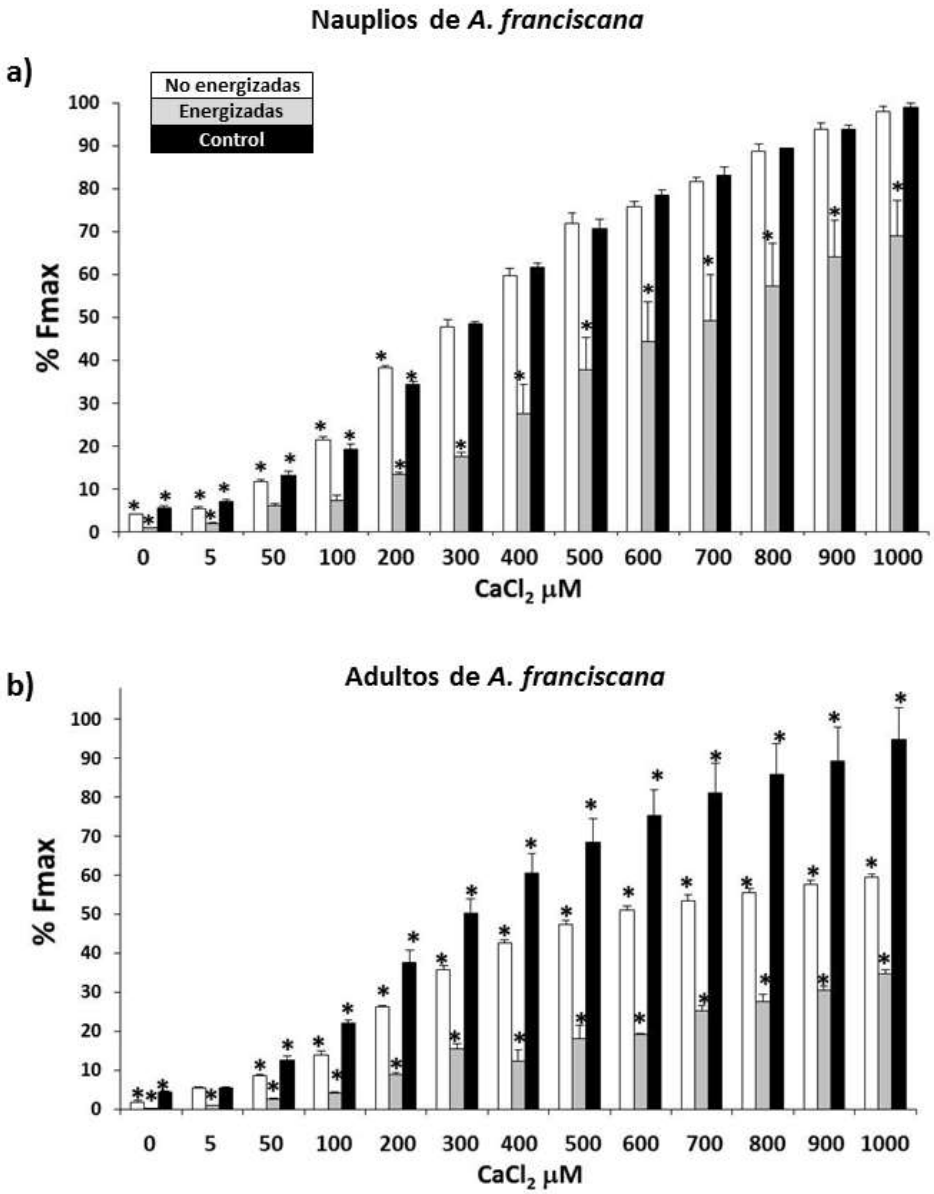


Figura 8. Monitoreo de la captación de captación de calcio mediante la sonda Fluo-5N en mitocondrias aisladas de artemia. a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana* adulta. Barras blancas: mitocondrias no energizadas. Barras grises: mitocondrias energizadas. Barras negras: sin mitocondrias (control). %Fmax: Porcentaje de fluorescencia máxima. Los valores representan la media de los triplicados. El asterisco (*) representa las diferencias significativas entre las mitocondrias energizadas, no energizadas y el control de cada concentración de calcio. Tukey-Kramer, ($p<0.05$).

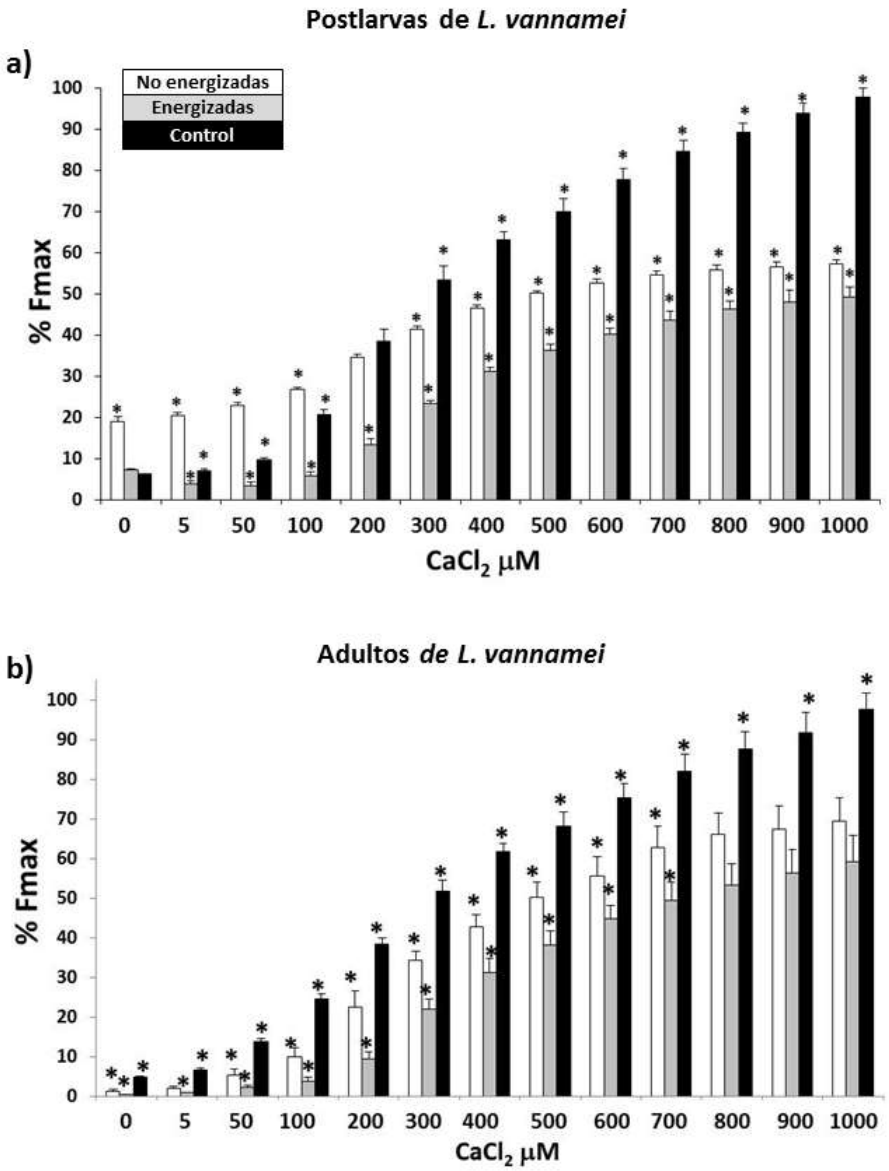


Figura 9. Monitoreo de la captación de captación de calcio mediante la sonda Fluo-5N en mitocondrias aisladas de camarón. a) Postlarvas de *L. vannamei*, b) Adultos de *L. vannamei*. Barras blancas: mitocondrias no energizadas. Barras grises: mitocondrias energizadas. Barras negras: sin mitocondrias (control). %Fmax: Porcentaje de fluorescencia máxima. Los valores representan la media de los triplicados. El asterisco (*) representa las diferencias significativas entre las mitocondrias energizadas, no energizadas y el control de cada concentración de calcio. Tukey-Kramer, ($p<0.05$).

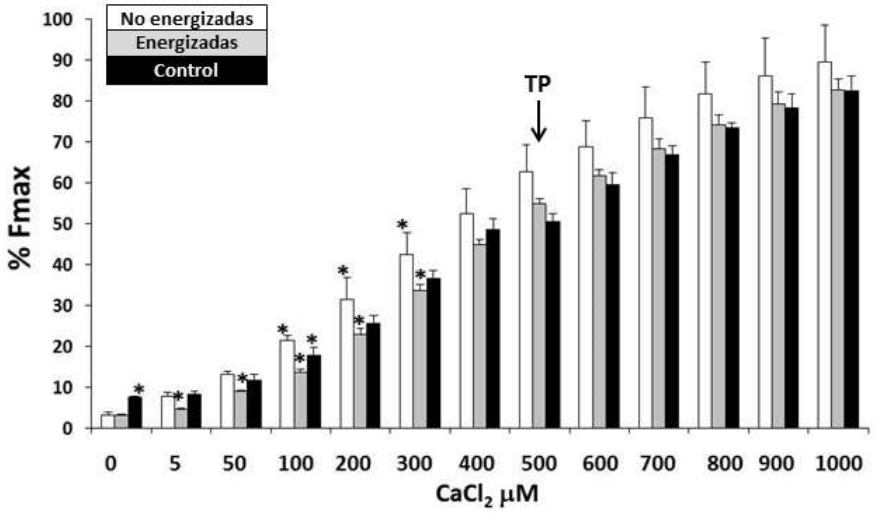


Figura 10. Monitoreo de la captación de captación de calcio mediante la sonda Fluo-5N en mitocondrias aisladas de corazón de bovino *Bos taurus*. Barras blancas: mitocondrias no energizadas. Barras grises: mitocondrias energizadas. Barras negras: sin mitocondrias (control). %Fmax: Porcentaje de fluorescencia máxima. Los valores representan la media de los triplicados. El asterisco (*) representa las diferencias significativas entre las mitocondrias energizadas, no energizadas y el control de cada concentración de calcio. Tukey-Kramer, ($p<0.05$).

6.4. Hinchamiento Mitocondrial.

El cambio en el volumen o hinchamiento mitocondrial es otra de las respuestas que se observan cuando la mitocondria entra en transición de la permeabilidad; se evaluó en las dos especies de crustáceos y el bovino como control positivo para comprobar si el efecto del calcio induce este fenómeno. Experimentalmente el hinchamiento mitocondrial se demuestra con la disminución en la densidad óptica (ΔDO).

En la figura 11 se observa que en las mitocondrias de los nauplios y adultos de artemia, y en las postlarvas y adultos de camarón, el calcio no indujo el hinchamiento mitocondrial debido a que no se observa una disminución en la ΔDO, sino hasta que se agregó el ionóforo fue que la ΔDO disminuyó, indicando que las mitocondrias comienzan a hincharse. Estos resultados contrastan con lo obtenido para las mitocondrias de corazón de bovino, en las cuales si se observa un descenso en la ΔDO,

indicando que las mitocondrias se están hinchando al momento de agregarles el calcio (Figura 11).

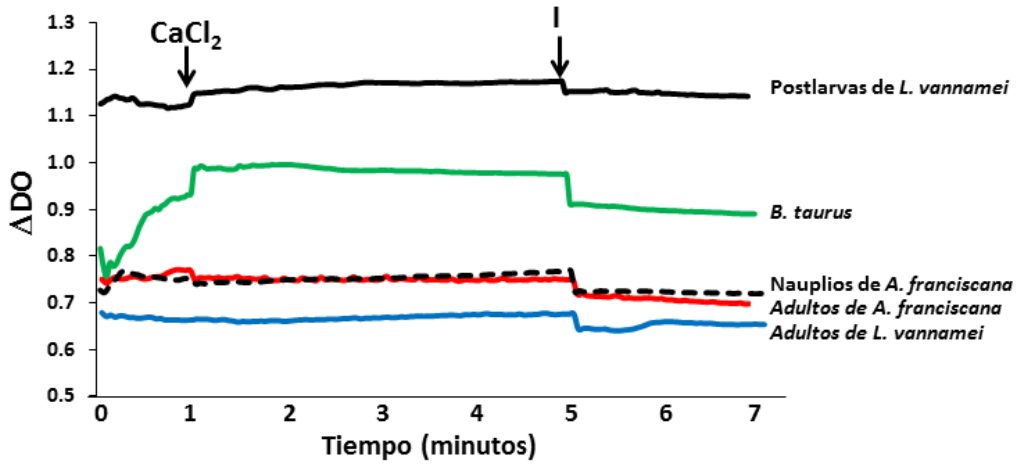


Figura 11. Efecto del calcio sobre el hinchamiento mitocondrial de artemia, camarón y bovino. Mitocondrias aisladas de: Nauplios de *A. franciscana* (línea punteada). Adultos de *A. franciscana* (línea roja). Postlarvas de *L. vannamei* (línea negra). Adultos de *L. vannamei* (línea azul). Corazón de *B. taurus* (línea verde). $CaCl_2$: 250 µM calcio. I: Ionóforo A23187. ΔDO: Cambios en la densidad óptica (540 nm). Se representan las medias de los triplicados.

6.5. Potencial Transmembranal de las Mitocondrias (ΔΨm).

Otro análisis que permitiría confirmar la presencia o no de la transición de la permeabilidad mitocondrial, fue la evaluación del ΔΨm. Este análisis se realizó en las mitocondrias de artemia y camarón en las dos etapas de cada especie utilizando el desacoplante CCCP como control positivo del abatimiento del ΔΨm y la adición de calcio. La figura 12 muestra que las mitocondrias aisladas de artemia forman ΔΨm cuando la fluorescencia disminuye y al agregar el CCCP la fluorescencia aumenta perdiéndose el potencial como se observa en las figuras 12a y 13a, respectivamente. En presencia de calcio el potencial transmembranal se mantuvo como se observa en las figuras 12b y 13b.

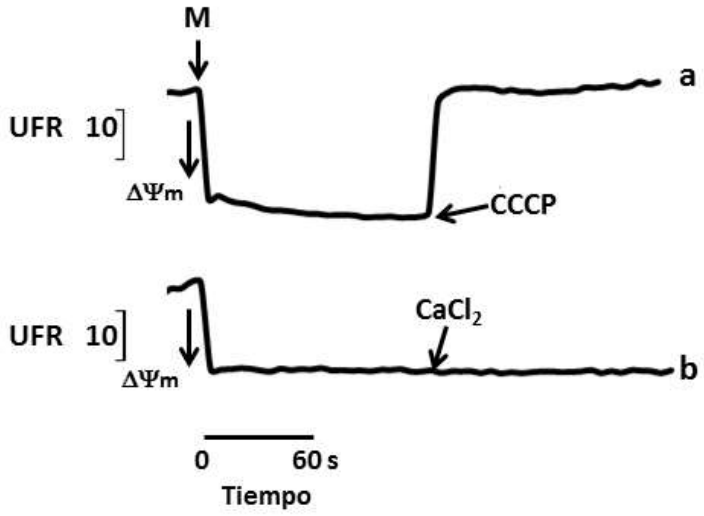


Figura 12. Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de nauplios de *A. franciscana*. Desacoplando con: a) CCCP 1.5 μM, b) $CaCl_2$ 250 μM. M: Mitocondrias aisladas (5 mg/mL). UFR: Unidades de fluorescencia relativa. ΔΨm: Formación del potencial transmembranal. Los trazos representan la media de los triplicados.

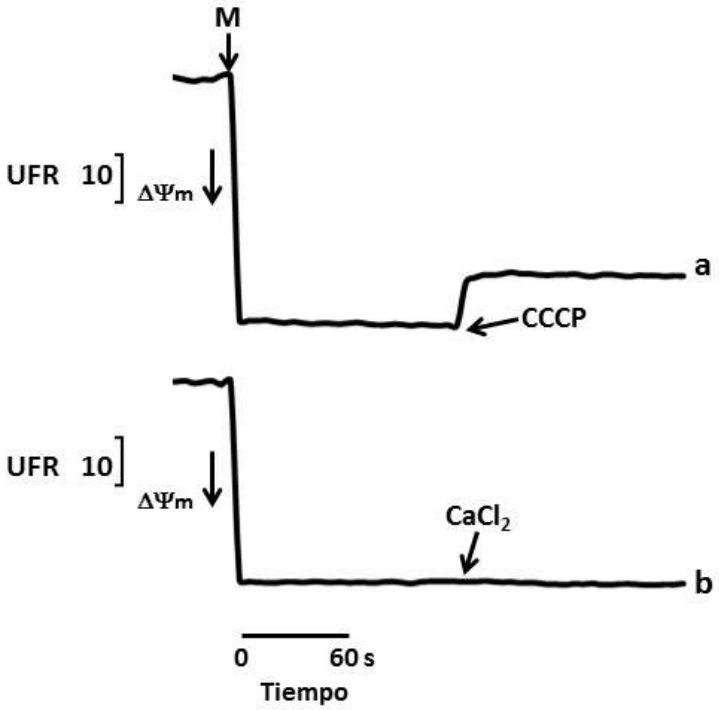


Figura 13. Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de adulto de *A. franciscana*. Desacoplando con: a) CCC 1.5 μM, b) $CaCl_2$ 250 μM. M: Mitocondrias aisladas (5 mg/mL). UFR: Unidades de fluorescencia relativa. ΔΨm: Formación del potencial transmembranal. Los trazos representan la media de los triplicados.

Cuando se evaluó el potencial transmembranal en las mitocondrias aisladas de postlarvas y adultos de camarón se observó la formación de potencial en ambos casos, pero sólo en las mitocondrias de los camarones adultos el potencial transmembranal se abatió por efecto del CCCP (Figura 15a), mientras que esto no ocurrió en las mitocondrias de las postlarvas de camarón (Figura 14a). Al agregar el calcio no se indujo la pérdida de ΔΨm en las postlarvas de camarón (Figura 14b) ni en los camarones adultos (Figura 15b). El hecho de que el CCCP no promueve la pérdida de potencial en las mitocondrias de las postlarvas, no significa que las mitocondrias estuvieran desacopladas desde el inicio, ya que el estado de acoplamiento se evaluó mediante el consumo de oxígeno mitocondrial en donde el CCCP sí promueve la aceleración del consumo de oxígeno, indicando que las mitocondrias de estos organismos estaban acopladas y funcionando (Figura 7a).

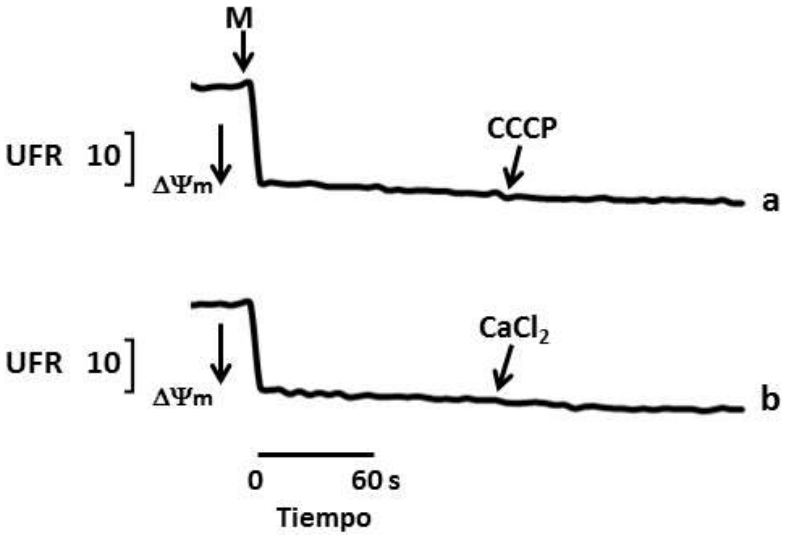


Figura 14. Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de postlarvas de *L. vannamei*. Desacoplando con: a) CCC 1.5 μM, b) $CaCl_2$ 250 μM. M: Mitocondrias aisladas (5 mg/mL). UFR: Unidades de fluorescencia relativa. ΔΨm: Formación del potencial transmembranal. Los trazos representan la media de los triplicados.

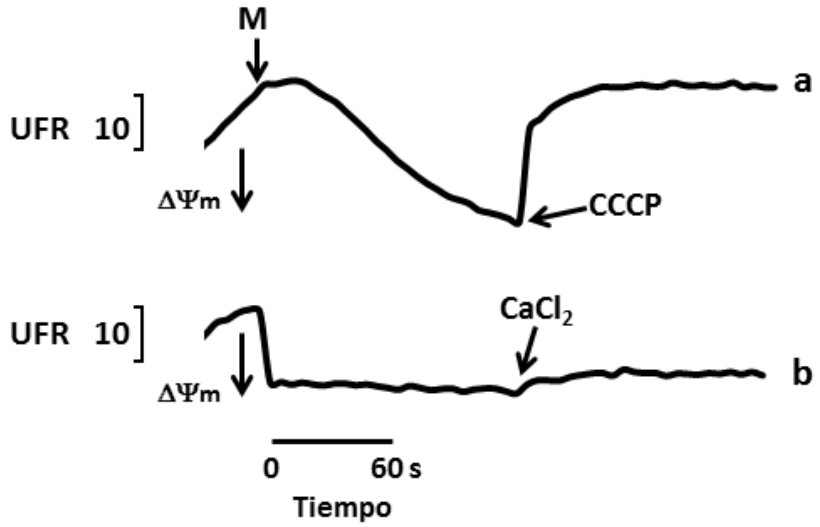


Figura 15. Monitoreo del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de adulto de *L. vannamei*. Desacoplando con: a) CCC 1.5 μM, b) $CaCl_2$ 250 μM. M: Mitocondrias aisladas (5 mg/mL). UFR: Unidades de fluorescencia relativa. ΔΨm: Formación del potencial transmembranal. Los trazos representan la media de los triplicados.

6.6. Determinación del Efecto de Iones, Fosfato y ATP sobre el Consumo de Oxígeno Mitocondrial.

Para detectar si la transición de la permeabilidad podría ser inducida ó el poro de transición regulado por otros iones como Cu^{2+}, K^{+}, Na^{+}, así como Pi y ATP, se evaluó el consumo de oxígeno en las mitocondrias artemia y camarón en sus diferentes estadios.

Las figuras que contienen los trazos individuales por triplicado de cada una de las evaluaciones se encuentran en el Anexo 1. De manera general, los resultados obtenidos indican que el consumo de oxígeno de las mitocondrias de ambas especies no se observó significativamente afectado por la presencia de Ca^{2+}, Cu^{2+}, K^{+} y Na^{+}.

En la figura A1 se observa que después de cada adición de calcio, el consumo de oxígeno disminuye en las mitocondrias de nauplios y adultos de artemia y en las postlarvas de camarón, mientras que en las mitocondrias de camarones adultos, el consumo de oxígeno no se observó afectado significativamente por la presencia del calcio, pues se mantiene estable en concentraciones entre 6 y 15 μM de $CaCl_2$,

disminuyendo a 18 μM, mientras que al agregar el CCCP se observa un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno indicando el desacoplamiento de las mitocondrias.

En presencia del $CuCl_2$, las mitocondrias de los nauplios y adultos de artemia disminuyeron su consumo de oxígeno (Figuras A2a y A2b); sin embargo, en las mitocondrias de postlarvas de camarón el consumo aumentó ligeramente a 6 μM de Cu^{2+} y posteriormente disminuyó (Figura A2c), mientras que en las mitocondrias del camarón adulto incrementó con la adición de 9 μM de Cu^{2+}, pero no se observaron cambios adicionales hasta que se agregó el CCCP (Figura A2d).

