



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

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS
DESACOPLANTES MITOCONDRIALES DEL CAMARÓN
BLANCO *Litopenaeus vannamei***

Por:

M.C. Ofelia Alejandra Méndez Romero

TESIS APROBADA POR LA

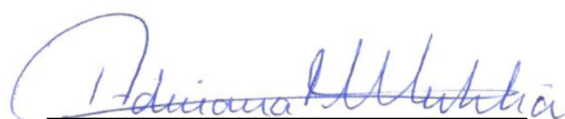
COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

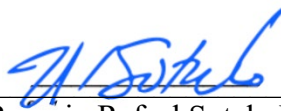
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ofelia Alejandra Méndez Romero, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias.



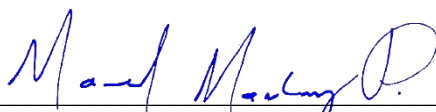
Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Directora de Tesis



Dr. Salvador Uribe Carvajal
Integrante del comité de tesis



Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo
Integrante del comité de tesis



Dr. Marcel Martínez Porchas
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Estudio Funcional de las Proteínas Desacoplantes Mitocondriales del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*” 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 de la autora Ofelia Alejandra Méndez Romero, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

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



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González", written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado y por el apoyo económico al proyecto 241670 y.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en especial a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), por todas las facilidades brindadas para la realización de mis estudios.

A la Coordinación de programas académicos, en especial a la Dra. Adriana Sañudo Barajas por todo el apoyo y a su grupo de trabajo Verónica Araiza, Laura E. García, Argelia Marín y Héctor Galindo.

A la Dra. Adriana Muhlia, por su apoyo incondicional y por contribuir en mi formación profesional y personal.

A cada uno de los miembros del comité de tesis: Dr. Salvador Uribe Carvajal, Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo y Dr. Marcel Martínez Porchas. Gracias por su interés y disponibilidad.

A la Q.B. Sandra Ruth Araujo Bernal, por su disponibilidad, su apoyo técnico y ayuda incondicional en todo el trabajo realizado en esta tesis.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. unidad Hermosillo, en especial al Dr. José Arturo Sánchez Paz y al M.C. José Fernando Mendoza Cano por las facilidades en la adquisición de organismos para los bioensayos.

Al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la Universidad de Sonora, en especial al Dr. Enrique de la Re Vega, por el préstamo de equipos así como la ayuda otorgada para realizar el silenciamiento.

A los miembros del Laboratorio del Departamento de Genética y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de México, especialmente al Dr. Salvador Uribe Carvajal y a la Dra. Natalia Chiquete Felix por todas las facilidades otorgadas durante la realización de la estancia de investigación realizada.

A cada uno de los integrantes del laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular. Gracias, chicos por todas las experiencias a lo largo de estos años.

Finalmente, gracias a mi familia por el apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi familia.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	18
2.1. El Camarón Blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> y los Eventos de Hipoxia	18
2.2. La Mitocondria y la Fosforilación Oxidativa	20
2.3. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en la Mitocondria.....	22
2.4. Estrategias Mitocondriales para el Control de EROs	25
2.5. Mecanismos de Desacoplamiento Fisiológico Mitocondrial.....	26
2.5.1. Mecanismos Intrínsecos de Desacoplamiento Mitocondrial	27
2.5.2. Mecanismos Extrínsecos de Desacoplamiento Mitocondrial	29
2.6. Proteínas Desacoplantes: Características y Funciones	30
2.6.1. Las Proteínas Desacoplantes de las Mitocondrias de Invertebrados	34
2.6.2. Las UCPs de los Crustáceos	38
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVOS	42
4.1. Objetivo General.....	42
4.2. Objetivos Específicos	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1. Aislamiento de Mitocondrias a Partir de Pleópodos de Camarón	43
5.2. Identificación de LvUCP4 y LvUCP5 por Inmunodetección.....	43
5.3. Determinación de las Tasas de Consumo de Oxígeno Mitocondrial del Camarón	44
5.4. Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial del Camarón ($\Delta\Psi_m$).....	45
5.5. Evaluación de la Permeabilidad Mitocondrial de Protones.....	46
5.6. Evaluación de la Producción de Anión Superóxido y Peróxido de Hidrógeno en Diferentes Órganos/Tejidos del Camarón	46
5.7. Ensayo de Hipoxia/Reoxigenación.....	47
5.7.1. Cuantificación de L-lactato en el Plasma	48
5.7.2. Determinación de Anión Superóxido (O_2^-) en Pleópodos del Camarón.....	49
5.7.3. Producción de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) Mitocondrial del Camarón.....	49

CONTENIDO (continuación)

5.7.4. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) Mitocondrial del Camarón	49
5.7.5. Inmunodetección de LvUCPs en las Mitocondrias del Camarón	50
5.8. Silenciamiento de los Transcritos UCP en el Camarón.....	51
5.8.1. Síntesis de los ARNs largos de doble cadena (dsRNAs) de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i>	51
5.8.2. Bioensayo Preliminar de Silenciamiento	53
5.8.3. Inyección del dsRNA.....	53
5.8.4. Aislamiento, Integridad y Limpieza del ARN Total.....	54
5.8.5. Cuantificación por qRT-PCR de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> en los camarones silenciados.....	55
5.8.6. Producción de Anión Superóxido en Pleópodos de los Camarones Silenciados.....	57
5.9. Análisis Estadístico	57
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
6.1. Identificación de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> en las Mitocondrias del Camarón.....	59
6.2. Características Funcionales de las UCPs en Mitocondrias del Camarón	60
6.2.1. Tasas de Consumo de Oxígeno Mitocondrial	60
6.2.2. Potencial Transmembrana de la Mitocondria ($\Delta\Psi_m$)	64
6.2.3. Transporte de Protones a través de la MIM	67
6.3. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en Diferentes Órganos/Tejidos del Camarón	69
6.4. Respuestas del Camarón Ante la Hipoxia-Reoxigenación	71
6.4.1. Producción de L-Lactato y Activación del Metabolismo Anaeróbico.....	71
6.4.2. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno.....	73
6.4.3. Actividad de la Superóxido Dismutasa Mitocondrial	75
6.4.4. Inmunodetección de las <i>LvUCPs</i> y el Desacoplamiento Leve	76
6.5. Silenciamiento de los Transcritos de las <i>LvUCPs</i>	80
6.5.1. Integridad del ARN Total.....	81
6.5.2. Cuantificación del ARN de las <i>LvUCPs</i> por qRT-PCR.....	82
6.5.3. Efecto del Silenciamiento de <i>LvUCPs</i> en la Producción de O_2^- en Pleópodos.....	86
7. CONCLUSIONES.....	88
8. RECOMENDACIONES.....	89
9. REFERENCIAS	90
10. ANEXOS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1. Variaciones circadianas en las concentraciones de oxígeno disuelto que enfrenta el camarón blanco.	19
2. Componentes de la cadena respiratoria ramificada y fosforilación oxidativa.	21
3. Sitios de producción de superóxido mitocondrial	24
4. Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones, sistema antioxidante y los diferentes mecanismos de desacoplamiento fisiológicos para la regulación de EROs mitocondrial.....	26
5. Modelos propuestos del ciclo protonoforético catalizado por UCP.	34
6. Modelo estructural predictivo de LvUCP4.....	39
7. Inmunodetección de las proteínas desacoplantes del camarón en fracciones mitocondriales.....	59
8. Tasas de consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas del camarón.....	61
9. Activación/inhibición de las LvUCPs en las mitocondrias del camarón.	63
10. Efecto de los activadores de las UCPs en el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) de las mitocondrias aisladas del camarón.....	66
11. Efecto de los activadores de las UCPs en el transporte de protones en las mitocondrias aisladas de camarón.....	67
12. Producción del anión superóxido en los diferentes órganos/ tejidos del camarón	70
13. Producción de peróxido de hidrógeno en los diferentes órganos/ tejidos del camarón.	70
14. Concentraciones de L-Lactato en el plasma de camarones expuestos anormoxia, hipoxia y reoxigenación	72
15. Producción de anión superóxido en los pleópodos de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación	74
16. Producción de peróxido de hidrógeno mitocondrial de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación.	74
17. Actividad mitocondrial de SOD en los pleópodos de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación.	75
18. Inmunodetección de las LvUCPs y ATP β en las mitocondrias de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación.....	78
19. Productos de PCR generados para la síntesis de los ssRNAs de las LvUCPs.	80

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Pagina
20. dsRNAs de las UCPs del camarón generados usando el sistema T7 RiboMAX™ Express RNAi.....	81
21. Integridad del ARN total aislado de los pleópodos de los camarones silenciados.....	82
22. Comparación de las curvas estándar de cada transcrito..	83
23. Curva de disociación de los productos de PCR de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i>	83
24. Expresión génica de las proteínas desacoplantes <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> en los pleópodos del camarón en respuesta a la inyección de dsRNAs.....	85
25. Producción de anión superóxido en los pleópodos de camarones silenciados.	86

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pagina
1. Oligonucleótidos específicos utilizados para producir los productos de PCR para generar los ssRNA de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i>	52
2. Oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar en tiempo real.	56

RESUMEN

Las proteínas desacoplantes (UCPs) juegan un papel esencial en la función mitocondrial, pues en su estado activo, promueven la fuga de protones a través de la membrana interna mitocondrial desacoplando la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa; lo anterior, provoca que el consumo de oxígeno mitocondrial aumente y la síntesis de ATP disminuya. Los invertebrados cuentan con los homólogos denominados UCP4 y UCP5; sin embargo, la función de estas proteínas no se ha esclarecido en la mayoría de las especies, ya que depende de las necesidades fisiológicas y energéticas de cada una. Este estudio presenta el primer reporte en crustáceos sobre la caracterización funcional de dos proteínas desacoplantes en las mitocondrias del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, denominadas LvUCP4 y LvUCP5. Ambas proteínas se identificaron en las mitocondrias aisladas de los pleópodos del camarón y se determinó la actividad tipo UCP mediante la evaluación de la tasa de consumo de oxígeno, el potencial de membrana y el transporte de protones en estado no fosforilante, en el cual también se determinó la activación/inhibición de cada proteína. También, se evaluó la capacidad de producción de radicales libres de diversos órganos/tejidos del camarón para posteriormente determinar si las proteínas desacoplantes cumplen un papel en la regulación de las especies reactivas de oxígeno cuando el camarón es sometido a un evento de hipoxia-reoxigenación. Finalmente, se silenciaron ambos transcritos para evaluar su participación en el control de las especies reactivas de oxígeno. Los resultados mostraron que las LvUCPs entran en un estado activo en presencia de 4-hidroxil-2-nonenal y ácido mirístico, mientras que se inhiben por el nucleótido de purina GDP. Se realizó un ensayo de hipoxia-reoxigenación y uno de silenciamiento para determinar si la respuesta mitocondrial del camarón al estrés oxidativo está mediada por las UCPs activas y el sistema antioxidante. Las mitocondrias aisladas de los pleópodos del camarón produjeron grandes cantidades de peróxido de hidrógeno durante la reoxigenación, y los niveles más altos de ambas LvUCPs se inmunodetectaron en esta condición; los resultados sugieren que, además de la respuesta del sistema antioxidante del camarón, las UCPs se activan en las mitocondrias después de la exposición a la hipoxia y durante la reoxigenación. Las LvUCPs pueden representar un mecanismo complementario de desacoplamiento leve (*mild uncoupling*) que se activa antes del sistema antioxidante mitocondrial de las células para controlar de forma temprana la producción

de especies reactivas de oxígeno y el daño oxidativo en los camarones.