Un efecto similar al del Cu^{2+} se observó cuando se agregaron el potasio y el sodio (Figuras A3 y A4), pues el consumo de oxígeno disminuyó constantemente en las mitocondrias de nauplios y adultos de artemia; y de camarón adulto con las adiciones de estos iones, hasta que se agregó el CCCP (Figuras A3a, A3b, A3d, A4a, A4b y A4d); sin embargo, en las mitocondrias de las postlarvas del camarón el consumo de oxígeno es muy bajo e incrementó y disminuyó sin relación con el incremento de la concentración de estos iones (Figuras A3c y A4c).

A diferencia de lo observado previamente en presencia de diferentes cationes al agregar Pi se observó que a la concentración de 10 mM, el consumo de oxígeno se aceleró en las mitocondrias de artemia y camarón en las etapas larvales y adultas, mientras que con las adiciones subsecuentes de Pi, el consumo de oxígeno disminuyó hasta que se agregó el desacoplante (Figuras A5a, A5b, A5c y A5d). Estos resultados junto con los obtenidos para Ca^{2+}, Cu^{2+}, K^+ y Na^+ indican que no se induce la transición de la permeabilidad por efecto de estos componentes, ya que de presentarse la TP se observaría un incremento descontrolado del consumo de oxígeno por adición de alguno de ellos, antes de agregar el agente desacoplante CCCP.

Los resultados de la adición de ATP mostraron que el consumo de oxígeno presentó un aumento en concentraciones específicas y un comportamiento diferente en artemia y camarón. En las mitocondrias de nauplios y artemia adulta el incremento se detectó a 0.5 mM de ATP, mismo que disminuyó con las adiciones posteriores hasta agregar el CCCP (Figuras A6a y A6b). Sin embargo, en las mitocondrias de postlarvas y camarones adultos hubo un incremento constante del consumo de oxígeno desde la adición de 0.5 mM hasta 2 mM de ATP (Figuras A6c y A6d). Es importante resaltar que los

incrementos observados por la adición de ATP en el consumo de oxígeno mitocondrial en todos los experimentos, fueron mayores que los incrementos observados al agregar el CCCP como agente desacoplante.

6.7. Efecto del ATP sobre la Captación de Calcio, Hinchamiento Mitocondrial y Potencial Transmembranal.

Con el objetivo entender mejor papel del ATP en las mitocondrias del camarón, se evaluó el efecto de la adición de ATP en la captación de calcio de las mitocondrias para determinar si estas condiciones inducen la transición de la permeabilidad.

La figura 16 muestra que en las dos especies, las mitocondrias energizadas captaron significativamente más calcio que las no energizadas. También es importante remarcar que la presencia de ATP promovió significativamente la captación de calcio en ambas especies y estadios de vida ($p<0.05$; Figuras 17 y 18).

En las mitocondrias no energizadas de adultos de artemia y camarón los resultados muestran que el efecto del ATP en la captación de calcio, no es tan significativo como en las energizadas (Figuras 17c y 18c).

Los resultados también mostraron que tras la segunda adición calcio, en todos los grupos experimentales aumentó significativamente la captación en presencia de ATP, comparado con el control de las dos adiciones sin ATP ($p<0.05$; Figuras 17 y 18).

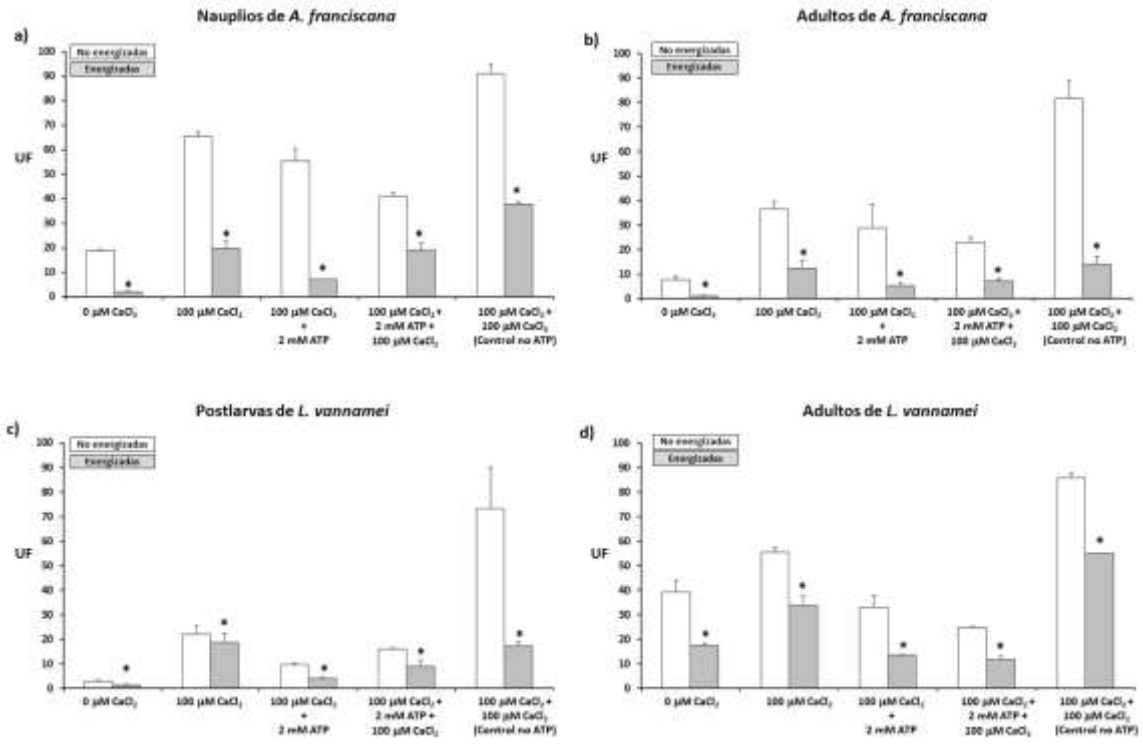


Figura 16. Efecto del ATP sobre la captación de calcio exógeno en mitocondrias de *A. franciscana y L. vannamei*.. a) Nauplios de artemia. b) Adultos de artemia. c) Postlarvas de camarón. b) Adultos de camarón. Barras blancas: mitocondrias no energizadas. Barras grises: mitocondrias energizadas. Los valores representan la media de los triplicados. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre las mitocondrias energizadas y no energizadas de cada adición de calcio y ATP. Tukey-Kramer ($p<0.05$).

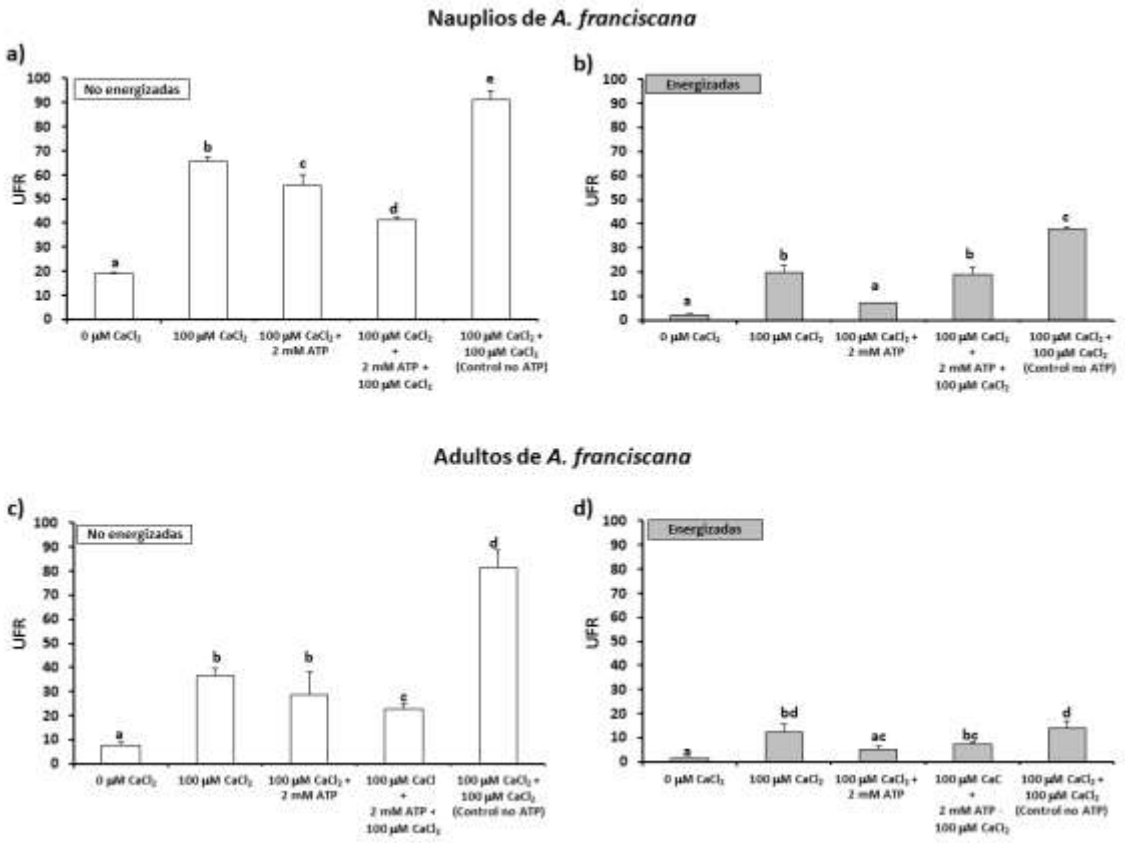


Figura 17. Efecto del ATP sobre la captación de calcio exógeno en mitocondrias de *Artemia franciscana.* a) Mitocondrias no energizadas de nauplios. b) Mitocondrias energizadas de nauplios. c) Mitocondrias no energizadas de adultos. d) Mitocondrias energizadas de adultos. Los valores representan la media de los triplicados. Las literales muestran las diferencias significativas de las mitocondrias energizadas y no energizadas de cada adición de calcio y ATP. Tukey-Kramer ($p<0.05$).

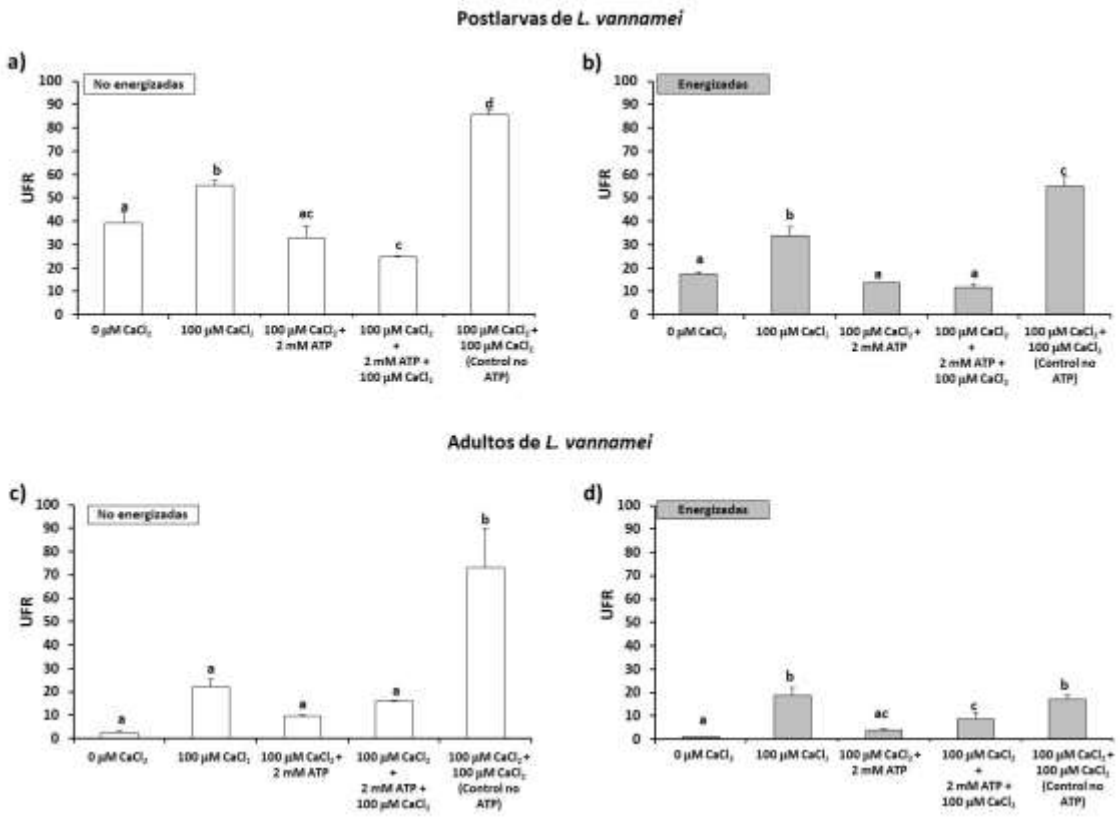


Figura 18. Efecto del ATP sobre la captación de calcio exógeno en mitocondrias del camarón *Litopenaeus vannamei*. a) Mitocondrias no energizadas de postlarvas. b) Mitocondrias energizadas de postlarvas. c) Mitocondrias no energizadas de adultos. d) Mitocondrias energizadas de adultos. Los valores representan la media de los triplicados. Las literales muestran las diferencias significativas de las mitocondrias energizadas y no energizadas de cada adición de calcio y ATP. Tukey-Kramer ($p<0.05$).

Cuando se evaluó el efecto del ATP sobre el hinchamiento mitocondrial en artemia y camarón, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la adición del calcio (apartado 6.4). En la figura 19 se puede observar que el ATP no promovió el hinchamiento de las mitocondrias en ninguno de los estadios de las dos especies (Figura 19), hasta que se adicionó el ionóforo se detectó una disminución en la ΔDO y el hinchamiento mitocondrial.

Sin embargo, al evaluar el potencial transmembranal adicionando ATP, se observó un ligero aumento en la fluorescencia sólo en las mitocondrias de los camarones adultos, lo que puede representar una ligera pérdida de potencial (Figura 20c), lo que podría sugerir que se presenta la TP en las mitocondrias de estos organismos por efecto del ATP. Sin

embargo, los resultados de captación de calcio e hinchamiento mitocondrial sugieren que no se induce la transición de la permeabilidad por la presencia de ATP.

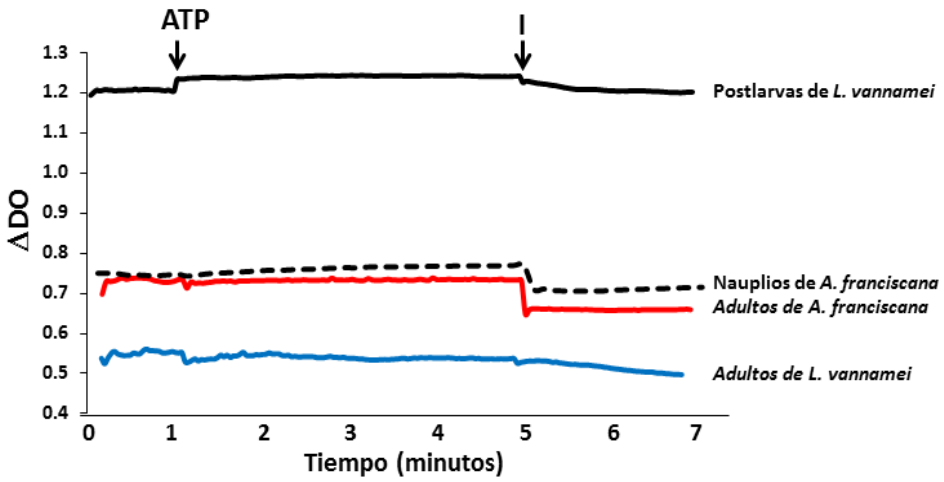


Figura 19. Efecto del ATP sobre el hinchamiento mitocondrial de artemia y camarón. Mitocondrias aisladas de: Nauplios de *A. franciscana* (línea punteada). Adultos de *A. franciscana* (línea roja). Postlarvas de *L. vannamei* (línea negra). Adultos de *L. vannamei* (línea azul). ATP: 2 mM. I: Ionóforo A23187. ΔDO: Cambios en la densidad óptica (540 nm). Se representan las medias de los triplicados.

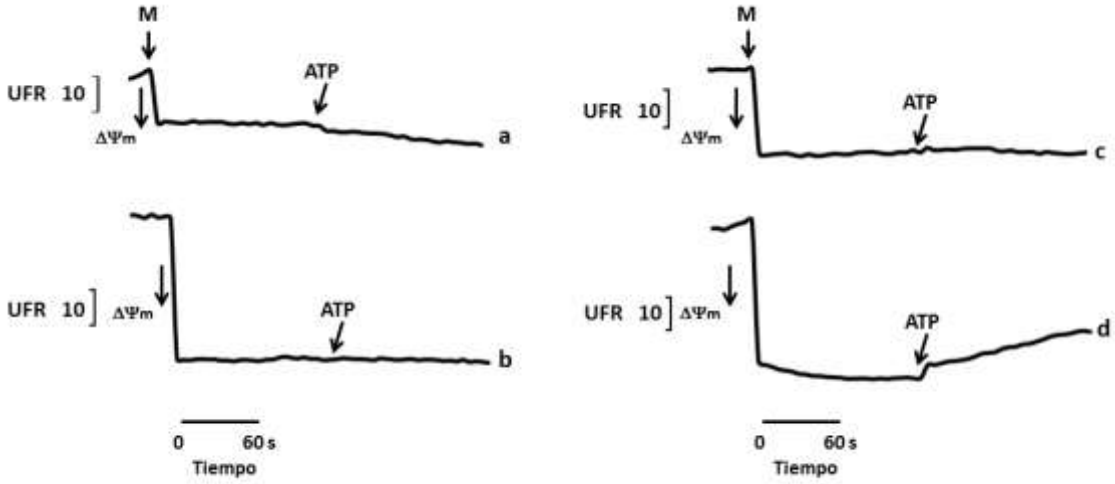


Figura 20. Efecto del ATP sobre el potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) de artemia y camarón. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*. b) Adultos de *A. franciscana*. c) Postlarvas de *L. vannamei*. d) Adultos de *L. vannamei*. Desacoplando con ATP 2 mM. M: Mitocondrias aisladas (5 mg/mL). UFR: Unidades de fluorescencia relativa. ΔΨm: Formación del potencial transmembranal. Los trazos representan la media de los triplicados.

6.8. Identificación de Enzimas Oxidorreductasas Alternas Mitocondriales.

Para detectar la presencia de las enzimas alternas (NADH deshidrogenasa II, GPDH mitocondrial y AOX), se evaluó el consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas utilizando sustratos e inhibidores específicos de la cadena respiratoria clásica y/o de las enzimas alternas en las mitocondrias de *A. franciscana* y *L. vannamei*.

Los trazos de la figura 21 confirman que en presencia de NADH, el consumo de oxígeno de las mitocondrias de los nauplios de artemia y camarón adulto es muy bajo comparado con el consumo de oxígeno en presencia de succinato como sustrato respiratorio (Figuras 6a y 7a). Tampoco hubo cambio en presencia de ADP, por lo que se sugiere que no existe una NADH deshidrogenasa alterna tipo II en ninguna de las dos especies que pudiera oxidar el NADH y así acelerar la velocidad del consumo de oxígeno.

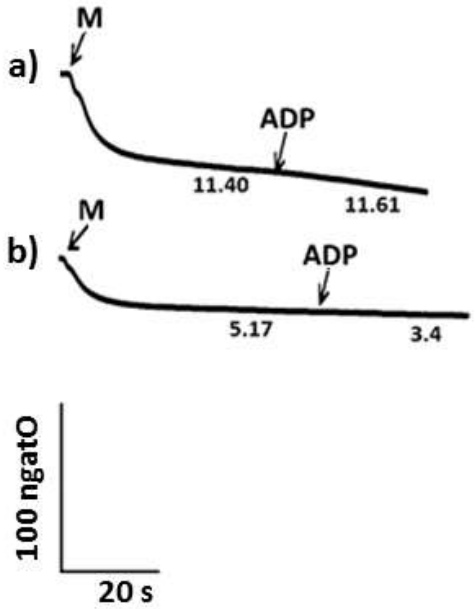


Figura 21. Efecto del NADH sobre el consumo de oxígeno para la identificación de la NADH deshidrogenasa alterna tipo II. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*. b) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: NADH. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

Por otro lado, el glicerol-3-fosfato (G3P) como sustrato respiratorio activó el consumo de oxígeno tanto en las mitocondrias de nauplios, como en las de artemias adultas. Al inhibir el complejo I con rotenona, la mitocondria quedó a expensas del consumo de oxígeno dependiente del G3P, después al agregar antimicina A (inhibidor del complejo III) la velocidad el consumo de oxígeno disminuyó significativamente, mientras que al agregar el KCN (inhibidor del complejo IV) este se abatió por completo (Figuras 22a y 22b). Estos resultados sugieren que en las mitocondrias de artemia existe una GPDHmit que forma parte de una cadena respiratoria alterna como donadora de electrones al complejo III.

En contraste, en las mitocondrias de camarón la tasa de consumo de oxígeno fue baja en presencia del G3P como sustrato respiratorio, al agregar el CCCP sólo se observó un ligero incremento en el consumo de oxígeno, mismo que fue inhibido por la rotenona, la antimicina A y finalmente el KCN (Figuras 22c y 22d).

Los controles de estas evaluaciones sin CCCP mostraron que en las mitocondrias de artemia, la rotenona ejerció el efecto inhibitorio sobre el complejo I, sin embargo, el consumo de oxígeno siguió activo (Figuras A7a y A7b). Por otro lado, al agregar la rotenona en las mitocondrias de las postlarvas de camarón se observó una ligera disminución del consumo de oxígeno (Figura A7c), mientras que en los camarones adultos el consumo de oxígeno siguió en aumento (Figura A7d); lo anterior indica la presencia de una GPDHmit en las mitocondrias de la artemian pero no en las del camarón.

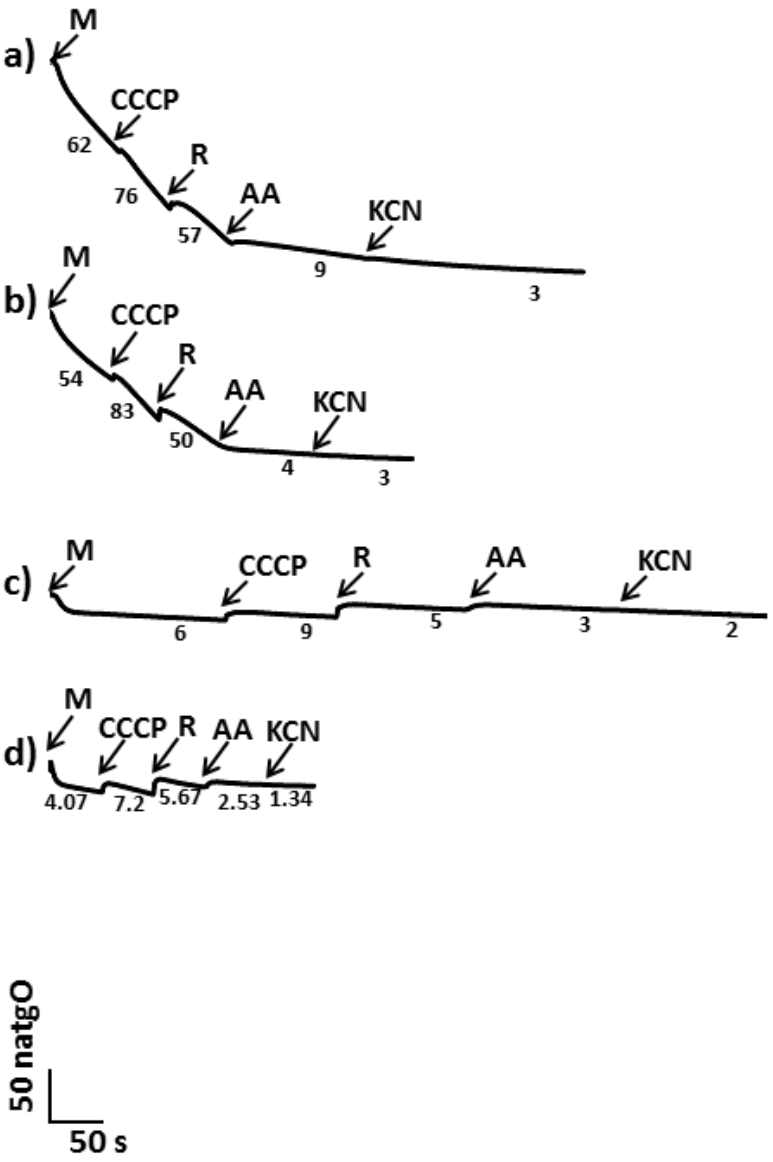


Figura 22. Efecto del G3P sobre el consumo de oxígeno para la identificación de la glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDHmit). Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: Glicerol-3-fosfato. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. R: Rotenona. AA: Antimicina A. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

Por otro lado, la presencia de una oxidasa alterna (AOX) se evaluó en las mitocondrias de nauplios de artemia midiendo el consumo de oxígeno que fue inhibido 9.3 veces en presencia de octil galato (OG, inhibidor específico de las AOXs), y posteriormente con la adición de KCN, que detuvo casi por completo el consumo de oxígeno (Figura 23a).

Al realizar la misma determinación pero agregando primero el KCN y luego el OG, el consumo de oxígeno se inhibió parcialmente y siguió disminuyendo hasta que se agregó el OG (Figura 24a). Los controles de esta determinación se evaluaron en ausencia del CCCP, observando que en las mitocondrias aisladas de nauplios de artemia al agregar OG o KCN, el consumo de oxígeno disminuyó drásticamente (Figura A8a). Estos resultados sugieren la presencia de una AOX en las mitocondrias de los nauplios de artemia.

Tanto en las artemias adultas, como en las postlarvas de camarón la determinación de la AOX mostró que al agregar OG, el consumo de oxígeno disminuyó (Figuras 23b y 23c) lo que podría indicar que el OG ejerce efecto inhibitorio sobre una AOX. Sin embargo, al agregar primero el KCN, el consumo de oxígeno se inhibió hasta 21 veces en las mitocondrias de las artemias adultas (Figura 24c), mientras que en las postlarvas de camarón sólo disminuyó 3.4 veces (Figura 24b) y en ambos casos el OG no mostró un efecto en la inhibición, mientras que el KCN abate el consumo de oxígeno por completo. Los controles de estas evaluaciones confirman que el consumo de oxígeno no disminuye en presencia de OG, sino por efecto del KCN y no hay presencia de una AOX (Figuras A8b, A9a, A10b y A10c).

En las mitocondrias de camarones adultos no se observó efecto inhibitorio alguno al agregar OG, mientras que el KCN inhibió el consumo de oxígeno (Figura 23d). Al agregar el OG en ausencia del CCCP se observó una disminución de 1.4 veces, mientras que al agregar el KCN el consumo de oxígeno se eliminó completamente (Figura A9b). Estos resultados sugieren la ausencia de la AOX también en las mitocondrias de camarón adulto.

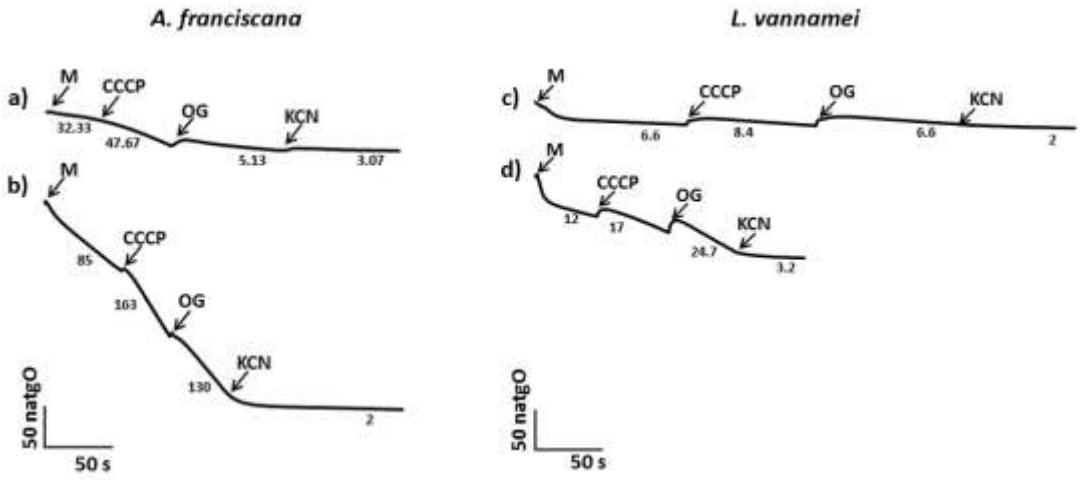


Figura 23. Identificación de la existencia de la AOX en las mitocondrias de artemia y camarón en presencia de los inhibidores OG y KCN. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*. c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: Succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial (1 mg/mL) en cada trazo. OG: Octil galato. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

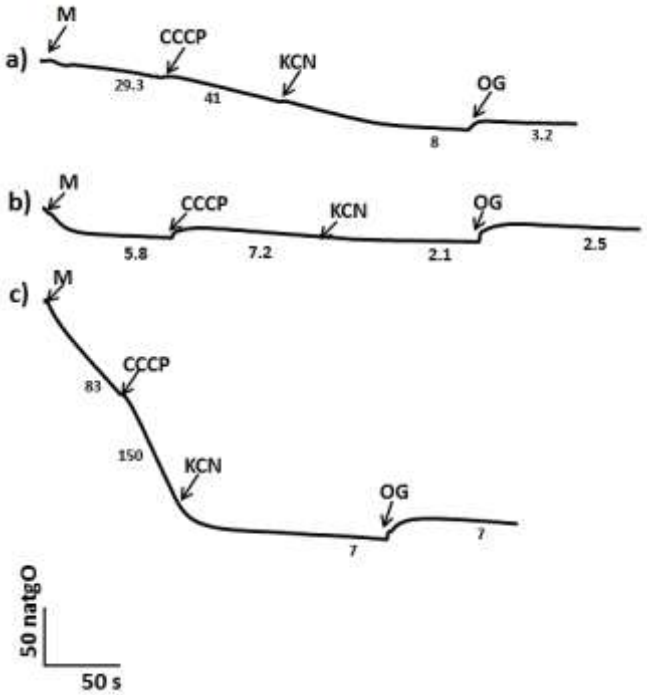


Figura 24. Identificación de la existencia de la AOX en las mitocondrias de artemia y camarón en presencia de los inhibidores KCN y OG. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Postlarvas de *L. vannamei*, c) Adultos de *A. franciscana*. Sustrato respiratorio: Succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. KCN: Cianuro. OG: Octil galato. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

6.9. Separación de la Proteína Mitocondrial en Geles hrCN-PAGE y Detección de la Actividad de los Complejos Respiratorios.

En la figura 25 se muestra el patrón de proteínas mitocondriales de los nauplios de artemia y de camarón adulto en geles hrCN-PAGE del 4-12% en los que se identificaron los complejos respiratorios I, II, III, IV y V por comparación de la masa molecular con los complejos del estándar en bovinos.

Una vez analizado el patrón de bandeo e identificados los complejos mitocondriales se evaluó la actividad en gel de cada complejo en las mitocondrias de *A. franciscana* y *L. vannamei* utilizando las mitocondrias de bovino como control positivo.

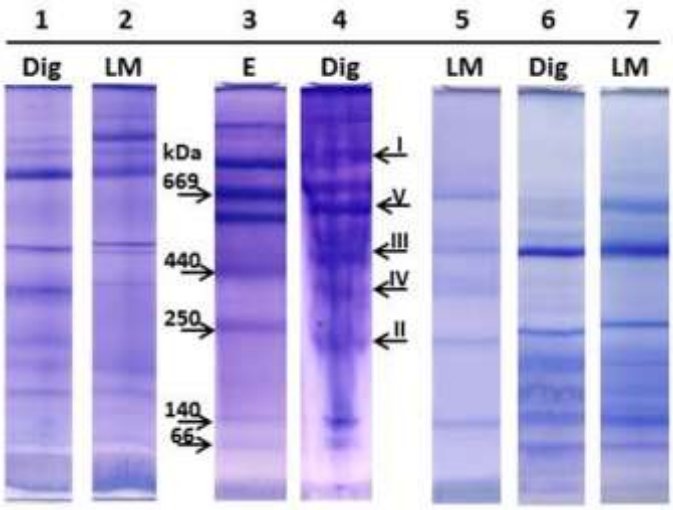


Figura 25. Patrón de bandeo de proteínas mitocondriales aisladas de artemia, camarón y bovino en gel hrCN-PAGE 4-12%. Carril 1-2: Adulto de *L. vannamei*. Carril 3: Estándar Amersham High Molecular Weight (E). Carril 4-5: Corazón de *B. taurus*. Carril 6-7: Nauplio de *A. franciscana*. I-V: complejos respiratorios mitocondriales. DG: Proteína mitocondrial solubilizada con digitonina. LM: Proteína mitocondrial solubilizada con dodecil-D-maltósido.

En la figuras 26a y 26b se muestra la actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa I), se detectaron al menos dos bandas con actividad en ambas especies, una banda con un tamaño de ≈1000 kDa que corresponde al complejo NADH deshidrogenasa y otras bandas de menor tamaño con masas moleculares de entre 60-80 kDa. Estas bandas con

actividad de deshidrogenasas se analizaron por espectrometría de masas, confirmándose su identidad como deshidrogenasas del ciclo de Krebs incluyendo la succinato y malato deshidrogenasa. Lo anterior sugiere que en las mitocondrias de ambas especies no existen enzimas NADH deshidrogenasas tipo II alternas.

En las figuras 26c y 26d se muestra la actividad en gel de la GPDHmit, tanto de artemia como de camarón. Se identificó una sola banda en las mitocondrias de bovino con una masa molecular de ≈161.4 kDa (Zimin et al., 2009), también en las mitocondrias de artemia se detectó una banda (Figura 26c), mientras que en el camarón no hubo presencia de bandas con actividad de esta enzima (Figura 26d). De manera adicional la actividad en gel de la GPDHmit también se evaluó en las mitocondrias de los adultos de artemia y de las postlarvas de camarón, observándose que solamente en los adultos de artemia se expresó la banda de actividad de GPDHmit (Figura A11). Estos resultados sugieren que la GPDHmit forma parte de la cadena respiratoria de las mitocondrias de artemia en las dos etapas de desarrollo, mas no en las mitocondrias del camarón y confirma los resultados obtenidos de la evaluación del consumo de oxigeno utilizando G3P como sustrato respiratorio (Figura 21).

La actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa) se muestra en las figuras 26e y 26f para artemia y camarón, respectivamente. Se puede observar una sola banda en las mitocondrias de ambos organismos con una masa molecular de ≈123 kDa, semejante a la banda detectada en las proteínas del bovino.

En las figuras 27a y 27b se muestra la actividad en gel del complejo IV (COX), como se observa hay una sola banda con actividad de COX tanto en artemia, como en camarón con un tamaño del dímero activo de ≈410 kDa, misma que se comparó con la banda detectada en las mitocondrias de bovino (Wittig y Schägger 2007; Wittig et al., 2010). Por otro lado, la actividad en gel de la ATP sintasa se muestra en las figuras 27c y 27d, en donde se observó una sola banda con actividad de ≈1194 kDa, que corresponde al dímero activo en las mitocondrias de bovino. Así mismo en las mitocondrias de artemia y camarón también se detectó una sola banda con una masa molecular similar (Figuras 27c y 27d).

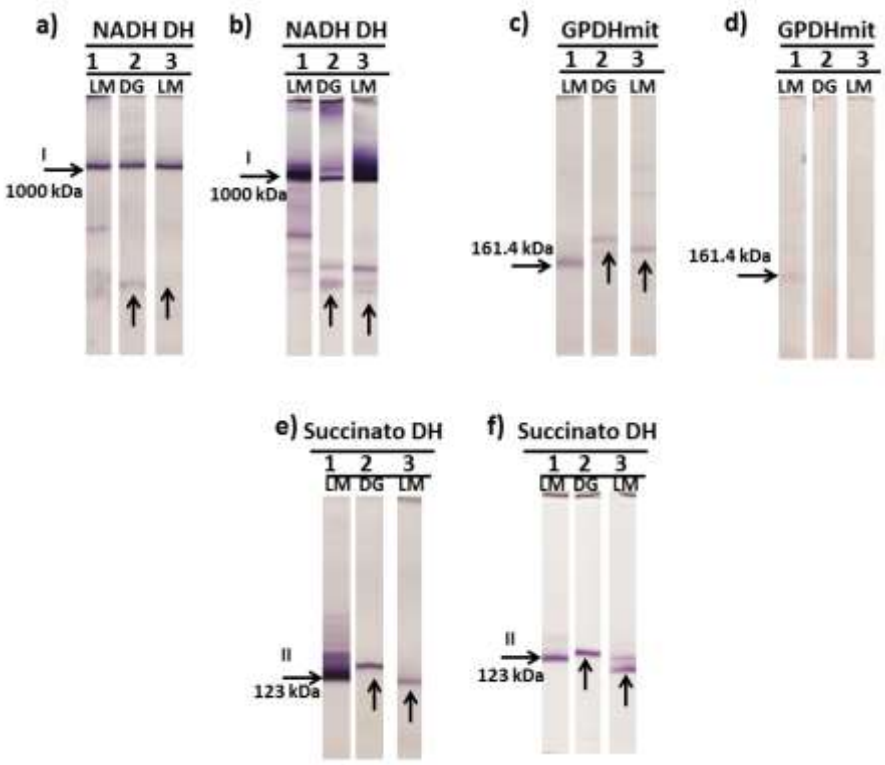


Figura 26. Actividad en gel de los complejos mitocondriales I, II y GPDHmit de *B. taurus*, *A. franciscana* y *L. vannamei*. Actividad de NADH deshidrogenasa I de: a) bovino (carril 1) y artemia (carriles 2-3); b) bovino (carril 1) y camarón (carril2-3). Actividad de GPDHmit de: c) bovino (carril 1) y artemia (carriles 2-3); d) bovino (carril 1) y camarón (carril2-3). Actividad de succinato deshidrogenasa de: e) bovino (carril 1) y artemia (carriles 2-3); f) bovino (carril 1) y camarón (carril 2-3). DG: Proteína mitocondrial solubilizada con digitonina. LM: Proteína mitocondrial solubilizada con dodecil-D-maltósido.

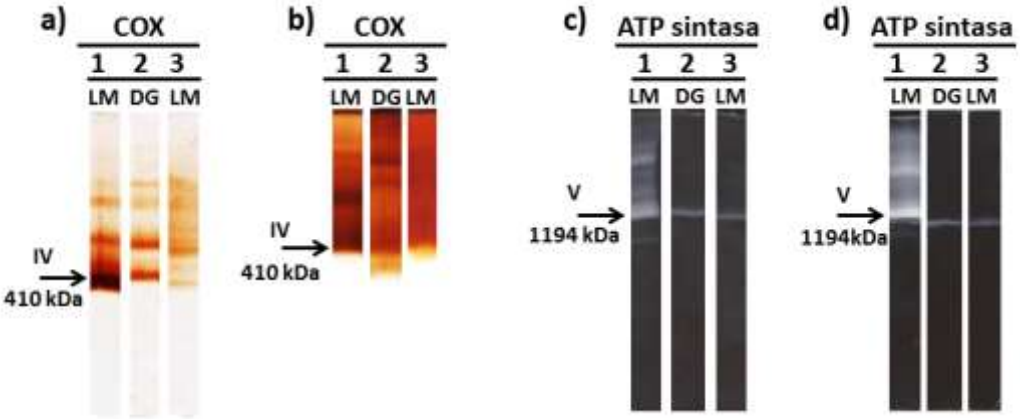


Figura 27. Actividad en gel de los complejos mitocondriales IV y V de *B. taurus*, *A. franciscana* y *L. vannamei*. Actividad de Citocromo C oxidasa (COX) de: a) bovino (carril 1) y artemia (carriles 2-3); b) bovino (carril 1) y camarón (carril 2-3). Actividad de ATP sintasa de: c) bovino (carril 1) y artemia (carriles 2-3); d) bovino (carril 1) y camarón (carril2-3). DG: Proteína mitocondrial solubilizada con digitonina. LM: Proteína mitocondrial solubilizada con dodecil-D-maltósido.

6.10. Identificación de la GPDHmit Mediante LC-MS/MS y Análisis Bioinformático y de la AOX Mediante Western Blot.

El análisis bioinformático de los datos LC-MS/MS con el motor de búsqueda Peaks y las secuencias de proteínas de branquiópodos y GPDH mitocondriales reportadas en la base de datos del NCBI permitió confirmar la existencia la GPDHmit en las mitocondrias de nauplios de artemia. La tabla 1 muestra que en la banda X (Figura A12) se identificaron tres péptidos presentes en la proteína GPDHmit de organismos como el pulpo *Octopus bimaculoides*, el marsupial *Monodelphis domestica*, y el ácaro *Metaseiulus occidentalis*.

Tabla 1. Identificación de la GPDHmit de *A. franciscana* mediante LC-MS/MS y búsqueda de homología en bases de datos.

Banda	Proteína	Organismo	Número de acceso [a]	MW/pI Teóricos [e]	Score [f]	PM [g]/ SC [h]	Secuencias de péptidos
X	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X2	*Octopus bimaculoides*	XP_014772456.1	61.0/ 7.15	39.26	1/1%	K.ALELFPMLK.R Oxidation M
	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial-like isoform X1	*Monodelphis domestica*	XP_007494252.1	80.9/6.65	55.91	1/2%	R.LVQDYGLESEVAQ.H
	PREDICTED: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	*Metaseiulus occidentalis*	XP_003739777.1	79.3/7.23	36.60	1/2%	R.LHEEFPYIEAEVR.Y

[a] Números de acceso de acuerdo con la base de datos de proteína del NCBI; [b] Masa molecular teórica y punto isoeléctrico (pI); [f] Scores reportados por el software PEAKS después de la búsqueda contra la base de datos que contenía las secuencias de proteínas de Branquiópodos de la base de datos del nrNCBI (600199 secuencias, Enero 2017), además de 1085 secuencias de proteínas correspondientes a las GDPHmit obtenidas del NCBI y la colección de contaminantes del Max Plank Institute of Biochemistry (247 secuencias). Scores >20 indican identidad o extensa homología, con una tasa de detección falsos positivos (FDR) <0.1%. [g] Péptidos identificados; [h] Porcentaje de cobertura de la secuencia.

Por otro lado, la identidad de AOX se confirmó por la detección de la proteína en las mitocondrias aisladas de nauplios de artemia a través de un análisis western. En la figura 28 (carril 1) se muestra una sola banda con masa molecular entre 25 y 37 kDa que

corresponde a la AOX de artemia, así mismo se observa la detección de esta enzima en los controles positivos de AOX provenientes del ostión, mango y huitlacoche, cuya identidad ya estaba previamente confirmada (Considine et al., 2001; McDonald et al., 2009; Cardenas-Monroy et al., 2017).

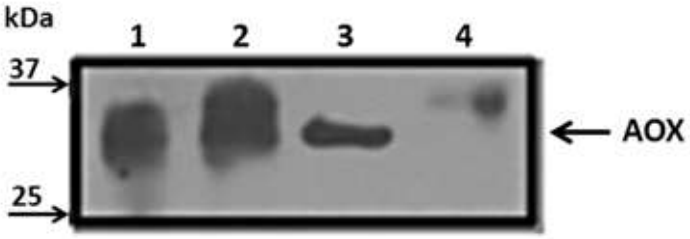


Figura 28. Inmunodetección de la AOX en las mitocondrias aisladas: Carril 1: nauplios de *Artemia franciscana*, Carril 2: ostión *Crassostrea gigas*, Carril 3: mango *Mangifera indica* y Carril 4: huitlacoche *Ustilago maydis*.

La figura 29 muestra de manera gráfica los resultados que en conjunto se obtuvieron sobre la existencia e identidad de enzimas alternas en las mitocondrias de artemia y camarón. Las postlarvas y adultos del camarón no cuentan con enzimas alternas, sino con una cadena respiratoria clásica (Figura 29a), mientras que las artemias en su estadio de nauplio expresan dos enzimas alternas, una GPDHmit y una AOX (Figura 29b), mientras que en el estadio adulto unicamente se identificó la presencia de una GPDHmit (Figura 29b), por lo que en ambos estadios la artemia cuenta con cadenas respiratorias ramificadas.

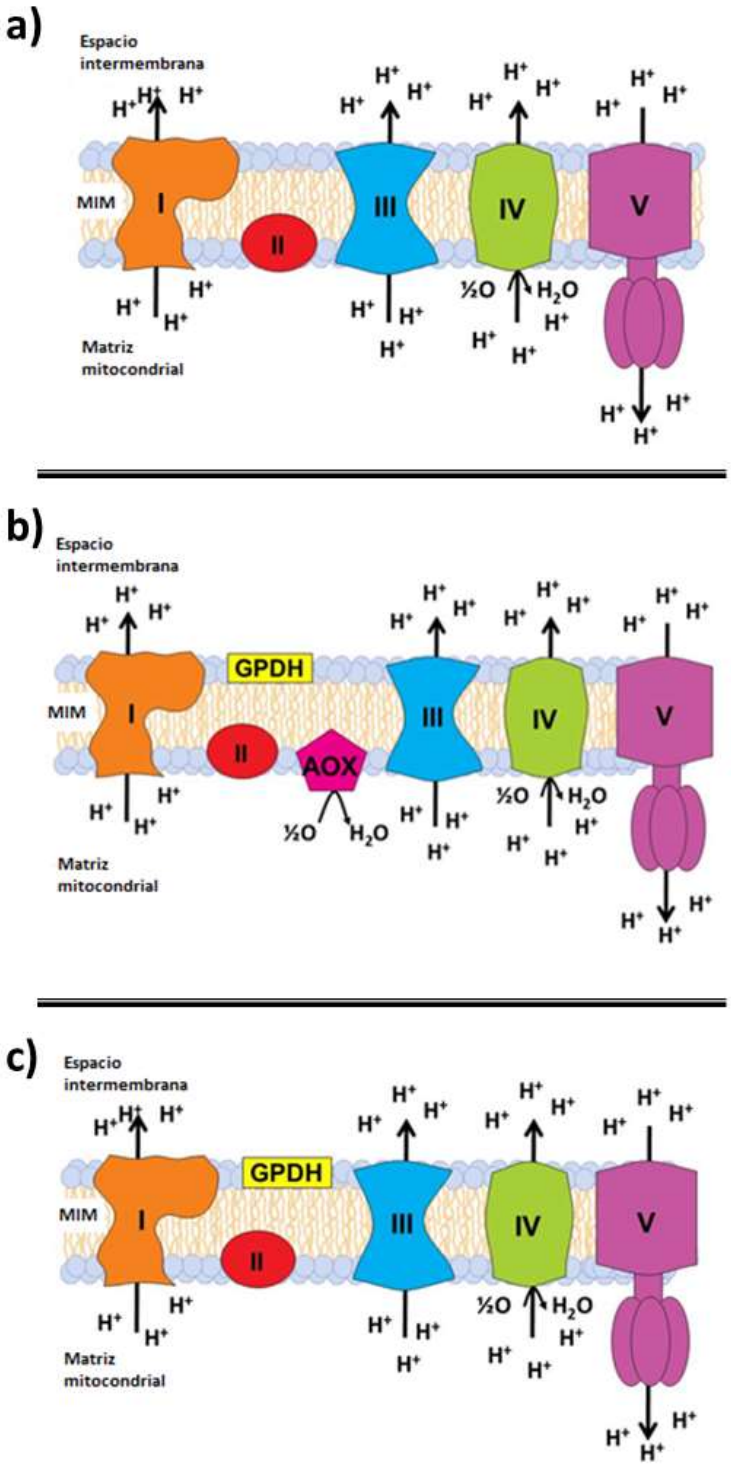


Figura 29. Cadenas respiratorias de las mitocondrias de artemia y camarón. a) Postlarvas y adultos de *L. vannamei.* b) Nauplios de *A. franciscana.* c) Adultos de *A. franciscana*. I) NADH deshidrogenasa. II) Succinato deshidrogenasa. III) Citocromo b reductasa. IV) Citocromo c oxidasa. V) ATP sintasa. GPDH) Glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial. AOX) Oxidasa alterna.