Palabras claves: Antioxidante, Hipoxia, Mitocondria, Reoxigenación, Camarón, Proteínas Desacoplantes

ABSTRACT

Mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) play an essential role in dissipating the proton gradient and controlling the mitochondrial inner membrane potential. When UCPs are active, these proteins promote a proton leak across the inner membrane, and oxidative phosphorylation is uncoupled, oxygen uptake increases while ATP synthesis decreases. Invertebrate's UCPs are limited to UCP4 and UCP5 homologues; however, the role of these proteins is not clear in most species since it may depend on the physiological and energy needs of each animal. This research is the first functional characterization of two crustacean uncoupling proteins from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, LvUCP4 and LvUCP5. Both proteins were detected in the isolated mitochondria of shrimp pleopods; their UCP-like activity was evaluated via the oxygen consumption rate, the membrane potential, and the proton transport at non-phosphorylating state to determine LvUCPs activation/inhibition. Afterwards, we evaluated the reactive oxygen species production in various shrimp organs/tissues to determine the LvUCPs role in the ROS control when shrimp were exposed to hypoxia/reoxygenation. Finally, both transcripts were silencing to determinate their participation in ROS control. Results indicated that shrimp UCP's active state is stimulated in the presence of 4-hydroxyl-2-nonenal and myristic acid and inhibited by the purine nucleotide GDP. Results from both, the hypoxia/re-oxygenation, and the gene-silencing assays, suggested that the shrimp mitochondrial response to oxidative stress is mediated by active UCPs and the antioxidant system. The isolated mitochondria from shrimp pleopods produced large quantities of hydrogen peroxide at re-oxygenation, and the higher levels of both LvUCPs were immunodetected at this condition; thus, results suggested that, besides the active response of the shrimp antioxidant system, mitochondrial UCPs are activated after hypoxia exposure and during re-oxygenation. These LvUCPs may represent a mild uncoupling mechanism which may be activated before the antioxidant system response, to early control reactive oxygen species production, and oxidative damage in shrimp cells.

Key words: Antioxidant, Hypoxia, Mitochondria, Reoxygenation, Shrimp, Uncoupling proteins

1. INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias son organelos que proporcionan a la célula la energía necesaria para realizar sus funciones, éstas cuentan con una membrana externa encargada de regular el transporte de nutrientes, así como una membrana interna que presenta plegamientos denominados crestas mitocondriales (LeMond y Hom, 2015). En las crestas mitocondriales se encuentran embebidos los cinco complejos proteicos que conforman la cadena de transporte de electrones (complejos I-IV) y la fosforilación oxidativa (complejo V). Estos complejos multiméricos son la base de la producción de energía en forma de ATP en la mitocondria (Nelson y Cox, 2015).

La cadena de transporte de electrones que genera la fuerza protón motriz (FPM) y el gradiente electroquímico ($\Delta\psi_m$ y ΔpH) a través de la membrana, es un mecanismo altamente organizado. En el cual los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, impulsados por la oxidación de NADH o FADH₂ provenientes de la reducción de diversas rutas metabólicas como el ciclo de Krebs, oxidación de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos. La FPM generada por el transporte de electrones se acopla a la fosforilación oxidativa para convertir el ADP + fosfato inorgánico en ATP a través del complejo V (F₁F₀ ATP-sintasa) (Berry et al., 2018; Zhao et al., 2019).

Los complejos mitocondriales que constituyen la cadena de transporte de electrones, además de generar la FPM necesaria para la síntesis de ATP, pueden contribuir a la generación constante de especies reactivas de oxígeno (EROs). Durante el proceso de transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, algunos electrones derivados de NADH o FADH₂ pueden reaccionar directamente con el oxígeno u otros aceptores de electrones en los pasos intermedios promoviendo la reducción monoelectrónica del oxígeno; esto genera el anión superóxido, principal precursor de otras EROs. Se considera que la mitocondria es la principal fuente generadora de EROs en la célula, contribuyendo aproximadamente con el 90% en la mayoría de los tejidos (Kowaltowski y Vercesi, 2002).

Las EROs en grandes cantidades pueden dañar constituyentes celulares que potencialmente pueden desencadenar la muerte celular; por lo que las células aeróbicas han desarrollado estrategias para

mantener los niveles de EROs dentro de límites tolerables. Una de estas estrategias es el desarrollo del sistema antioxidante mitocondrial conformado por enzimas como la superóxido dismutasa de manganeso, catalasa y glutatión peroxidasa (Mailloux y Harper, 2011; Macedo-Márquez, 2012).

Algunos sistemas antioxidantes pueden ser energéticamente costosos para el organismo, ya que dependen tanto del ATP como del NADPH; tal es el caso del sistema glutatión peroxidasa y tiorredoxina. Sin embargo, existen otros mecanismos mitocondriales que permiten el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y representan otro mecanismo para disminuir la producción de EROs (Mailloux y Harper, 2011). Este desacoplamiento “leve” (*mild uncoupling*), puede llevarse a cabo gracias a las proteínas desacoplantes (*Uncoupling proteins*, UCPs). Estas proteínas desacoplan a la mitocondria a través de un mecanismo de fuga de protones ya que, en presencia de ácidos grasos, las UCPs se activan y permiten el retorno de los protones a la matriz mitocondrial disipando el gradiente de protones, disminuyendo la capacidad para producir ATP y el potencial transmembrana mitocondrial; a su vez, se observa un aumento en la tasa de consumo de oxígeno y, como resultado, disminuye la producción de EROs (Brand y Esteves, 2005; Echtay, 2007; Luévano-Martínez et al., 2010; Guerrero-Castillo et al., 2011).

A la fecha, se han descrito hasta cinco homólogos de las proteínas desacoplantes (UCP1 a UCP5), algunas de ellas ampliamente distribuidas en casi todas las células eucariotas incluyendo plantas, hongos, protistas y animales vertebrados (mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces) e invertebrados como insectos, nemátodos, moluscos y anfibios (Hourton-Cabassa et al., 2004; Sokolova y Sokolov, 2005; Chen et al., 2010; Jarmuszkiewicz et al., 2010; Bouillaud et al., 2016; Slocinska et al., 2016). El número de UCPs puede variar en cada especie y los artrópodos sólo poseen las proteínas UCP4 y UCP5, homólogas a las de los vertebrados. Estudios previos han reportado que algunas de estas proteínas pueden expresarse de manera diferencial en un tejido/órgano específico, como ocurre en la chinche hematófaga *Rhodnius prolixus* (Sokolova y Sokolov, 2005; Alves-Bezerra et al., 2014; Slocinska et al., 2016).

Diferentes estudios en animales vertebrados sugieren que las proteínas UCP2 a UCP5 promueven un desacoplamiento “leve”, una función conservada entre especies (Ježek et al., 2004; Woyda-Ploszczyca y Jarmuszkiewicz, 2017). Por su parte, las proteínas desacoplantes de los invertebrados

tienen características estructurales y moleculares similares a sus homólogos en los vertebrados y pueden expresarse diferencialmente en tejidos/órganos o en etapas específicas del ciclo de vida, pero se asume cumplen funciones diferentes. En estudios previos, se ha determinado que las UCPs de los invertebrados tienen un papel importante en el metabolismo energético y en la homeostasis celular; además, estas proteínas son esenciales para la actividad óptima de la cadena de transporte de electrones. El papel que cumplen las UCPs también se ha relacionado con el proceso de crecimiento, la diferenciación de la etapa larval-pupal, el envejecimiento y en muchas especies, se ha planteado la hipótesis de que su función principal es la protección contra el daño oxidativo (Sánchez-Blanco et al., 2006; Pfeiffer et al., 2011; Slocinska et al., 2011; Slocinska et al., 2013; Alves-Bezerra et al., 2014).

Recientemente, Méndez-Romero et al. (2019) reportaron por primera vez la secuencia completa del ADN complementario (ADNc) de dos proteínas homólogas a las UCPs de los vertebrados en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (números de acceso al GenBank **MG385539** y **MG385540**). Ambas proteínas comparten una identidad del 50% con las UCPs de insectos, cuentan en su secuencia primaria con los motivos conservados de la familia de acarreadores mitocondriales, los residuos con carga negativa como el ácido glutámico (Glu) involucrados en la unión de protones y tres residuos de arginina (Arg) propuestos como esenciales para la unión de nucleótidos de purina (Echtay et al., 2000; Ježek y Urbánková, 2000). Sin embargo, aún se desconoce el papel fisiológico de las UCPs en las mitocondrias de los crustáceos. Por lo anterior, el presente trabajo abordó el estudio de las proteínas desacoplantes como el primer mecanismo de desacoplamiento descrito en las mitocondrias del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en condiciones de estrés oxidativo.

2. ANTECEDENTES

2.1. El Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* y los Eventos de Hipoxia

Los decápodos son un grupo diverso de crustáceos que incluye muchas especies de importancia comercial, especialmente las langostas, los camarones y los cangrejos (Miller et al., 2005). Endémico de las costas orientales del Pacífico, el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, es una de las especies de peneidos más importante para la acuicultura en todo el mundo. Las principales características que le confieren tal importancia son su alta tasa de crecimiento, tolerancia al estrés, tolerancia a un amplio rango de salinidad y resistencia a la infección con el virus del síndrome de Taura (TSV) (Wang et al., 2019).