6.11. Evaluación de la Función Mitocondrial del Camarón Blanco *L. vannamei* Expuesto a Cambios en la Concentración de Oxígeno Disuelto en el Agua.

La figura 30 muestra los gráficos del acoplamiento mitocondrial de los camarones sometidos a estrés oxidativo mediante hipoxia y reoxigenación. Se observó que las mitocondrias se encontraban intactas y acopladas, se calcularon los controles respiratorios y las mitocondrias de camarones en normoxia (5 mg O_2/L) presentaron un CR de 1.66 (Figura 30a), mientras que en las mitocondrias de los camarones en hipoxia (1.5 mg O_2/L) disminuyó a 1.09 (Figura 30b) y aumentó cuando los camarones fueron reoxigenados (4 mg O_2/L) con un valor de 1.47 (Figura 30c).

La velocidad del consumo de oxígeno de las mitocondrias en el estado respiratorio IV mostró ser significativamente mayor en las mitocondrias aisladas de los camarones en normoxia (30 natgO / mg de proteína·min) comparadas con las de los camarones en hipoxia (6.5 natgO / mg de proteína·min) y con aquellos en reoxigenación (10.2 natgO / mg de proteína·min) ($p<0.05$; Figura 31).

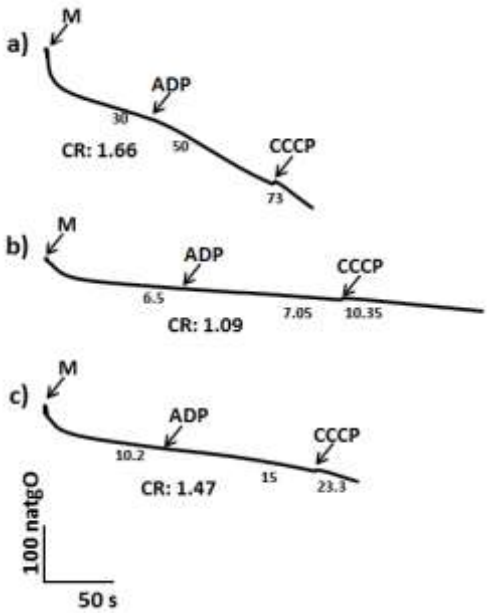


Figura 30. Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas del camarón *L. vannamei* expuesto a estrés oxidativo. a) Normoxia (5 mg O_2/L), b) Hipoxia (1.5 mg O_2/L), c) Reoxigenación (4 mg O_2/L). Sustrato respiratorio: succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Los números indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. CR: control respiratorio (estado III/ estado IV). Los valores representan las medias de los triplicados.

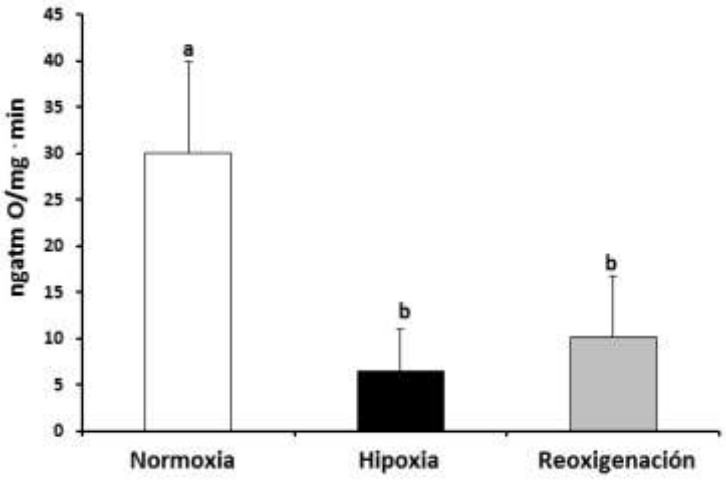


Figura 31. Tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias intactas y acopladas del camarón *L. vannamei* en estado no fosforilado. Normoxia (5 mg O_2/L), hipoxia (1.5 mg O_2/L) y reoxigenación (4 mg O_2/L). Sustrato respiratorio: succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Tasa de consumo de oxígeno en unidades de natgO / mg de proteína·min. Las literales indican las diferencias significativas entre las medias de los triplicados, Tukey-Kramer, ($p<0.05$).

6.12. Efecto del Estrés Oxidativo sobre la Captación de Calcio Exógeno en Mitocondrias de Camarón.

Debido a que se ha reportado que la transición de la permeabilidad mitocondrial ocurre en condiciones de estrés oxidativo, se determinó la captación de calcio exógeno en las mitocondrias aisladas del camarón en hipoxia y reoxigenación (Figura 32). En los tratamientos de normoxia y reoxigenación se observaron diferencias en concentraciones de 0 a 700 μM de calcio ($p<0.05$), sin embargo, en 800, 900 y 1000 μM no se observaron diferencias significativas, sin embargo, si se observó que la %Fmax de las mitocondrias energizadas es ligeramente menor (Figura 32a y 32c).

En el tratamiento de hipoxia se observó que, en cada una de las adiciones de calcio, el %Fmax de las mitocondrias energizadas siempre fue menor ($p<0.05$) comparado con el %Fmax de las mitocondrias no energizadas (Figura 32b). En todos los tratamientos el %Fmax de los controles aumentó durante cada una de las adiciones hasta la saturación de la sonda (Figura 32a, 32b y 32c). Esto indica que la transición de la permeabilidad

tampoco se induce por efecto del estrés oxidativo provocado por los cambios en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, además los resultados sugieren que las mitocondrias del camarón tienen una capacidad inusual de almacenar calcio dentro de su matriz y que probablemente el calcio no es el catión que induce este evento de transición, si es que el fenómeno existe en las mitocondrias de camarón y artemia.

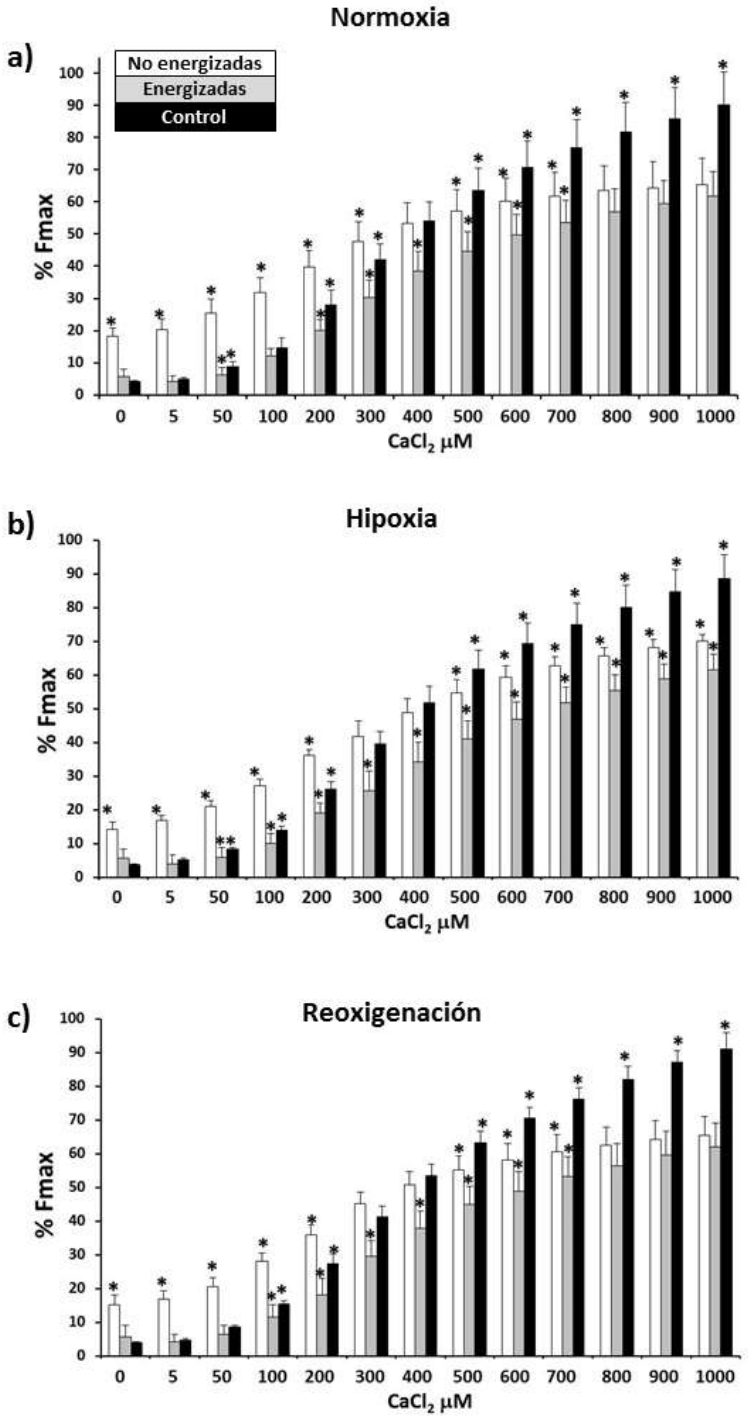


Figura 32. Efecto del estrés oxidativo sobre la captación del calcio exógeno en el camarón. Mitocondrias aisladas de camarón adulto expuesto a: a) Normoxia (5 mg O_2/L), b) Hipoxia (1.5 mg O_2/L), c) Reoxigenación (4 mg O_2/L). Barras blancas: mitocondrias no energizadas. Barras grises: mitocondrias energizadas. Barras negras: sin mitocondrias (control). %Fmax: Porcentaje de fluorescencia máxima. Los valores representan la media de los triplicados. El asterisco (*) representa las diferencias significativas entre las mitocondrias energizadas, no energizadas y el control de cada concentración de calcio. Tukey-Kramer, ($p<0.05$).

6.13. Efecto del Estrés Oxidativo sobre el Hinchamiento Mitocondrial y el Potencial Transmembranal en Mitocondrias de Camarón.

Al determinar si la adición de calcio a las mitocondrias del camarón expuesto a hipoxia y reoxigenación produce hinchamiento no se observó respuesta alguna, puesto que la ΔDO no disminuyó hasta que se agregó el ionóforo como se muestra en las figura 33.

También se evaluó el potencial transmembranal en las mitocondrias de los camarones expuestos a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en el agua (Figura 34). Se observó que, al agregar las mitocondrias, el ΔΨm se empezó a formar ya que se detectó una disminución de la fluorescencia, sin embargo, al adicionar el calcio no se evidencia el colapso de ΔΨm esperado en ninguno de los tratamientos (Figuras 34a, 34b y 34c). Estos resultados sugieren que estos factores no promueven el hinchamiento, ni el desacoplamiento mitocondrial, lo que indica que no se presentó la transición de la permeabilidad.

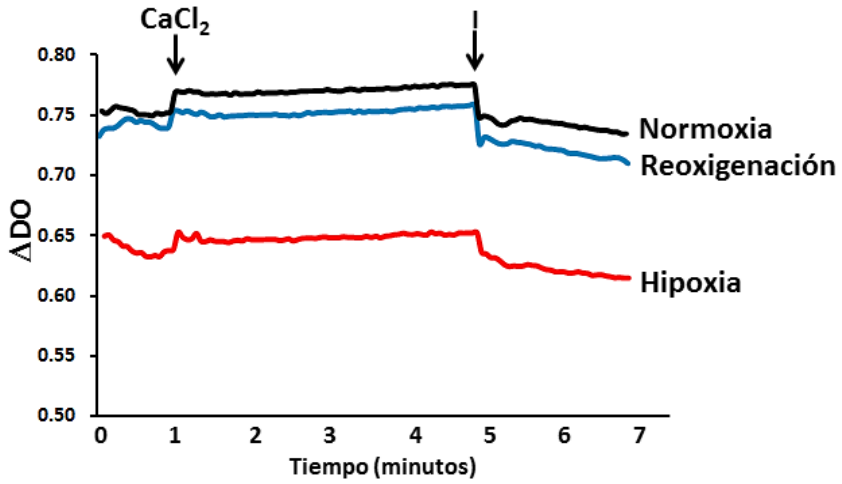


Figura 33. Hinchamiento mitocondrial en camarones expuestos a estrés oxidativo. Mitocondrias aisladas de adultos de *L. vannamei* expuestos a: Normoxia (5 mg O_2/L) (línea negra), hipoxia (1.5 mg O_2/L) (línea roja) y reoxigenación (4 mg O_2/L) (línea azul). $CaCl_2$: 250 µM calcio. I: Ionóforo A23187. ΔDO: Cambios en la densidad óptica (540 nm). Se representan las medias de los triplicados.

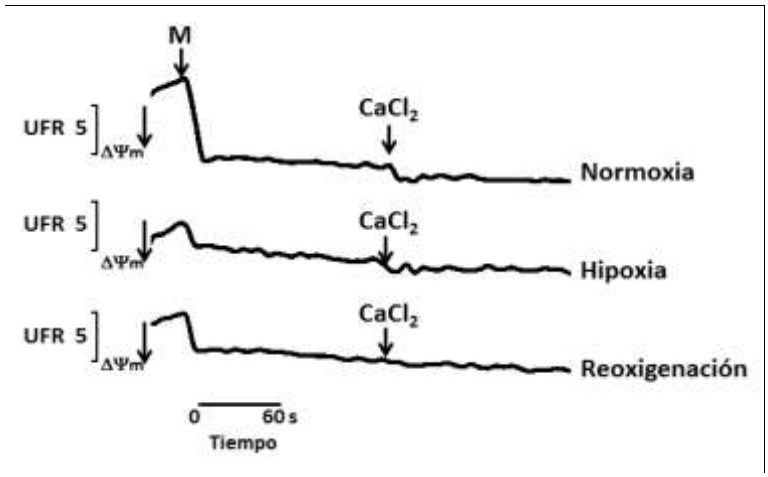


Figura 34. Evaluación del potencial transmembranal mitocondrial (ΔΨm) en mitocondrias aisladas de adultos de *L. vannamei* expuestos a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto. Normoxia (5 mg O_2/L), hipoxia (1.5 mg O_2/L) y reoxigenación (4 mg O_2/L). Desacoplando con calcio ($CaCl_2$) 250 μM. M: Mitocondrias aisladas (5 mg/mL). UFR: Unidades de fluorescencia relativa. ΔΨm: Formación del potencial transmembranal. Los trazos representan el promedio de los triplicados.

6.14. Detección de la AOX y GPDHmit en Mitocondrias de *L. vannamei* Expuesto a Estrés Oxidativo.

A pesar de la ausencia previamente observada de una AOX en las mitocondrias del camarón en diferentes estadios de crecimiento, la presencia de esta enzima se evaluó por oximetría en camarones sometidos a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en el agua, para determinar si la proteína se expresa por efecto del estrés oxidativo.

La figura 35 muestra que las mitocondrias del camarón en las tres las condiciones evaluadas estaban acopladas, pues el CCCP aceleró el consumo de oxígeno, sin embargo, al agregar el OG la velocidad de consumo de oxígeno apenas disminuyó y al agregar el KCN en las mitocondrias de los organismos en los tres tratamientos, este abatió el consumo de oxígeno (Figura 35a, 35b y 35c). Al realizar el control de estas evaluaciones se observó que sin la presencia del CCCP, el OG no muestra un efecto sobre el consumo de oxígeno en ninguno de los tratamientos confirmando la ausencia de AOX (Figura A13).

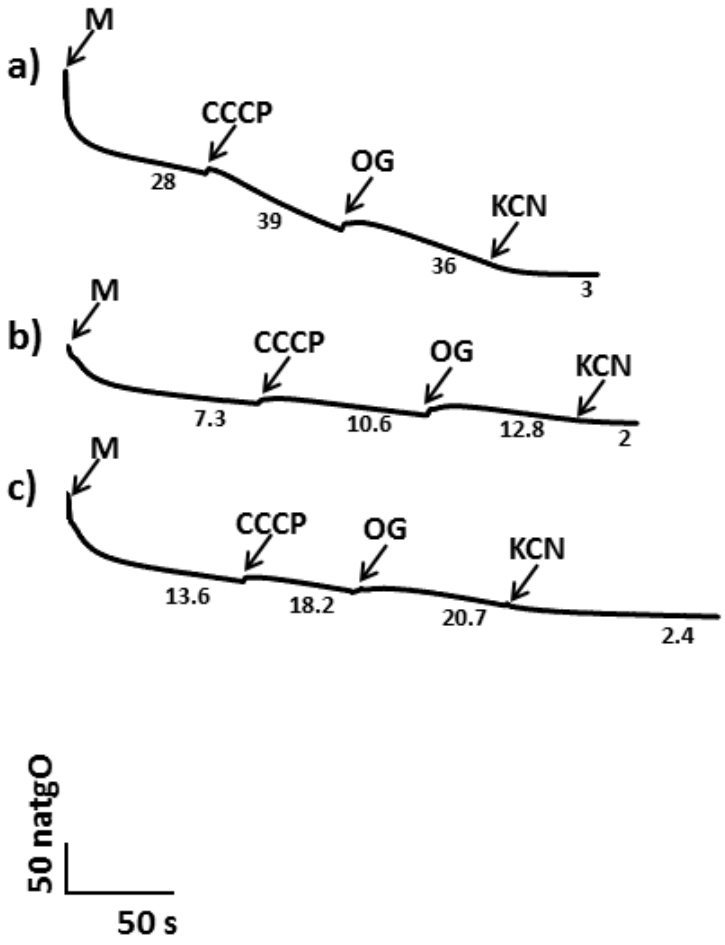


Figura 35. Identificación de la AOX en las mitocondrias del camarón *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto. a) Normoxia (5 mg O_2/L). b) Hipoxia (1.5 mg O_2/L). c) Reoxigenación (4 mg O_2/L). M: Proteína mitocondrial de camarón (1 mg/mL) en cada trazo. Sustrato respiratorio: Succinato. OG: Octil galato. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

La presencia de la GPDHmit se determinó por oximetría en las mitocondrias del camarón en condiciones de normoxia, hipoxia y reoxigenación. En presencia de G3P como sustrato respiratorio se observó un bajo consumo de oxígeno, incluso en el estado desacoplado, comparado con la tasa respiratoria obtenida con succinato (Figuras 36a, 36b y 36c). En la evaluación de los controles (Figura A14) se observó un efecto casi nulo de la rotenona pues la tasa respiratoria se mantuvo, pero con un bajo flujo de electrones; después de agregar la antimicina A y el KCN, el consumo de oxígeno

disminuyó constantemente. Lo anterior indica la ausencia de una GPDHmit en las mitocondrias del camarón.

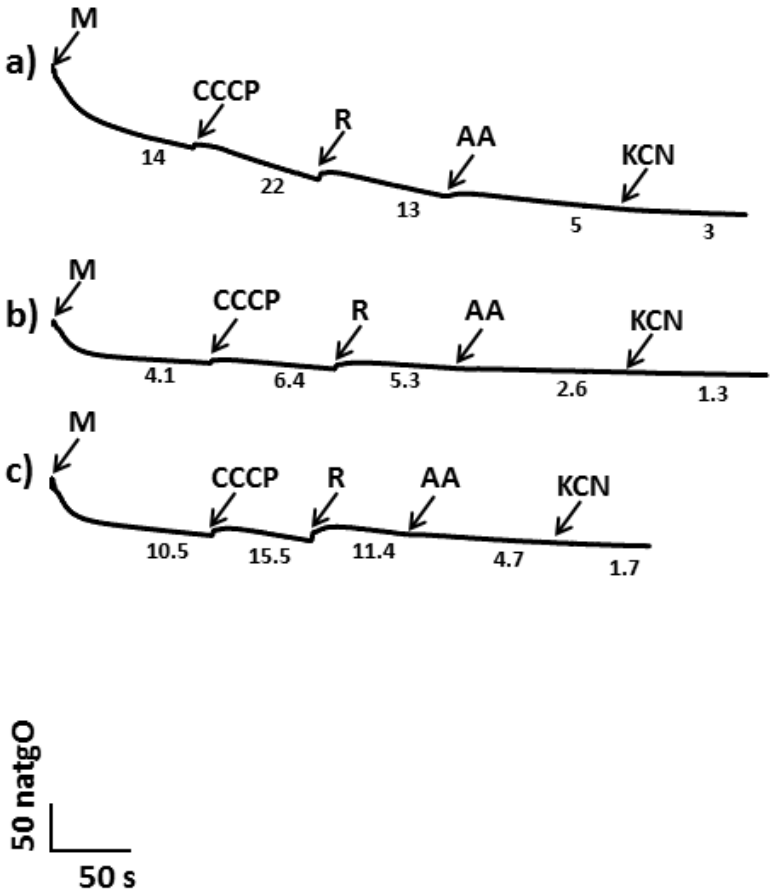


Figura 36. Identificación de la GPDHmit en las mitocondrias del camarón *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto. a) Normoxia (5 mg O_2/L). b) Hipoxia (1.5 mg O_2/L). c) Reoxigenación (4 mg O_2/L). M: Proteína mitocondrial de camarón (1 mg/mL) en cada trazo. Sustrato respiratorio: glicerol-3-fosfato. R: Rotenona. AA: Antimicina A. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

Considerando todos resultados previos y para un mejor entendimiento del papel que desempeñan las proteínas desacoplantes (UCPs) del camarón en el estado de desacoplamiento intermitente que el ATP parece inducir en las mitocondrias del camarón (Figuras A6c y A6d), se evaluó el consumo de oxígeno mitocondrial en presencia de un inhibidor de las UCPs, guanosín difosfato (GDP).

Como se muestra en la figura A15, los resultados confirmaron un mayor consumo de oxígeno en las mitocondrias de camarón al agregar ATP; sin embargo, la adición de GDP (0.1 mM) después del ATP promovió la disminución de la tasa respiratoria; mientras que después de la adición del CCCP ya no se observó su efecto desacoplante (Figura A15a). Cuando se agregó primero el GDP a la mezcla de reacción, el consumo de oxígeno disminuyó y la adición del ATP indujo un ligero incremento, seguido por el CCCP (Figura A15b). Lo anterior sugiere que en presencia del ATP, las mitocondrias del camarón pudieran estar activando las UCPs, para alcanzar el estado desacoplado intermitente provoca la fuga de protones del espacio intermembrana a la matriz mitocondrial y el aumento en el consumo de oxigeno detectado en este experimento.

7. DISCUSIÓN

Entre las miles de especies de crustáceos, los branquiópodos y los decápodos son organismos adaptados a sobrevivir en ambientes marinos extremos ya que existen especies capaces de enfrentar cambios importantes en la salinidad del agua, el oxígeno y la temperatura (Abatzopoulos et al., 2002; Puente-Carreón, 2009). *Artemia franciscana* tiene como característica particular la habilidad de sobrevivir a largos periodos de anoxia en forma de quistes, evidenciando un mecanismo de regulación del metabolismo energético que le permite disminuir la síntesis de ATP y controlar su gasto energético (Clegg et al., 1997). Por otro lado, el camarón blanco *L. vannamei* ha sido identificado como una especie tolerante a la hipoxia, con la habilidad de enfrentarse a cambios continuos en los niveles de oxígeno disuelto en el agua a lo largo de su ciclo de vida, en donde se encuentra expuesto continuamente a condiciones de hipoxia y reoxigenación (Le Moullac et al., 1998; Grecay et al., 2002; Pérez-Rostro et al., 2004).

Estudios previos han confirmado que las variaciones en el oxígeno ambiental disparan cambios metabólicos en las células de los organismos, por ejemplo, una baja tasa metabólica, la disminución de la síntesis de ATP, cambios en el pH intracelular, sobreproducción de EROS, sobrecarga de calcio citosólico y mitocondrial y por último la apoptosis (Haworth y Hunter, 1979; Halestrap et al., 1998). Para enfrentar todos estos retos, los organismos han tenido que desarrollar mecanismos y moléculas especializados para sobrevivir a los cambios en las condiciones ambientales.

De acuerdo a lo anterior, la mitocondria es el organelo que cubre algunas de las funciones esenciales que le permiten al organismo enfrentar los retos ambientales, pues hace uso del oxígeno molecular que viene del ambiente para producir la energía química que mantiene en funcionamiento a la célula y su estado homeostático, confiriéndole además la capacidad de respuesta en condiciones de estrés oxidativo (Nicholls y Ferguson, 2003).

En este trabajo se aislaron mitocondrias intactas y acopladas de artemia y camarón en sus etapas larvales y adultas. El consumo de oxígeno mitocondrial y los coeficientes respiratorios calculados para ambos crustáceos presentaron valores menores a los

reportados para las mitocondrias de corazón de bovino y otros vertebrados; sin embargo, los valores obtenidos en este estudio coinciden con los reportes previos en esta especie de camarón (Chimeo-Nuñez, 2017, Reyes-Zamora, 2018) y otros organismos marinos incluyendo el poliqueto *Nereis pelagica* y el bivalvo *Arctica islandica* con CRs de 1.9 and 2.5, respectivamente (Tschischka et al., 2000). Estos valores bajos pueden deberse a las bajas concentraciones de oxígeno que se encuentran en el agua marina, comparadas con la de la atmósfera, por lo que la tasa respiratoria mitocondrial de los organismos acuáticos en general, pudiera estar adaptada a la baja disponibilidad de oxígeno ambiental para seguir sintetizando ATP y evitar la sobreproducción de EROS (Tschischka et al., 2000).

Las mitocondrias entre sus funciones esenciales presentan respuestas específicas que les permiten controlar o prevenir la producción de EROS, una de esas respuestas son los mecanismos de desacoplamiento fisiológico mitocondrial. Entre los mecanismos de desacoplamiento hasta la fecha reportados para las mitocondrias de varias especies de organismos están la transición de la permeabilidad (TP) y la presencia de enzimas deshidrogenasas y oxidasas alternas mitocondriales que forman parte de la cadena respiratoria de algunas especies (Marres et al., 1991; Duarte et al., 2003; Nicholls y Ferguson, 2003; Cabrera-Orefice et al., 2014a).

Una serie de estudios previos han reportado que en las mitocondrias de vertebrados la presencia de patógenos, enfermedades, ó el estrés oxidativo que genera un evento de isquemia-reperfusión pueden provocar una sobrecarga de calcio citosólico. En estas condiciones, las mitocondrias funcionan captando calcio en un esfuerzo de lograr un efecto amortiguador para mantener estables las concentraciones de calcio citosólico (Azzi y Azzone, 1966; Haworth y Hunter, 1979; Azzolin et al., 2010; Chernorudskiy y Zito, 2017). La entrada de gran cantidad de iones de calcio a la mitocondria de los vertebrados provoca que se desencadene el proceso conocido como transición de la permeabilidad. Cuando este proceso se activa, se da un incremento abrupto en la permeabilidad de la MIM, permitiendo el paso indiscriminado de iones y metabolitos con una masa molecular no mayor a 1.5 kDa; este fenómeno se manifiesta junto con el hinchamiento mitocondrial y el colapso del potencial transmembranal ($\Delta\Psi m$) (Haworth y Hunter, 1979; Chalmers y Nicholls, 2003).

Debido a que hasta la fecha no existe ningún mecanismo de desacoplamiento reportado en las mitocondrias de los crustáceos, el presente estudio estuvo enfocado en determinar la existencia alguno de estos mecanismos, específicamente la transición de la permeabilidad y la presencia de enzimas oxidorreductasas alternas tanto en artemia como en el camarón.

La primera parte de la investigación permitió confirmar que las mitocondrias del camarón cuentan con todas las proteínas que se ha reportado podrían estar involucradas en la transición de la permeabilidad, mientras que en la artemia estas proteínas fueron identificadas previamente por Menze et al. (2005).

Los primeros resultados de la evaluación de la función mitocondrial de los crustáceos en este estudio demuestran que las mitocondrias tanto energizadas, como las no energizadas de nauplios y adultos de *A. franciscana*, y de las postlarvas y adultos del camarón *L. vannamei* son capaces de captar grandes cantidades de calcio, pero sin entrar en el proceso de transición de permeabilidad. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Menze et al. (2005), quienes previamente no observaron TP en las mitocondrias de nauplios de artemia.

En los mamíferos, el uniportador de calcio mitocondrial (MCU) es el canal específico que atraviesa la MIM, permitiendo la entrada de calcio (Marchi y Pinton, 2014). Reportes previos han demostrado que en los mamíferos, la concentración de calcio en la matriz mitocondrial es de aproximadamente 0.2-10 μM de calcio por mg de proteína, de tal manera que al sobrepasar esas concentraciones se induce la TP (Nicholls y Ferguson, 2003).

Recientemente se publicó un estudio que confirma, en el camarón blanco *L. vannamei*, la existencia del MCU con todas las características estructurales de una proteína funcional (Reyes-Zamora, 2018), de tal manera que este resultado permite inferir que las mitocondrias de este organismo cuentan con el uniportador mitocondrial específico para la captación de calcio citosólico. A pesar de lo anterior, los resultados de este estudio muestran que en las mitocondrias de *A. franciscana* y *L. vannamei*, ni el calcio, ni el estrés oxidativo inducen el hinchamiento mitocondrial, contrario a lo que sucedió en las mitocondrias de bovino evaluadas como control positivo en este trabajo y en las mitocondrias aisladas de ratón evaluadas por Menze et al. (2005).

Estos resultados coinciden también con reportes previos en las especies de camarones *Lepidophthalmus louisianensis*, *Crangon crangon* y *Palaemon serratus*, cuyas mitocondrias no entran en TP en presencia de altas concentraciones de calcio y el hinchamiento mitocondrial tampoco ocurre (Menze et al., 2005; Holman y Hand, 2009; Konrad et al., 2012).

El colapso del potencial transmembranal mitocondrial es otra de las características de las mitocondrias que han entrado en un estado de transición de la permeabilidad. En los crustáceos este parámetro ha sido escasamente estudiado. Los resultados de este estudio muestran que en las mitocondrias aisladas de los nauplios y adultos de artemia, así como las de camarón adulto se forma un potencial transmembranal que colapsa pero no en presencia de calcio, sino hasta que se agrega el agente desacoplante CCCP sin que ocurra la TP.

En el caso particular de las mitocondrias de las postlarvas de camarón, el $\Delta\Psi m$ se forma y se mantiene aún al agregar el CCCP, lo que supondría que las mitocondrias no estaban acopladas, sin embargo, en la evaluación del consumo de oxígeno se observa que el CCCP si desacopla las mitocondrias de las postlarvas, por lo que el método de aislamiento fue adecuado.

El hecho de que el CCCP no haya causado el efecto esperado en las mitocondrias de postlarvas de camarón podría deberse a una disminución de la sensibilidad de la MIM hacia el CCCP, esto generado por una variación en la composición lipídica de las membranas mitocondriales (lipidoma) en este estadio. Se ha reportado que, en algunos crustáceos, como es el caso de *A. franciscana*, el lipidoma varía de acuerdo a la etapa de desarrollo, permitiendo que se modifique la funcionalidad de algunas proteínas de membrana (Chen et al., 2016; Chen et al., 2018), por lo que se sugiere evaluar el desacoplamiento mitocondrial y el potencial transmembranal con otro agente desacoplante como el FCCP.

Debido a que las mitocondrias de ambos crustáceos no entraron en un proceso de transición de la permeabilidad por efecto de una sobrecarga de calcio, como se ha observado en la mayoría de las especies eucariontes (Azzi y Azzone, 1966; Haworth y Hunter, 1979; Azzolin et al., 2010), en este estudio se probaron otros cationes y compuestos como posibles inductores o reguladores de la apertura del poro de la

transición en los crustáceos, confirmandose que en presencia de otros cationes mono- ó divalentes como el Cu^{2+}, K^{+}, y Na^{+} no hay transición de la permeabilidad en ninguna de las dos especies.

Un estudio previo reportó que en las mitocondrias de hepatocitos de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, la TP se indujo por la adición de Cu^{2+} (Krumschnabel et al., 2005).

Las respuestas de las mitocondrias de los crustáceos se asemejan a las de las mitocondrias de la levadura salina *Debaryomyces hansenii*. Se ha observado que el canal inespecífico mitocondrial (MUC), mediante el cual ocurre la TP en levaduras, se cierra al sensar el Ca^{2+}, Mg^{2+}, y Na^{+}. Sin embargo el K^{+} en presencia de Pi (0.4 mM) promueve el incremento de la sintesis de ATP con una posterior apertura del MUC. Los autores sugieren que esta levadura marina, la cual se desarrolla en ambientes hipersalinos, está adaptada para sobrevivir a las altas concentraciones de sal (Cabrera-Orefice et al., 2010).

En otros estudios como el de Kowaltowski et al. (1996) se reportó que la presencia del fosfato induce la TP en mitocondrias de rata, sin embargo, se encontró que el Pi acelera el consumo de oxígeno a una concentración de 10 mM. Resultados similares se observaron en el presente estudio, sugiriendo que la respiración de las mitocondrias de artemia y camarón es dependiente del Pi, pero la presencia del mismo no induce la TP.

Por otra parte, se ha observado que en las mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la TP se induce por la adición de ATP y se inhibe en presencia de altas concentraciones de Pi (Prieto et al., 1995).

En este estudio se observó que la adición de ATP acelera el consumo de oxígeno mitocondrial y promueve la captación de calcio en las mitocondrias energizadas y no energizadas de artemia y camarón, sin evidencia de la TP. Lo anterior sugiere que en presencia de ATP, las mitocondrias entran en un estado de desacoplamiento fisiológico intermitente, desacoplándose por algún otro mecanismo diferente a la TP, controlando así la respiración y la formación de EROS.

Si bien en las mitocondrias de las artemias el desacoplamiento intermitente en presencia de ATP puede ser mediado por las enzimas alternas como se discutirá mas adelante, en el camarón blanco a la fecha no hay evidencia clara de algún mecanismo de desacoplamiento existente.

En este estudio se confirmó la ausencia de la TP en cualquier estadio de crecimiento o condición de estrés evaluada, sin embargo en las mitocondrias del camarón recientemente se identificaron y caracterizaron dos proteínas desacoplantes (LvUCP4 y LvUCP5) (Mendez-Romero, 2016). Tomando en cuenta estos hallazgos y el efecto del ATP en presencia del inhibidor de las UCPs (GDP) en las mitocondrias aisladas de camarón, se sugiere que las UCPs pudieran participar en la fuga de protones permitiendo un estado desacoplado intermitente ante un exceso de ATP. Si bien las mitocondrias de los crustáceos no presentan la transición de la permeabilidad como mecanismo de desacoplamiento mitocondrial, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que utilizan otro mecanismo como lo son, las enzimas oxidorreductasas alternas.

Primeramente, la actividad en gel de los complejos I, II, III, IV y V fue evaluada en mitocondrias de nauplios de *A. franciscana* y *L. vannamei* y comparada con la actividad de los complejos respiratorios de bovino. Se detectó más de una banda con actividad de NADH deshidrogenasa en las mitocondrias de artemia y camarón, lo que parecía indicar que se trataba de enzimas NADH deshidrogenasas externas (tipo II), sin embargo, los análisis de LC-MS/MS confirmaron que se trataba de deshidrogenasas del ciclo de Krebs. Estos resultados se confirmaron con la evaluación del consumo de oxígeno utilizando NADH como sustrato respiratorio y tampoco se confirmó la presencia de esta enzima. Por lo anterior se sugiere que no existe una NADH deshidrogenasa externa en las mitocondrias de estos dos crustáceos, contrario a lo observado en las mitocondrias del hongo *Neurospora crassa* (Duarte et al., 2003), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Marres et al., 1991) y la levadura *Debaryomyces hansenii* (Cabrera-Orefice et al., 2014a).

Por otro lado, se detectó una banda con actividad de GPDHmit unicamente en las mitocondrias de los nauplios y adultos de *A. franciscana*, misma que se confirmó mediante análisis de LC-MS/MS. Sin embargo, no se detectó esta enzima en las mitocondrias de postlarvas de camarón ni en las de camarones adultos.

La GPDHmit es una enzima que mantiene el consumo de oxígeno reduciendo el FAD, alimentando la cadena de transporte de electrones sin el bombeo de protones al espacio intermembranal, evitando la sobreproducción de EROS. Se sugiere que esta enzima se localiza en la cara externa de la MIM y que usa el G3P como sustrato proveniente del

citosol, como fue reportado por Klimgenberg (1970); a partir de esta reacción se reduce la ubiquinona a ubiquinol y este último transfiere los electrones al complejo III o a la AOX como se ha reportado en las levaduras (Guerrero-Castillo, 2012).

El hecho de que la GPDHmit se encuentre en las mitocondrias de los nauplios de artemia que recién han eclosionado puede estar asociado a que cuando la artemia se encuentra dentro del quiste, el metabolismo energético se mantiene utilizando la trealosa como fuente de energía. La trealosa es un disacárido que al hidrolizarse genera dos moléculas de glucosa que se utilizan para la síntesis de ATP, vía glucolisis, ciclo de Krebs, cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Cuando el organismo sensa las condiciones óptimas para eclosionar, se acumulan grandes cantidades de glicerol dentro del quiste, para generar una alta presión osmótica que le permita romper el corion y eclosionar (Clegg, 1964). Como consecuencia de las grandes cantidades de glucosa proveniente de la trealosa, se generan abundantes moléculas de G3P proveniente de la oxidación de la glucosa y de la isomerización de la dihidroxiacetona, por lo tanto, este sustrato respiratorio es utilizado por la GPDHmit y por ende se incrementa el consumo de oxígeno, la actividad de la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP para satisfacer la alta demanda energética del organismo.

Se observó que la GPDHmit permanece en las mitocondrias de las artemias hasta su etapa adulto, hecho que se justifica debido al tipo de alimentación y la movilización de los lípidos que surgen durante el desarrollo (Figueiredo et al., 2009). Durante la etapa adulta la artemia requiere de la ingesta de carbohidratos, proteínas, así como de ácidos grasos para su supervivencia, especialmente los ácidos grasos polinsaturados (ACP) ya que el organismo no los puede sintetizar (Bergé y Barnathan, 2005). El alga espirulina, entre otros tipos de microalgas, es rica en los carbohidratos y en ACPs que la artemia utiliza (Tokusoglu y Ünal, 2003), es por esto que la alimentación con esta alga durante treinta días, resultó en un cultivo exitoso. Se ha reportado que en algunas etapas del desarrollo de la artemia ocurre una reorganización constante de los lípidos en las membranas de los organismos (Dutrieu, 1960), lo que activaría la síntesis y oxidación lipídica, en donde podría estar involucrada la GPDHmit en las mitocondrias adultas.

En estudios previos realizados en la levadura marina *D. hansenii*, se reportó la participación de la GPDHmin en la acumulación y síntesis de glicerol y lípidos para

mantener la osmorregulación (Adler et al., 1985), por lo que un proceso similar podría estar implicado en las mitocondrias de la artemia. En la figura 37 se muestra un esquema que representa los procesos metabólicos que pudieran participar durante la eclosión y alimentación en el ciclo de vida de *A. franciscana.*

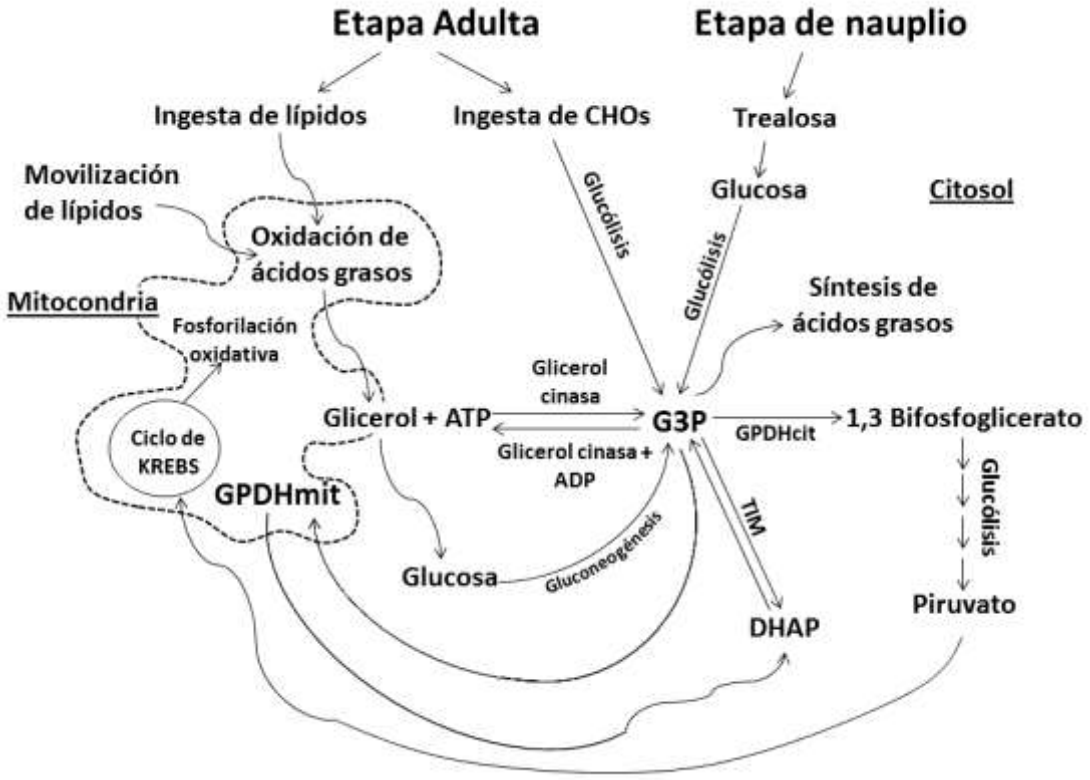


Figura 37. Procesos metabólicos relacionados con la presencia de la GPDHmit en *Artemia franciscana*. GPDHmit: Glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial, GPDHcit: Glicerol fosfato deshidrogenasa citosólica, G3P: Glicerol-3-fosfato, DHAP: Dihidroxiacetona fosfato, TIM: Triosa fosfato isomerasa, CHOs: Carbohidratos.

De manera adicional se sabe que la AOX tiene un rol importante en el mantenimiento del oxígeno intracelular, ya que cuando el ADP disminuye o el oxígeno se acumula dentro de la célula, la AOX se activa para disminuir el riesgo de una sobreproducción de EROS, evitando así un daño celular por estrés oxidativo (Korshunov et al., 1997; Tschischka et al., 2000).

El hecho de que las mitocondrias de nauplios de artemia presenten actividad de la GPHDmit, la AOX y la COX al mismo tiempo, pudiera deberse a que en esa etapa la artemia presenta una demanda energética muy alta, ya que requiere de suficiente energía para eclosionar, mantener sus funciones celulares recientemente activadas, nadar y mudar para crecer (Abatzopoulos et al., 2002). Por lo que esta enzima permite controlar los niveles de ATP y regula los niveles de oxígeno molecular para prevenir una sobreproducción de EROS como se ha sugerido en otros organismos invertebrados y hongos (Joseph-Horne et al., 2001; Abele et al., 2007). Estudios previos han reportado la presencia de la AOX en moluscos e invertebrados marinos (McDonald et al., 2009), sin embargo, este es el primer hallazgo, en donde se reporta la presencia de dos enzimas alternas en las mitocondrias de crustáceos.

Debido a que en las mitocondrias del camarón no se encontró evidencia de que ocurra la transición de la permeabilidad y tampoco se detectó la presencia de enzimas alternas en su cadena respiratoria, es necesario evaluar otros mecanismos de desacoplamiento mitocondrial. A la fecha se cuenta con evidencia reciente de la existencia de las proteínas desacoplantes (UCPs) en las mitocondrias del camarón (Mendez-Romero, en preparación), sugiriendo que estas enzimas pueden realizar la función desacoplante que le confieren las enzimas alternas a las mitocondrias de la artemia para mantener el balance energético.

8. CONCLUSIÓN

Los mecanismos de desacoplamiento mitocondrial parecen presentarse en respuesta a las necesidades energéticas de los organismos y a las condiciones ambientales en las que estos se desarrollan. Los resultados de este trabajo sugieren que el fenómeno de la transición de la permeabilidad no ocurre en las mitocondrias de los crustáceos, y/o que este fenómeno se encuentra altamente regulado ante la presencia de calcio, y estrés oxidativo. La ausencia de la TP en los crustáceos marinos pudiera representar una adaptación evolutiva de estos organismos para sobrevivir a las altas concentraciones de calcio, cobre, sodio y potasio que se encuentran en el ambiente marino, además, que estos son capaces de tolerar cambios en la concentración de oxígeno disuelto en el agua para lograr la supervivencia. Se sugiere que el ATP genera un mecanismo de desacoplamiento fisiológico intermitente en las mitocondrias del camarón, y siendo a la fecha, las UCPs la única prueba de un mecanismo de desacoplamiento mitocondrial en *L. vannamei*, se sugiere que estas proteínas pueden realizar la función desacoplante que le confieren las enzimas alternas a las mitocondrias de la artemia para mantener el balance energético.

Por otra parte, el hecho de que los nauplios de artemia posean una GPDHmit y una AOX como parte de su cadena respiratoria, pudiera representar un mecanismo evolutivo de supervivencia para enfrentar los retos de la eclosión, así como para soportar la gran cantidad de oxígeno a la que se exponen después de la eclosión.