Se estima que la producción anual de camarón blanco en el mundo contribuye con el 57% del rendimiento total de la acuicultura. En 2017, México ocupó el 7° lugar en producción mundial de camarón contribuyendo con un 2.5% de la producción global. Los principales estados que contribuyeron a la producción nacional fueron Sonora y Sinaloa con un 36.9 y 36.5%, respectivamente (SIAP, 2020). Estos estados se encuentran en el Noroeste de México en donde se distribuye el 89% de las hectáreas de producción nacional en las cuales los sistemas de cultivo se han intensificado para obtener mayores volúmenes de producción. Sin embargo, uno de los principales factores abióticos que se han generado con la intensificación de los sistemas de cultivo es el incremento en la presencia de eventos de hipoxia en los estanques (Chen et al., 2019).

La hipoxia en el mar se ha definido como la disminución en la concentración del oxígeno disuelto (OD) en el agua con valores menores a 2 mg/L (O'Connor y Whitall, 2007); siendo este uno de los factores ambientales limitantes dentro de los sistemas de cultivo intensivos y uno de los estresores fisiológicos más comunes en ambientes acuáticos (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Li et al., 2016). Reportes previos han descrito que en los estanques de cultivo las concentraciones de OD en el agua fluctúan con frecuencia; durante el día las concentraciones incrementan gracias a la fotosíntesis realizada por las microalgas presentes; sin embargo, las concentraciones de OD

disminuyen considerablemente durante la noche debido a que la materia orgánica de desecho presente se oxida, no hay producción de oxígeno por fotosíntesis y además, se mantiene el consumo de oxígeno constante por los organismos.. Se ha observado que hacia el amanecer se presentan los niveles más críticos de OD los cuales puede caer por debajo del límite fisiológico del animal (Puente-Carreón, 2009). Paradójicamente, el principal daño para los organismos ocurre durante la reoxigenación (reintroducción de O_2), ya que es en esta fase en donde la mitocondria incrementa la producción de EROs (Figura 1; Sokolova, 2018) .

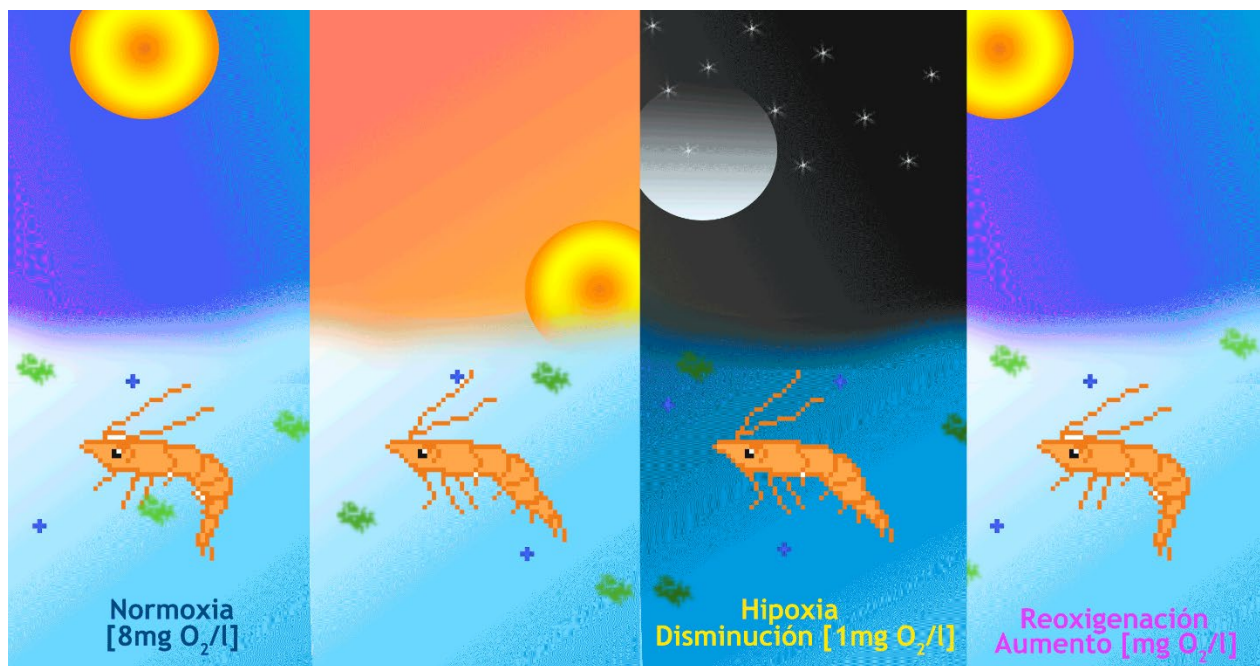


Figura 1. Variaciones circadianas en las concentraciones de oxígeno disuelto que enfrenta el camarón blanco.

Se ha reportado que algunas especies de crustáceos como el camarón fantasma *Lepidophtalmus louisianensis* y el branquiópodo *Artemia franciscana*, tienen la capacidad de sobrevivir en ambientes extremadamente hipóxicos e incluso anóxicos, reduciendo su frecuencia respiratoria y su tasa metabólica. Los animales oxiconformadores como el camarón blanco, que poseen la capacidad de disminuir su tasa metabólica cuando los niveles de oxígeno ambiental se reducen, han mostrado que el ajuste de su maquinaria metabólica está relacionado directamente con la función mitocondrial (Martínez-Cruz et al., 2012; Jiménez-Gutiérrez et al., 2014; Rosas-Lemus et al., 2016; Martínez-Cruz et al., 2017). Sin embargo, aún queda mucho por estudiar sobre las

adaptaciones mitocondriales de los organismos acuáticos como el camarón blanco *L. vannamei*.

2.2. La Mitocondria y la Fosforilación Oxidativa

Las mitocondrias son organelos que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas, cuya principal función es convertir los alimentos consumidos (carbohidratos, proteínas y grasas) en energía utilizable en presencia de oxígeno, gracias a un proceso denominado fosforilación oxidativa (LeMond y Hom, 2015). Las mitocondrias pueden variar de tamaño y forma, generalmente en hepatocitos y fibroblastos tienen dimensiones de 3-4 μm (longitud) y $\sim 1 \mu\text{m}$ (diámetro). El número de mitocondrias por célula varía de un tipo de célula a otro (Scheffler, 2011).

Estructuralmente las mitocondrias cuentan con un sistema de doble membrana que las delimita dentro del citosol con diferentes funciones: la membrana externa (MEM) y la interna (MIM), separadas por un espacio intermembrana. El espacio acotado por la MIM constituye la matriz mitocondrial, donde se llevan a cabo diversos procesos como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo de la urea y la oxidación de ciertos aminoácidos, entre otros. Además, la matriz contiene el ADN mitocondrial y la maquinaria necesaria para su expresión (Nelson y Cox, 2015).

En cuanto a las membranas, la MEM posee proteínas denominadas porinas que permiten el paso de algunos solutos de peso molecular inferior a 10 kDa y agua; por lo tanto, es libremente permeable a los iones y a la mayoría de metabolitos. Por otro lado, la MIM se caracteriza por ser impermeable, por lo que sólo ciertas moléculas que no llevan carga como O_2 , CO_2 y H_2O , cruzan la membrana sin mediación de proteínas. Además, posee un alto contenido de proteínas de membrana entre las que destacan las que conforman la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Nicholls, 2013).

Como se mencionó anteriormente, una de las principales funciones de las mitocondrias es la generación de energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Este proceso se

explica por la teoría quimiosmótica de Peter Mitchell (1961), la cual demostró que los electrones generados durante el catabolismo celular conducen a la síntesis de los donadores de electrones NADH y FADH₂. Ambos sustratos localizados en la matriz mitocondrial donan sus electrones a una serie de complejos enzimáticos embebidos en la MIM denominados en conjunto “cadena respiratoria”; al llegar los electrones hasta el O₂ que es el aceptor final, éste se reduce a agua. Este proceso de transporte de electrones genera a su vez un gradiente de protones que son bombeados desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana y que es utilizado por la enzima F₁F₀-ATP sintasa (complejo V), la cual es capaz de acoplar el paso de H⁺ desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial con la síntesis de ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Figura 2; Mitchell, 1961).

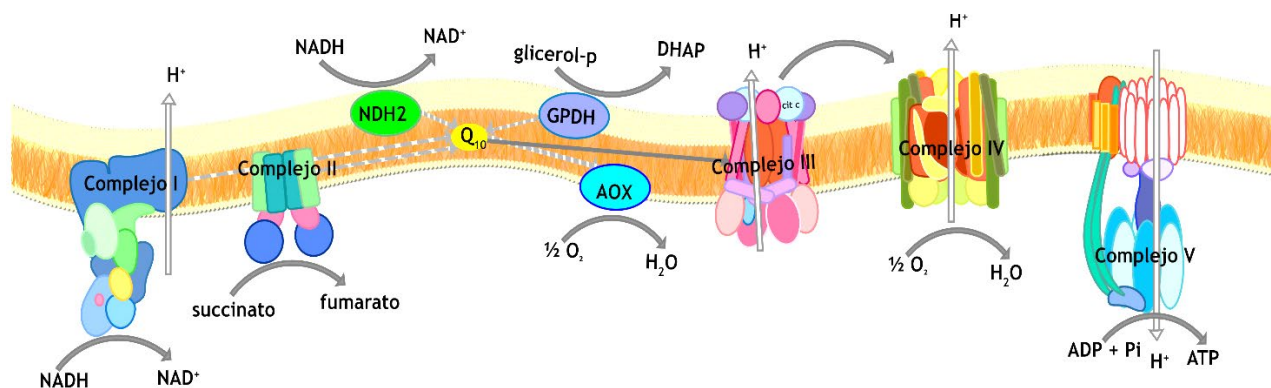


Figura 2. Componentes de la cadena respiratoria ramificada y fosforilación oxidativa.