Con base en lo anterior se considera importante continuar con el estudio de las proteínas desacoplantes del camarón, y la evaluación detallada del efecto que ejerce el ATP sobre las UCPs mediante el cual se manifiesta el desacoplamiento fisiólogico intermitente mitcondrial reportado en este estudio.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abatzopoulos T.J., Beardmore J.A, Clegg, J.S., Sorgeloos P. 2002. Artemia: basic and applied biology. Springer science businessmedia Dordrecht. ISBN 978–90–481-6073-0.

Abele D., Philipp E., Gonzalez P.M., Puntarulo S. 2007. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. Front. Biosci. 12: 933-946.

Adler L., Blomberg A., Nilsson A. 1985. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. 162: 300-306.

Albertyn J., Hohmann S., Thevelein J.M., Prior B.A. 1994. GPD1, Which Encodes Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, Is Essential for Growth under Osmotic Stress in Saccharomyces cerevisiae, and Its Expression Is Regulated by the High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. Mol. Cell. Biol. 14: 4135-4144.

Albertyn J., van Tonder A., Prior B.A. 1992. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 308: 130-132.

Al-Nasser I. and Crompton M. 1986. The entrapment of the Ca^{2+} indicator arsenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilization and resealing Na^{+}-dependent and -independent effluxes of Ca^{2+} in arsenazo III-loaded mitochondria. Biochem. J. 239: 31-40.

Altschul S.F. Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.

Anchordouguy T.J. and Hand S.C. 1995. Reactivation of ubiquination in *Artemia franciscana* embryos during recovery from anoxia-induced quiescence. J. Exp. Biol. 198: 1299-1305.

Armenta-Castro E. 2017. Evaluación de la expresión génica y caracterización bioinformática de dos isoformas del translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.

Azzi A. and Azzone G.F. 1966. Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria. Irreversible swelling induced by inorganic phosphate and Ca^{2+}. Biochim. Biophys. Acta.113: 438-444.

Azzolin L., Basso E., Argenton F., Bernardi P. 2010. Mitochondrial Ca^{2+} transport and permeability transition in zebrafish (*Danio rerio*). Biochim. Biophys. Acta. 1797: 1775-1779.

Azzone G.F., Zoratti M., Petronilli V., Pietrobon D. 1985. The stoichiometry of H+ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. J. Inorg. Biochem. 23: 349-356.

Bergé J.P., Barnathan G., 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 96: 49-105.

Bernardi P. 2013. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery soved? Front. Physiol. 4: 1-12.

Bonner W.D. and Voss D.O. 1961. Some Characteristics of Mitochondria Extracted from Higher Plants. Nature. 191:682-684.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Cabrera-Orefice A., Chiquete-Félix N., Espinasa-Jaramillo J., Rosas-Lemus M., Guerrero-Castillo S., Peña A., Uribe-Carvajal S. 2014a. The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. Biochim. Biophys. Acta. 1837: 73-84.

Cabrera-Orefice A., Guerrero-Castillo S., Díaz-Ruíz R., Uribe-Carvajal S. 2014b. Oxidative phosphorylation in Debaryomyces hansenii: Physiological uncoupling at different growth phases. Biochimie. 102: 124-136.

Cabrera-Orefice A., Guerrero-Castillo S., Luevano-Martinez L.A., Peña A. y Uribe-Carvajal S. 2010. Mitochondria from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* (halophilic organelles?). J. Bioenerg. Biomembr. 42: 11-19.

Cardenas-Monroy C.A., Pohlmann T., Piñon-Zarate G., Matus-Ortega G., Guerra G., Feldbrügge M., Pardo J.P. 2017. The mitochondrial alternative oxidase Aox1 is needed to cope with respiratory stress but dispensable for pathogenic development in *Ustilago maydis*. PLoS One. 12: e0173389.

Cesura A.M., Pinard E., Schubenel R., Goetschy V., Friedlein A., Langen H., Polcic P., Forte M.A., Bernardi P., and Kemp J.A. 2003. The voltage dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. J. Biol. Chem. 278: 49812-49818.

Chalmers S. and Nicholls D.G. 2003. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. J. Biol. Chem. 278: 19062-19070.

Chaudhuri M. and Hill G.C. 1996. Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei* brucei alternative oxidase. Mol. Biochem. Parasitol. 83: 125-129.

Chaudhuri M., Ott R.D., Hill G.C. 2006. Trypanosome alternative oxidase: From molecule to function. Trends. Parasitol. 22: 484-491.

Chen C., Ko Y., Delannoy M., Ludtke S.J., Chiu W. and Pedersen P.L. 2004. Mitochondrial ATP Synthasome three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carries for Pi and ADP/ATP. J. Biol. Chem. 279: 31761-31768.

Chen E., Kiebish M.A., McDaniel J., Niedzwiecka K., Kucharczyk R., Ravasz D., Gao F., Narain N.R., Sarangarajan R., Seyfried T.N., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. 2018. Perturbation of the yeast mitochondrial lipidome and associated membrane proteins following heterologous expression of Artemia-ANT. Sci. Rep. 8:5915.

Chen E., Kiebisha M.A., McDaniel J., Gao F., Narain N.R., Sarangarajan R., Kacso G., Ravasz D., Seyfriedd T.N., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. 2016. The total and mitochondrial lipidome of *Artemia franciscana* encysted embryos. Biochim. Biophys. Acta. 1861: 1727–1735.

Chen T., Villeneuve T.S., Garant K.A., Amons R., MacRae T.H. 2007. Functional characterization of artemin, a ferritin homolog synthesized in Artemia embryos during encystment and diapause. FEBS J. 274: 1093-1101.

Chernorudskiy A.L. and Zito E. 2017. Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox: A Close-Up of the ER/Mitochondria Connection. J. Mol. Biol. 429: 620–632.

Chimeo-Nuñez C. 2017. El inhibidor endógeno IF1 del complejo mitocondrial ATPasa y su papel en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante la hipoxia-reoxigenación. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Clegg J.S and Conte F.P. 1980. A review of the cellular and developmental biology of artemia. In: Persoone G., Sorgeloos P., Roels O., Jaspers E. The brine shrimp artemia. Universa Press, vol 2. Wetteren. pp 11-54.

Clegg J.S. 1964. The control of emergence and metabolism by external osmotic pressure and the role of free glycerol in developing cyst of artemia salina. Exp. Biol. 41: 879-892.

Clegg J.S. 1997. Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia: the case for complete metabolic rate depression. J. Exp. Biol. 200: 467-475.

Clegg J.S., Jackson S.A., Popov VI. 2000. Long term anoxia in encysted embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*: viability, ultrastructure and stress proteins. Cell Tissue Res. 301: 433-446.

Clifton R., Lister R., Parker K.L., Sappl P.G., Elhafez D., Harver-Millar A., Day D.A., Whelan J. 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana.* Plant. Mol. Biol. 58: 193.

Considine M.J., Daley D.O., Whelan J. 2001. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. Plant Physiol. 126: 1619-1629.

Crompton M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem. J. 341: 233-249.

Crompton M. 2000. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. J. Physiol. 15: 529-1121.

Crompton M. and Costi A.1990. A heart mitochondrial Ca^{2+}-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Biochem. J. 266: 33-39.

Crompton M., Virji S., Ward J.M. 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. Eur. J. Biochem. 258: 729-735.

de Vries S., Grivell L. A. 1988. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 176: 377-384.

DePierre J. W. D. and Ernester L. 1977. Enzyme topology of intracellular membranes. Annu. Rev. Biochem. 46: 201-262.

Duarte M., Peters M., Schulte U., Videira A. 2003. The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. Biochem. J. 371:1005-1011.

Dutrieu J., 1960. Observations biochimiques et physiologiques sur le developpement d'Artemia sauna Leach. Archs Zool. Exp. Gen. 99: 1-133.

Elthon T.E., Nickels R.L, McIntosh L. 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higer plant mitochondrial. Plant Physiol. l89: 1311-1317.

Ernster L. 1988. Biochemistry of reoxygenation injury. Crit. Care Med. 16:947-953.

Feniouk B.A., Mulkidjanian A.Y., Junge W. 2005. Proton slip in the ATP synthase of *Rhodobacter capsulatus*: induction, proton conduction, and nucleotide dependence. Biochim. Biophys. Acta. 1706: 184-194.

Figueira T., Melo D., Vercesi A., Castilho R. 2011. Safranine as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial potential in isolated organelles and permeabilized cells. Methods Mol. Biol. 810:103-117.

Figueiredo J., van Woesik R., Lin J., Narciso L. 2009. *Artemia franciscana* enrichment model, How to keep them small, rich and alive?. Aquaculture. 294: 212-220.

Frank V. and Kadenbach B. 1996. Regulation of the H+/e- stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. FEBS Lett. 382: 121-124.

Ghaffari N., Sanchez-Flores A., Doan R., Garcia-Orozco K.D., Chen P.L., Ochoa-Leyva A., Lopez-Zavala A.A., Carrasco J.S., Hong C., Brieba L.G., Rudiño-Piñera E., Blood P.D., Sawyer J.E., Johnson C. D., Dindot S.V., Sotelo-Mundo R.R., Criscitiello M.F. 2014. Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. Sci. Rep. 4: Article 7081.

Giorgio V., von Stockum S., Antoniel M., Fabbro A., Fogolari F., Forte M., Glick G. D., Petronolli V., Zoratti M., Szabó I., Lippe G., Bernardi P. 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. PNAS. 110: 5887-5892.

Gnaiger E., Mendez E. and Hand C. 2000. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. PNAS. 97: 11080-11085.

Grecay P.A. and Stierhoff K.L. 2002. A device for simultaneously controlling multiple treatment levels of dissolved oxygen in laboratory experiments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 280: 53-62

Guerrero-Castillo S. 2012. Diferencias en la asociación de complejos respiratorios de *Yarrowia lipolytica* en respuesta a los requerimientos energéticos. Tesis de Doctorado. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Guerrero-Castillo S., Araiza-Olivera D., Cabrera-Orefice A., Espinasa-Jaramillo J., Gutierrez-Aguilar M., Luevano-Martinez L.A., Zepeda-Bastida A., Uribe-Carvajal S. 2011. Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. J. Bioenerg. Biomembr. 43: 323-331.

Guerrero-Castillo S., Vazquez-Acevedo M., González-Halphen D., Uribe-Carvajal S. 2009. In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. Biochim. Biophys. Acta. 1787:75-85.

Halestrap A. 2014. The c ring of the F1Fo ATP synthase forms the mitochondrial permeability transition pore: a critical appraisal. Front. Oncol. 4: Article 234.

Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S., Woodfield K.Y. 1998. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. Biochim. Biophys. Acta. 1366: 79-94.

Hand S.C. and Hardewig I. 1996. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: Mechanisms and implications. Annu. Rev. Physiol. 58: 539-563.

Hand S.C. and Menze M.A. 2008. Commentary Mitochondria in energy-limited states: mechanisms that blunt the signaling of cell death. J. Exp. Biol. 211: 1829-1840

Hatefi Y., Haavik A.G., Griffiths D.E. 1962. Studies on the electron transfer system. XLI. Reduce coenzyme Q (QH2)-cytochrome *c* reductase. J. Biol. Chem. 237: 1681-1685.

Haworth R.A. and Hunter D.R. 1979. The Ca^{2+} induced membrane transition of rat liver mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. Arch. Biochem. Biophys. 195: 460-467.

Holman J.D. and Hand S.C. 2009. Metabolic Depression is Delayed and Mitochondrial Impairment Averted during Prolonged Anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 376: 85-93.

Jackson S.A. and Clegg J.S. 1996. The ontogeny of low molecular weight stress protein p26 during early development of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. Dev. Growth. Differ. 38:153-160.

Jiménez-Gutiérrez L.R., Uribe-Carvajal S., Sanchez-Paz A., Chimeo C. and Muhlia-Almazan A. 2014. The cytochrome c oxidase and its mitochondrial function in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia. J. Bioenerg. Biomembr. 46: 189-196.

Joaquin-Ramos A., Huerta-Ocampo J.A., Barrera-Pacheco A., De Leon-Rodriguez A., Baginsky S., Barba de la Rosa A.P. 2014. Comparative proteomic analysis of amaranth mesophyll and bundle sheath chloroplasts and their adaptation to salt stress. J. Plant Physiol. 171: 1423-1435.

Joseph-Horne T., Hollomon D.W., Wood P.M. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. Biochim. Biophys. Acta. 1504: 179-195.

Joseph-Horne T., Wood P.M., Wood C.K., Moore A.L., Headrick J., Hollomon D. 1998. Characterization of a Split Respiratory Pathway in the Wheat Take-all Fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. J. Biol. Chem. 273: 11127-11133.

Juarez O., Guerra G., Martínez F., Pardo J. P. 2004. The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. Biochim. Biophys. Acta. 1658: 244-251.

Kadenbach B. 2003. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 1604: 77-94

Kautsky N., Rônnbâck P., Tedengren M., Troell M. 2000. Ecosystem perspectives and management of diseases in shrimp ponds farming. Aquaculture. 191: 145-161.

Kerscher S., Dröse S., Zickermann V., Brandt, U. 2008. The three families of respiratory NADH dehydrogenases. Results Probl. Cell Differ. 45: 185-222.

Kirimura K., Yoda M., Usami S. 1999. Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. Curr. Genet. 34: 472-7.

Klimgenberg M. 1970. Localization of the Glycerol-phosphate dehydrogenase in the outer phase of the mitochondrial inner membrane. Eur. J. Biochem. 13: 247-252.

Konrad C., Kiss G., Torocsik B., Adam-Vizi V., Chinopoulos C. 2012 Absence of Ca^{2+}-induced mitochondrial permeability transition but presence of bongkrekate-sensitive nucleotide exchange in *C. crangon* and *P. serratus*. PLoS ONE. 7:e39839.

Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starkov A.A. 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett. 416: 15-18.

Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. 1996. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca 2+ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. FEBS Lett. 378: 150-152.

Kowaltowski A.J., Costa A.D., Vercesi A.E. 1998. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. FEBS Lett. 425: 213-216.

Krumschnabel G., Manzl C., Berger C., Hofer C. 2005. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu^{2+} exposed trout hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 209: 62-73.

Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Ansquer D., Avarre J. C. and Levy P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris.* Fish. Shellfish. Immun. 8: 621-629.

Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T., Trost L.C., Elmore S.P., Nishimura Y., Crowe R.A., Cascio W.E., Bradham C.A., Brenner D.A., Herman B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim. Biophys. Acta. 1366: 177-196.

Leung A.W., Varanyuwatana P. and Halestrap A.P. 2008. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. J. Biol. Chem. 283: 26312-26323.

Lightner D.V. and Redman R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. Aquaculture. 164: 201-220.

Lodish H. 2005. Biología Celular y Molecular. Panamericana, E. M.

Mailloux R.J. and Harper M.E. 2012. Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. Trends. Endocrinol. Metab. 23: 451-458.

Marchi S. and Pinton P. 2014. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. J. Physiol. 592.5: 829–839.

Marres C.A.M., de Vries S., Grivell LA. 1991. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 195: 857-862.

Martínez-Cruz O., Sánchez-Paz A., Garcia-Carreño F., Jimenez-Gutierrez L., Navarrete-del-Toro M.A. and Muhlia-Almazán A. 2012. Invertebrates mitochondrial funtion and energetic challenges. Bioenergetics. INTECH. Clark K. 181-218 pp.

Mathews C. K., Holde K. E., Ahern K.G. 2003. Bioquímica. Madrid.

McDonald A.E. and Vanlerberghe G.C. 2004. Branched Mitochondrial Electron Transport in the Animalia: Presence of Alternative Oxidase in Several Animal Phyla. IUBMB Life, 56: 333–341.

McDonald A.E., Vanlerberghe G.C., Staples J.F. 2009. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. J. Exp. Biol. 212: 2627-2634.

Melo A.M., Duarte M., Videira A. 1999. Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 1412: 282-287.

Mendez-Romero O. F. 2016. Las proteínas mitocondriales desacoplantes UCP4 y UCP5 del camarón blanco y su posible función durante la hipoxia. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Menze M.A., Hutchinson K., Laborde S.M., Hand S. C. 2005. Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a

calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 289: R68-R76.

Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature. 191: 144-148.

Mitchell, P. 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 41: 445-502.

Mizutani A., Miki N., Yukioka H., Tamura H., Masuko M. 1996. A possible mechanism of control of rice blast disease by a novel alkoxyiminoacetamide fungicide, SSF126. Biochem. Cell Biol. 86: 295-300.

Moore A.L. and Siedow J.N. 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 1059: 121-140.

Mráček T., Holzerová E., Drahota Z., Kovářová N., Vrbacký M., Ješina P., Houštěk J. 2014. ROS generation and multiple forms of mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta. 1837: 98-111.

Muhlia-Almazán A. and García-Carreño F. 2003. Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean. Contributions to the Study of the east Pacific crustaceans. In: Henrickx, M. E. 2: 77-91.

Muhlia-Almazan A., Martinez-Cruz O., Navarrete del Toro M.A., García-Carreño F., Arreola R., Sotelo-Mundo R., Yepiz-Plascencia G. 2008. Nuclear and mitochondrial subunits from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* F0F1 ATP-synthase complex: cDNA sequence, molecular modeling, and mRNA quantification of atp9 and atp6. J. Bioenerg. Biomembr. 40: 359-369.

Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. Annu. Rev. Biochem. 66: 863-917.

Nicholls D.G. and Ferguson S.J. 2003. Bioenergetics 3. Academic Press, London

Pallotti F. and Lenaz G. 2007.Isolation and Subfractionation of Mitochondria from Animal Cells and Tissue Culture Lines. In Methods in Cell Biology. L. Wilson and P. Tran. Elsevier Inc. 3-44 pp.

Pérez-Rostro C., Racotta I., Ibarra A. M. 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of Litopenaeus vannamei shrimp after exposure to acute hypoxia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 302: 189-200.

Pietrobon D., Azzone G.F., Walz D. 1981. Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-driven H^+ pumps in mitochondria: on the nature of 'leaks'. Eur. J. Biochem. 117: 389-394.

Prieto S., Bouillaud F., Rial E. 1995. The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 307: 657-661.

Prieto S., Bouillaud F., Rial E. 1995. The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Biochem. J.* 307**:** 657-661.

Puente-Carreón E. 2009. Respuesta fisiológica de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN. Tesis doctoral. La Paz Baja California.

Rasmusson A., Svensson A.S., Knoop V., Brennicke A. 1999. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH deshydrogenases in higer eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochodria. Plant J. 20: 79-87.

Reyes-Zamora O. 2018. El transportador mitocondrial de calcio: su estructura y función en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante una infección viral. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Ricquier D. 2005. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. Proc. Nutr. Soc. 64: 47-52.

Rodriguez-Armenta C., Uribe-Carvajal S., Rosas-Lemus M., Chiquete-Felix N., Huerta-Ocampo J. A., Muhlia-Almazan A. 2018. Alternative mitochondrial respiratory chains from two crustaceans: *Artemia franciscana* nauplii and the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. Bioenerg. Biomembr. 50:143-152.

Rottenberg H., Covian R., Trumpower B.L. 2009. Membrane potential greatly enhances superoxide generation by the cytochrome *bc1* complex reconstituted into phospholipid vesicles. J. Biol. Chem. 284: 19203-19210.

Scheffler I.E., Ed. 1999. Mitochondria. New York.

Schmidt-Nielsen K. 1975. In: Animal physiology. Adaptation and environment, Ed: Schmidt-Nielsen K. Cambrige.

Shiba T., Kido Y., Sakamoto K., Inaoka D.K., Tsuge C., Tatsumi R., Takahashi G., Oluwadare-Balogun E., Nara T., Aoki T., HonmaT., Tanaka A., Inoue M., Matsuoka S., Saimoto H., Moore A.L., Harada S., Kita K. 2013. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. PNAS. 110: 4580-4585.

Siedow J.N and Umbach A.L. 1995. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. Plant Cell. 7: 821-831.

Silverman H.S. and Stern M.D. 1994. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. Cardiovasc. Res. 28: 581-597.

Tanton L.L., Nargang C.E., Kessler K.E., Li Q., Nargang F.E. 2003. Alternative oxidase expression in Neurospora crassa. Fungal Genet. Biol. 39: 176-90.

Tokusoglu Ö. and Ünal M.K. 2003. Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis, Chlorella vulgaris,* and *Isochrisis galbana.* J. Food Sci. 68: 1144-1148.

Tornero D., Ceña V., González-García C., Jordán J. 2002. The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes. Rev. Neurol. 35: 354-361.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from prolyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. PNAS. 76: 4350-4354.

Tschischka K., Abele D., Pörtner H.O. 2000. Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaete Nereis pelagica and the bivalve *Arctica islandica* from the Baltic and white seas. J. Exp. Biol. 203: 3355-3368.

Turrens J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552: 335-344.

Vanlerberghe G.C. and McIntosh L. 1997. Alternative oxidase: from gene to function. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 48: 703-734.

Veiga A., Arabaça J.D., Loureiro-Dias M.C. 2003. Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. FEMS Yeast. Res. 3: 239-245.

Voet D. and Voet J.G. 2006. Bioquímica Panamericana, E. M.

von Stockum S., Giorgio V., Trevisan E., Lippe G., Glick G.D., Forte M.A., Da-Re C., Checchetto V., Mazzotta G., Costa R., Szabo I., and Bernardi P. 2015. F-ATPase of *Drosophila melanogaster* Forms 53-Picosiemen (53-pS) Channels responsible for mitochondrial Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release. J. Biol. Chem. 290: 4537-4544.

Wilson-Verdugo M.D. 2017. La ciclofilina D del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*): caracterización del transcrito e identificación de la proteína. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.

Wittig I. and Schägger H. 2007. Electrophoretic methods to isolated protein complexes from mitochondria. Methods Cell. Biol. 80: 723-741.

Wittig I., Beckhaus T., Wumaier Z., Karas M., Schägger H. 2010. Mass estimation of native proteins by blue native electrophoresis: principles and practical hints. Mol. Cell. Proteomics. 9: 2149-2161.

Wittig I., Karas M., Schägger H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. Mol. Cell. Proteomics. 6: 1215-1225.

Yeh J., Chinte U., Du S. 2008. Structure of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, an essential monotopic membrane enzyme involved in respiration and metabolism. PNAS. 105: 3280-3285.

Yin Q., Cui L., Peng J., Wei P., Xie D., Chen X., Wang Z. & Li K. 2012. Molecular cloning of LvANT2 gene and its expression pattern by cold induction. Acta Hydrobiol. Sin. 36: 24-28.

Zerbetto E., Vergani L., Dabbeni-Sala F. 1997 Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. Electrophoresis. 18: 2059-2064.

Zimin A.V., Delcher A.L., Florea L., Kelley D.R., Schatz M.C., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., Van Tassell C.P., Sonstegard T.S., Marçais G., Roberts M., Subramanian .P, Yorke J.A., Salzberg S.L. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. Genome Biol. 10: R42.