La cadena respiratoria clásica de las mitocondrias puede cambiar dependiendo de la especie. En los mamíferos, la cadena está conformada por cuatro complejos clásicos: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), citocromo c oxidorreductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV). Sin embargo, las mitocondrias de plantas, hongos, protozoarios, unicelulares y algunos crustáceos, pueden contar con cadenas respiratorias ramificadas, es decir, que tienen enzimas adicionales que participan en la cadena cumpliendo funciones alternas a alguna de las enzimas canónicas, tal es el caso de las enzimas alternas que catalizan las mismas reacciones que los complejos I y IV como las NADH deshidrogenasas tipo II (NDH2) y las oxidasas alternas (AOXs), respectivamente. También, pueden contar con otra enzima alterna denominada glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (mitGPDH). Estas enzimas

alternas no participan en el bombeo de protones al espacio intermembrana como lo hacen los complejos clásicos. En el caso específico del camarón blanco, éste no cuenta con oxidorreductasas alternas como otros crustáceos (Rodríguez-Armenta et al., 2018), por lo que se considera que la cadena respiratoria del camarón tiene una conformación clásica, como se describe a continuación.

El complejo I combina la transferencia de electrones de NADH a ubiquinona (Q) con la translocación de protones a través de la MIM, con una estequiometría de 4 H⁺ por 2 e⁻. Mientras que el complejo II recibe electrones al oxidar succinato a fumarato y los transfiere a través de un grupo prostético FAD, desde tres centros Fe-S y un grupo hemo *b* hasta la Q para formar ubiquinol (QH₂); sin embargo, este complejo no bombea protones al espacio intermembrana. El complejo III se oxida al obtener dos electrones del QH₂ y los transfiere a un acarreador móvil de electrones hidrosoluble, el citocromo *c* (*cit c*) que se encuentra en el espacio intermembrana. Este complejo transloca 4 H⁺ por 2 e⁻ transportados desde el ubiquinol. Por su parte, el complejo IV es la oxidasa terminal de la cadena respiratoria, capta los electrones provenientes del *cit c* y los transfiere al oxígeno molecular permitiendo la reducción de ½O₂ a H₂O. Este ciclo catalítico está acoplado a la translocación de protones, con una estequiometría 2 H⁺ por 2 e⁻ (Joseph-Horne et al., 2001; Nelson y Cox, 2015).

Las diferencias de pH (ΔpH) y de cargas ($\Delta\Psi$) que se generan a ambos lados de la MIM por la cadena respiratoria manteniendo la membrana polarizada, se disipan cuando los protones viajan de nuevo hacia la matriz, a través de los rotores F₀ y F₁ de la ATP sintasa ó complejo V como fuente de energía para sintetizar el ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi). Así, la fosforilación oxidativa se logra por el circuito quimiosmótico de protones a través de la membrana mitocondrial interna que es responsable del acoplamiento de la producción de ATP y la oxidación de los sustratos (Tuena de Gómez Puyou y Trejo, 2015; Klaus y Ost, 2020).

2.3. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en la Mitocondria

En la cadena respiratoria, la continua reducción del oxígeno para construir el potencial

electroquímico transmembranal necesario para la síntesis de ATP, tiene como efecto secundario la constante generación de EROs (Kowaltowski y Vercesi, 2002). Debido a ello, las mitocondrias son una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno en la célula. En condiciones fisiológicas, el 0.2-2% de los electrones en la cadena respiratoria pueden interactuar directamente con el oxígeno y producir el anión superóxido (O_2^-), principal precursor de las otras EROs (Zhao et al., 2019).

Los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial son los principales sitios de producción de superóxido en la célula aeróbica. La producción de O_2^- ocurre cuando la FPM es alta y los componentes de la cadena respiratoria se encuentran en sus estados reducidos; en este estado, los electrones liberados de los complejos I y III pueden reducir univalentemente el O_2 a O_2^- (Echtay, 2007; Mailloux y Harper, 2011). En mitocondrias aisladas, se han reconocido alrededor de 11 sitios diferentes en los cuales se genera el anión superóxido (Figura 3). Estos sitios están estrechamente relacionados con la oxidación del sustrato y se han asociado con la producción de O_2^- en los complejos I y III de la cadena respiratoria. Se ha determinado que para producir EROs en la cadena respiratoria es necesaria la formación de un radical derivado de la flavina o una ubisemiquinona, que es el intermediario con un electrón desapareado y es capaz de transferir este electrón al oxígeno molecular (Kowaltowski y Vercesi, 2002; Ježek et al., 2018).

La capacidad de producción de O_2^- del complejo I está estrechamente relacionada con la cantidad reducida de flavoproteína presente. Otra condición en la cual el complejo I puede producir EROs es el transporte inverso de electrones (TRE) que ocurre cuando se lleva a cabo la reacción inversa del complejo, es decir, catalizar la reducción de NAD^+ con electrones tomados de la poza de ubiquinol. Un ejemplo del TRE ocurre en la patología de isquemia-reperfusión (similar a la hipoxia-reoxigenación en los organismos acuáticos). Las EROs se producen debido a que la FPM es elevada durante la perfusión, lo cual reduce el flujo de electrones a través del complejo I o puede revertirlo. El ΔpH de la FPM es la principal fuerza impulsora de TRE, ya que cuando el ΔpH es grande, la matriz mitocondrial se alcaliniza, lo que favorece la formación de EROs por TRE. Por lo tanto, la producción de EROS por TRE es muy sensible a la fuga de protones disminuyendo el ΔpH . Las EROs producidas por el complejo I se encuentran exclusivamente en la matriz, ya que la flavoproteína se encuentra en el lado de la matriz de la membrana mitocondrial interna (Berry et

al., 2018; Zhao et al., 2019).

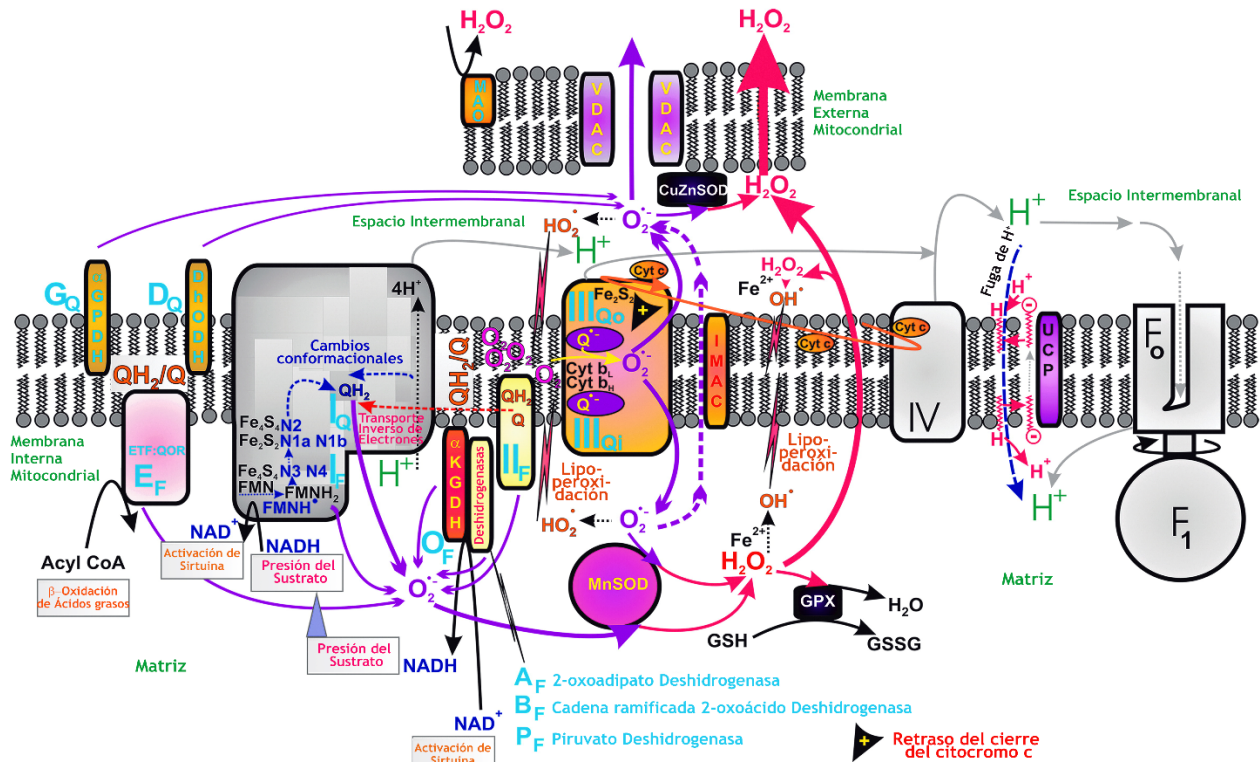


Figura 3. Sitios de producción de superóxido mitocondrial. Donde se ilustra una descripción general de las ubicaciones de las fuentes de superóxido, mientras que su contribución relativa se expresa mediante el grosor de la flecha (flechas moradas para el superóxido, flechas rojas para H₂O₂). Modificado de Ježek et al. (2018).

Por otro lado, el complejo III que cataliza un ciclo Q en el que los electrones se transfieren de Q al citocromo c y los protones de Q se bombean al espacio intermembrana en una serie de reacciones, puede generar EROs tanto del lado de la matriz, como de lado del espacio intermembrana. Lo anterior se debe a que la ubisemiquinona (QH⁻) del sitio Q_o que transporta un sólo electrón puede moverse libremente en el complejo III, filtrando directamente el único electrón al O₂, formando EROs a través de una reacción no enzimática. Así, la transferencia lenta de electrones (un ciclo Q más lento), resulta en más tiempo para que la ubisemiquinona reduzca el oxígeno a EROs y estos pueden liberarse en ambos lados a pesar de la ubicación del sitio Q_o en el lado del espacio intermembrana de la membrana mitocondrial interna. La formación de EROs por el complejo III puede disminuirse cuando se acelera el transporte de electrones y se disminuye el ΔpH (Berry et al., 2018; Zhao et al., 2019).

Cuando la producción de EROs aumenta, se producen lesiones oxidativas en la membrana que conducen a la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, la liberación de citocromo c en el citosol y el inicio de la cascada apoptótica, la muerte celular y la insuficiencia orgánica. Las EROs pueden causar daño a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos de los organismos y han estado implicadas en muchos eventos degenerativos del ciclo de vida, incluido el envejecimiento y la muerte celular necrótica y apoptótica. Las EROs también están implicadas en la patogénesis de enfermedades específicas como la arteriosclerosis, Alzheimer, Parkinson y accidentes cerebrovasculares (Mailloux y Harper, 2011; Sokolova, 2018). Sin embargo, estas EROs también son necesarias para el organismo. En los mamíferos las EROs desempeñan un doble papel, sirviendo como moléculas de señalización en una amplia gama de procesos celulares normales como la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas (comunicación entre células), la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de iones (Mailloux y Harper, 2011; Macedo-Márquez, 2012).

2.4. Estrategias Mitocondriales para el Control de EROs

Las mitocondrias de todos los organismos han desarrollado diferentes vías para la eliminación de las EROs (Figura 4). Estos sistemas de defensa antioxidante incluyen componentes enzimáticos como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-peroxidasa y peroxiredoxina. En condiciones fisiológicas estos sistemas antioxidantes les permiten a los organismos mantener el equilibrio entre la generación y la eliminación de las EROs (Martínez-Cruz et al., 2017).

La enzima superóxido dismutasa de manganeso (EC 1.15.1.1), tiene como función dismutar dos moléculas del anión superóxido producido en la matriz mitocondrial a una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y una de O_2 . El H_2O_2 , producto de esta dismutación es una molécula más estable que el O_2^- y se considera que es una de las moléculas clave en la señalización mitocondrial, aunado a su capacidad para oxidar los residuos tiol y su movilidad a través de las membranas. Sin embargo, una sobreproducción de H_2O_2 puede ocasionar daño a la célula mediante la generación de radicales hidroxilos al reaccionar con metales como el hierro. Para controlar los niveles de H_2O_2 ,

la mitocondria cuenta con los sistemas de peroxiredoxina (PRx, EC 1.11.1.15), glutatión (GSH)/glutaredoxina y (GRx)/glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9); así como con la enzima catalasa (EC 1.11.1.6), la cual cataliza la dismutación de $2\text{H}_2\text{O}_2$ en O_2 y $2\text{H}_2\text{O}$, ayudando a mantener el equilibrio redox (Mailloux y Harper, 2011). Además, el sistema antioxidante enzimático se complementa con antioxidantes de molécula pequeña como glutatión, vitaminas E, A y C, urato y biliverdina, entre otros (Abele et al., 2007).

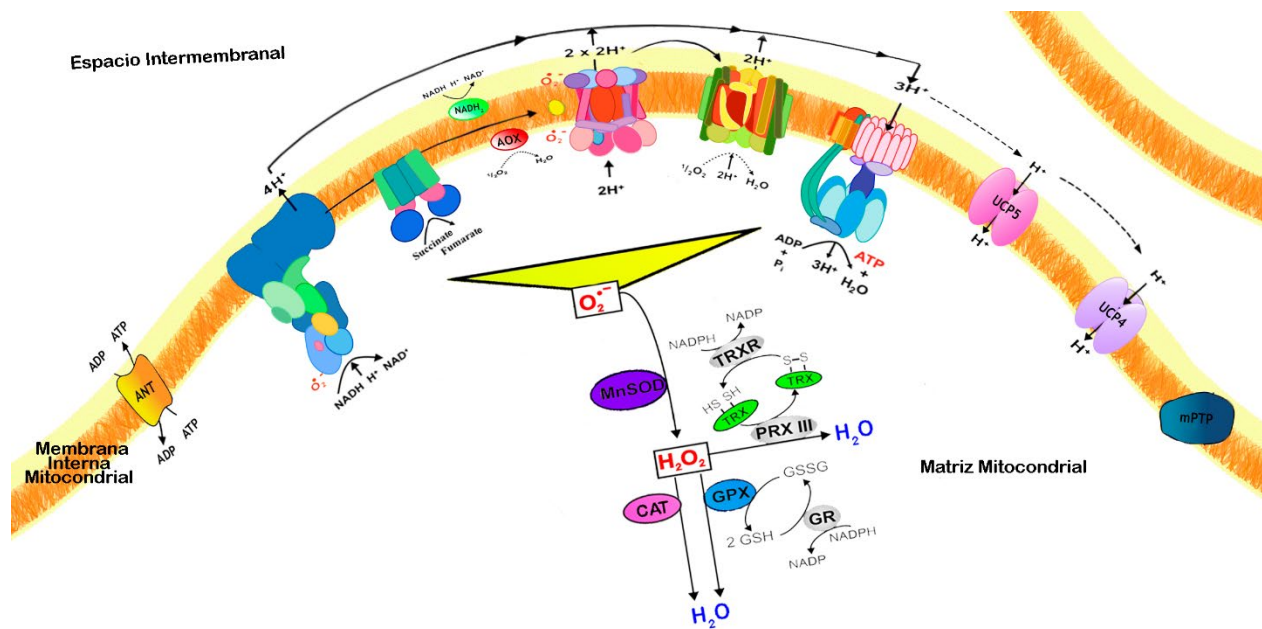


Figura 4. Representación esquemática de la cadena de transporte de electrones, sistema antioxidante y los diferentes mecanismos de desacoplamiento fisiológicos para la regulación de EROs mitocondrial.

Otra de las formas en las cuales la mitocondria puede prevenir producción de EROs es mediante el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, con la activación de alguno de los mecanismos de desacoplamiento fisiológico mitocondrial (Figura 4).

2.5. Mecanismos de Desacoplamiento Fisiológico Mitocondrial

Los mecanismos de desacoplamiento fisiológico mitocondrial se han descrito en una variedad de organismos como las levaduras, protozoos, plantas, hongos, peces, mamíferos y algunos

invertebrados (McDonald y Vanlerberghe, 2004; Guerrero-Castillo et al., 2011; Cabrera-Orefice et al., 2015; Del-Saz et al., 2018). Estos mecanismos fueron clasificados de acuerdo con la función que realizan en la mitocondria como: intrínsecos (proteínas que no bombean protones) y extrínsecos (disipadores de protones) (Azzone et al., 1985). En los mecanismos intrínsecos se encuentra el *slipping* y las enzimas oxidorreductasas alternas, mientras que en los mecanismos extrínsecos se encuentran el poro de transición de permeabilidad mitocondrial y las proteínas desacoplantes (UCPs) (Guerrero-Castillo et al., 2011). Sin embargo, la información disponible de estos mecanismos de desacoplamiento y sus posibles funciones en invertebrados marinos como el camarón blanco, es aún escasa.

2.5.1. Mecanismos Intrínsecos de Desacoplamiento Mitocondrial

El *slipping* o deslizamiento, es un fenómeno en el cual existe una disminución de la estequiometría H^+/e^- cuando la FPM es elevada. Este deslizamiento de energía es posible en todas las bombas de protones; sin embargo, sólo ha sido verificado para el complejo citocromo c oxidasa y la ATP sintasa (Kadenbach, 2003; Feniouk et al., 2005) .

El otro mecanismo intrínseco de desacoplamiento fisiológico mitocondrial está dado por las enzimas oxidorreductasas alternas (ver Figura 2). Estas son proteínas monoméricas que forman parte de las cadenas respiratorias ramificadas e incluyen deshidrogenasas y/o oxidasas terminales adicionales. Uno de los puntos ramificados de la reducción de ubiquinona y la oxidación de ubiquinol está mediado por la NADH deshidrogenasa alterna (NDH2). La presencia de NDH2 se ha reportado principalmente en plantas, hongos y levaduras. Esta enzima cataliza la misma reacción que el complejo I, pero dentro de las características que las diferencian: no bombea protones a través de la MIM, no son inhibidas por la rotenona y no son proteínas transmembranales, pueden estar asociadas con la MIM ya sea por el lado de la matriz o por el lado del espacio intermembrana (Rasmusson et al., 2004).

Otro punto ramificado de la oxidación del ubiquinol está mediado por la oxidasa alterna (AOX). Esta enzima se encuentra en la cara interna de la MIM hacia la matriz mitocondrial, en el lado del

sustrato del complejo bc_1 , donde los electrones de la oxidación de NADH pueden fluir desde la ubiquinona directamente a la AOX y catalizar la reducción de cuatro electrones de O_2 a H_2O . Sin el bombeo de protones a través de la MIM, la AOX conduce a una disminución de la eficiencia energética en las células. Se sabe que mientras el complejo IV es inhibido por el cianuro, la AOX no lo es y, por lo tanto, una característica de la función AOX es el consumo de O_2 en presencia de cianuro. La AOX puede ser inhibida por ácidos hidroxámicos y galato de n-propilo (Del-Saz et al., 2018).

Hasta hace poco, se consideraba que las cadenas respiratorias ramificadas estaban limitadas a organismos tales como arqueas, bacterias, plantas, hongos y protozoos. Sin embargo, se han encontrado secuencias que codifican NDH2 y AOX en los genomas de varios filos de animales, incluidos Placozoa, Porifera, Cnidaria, Annelida, Echinodermata, Mollusca, Nematoda, Hemichordata y Chordata. En 2019, McDonald y Gospodaryov propusieron que la presencia de oxidasas alternas en animales marinos les permiten adaptarse a los cambios causados por el cambio climático.

Otra deshidrogenasa que puede formar parte de las cadenas respiratorias ramificadas es la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial (GPDHmit), la cual forma parte de la lanzadera del glicerol fosfato hacia la cadena respiratoria y se sitúa en la superficie externa de la MIM (Nelson y Cox, 2015). A diferencia de la NDH2 y la AOX, la GPDHmit no realiza una función alterna a los complejos clásicos, siendo la enzima que cataliza la conversión reversible del glicerol-3-fosfato (G3P) citosólico en dihidroxiacetona fosfato, permitiendo así su entrada en la vía glucolítica. Los electrones de esta reacción se canalizan a través de FAD a la coenzima Q, reduciéndolo a $FADH_2$ y cediendo los electrones a la ubiquinona para reducirla a ubiquinol. El glicerol-3-fosfato actúa como un sustrato para la fosforilación oxidativa que proporciona electrones desde el lado citosólico de la MIM que, finalmente, se utilizan para reducir el oxígeno por la citocromo oxidasa (Cabrera-Orefice et al., 2014; Clarke y Porter, 2018).