10. ANEXOS.

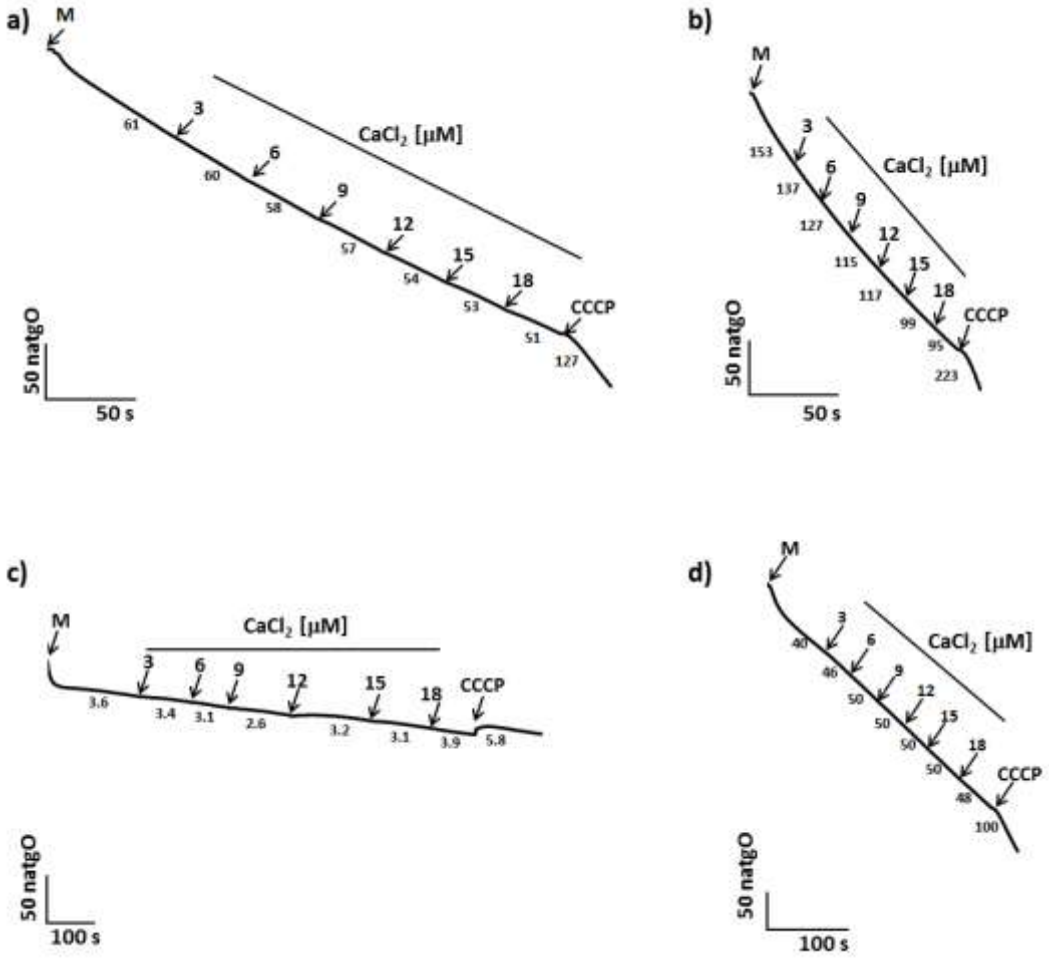


Figura A1. Efecto del calcio (Ca^{2+}) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Números encima de la gráfica indican la concentración de calcio [µM] usada en cada adición. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

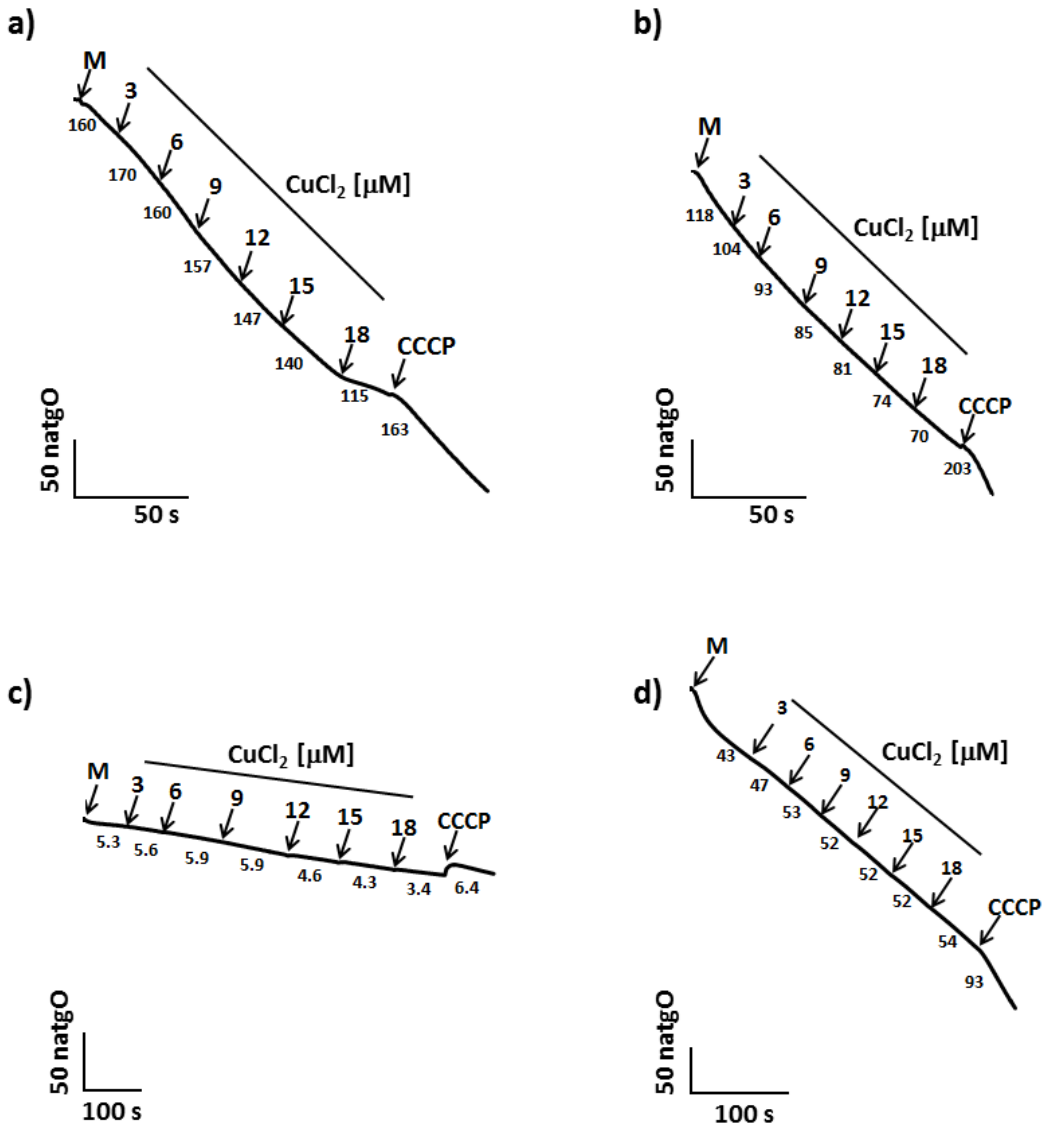


Figura A2. Efecto del cobre (Cu^{2+}) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Números encima de la gráfica indican la concentración de cobre [µM] usada en cada adición. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

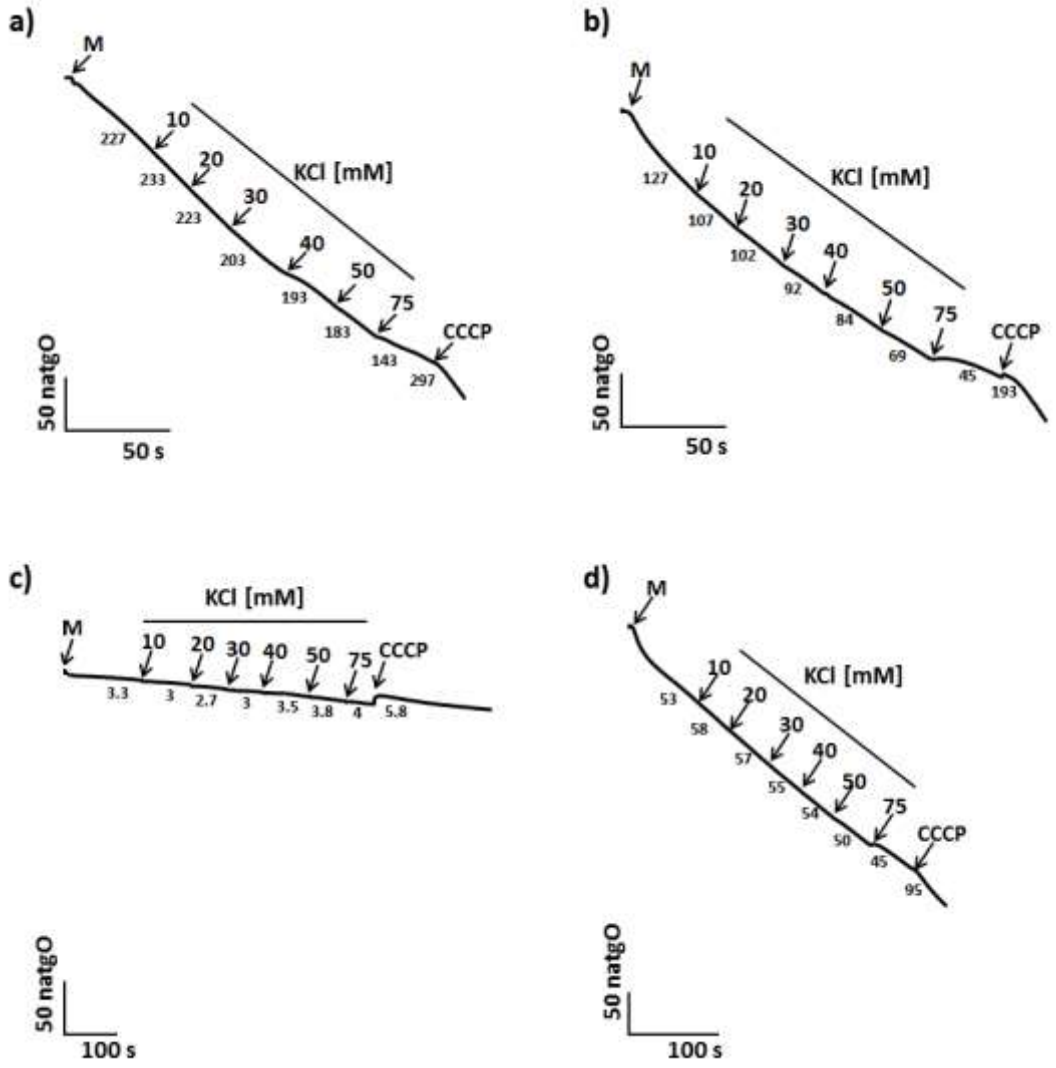


Figura A3. Efecto del potasio (K^+) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Números encima de la gráfica indican la concentración de potasio [mM] usada en cada adición. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

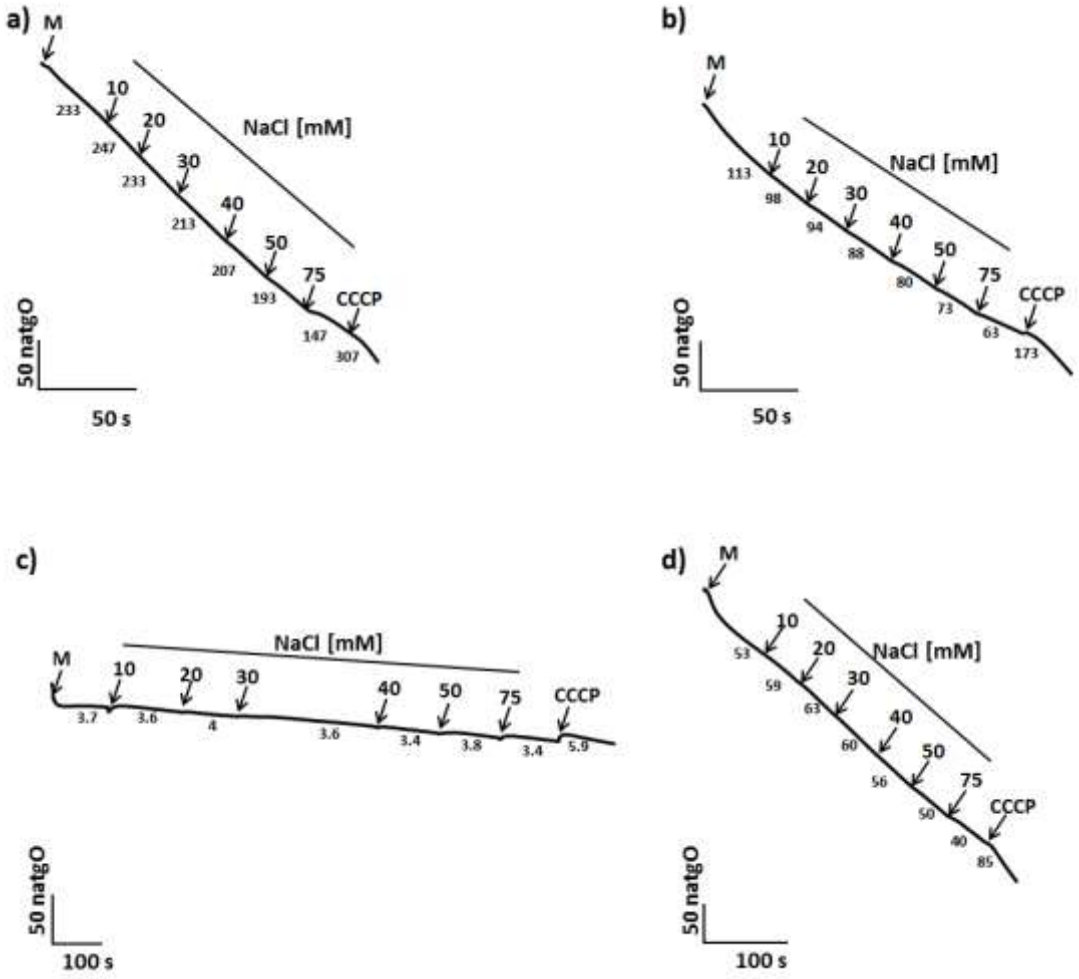


Figura A4. Efecto del sodio (Na^+) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Números encima de la gráfica indican la concentración de sodio [mM] usada en cada adición. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

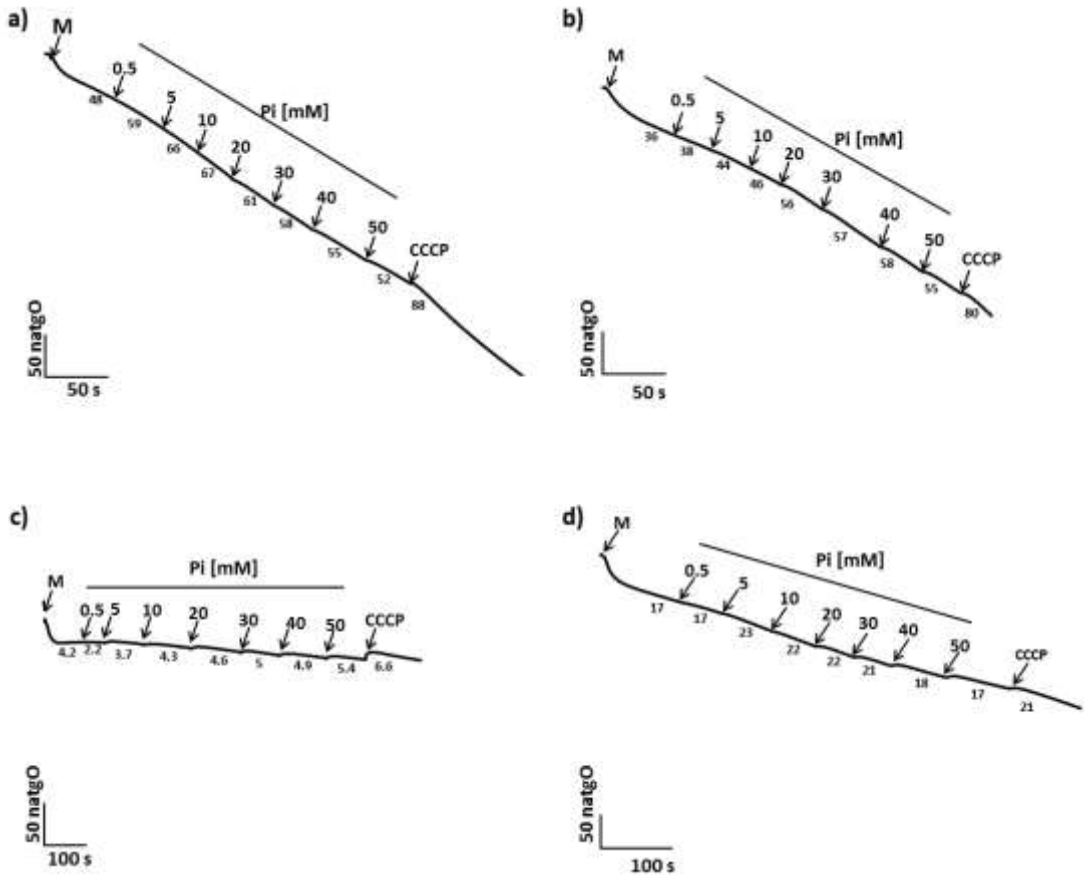


Figura A5. Efecto del fosfato (Pi) sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Números encima de la gráfica indican la concentración de fosfato [mM] usada en cada adición. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

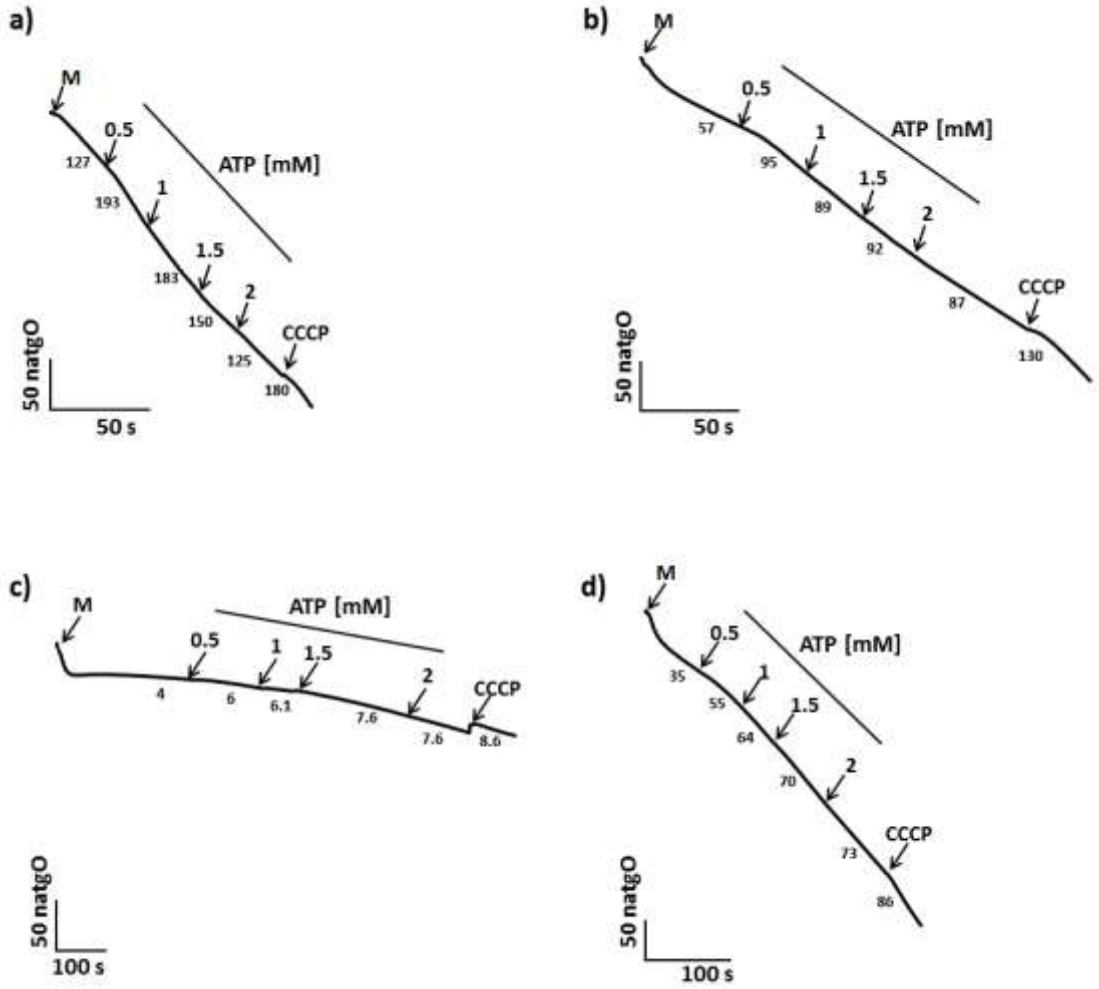


Figura A6. Efecto del ATP sobre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Adultos de *A. franciscana*, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Adultos de *L. vannamei*. Sustrato respiratorio: succinato. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. Números encima de la gráfica indican la concentración de ATP [mM] usada en cada adición. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·min. Los valores representan las medias de los triplicados.

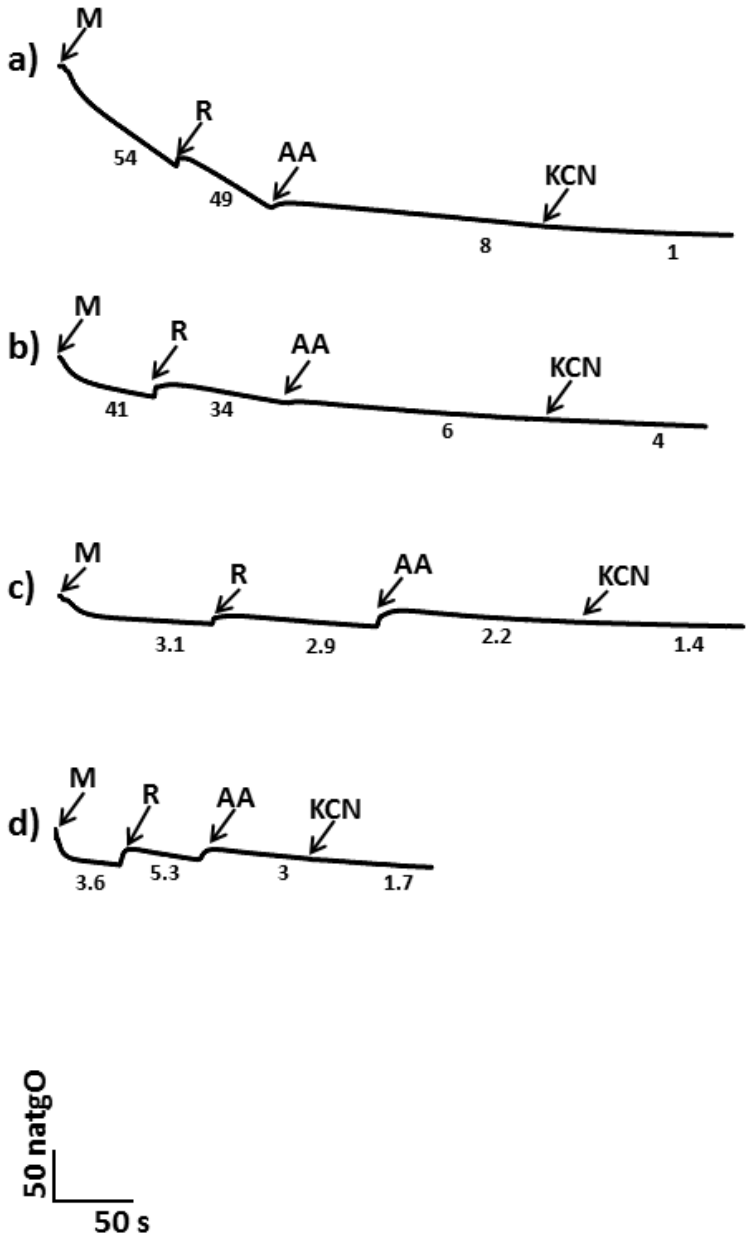


Figura A7. Control de la determinación de la GPDHmit de artemia y camarón. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) *A. franciscana* adulta, c) Postlarvas de *L. vannamei*, d) Pleópodos de *L. vannamei* adulto. Sustrato respiratorio: Succinato. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. R: Rotenona. AA: Antimicina A. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·minuto. Los valores representan las medias de los triplicados.