2.5.2. Mecanismos Extrínsecos de Desacoplamiento Mitocondrial

Dentro de los mecanismos extrínsecos de desacoplamiento fisiológico mitocondrial, el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) en mamíferos, también denominado canal no-específico mitocondrial (MUC) en levaduras, es uno de los más ampliamente estudiados. La activación de este poro/canal promueve un fenómeno de transición de la permeabilidad mitocondrial, en donde cambia la permeabilidad de la MIM, permitiendo el paso de moléculas de hasta 1.5 kDa. Una consecuencia de la activación o apertura de este poro es el aumento en el volumen de la matriz (también llamado hinchamiento mitocondrial), el cual, si se descontrola, puede ocasionar el rompimiento de la MEM ocasionando así la muerte celular. Este fenómeno ha sido observado en levaduras, plantas y mamíferos; específicamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ha propuesto que este fenómeno es un mecanismo reversible utilizado como un mecanismo fisiológico para disminuir la producción de EROs (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014; Rosas-Lemus, 2015; Morales-García, 2020).

A la fecha, la estructura del mPTP aún se encuentra en debate; uno de los primeros modelos propuso que estaba conformado por el acarreador de nucleótidos de adenina (ANT), el acarreador de fosfatos (PiC), el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y la ciclofilina D (CypD) (Crompton, 1999). Estudios recientes proponen que el mPTP está formado por el dímero de la ATP sintasa; sin embargo, el posible mecanismo y la aparición de la formación de canales por el Complejo V, sigue siendo motivo de controversia (Carraro et al., 2019).

Las proteínas desacoplantes (UCPs) son otro mecanismo de desacoplamiento extrínseco con el que cuentan las mitocondrias. Las UCPs son una familia heterogénea de proteínas de transporte transmembrana conservadas evolutivamente; éstas disipan parcialmente el gradiente electroquímico de protones, lo que reduce la producción de EROs (Berry et al., 2018; Ji et al., 2020). En la siguiente sección se ampliará la información sobre este mecanismo de desacoplamiento.

De todos los mecanismos de desacoplamiento fisiológico descritos anteriormente, en las

mitocondrias del camarón blanco se ha confirmado que no ocurre el fenómeno de la transición de la permeabilidad, además de que no cuenta con enzimas oxidorreductasas alternas en su cadena respiratoria. Sin embargo, si existe evidencia de dos trascritos que codifican a dos proteínas desacoplantes, siendo este el único mecanismo de desacoplamiento mitocondrial fisiológico reportado a la fecha en esta especie (Rodríguez Armenta, 2018; Méndez-Romero et al., 2019).

2.6. Proteínas Desacoplantes: Características y Funciones

La superfamilia de acarreadores mitocondriales SLC25 está conformada por 53 miembros diferentes, los cuales se encuentran ubicados principalmente en la MIM de la mitocondria y algunos de ellos en los peroxisomas y los cloroplastos. Estos acarreadores transportan una gran variedad de moléculas que incluyen nucleótidos (ATP y ADP), aminoácidos (glutamato, aspartato, lisina, histidina, arginina, ornitina y citrulina) y otros compuestos (malato y calcio). Los acarreadores mitocondriales se encuentran comúnmente en todas las células eucariotas unicelulares y multicelulares. El nivel de expresión de estos acarreadores varía entre tejidos, algunos se expresan en casi todos los tejidos, mientras que otros son específicos (Palmieri, 2014).

Los miembros de la superfamilia SLC25 son proteínas codificadas en el núcleo e importadas hacia la MIM; sin embargo, en su mayoría carecen de péptido señal. Estructuralmente, estas proteínas poseen una organización conservada de seis hélices alfa transmembranales, que consisten cada una en tres dominios repetidos en tándem de 100 residuos. Cada dominio contiene dos segmentos hidrofóbicos y el motivo PxD/ExxK/RxK/R- (20-30 residuos) D/EGxxxxaK/RG (en donde x puede ser cualquier aminoácido). A pesar de que los miembros de la superfamilia SLC25 poseen una estructura similar, tanto sus mecanismos de transporte, como la naturaleza y el tamaño de los sustratos que acarrear difieren en cada uno de sus miembros (Palmieri, 2013; Echtay et al., 2018).

Dentro de la superfamilia SLC25 se encuentra una subfamilia de proteínas integrales de la MIM, denominadas proteínas desacoplantes o UCPs. Las UCPs disipan el gradiente electroquímico de protones generado durante el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria

mitocondrial, cuando son activadas por ácidos grasos libres (AG) o productos de la β -oxidación. La reincorporación de H^+ hacia la matriz mitocondrial inducida por la actividad de las UCPs puede ser inhibida por nucleótidos de purina (Palmieri, 2004; Gaudry y Jastroch, 2019).

Las UCPs han sido identificadas en casi todas las células eucariotas, incluidas las de mamíferos, aves, reptiles, peces, insectos, plantas, hongos y protistas (Vercesi et al., 2006; Jarmuszkiewicz et al., 2010; Slocinska et al., 2016). En los mamíferos esta subfamilia está conformada por cinco proteínas diferentes: UCP1 (SLC25A7), UCP2 (SLC25A8), UCP3 (SLC25A9), UCP4 (SLC25A27) y UCP5 (SLC25A14/SLC25A30) (Palmieri, 2013); mientras que en los invertebrados, sólo están presentes los homólogos de las proteínas UCP4 y UCP5 (Sokolova y Sokolov, 2005).

Hace más de 44 años se descubrió el primer miembro de la familia de las proteínas desacoplantes en los mamíferos, la UCP1 (Nicholls, 1976). Esta UCP1 ó SLC25A7 se localiza en la MIM de las mitocondrias del tejido adiposo marrón y café de mamíferos neonatales, desempeñando un papel importante en la termogénesis-sin temblores. Esto se debe a que, cuando se encuentra activa, la UCP1 es capaz de translocar protones de nuevo hacia la matriz, generando calor al disipar esta energía. El desacoplamiento de la síntesis de ATP dada por la UCP1, es activado por ácidos grasos libres (AG) y superóxido. Además, esta proteína puede ser inhibida por nucleótidos de purina como el guanosin difosfato (GDP), pero el mecanismo aún se encuentra en debate (Echtay, 2007; Zhao et al., 2017; Ruprecht y Kunji, 2019).

Los siguientes miembros en ser identificados fueron las UCP2 y UCP3 en 1997 (Fleury et al., 1997). La UCP2 se convirtió en la proteína más conocida de esta familia pues se expresa de forma ubicua en múltiples tejidos: sistema nervioso central, riñón, corazón, hígado, páncreas, bazo, timo y macrófagos. La UCP2 está estrictamente regulada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional. Al igual que UCP1, la UCP2 desacopla el consumo de oxígeno de la síntesis de ATP (Tian et al., 2018). Diversos estudios han determinado que la UCP2 es importante para la defensa contra diversas señales de estrés y modula varios procesos energéticos celulares como la producción de ATP y EROS, la oxidación de ácidos grasos, la absorción de calcio mitocondrial, así como estabilización del $\Delta\Psi_m$ y el control de la glucosa. Además, existen reportes de su

participación en la regulación de la inmunidad y en múltiples patologías como sepsis, diabetes y cáncer (Dutra et al., 2018; Tian et al., 2018; Ding et al., 2019).

Por su lado, la UCP3 se expresa predominantemente en las fibras del músculo esquelético y el corazón, pudiéndose encontrar también en el tejido adiposo marrón, pero en menor cantidad que UCP1. Los patrones de distribución de UCP3 difieren entre organismos y muestran una clara dependencia del metabolismo celular. Se ha reportado que UCP3 y UCP2 cuentan con una vida media corta (30 min) comparada con la vida media de UCP1 (30 h), por lo que UCP3 es una proteína que se expresa en gran medida durante una necesidad metabólica como el ejercicio (Pohl et al., 2019). A diferencia de UCP1, la función de transporte y el mecanismo molecular de la regulación de UCP3 están poco investigados, aunque generalmente se acuerda que UCP3 transporta protones y es activado por AG e inhibido por nucleótidos de purina. Existen diferencias significativas en la inhibición por nucleótidos de purina entre UCP3 y UCP1, causadas por los diferentes mecanismos de interacción entre los nucleótidos de purina y los residuos de arginina (Macher et al., 2018; Pohl et al., 2019). En un inicio se sugirió que UCP3 podría regular el gasto de energía en el músculo, por su homología con UCP1; sin embargo, las investigaciones realizadas a la fecha apuntan a un papel en la protección de las mitocondrias contra el daño oxidativo inducido por los lípidos, ya sea facilitando la exportación de ácidos grasos mitocondriales o afectando los niveles EROs (Nabben et al., 2008).

Finalmente, entre 1998 y 1999 fueron identificadas la UCP5 y UCP4, respectivamente (Sanchis et al., 1998; Mao et al., 1999). Existen marcadas diferencias entre las secuencias de aminoácidos de ambas proteínas en comparación con las de UCP1-3, de hecho, están más estrechamente relacionadas con las proteínas transportadoras de oxoglutarato/malato y dicarboxilato, pero ambas proteínas pueden catalizar el transporte de protones y cloruro a través de las bicapas lipídicas, lo que sugiere un papel en la mitigación de las EROs por desacoplamiento (Echtay et al., 2018; Gaudry y Jastroch, 2019).

Estudios previos reportan que la UCP4 de los vertebrados se expresa predominantemente en el sistema nervioso, incluidas las diferentes regiones del cerebro, la médula espinal, las células ciliadas del oído interno y las células de Merkel en la piel (Ogunbona y Claypool, 2019). Por su

parte, UCP5 primero fue denominada proteína acarreadora mitocondrial del cerebro-1 o BMCP1, ya que se expresa predominantemente en el sistema nervioso central de los mamíferos. Ahora se sabe que esta proteína se encuentra presente en la corteza cerebral, hipotálamo, sistema límbico, el cerebelo, ganglios basales, médula espinal, testículos, útero, riñones, pulmones, estómago, hígado y corazón (Echtay, 2007). La UCP5 tiene tres formas diferentes en humanos: forma larga (UCP5L) con 325 aminoácidos, forma corta (UCP5S) con 322 aminoácidos y forma de inserción corta (UCP5S1) con 353 aminoácidos (Ramsden et al., 2012). Sorpresivamente los homólogos de UCP4 y UCP5 se expresan predominantemente también en varios tejidos de invertebrados (Slocinska et al., 2016).

Como se describió anteriormente, el mecanismo mediante el cual los ácidos grasos activan a las proteínas desacoplantes aún se encuentra en debate. Se han propuesto dos modelos para explicar este mecanismo. El modelo más aceptado es el propuesto por Garlid et al. (1996) denominado ciclo de ácidos grasos (flip-flop o cycling), en este modelo el anion del AG se difunde lateralmente dentro de la MIM para alcanzar un sitio de unión periférico subsuperficial de la UCP ubicado cerca de la matriz, donde se une específicamente a los residuos básicos (arginina y lisina). El potencial de la MIM impulsa el grupo carboxilo del AG a través de una ruta electrostática compuesta de los residuos básicos (dentro y fuera de la cavidad de UCP), lo que resulta en el transporte del anión del AG al otro lado de la membrana, El anion difunde lateralmente lejos de la UCP, donde es protonado y rápidamente difunde a través de la membrana para enviar protones de forma electroneutral a la matriz mediante un mecanismo de flip-flop espontáneo, completando el ciclo (Figura 5A). (Garlid et al., 2000; Ježek et al. 2018).

El otro modelo es el traslado de AG (shuttling), en este modelo se considera a la UCP como un “portador” ya que los AG no se difunden desde la UCP a la bicapa lipídica, sino que permanecen unidos a la UCP por interacciones hidrofóbicas, mientras se expone al lado cis o trans de la membrana como anión o después de la protonación. El AG protonado transporta H^+ a la matriz, no por difusión espontánea a través de la bicapa lipídica, si no a través de la proteína (Figura 5B). Esta es una de las principales diferencias entre el traslado y el ciclo de AG. Sin embargo, dado que el sitio de unión real se ha verificado anteriormente en una bicapa lipídica, es poco probable que este mecanismo sea el que se lleve a cabo (Ježek et al. 2018).

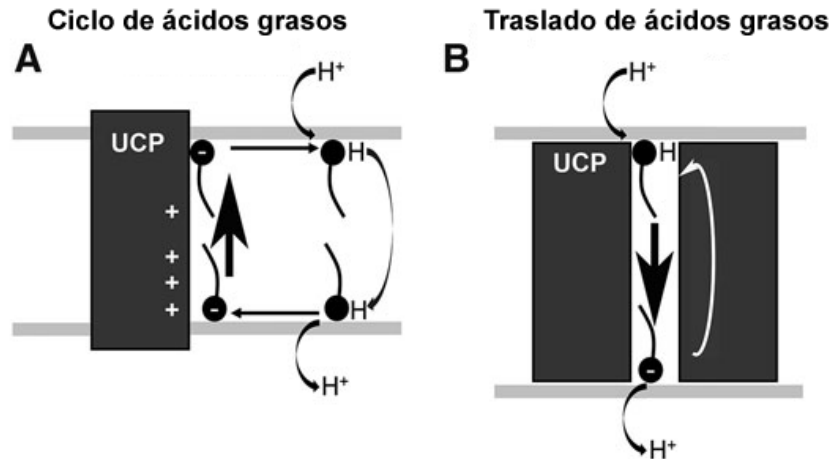


Figura 5. Modelos propuestos del ciclo protonoforético catalizado por UCP. Donde + representa los aminoácidos básicos arginina y lisina. Modificado de Ježek et al. (2018)

2.6.1. Las Proteínas Desacoplantes de las Mitocondrias de Invertebrados

A pesar de que el estudio de las proteínas desacoplantes en mamíferos inicio hace más de 40 años, el estudio las UCPs en otros grupos de organismos como los invertebrados son escasos aún cuando éstos comprenden un grupo muy vasto de especies incluyendo anélidos, moluscos, poríferos, cnidarios, equinodermos y todas las especies de los filos Arthropoda (insectos, arácnidos y crustáceos) (Martínez-Cruz et al., 2012; Slocinska et al., 2016).

Los invertebrados se encuentran en todos los ecosistemas y desempeñan un papel ecológico importante en cada uno, por lo que la comprensión sobre la estructura y función de las proteínas desacoplantes es un área de estudio muy amplia e interesante (Martínez-Cruz et al., 2012; Slocinska et al., 2016). Una forma conveniente de analizar la función de las UCPs en los organismos es medir en las mitocondrias aisladas, la tasa de consumo de oxígeno y/o la producción de especies reactivas de oxígeno en presencia y ausencia de un activador o inhibidor (Clarke y Porter, 2018).

Uno de los primeros modelos invertebrados en el que se reportó la presencia de un homólogo de UCPs fue la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Hanák y Ježek, 2001); sin embargo, pasaron varios años para que la caracterización funcional de esta proteína por Fridell et al. (2004)

permitiera confirmar su actividad y relacionarla con su función. Los autores utilizaron técnicas de sobreexpresión en levaduras y demostraron que DmUCP5 tiene actividad desacoplante, la cual es estimulada por 100 μM de ácido láurico e inhibida en presencia de 0.5 mM de GDP. En mitocondrias aisladas en estado respiratorio IV, esta actividad promueve un aumento en la tasa de respiración y una disminución en el $\Delta\Psi_m$. Sin embargo, cuando DmUCP5 es bloqueada por la técnica de knockout (alteración del gen del elemento P BmcpBG⁰²⁴⁴⁶), se muestra el mismo patrón de respiración en las mitocondrias aisladas de la cabeza y tórax de las líneas transgénicas, por lo que se propuso que alguna otra proteína, por ejemplo, UCP4, podría utilizar el gradiente de protones mitocondriales. Así, se estableció que DmUCP5 tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis metabólica de las moscas, influyendo también en el control hormonal del metabolismo (Sánchez-Blanco et al., 2006).

A la fecha, tres isoformas de UCP4 han sido identificadas en la mosca de la fruta UCP4A, 4B, 4C. Debido a que DmUCP5 no media el desacoplamiento en *D. melanogaster*, Da-Ré et al. (2014) investigaron el papel de UCP4 utilizando técnicas de knockout (utilizando el sistema GAL4/UAS). Estos autores demostraron que DmUCP4C es esencial para el desacoplamiento en las mitocondrias de larvas de *Drosophila*, el cual es estimulado por 15 μM de palmitato e inhibido por 2 mM de GDP. Además, DmUCP4C es necesaria para el desarrollo de las larvas a adulto a 15 °C, sugiriendo que la respiración desacoplada podría haber evolucionado como una adaptación que favorece la progresión de las larvas hacia etapas de desarrollo más tolerantes al frío y podría ser necesaria para permitir la renovación rápida del ciclo del ácido tricarboxílico a fin de proporcionar intermediarios necesarios para el crecimiento y/o disminuir la producción de EROs (Da-Ré et al., 2014).

Al igual que la mosca de la fruta, el nematodo *Caenorhabditis elegans* fue uno de los primeros invertebrados en los que se reportó la caracterización genética de un homólogo de UCP. En *C. elegans* la distribución de esta proteína es consistente con el almacenamiento de la grasa y puede funcionar en los músculos de la cabeza, la faringe (cuerpo, istmo y bulbo terminal) y el músculo de la pared corporal. Para la caracterización de esta proteína se utilizaron embriones y larvas de *C. elegans* que carecían del gen UCP4, encontrando que estos contenían niveles elevados de ATP y un potencial de membrana mitocondrial elevado; además, exhibían un defecto en la supervivencia en ambientes fríos. Todo lo anterior permitió sugerir que UCP4 es necesaria para mantener la

homeostasis a baja temperatura en *C. elegans* (Iser et al., 2005).

En 2011 Pfeiffer et al. propusieron una nueva función para la UCP4 de *C. elegans*. Utilizando mitocondrias aisladas de organismos que carecía del gen UCP4, estos autores, determinaron que la habilidad para la absorción de succinato de estas mitocondrias se ve notablemente disminuida, pero los parámetros de acoplamiento y la función de la cadena de electrones mitocondriales permanecen sin cambios. Observaron que al utilizar 500 μM de palmitato y 1 mM GDP, no se logró aumentar ni disminuir la respiración, respectivamente. Lo que indica que CeUCP4 no parece funcionar como un desacoplante sensible a los ácidos grasos. Sin embargo, cuando se inhibe CeUCP4 la respiración impulsada por succinato se bloquea; esto implica que CeUCP4 participa en la regulación del metabolismo basado en el complejo II a través de un mecanismo que implica el transporte de succinato (Pfeiffer et al., 2011).

En 2011 Slocinska et al., realizaron la caracterización funcional en mitocondrias aisladas del músculo de la pierna y el cuerpo graso de la cucaracha *Gromphadorhina coquereliana* (GcUCP). Estos autores encontraron que la adición de 10 y 15 μM de ácido palmítico induce la estimulación máxima de la respiración en mitocondrias (estado IV) del cuerpo graso y la pierna, en un 37 y 72%, respectivamente. Asimismo, la adición de 2 mM de GTP revirtió parcialmente la estimulación de la respiración en ambos tipos de mitocondrias. Por otro lado, se observó que la actividad de la GcUCP en mitocondrias en estado III puede desviar la energía de la fosforilación oxidativa, lo que conduce a una disminución en el rendimiento de la síntesis de ATP; además, la activación de GcUCP promueve una disminución en la producción del anión superóxido, sugiriendo así que la protección contra el estrés oxidativo mitocondrial puede ser un papel fisiológico de las UCPs en los insectos (Slocinska et al., 2011).

Más recientemente, se reportó la actividad de UCPs en mitocondrias del escarabajo *Zophobas atratus* (ZaUCP4). Slocinska et al. (2012) determinaron que la estimulación de ZaUCP por 10 μM de ácido palmítico conduce a un aumento de un 30% en la respiración en las mitocondrias de la grasa de la pupa (estado III). Mientras que 15 μM de ácido palmítico estimula un 83% la frecuencia respiratoria en las mitocondrias de la grasa larval en estado III y la adición de 2 mM GTP revierte la respiración estimulada por el ácido palmítico en ambos tipos de mitocondrias. Lo anterior

demonstró que ZaUCP es inducida por ácidos grasos libres e inhibida por nucleótidos de purina. Además, la actividad y la expresión de ZaUCP4 disminuyen significativamente durante la transformación larval-pupal, indicando un papel fisiológico importante para UCP4 en la grasa del insecto en el desarrollo y función corporal (Slocinska et al., 2012). Además, se ha relacionado la actividad de ZaUCP4 con la neurohormona adipocinética (AKH, el equivalente en insectos al glucagón) en el desarrollo pupal y larval. En ambas etapas de desarrollo, Slocinska et al. observaron una regulación negativa de la expresión de ZaUCP en los niveles de ARNm y las proteínas, así como una disminución en la actividad de ZaUCP4 después del tratamiento con AKH, posiblemente debido a que se redujo el estrés oxidativo de la célula. Por lo que un posible papel de UCP4 relacionado con la protección antioxidante durante la metamorfosis del insecto, no se puede descartar (Slocinska et al., 2013).