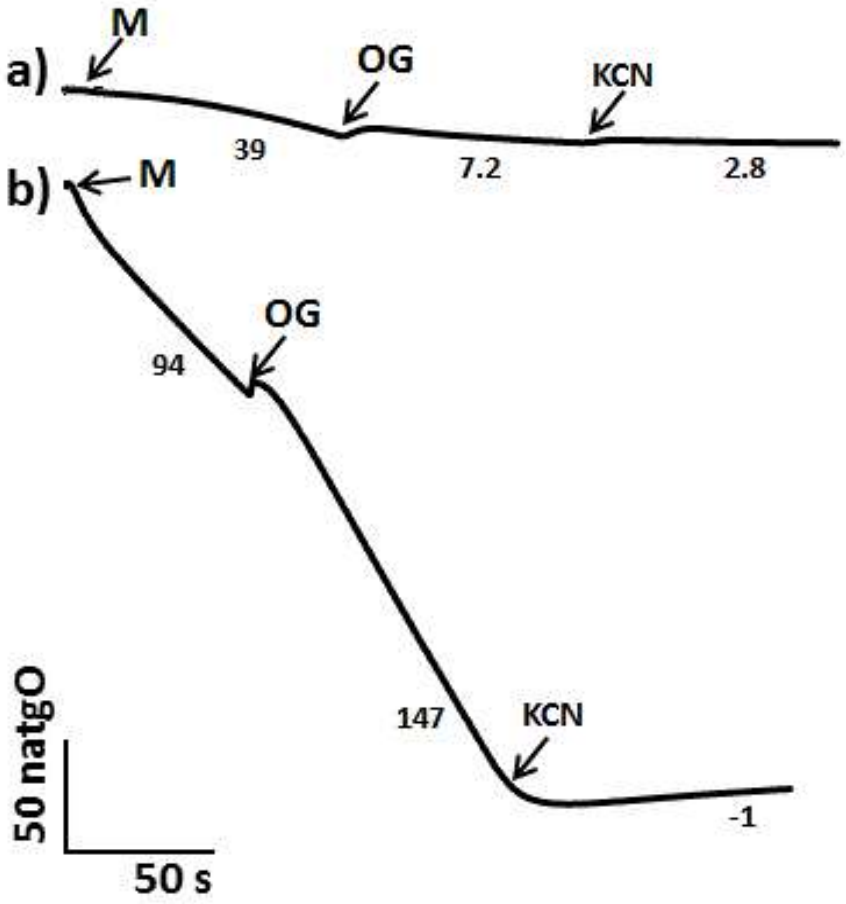


Figura A8. Control de la determinación de la AOX en artemia adicionando OG-KCN. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) *A. franciscana* adulta. Sustrato respiratorio: Succinato. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. OG: Octil galato. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·minuto. Los valores representan las medias de los triplicados.

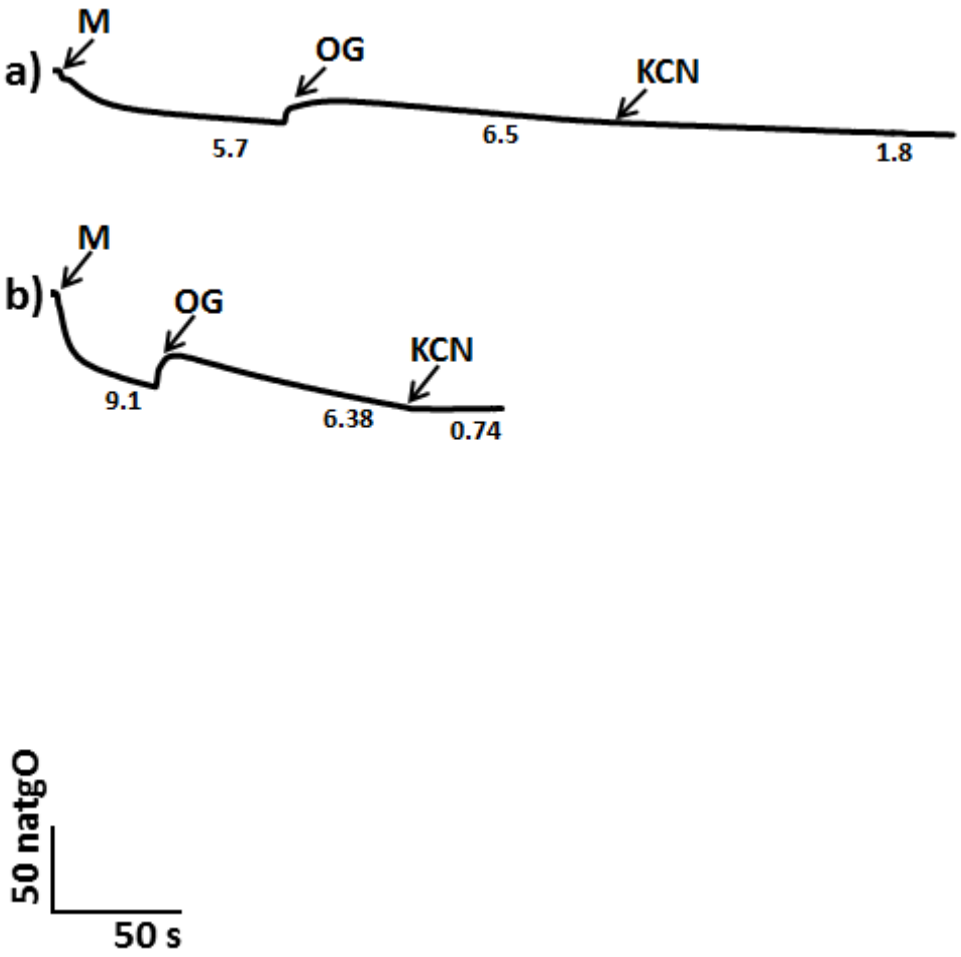


Figura A9. Control de la determinación de la AOX en camarón adicionando OG-KCN. Mitocondrias aisladas de: a) Postlarvas de *L. vannamei*, b) Pleópodos de *L. vannamei* adulto. Sustrato respiratorio: Succinato. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. OG: Octil galato. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·minuto. Los valores representan las medias de los triplicados.

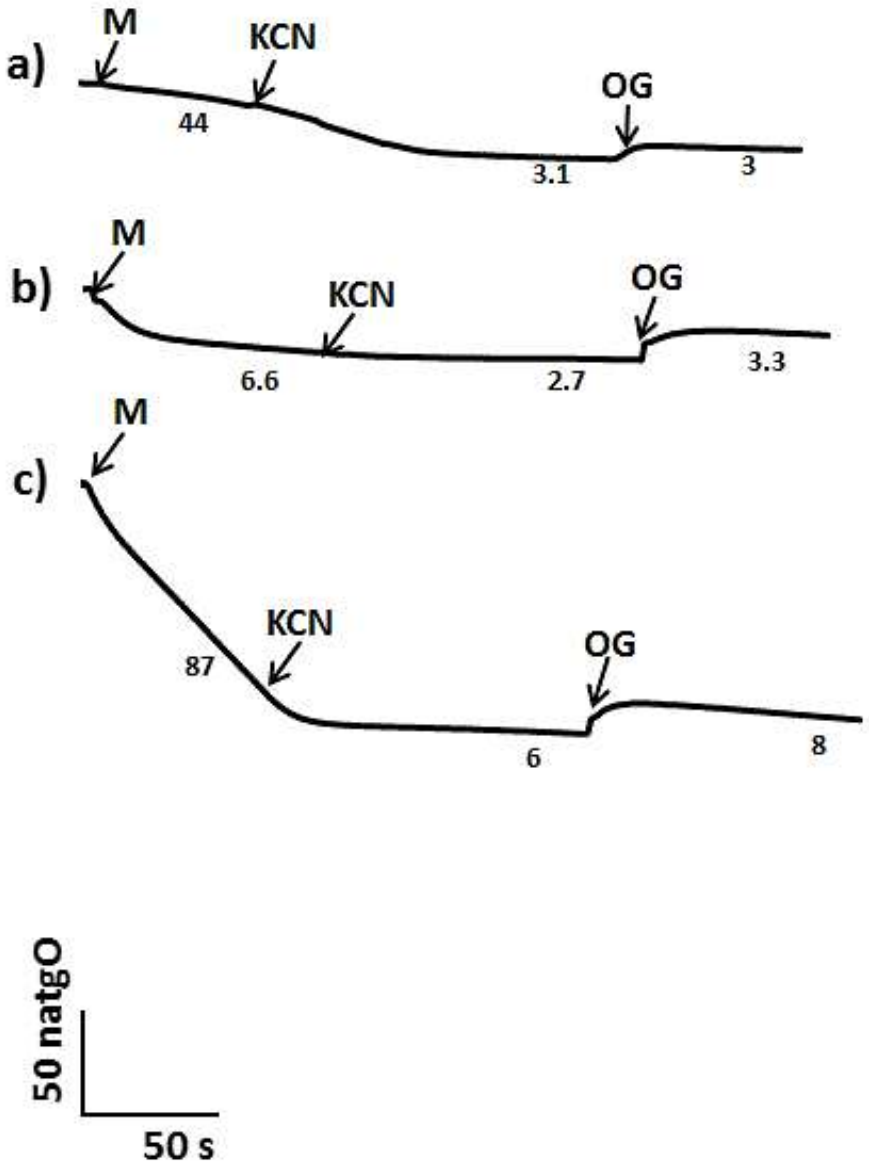


Figura A10. Control de la determinación de la AOX de artemia y camarón adicionando KCN-OG. Mitocondrias aisladas de: a) Nauplios de *A. franciscana*, b) Postlarvas de *L. vannamei*, c) *A. franciscana* adulta. Sustrato respiratorio: Succinato. M: Proteína mitocondrial, se utilizó 1 mg/mL en cada trazo. KCN: Cianuro. OG: Octil galato. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·minuto. Los valores representan las medias de los triplicados.

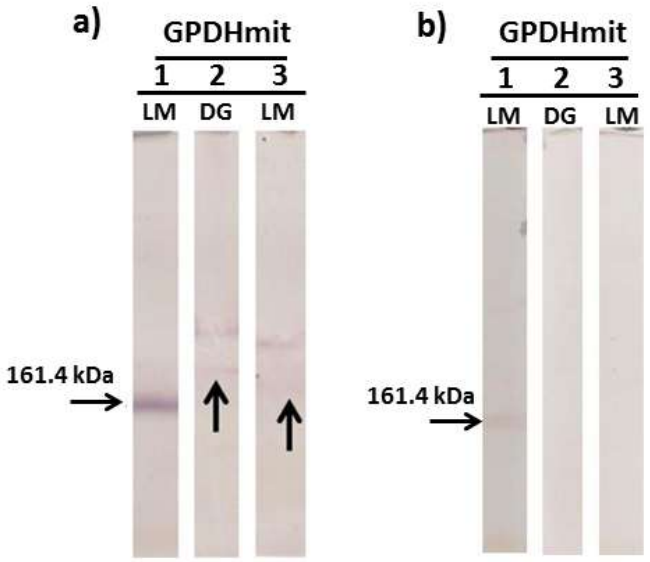


Figura A11. Actividad en gel de la GPDHmit en mitocondrias aisladas de *B. taurus*, *A. franciscana* y *L. vannamei*. a) bovino (carril 1), artemia adulta (carril 2-3). b) bovino (carril 1), postlarvas de camarón (carril 2-3). DG: Proteína mitocondrial solubilizada con digitonina. LM: Proteína mitocondrial solubilizada con dodecil-D-maltósido.

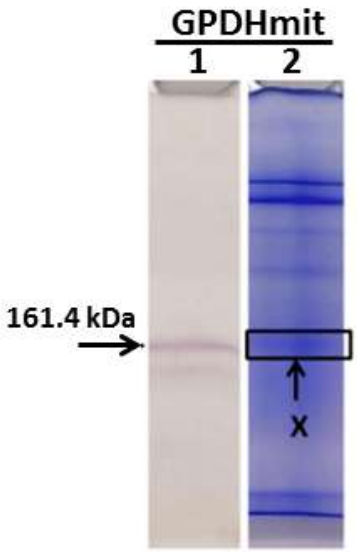


Figura A12. Ubicación y corte de la banda para el análisis de la GPDHmit por digestión en con tripsina, LC-MS/MS y análisis bioinformático para su identificación. Carril 1: Banda con actividad de glicerol fosfato deshidrogenasa. Carril 2: Gel hrCN-PAGE (gradiente del 4-12%) teñido con azul de Coomassie. Rectángulo negro: indica la banda cortada correspondiente a la GPDHmit identificada (banda X).

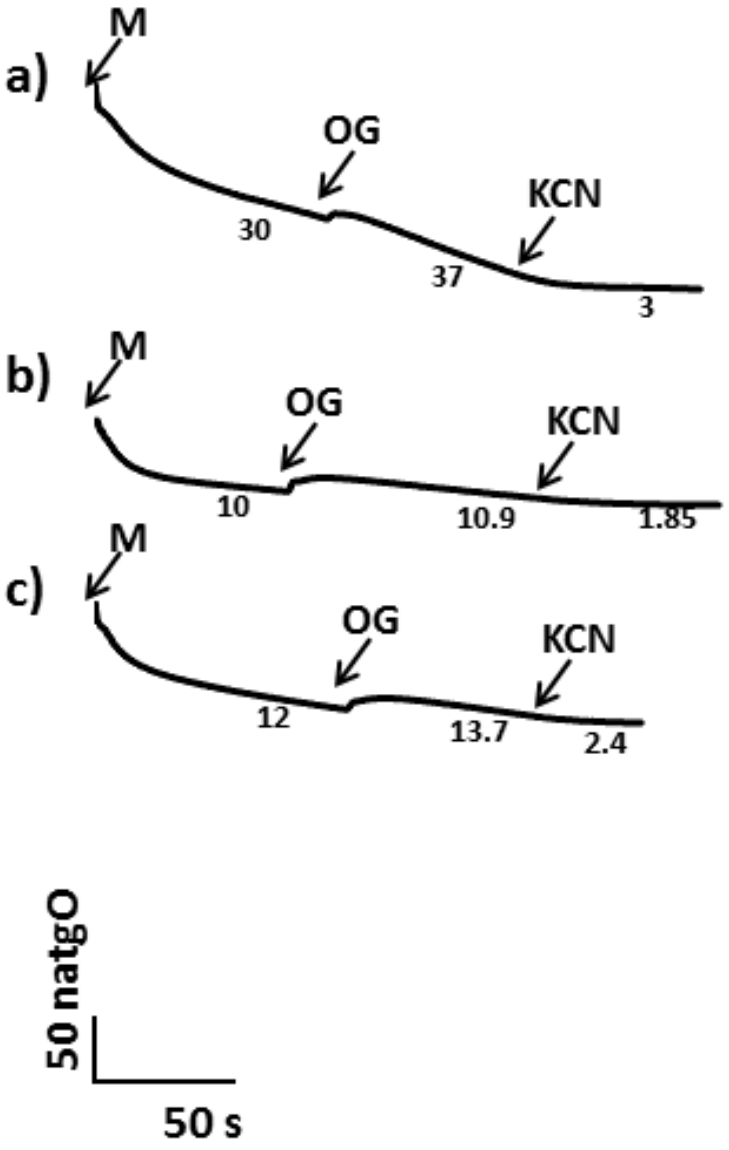


Figura A13. Control de la determinación de la AOX en *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto. a) Normoxia (5 mg O_2/L), b) Hipoxia (1.5 mg O_2/L), c) Reoxigenación (4 mg O_2/L). M: Proteína mitocondrial de pleópodos de camarón (1 mg/mL) en cada trazo. Sustrato respiratorio: Succinato. OG: Octil galato. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·minuto. Los valores representan las medias de los triplicados.

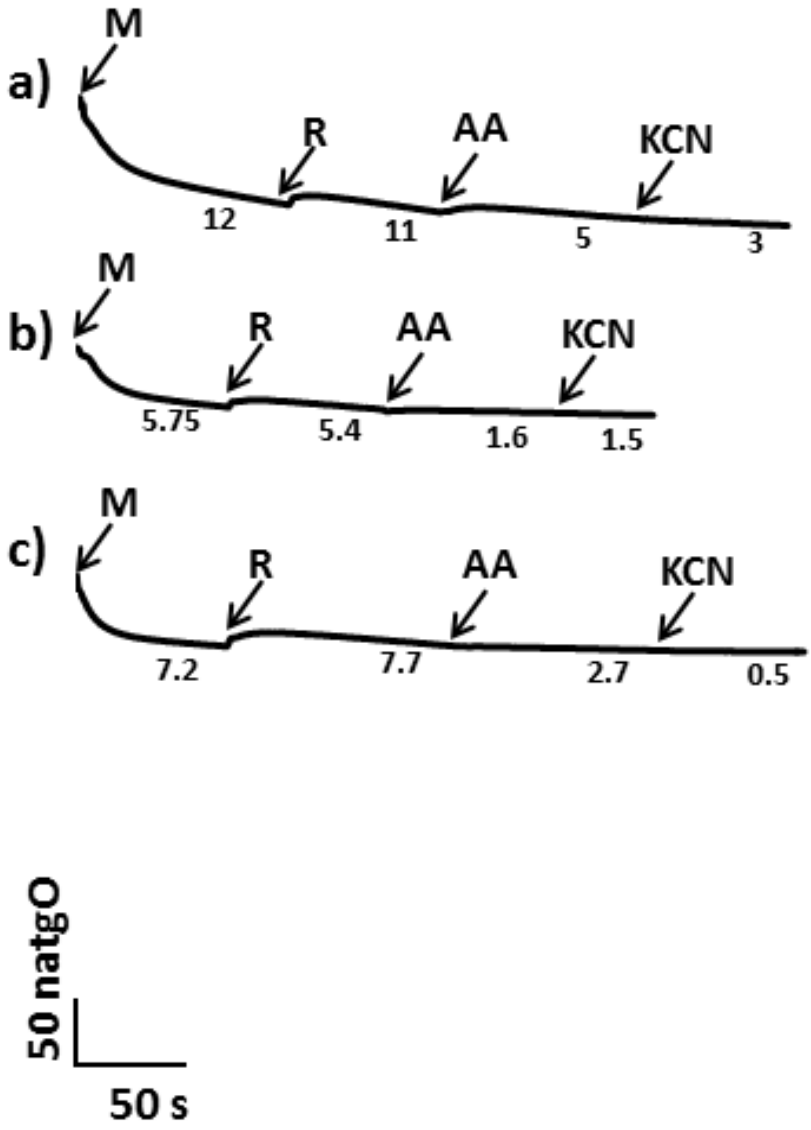
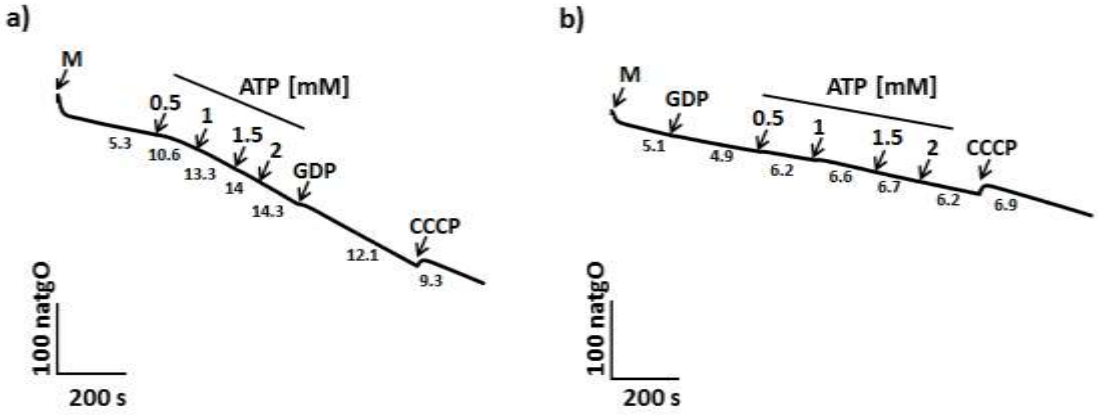


Figura A14. Control de la determinación de la GPDHmit en *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto. a) Normoxia (5 mg O_2/L), b) Hipoxia (1.5 mg O_2/L), c) Reoxigenación (4 mg O_2/L). M: Proteína mitocondrial de pleópodos de camarón (1 mg/mL) en cada trazo. Sustrato respiratorio: glicerol-3-fosfato. R: Rotenona. AA: Antimicina A. KCN: Cianuro. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·minuto. Los valores representan las medias de los triplicados.



A15. Efecto de la adicion de ATP como parte de un estado de desacoplamiento intermitente de las mitcondrias de camarón adulto. Sustrato respiratorio: Succinato 10 mM. M: Proteína mitocondrial de pleópodos de camarón (1 mg/mL) en cada trazo. GDP 0.1 mM. Números debajo de la gráfica indican la tasa del consumo de oxígeno en unidades natgO / mg de proteína·minuto. Los valores representan las medias de los triplicados.

11. GLOSARIO

ADP: Adenosín difosfato

ANT: Translocador de nucleótidos de adenina

AOX: Oxidasa alterna

APS: Persulfato de amonio

ATP: Adenosín trifosfato

ATPc: Subunidad “c” de la ATPsintasa

BSA: Albúmina sérica de bovino

CCCP: Carbonil cianida m-clorofenil hidrazona

Complejo I: NADH deshidrogenasa

Complejo II: Succinato deshidrogenasa

Complejo III: Citocromo b reductasa

Complejo IV: Citocromo c oxidasa

Complejo V: ATP sintasa

COX: Citocromo C oxidasa

CTE: Cadena de transporte de electrones

CyP-D: Ciclofilina D

EGTA: Ácido tetra acético etilenglicol

EROS: Especies reactivas de oxígeno

FO: Fosforilación oxidativa

G3P: Glicerol-3-fosfato

GDP: Guanosín difosfato

GPDHcit: Glicerol fosfato deshidrogenasa citosólica

GPDHmit: Glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial

hrCN-PAGE: Geles de poliacrilamida claros nativos de alta resolución

KCN: Cianuro

LM: Dodecil-D-maltósido

MDM: Mecanismos de desacoplamiento mitocondrial

MEM: Membrana externa mitocondrial

MIM: Membrana interna mitocondrial

MUCs: Mitochondrial Unspecific Channels

NADH2: NADH deshidrogenasa tipo II

natgO/mg de proteína·minuto: Nanoátomogramo de oxígeno por mg de proteína mitocondrial por minuto

NBT: Bromuro de nitro azul tetrazolio

OG: Octil galato

OSCP: Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina

PG: Propil galato

PiC: Acarreados de fosfatos

PTPM: Poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial

SDS: Dodecilsulfato sódico

SHAM: Ácido salicilhidroxámico

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TP: Transición de la permeabilidad

UCPs: Proteínas desacoplantes

UFR: Unidades de fluorescencia relativa

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

ΔDO: Cambios en la densidad óptica

ΔΨm: Potencial transmembranal mitocondrial