En 2014 se identificaron dos genes que codifican a las proteínas UCP4 y UCP5 de la chinche hematófaga *Rhodnius prolixus*. Alves-Bezerra et al. (2014) demostraron que los niveles de generación de H₂O₂ se reducen en paralelo al aumento de la expresión de RpUCP4 después de la alimentación. En las mitocondrias aisladas de los enterocitos la activación de la UCP por 1 μM de ácido palmítico disminuyó los niveles de H₂O₂ en un 18%, mientras que la inhibición de la actividad UCP en presencia de 0.5 mM GDP y albumina de suero bovina (BSA) al 0.05% ocasionaron un aumento de 25-65% en los niveles de H₂O₂. Los autores proponen que la RpUCP4 expresada en el intestino, puede funcionar como un mecanismo antioxidante para proteger a las células contra el daño oxidativo causado por la digestión de la sangre (Alves-Bezerra et al., 2014).

Los reportes sobre la presencia de las proteínas desacoplantes en invertebrados marinos son aún más escasos. Uno de los pocos estudios que existe es el del anfibio marino *Branchiostoma belcherik* (BbUCP), denominado como el invertebrado vivo más cercano a los vertebrados (Chen et al., 2010). La actividad de BbUCP se determinó a través de la expresión heteróloga en levadura, la cual se comparó con UCP1 de rata y UCP2 humana (cada una expresada en un sistema heterólogo). Las mitocondrias de levadura recombinante se aislaron y analizaron para determinar la tasa de respiración en estado IV. La BbUCP aumentó 1.7 veces la respiración mitocondrial en presencia de 50 μM de ácido palmítico de una manera insensible a 1 mM de GDP; lo cual indica que tiene una actividad de desacoplamiento leve y no regulada en el sistema de la levadura, que se

asemeja a la UCP2 de un mamífero, pero no a UCP1 (Chen et al., 2010) .

Otros reportes abordan las características de los transcritos de las UCPs y sus niveles de expresión bajo estrés. Uno de ellos es el de la ostra oriental *Crassostrea virginica* (CvUCP), el cual es el primer reporte de la estructura de nucleótidos y proteínas de UCP5 en estos invertebrados. La CvUCP5 se expresa en todos los tejidos analizados y cuenta con dos transcritos UCP5S y UCP5L; los cuales difieren en 152 pb de longitud debido a la presencia de un intrón en UCP5L. No existen cambios significativos en la expresión de ARNm de CvUCP5 de organismos sometidos a estrés por hipoxia-reoxigenación, exposición subletal a Cd (50 µg/L Cd durante 56 días) y aclimatación a diferentes temperaturas (12 y 20 °C) (Kern et al., 2009).

2.6.2. Las UCPs de los Crustáceos

Hasta donde sabemos, en los crustáceos existe un sólo estudio de las UCPs. En 2019, Méndez-Romero y colaboradores reportaron en el camarón blanco *L. vannamei* dos transcritos, uno que codifica a UCP4 y otro a una UCP5. Se encontró que el transcrito completo de *LvUCP4* consta de 1809 pb con una región codificante de 959 pb que se traduce a una proteína deducida de 318 residuos, con un peso molecular calculado de 35.349 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 9.65. Mientras que el transcrito de *LvUCP5* consta de 2332 pb con una región codificante de proteína deducida de 302 residuos, con un peso molecular calculado de 33.177 kDa y pI de 9.58. Se determinó también que *LvUCP4* es de expresión ubicua, mientras que *LvUCP5* es de expresión tejido-específica, expresándose sólo en las branquias, músculo y pleópodos del camarón blanco (Méndez-Romero et al., 2019).

Las secuencias deducidas de aminoácidos de ambas proteínas comparten identidad de un 45-60% con las UCP4 y UCP5 de otros invertebrados. El análisis filogenético de ambas proteínas indica que están estrechamente relacionadas con las UCPs reportadas para otros invertebrados, confirmando su correcta identificación molecular. Ambas secuencias deducidas de aminoácidos conservan los tres residuos de prolina en las hélices de número impar (TMH1, -3 y -5) y los tres

residuos de arginina en las hélices de número par (TMH2, -4 y -6) que son esenciales para la unión de nucleótidos de purina. Ambas secuencias también contienen las firmas PxD/ExxK/RxK/R (donde x es cualquier aminoácido), comunes en la familia de acarreadores de solutos mitocondriales (Méndez-Romero et al., 2019).

Ambas proteínas, LvUCP4 y LvUCP5 tienen una estructura tripartita que consta de tres regiones hidrofóbicas conformadas por dos hélices α cada una, que se extienden a través de la MIM atravesándola seis veces (TMH1-6). Las dos hélices adjuntas que forman cada región repetida están conectadas por una hélice anfipática (APH) orientada hacia la matriz. Los extremos N- (marcados en azul oscuro) y C-terminales (marcados en rojo) de estas proteínas se encuentran en el espacio intermembranal (Figura 5A). El espacio embebido en la MIM tiene una carga neutra hacia el exterior; sin embargo, existe una alta carga positiva en la cavidad de las UCPs (Figura 5B) (Méndez-Romero et al., 2019).

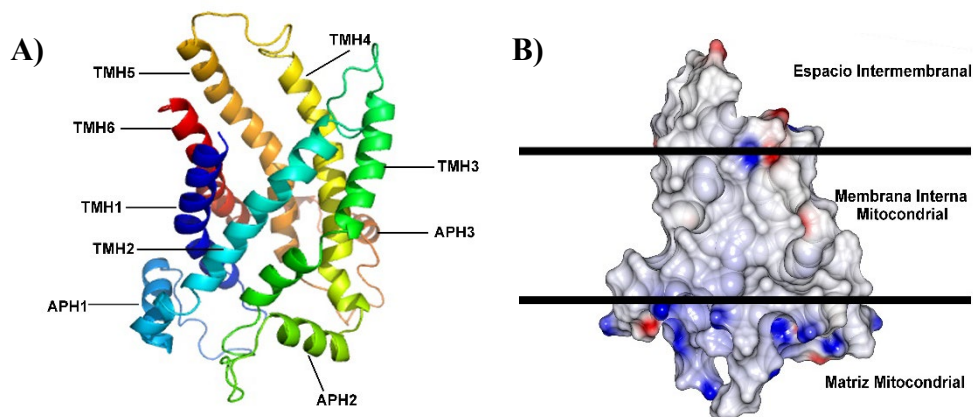


Figura 6. Modelo estructural predictivo de LvUCP4. A) Estructura secundaria B) Distribución espacial de las cargas de los residuos. Donde las cargas positivas están marcadas en azul, los residuos de carga negativa marcados en rojo y los residuos de carga neutra en blanco.

En el camarón blanco la expresión de los genes *LvUCP4* y *LvUCP5* mostró ligeros cambios en respuesta a hipoxia y reoxigenación, aunque la posible participación de las UCPs en el control de la producción de EROS no se ha confirmado debido a la ausencia de estudios (Méndez-Romero et al., 2019). A la fecha, se sugiere que los homólogos UCP4 y UCP5 de la mitocondria del camarón podrían tener un efecto significativo tanto en la tasa de respiración mitocondrial, en el potencial de

membrana y en la producción de especies reactivas de oxígeno. Derivado de lo anterior, surgen varias preguntas de investigación como:

- ¿Cómo el desacoplamiento fisiológico producido por las UCPs ayuda al camarón a tolerar las variaciones en las concentraciones de oxígeno ambiental?
- ¿En qué condiciones las mitocondrias del camarón se desacoplan activando sus proteínas desacoplantes UCP4 y UCP5?
- ¿Cómo las concentraciones cambiantes de oxígeno en el agua afectan la función de la mitocondria y la activación de las proteínas desacoplantes?

3. HIPÓTESIS

Las proteínas desacoplantes de las mitocondrias del camarón representan un mecanismo de desacoplamiento fisiológico que les permite prevenir la producción de especies reactivas de oxígeno en condiciones de estrés oxidativo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Identificar y evaluar la funcionalidad de las proteínas desacoplantes LvUCP4 y LvUCP5 en las mitocondrias aisladas del camarón blanco e inferir sobre su posible función.

4.2. Objetivos Específicos

1. Identificar y detectar las UCPs en mitocondrias aisladas del camarón blanco por Western Blot.
2. Evaluar la funcionalidad de LvUCP4 y LvUCP5 a través de ensayos de oximetría, medición del potencial de membrana y determinación de especies reactivas de oxígeno.
3. Inferir acerca de la función de las UCPs del camarón a través del uso de técnicas de RNAi de los transcritos de *LvUCP4* y *LvUCP5*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Aislamiento de Mitocondrias a Partir de Pleópodos de Camarón

Se aislaron las mitocondrias de los pleópodos de camarones adultos sanos por el método de centrifugación diferencial descrito previamente por Rodríguez-Armenta et al. (2018). Los pleópodos se disecctaron individualmente, se colocaron en un buffer de aislamiento frío (sacarosa 0.125 M, D-sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, EGTA 1 mM, K-HEPES 20 mM y BSA al 0.5% a pH 7.5) y se cortaron en trozos pequeños. El homogeneizado de pleópodos se hizo utilizando un sistema Potter-Elvehjem (Wheaton, USA) dando cinco pulsos de 30 seg en frío. El homogenizado se centrifugó a 5000 rpm por 10 seg a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet con buffer de aislamiento frío 2 (sacarosa 0.125 M, D-sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, EGTA 0.025 mM, K-HEPES 20 mM y BSA al 0.5% a pH 7.5) y nuevamente se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4 °C. Después de las etapas de centrifugación, se concentraron las mitocondrias y el pellet se resuspendió en una solución fría que contenía sacarosa 0.125 M, D-sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, EGTA 0.025 mM, K-HEPES 20 mM y BSA al 0.5% (pH 7.5). El contenido de proteína soluble de las fracciones mitocondriales se determinó mediante el método de Bradford (1976), utilizando BSA como estándar.

5.2. Identificación de LvUCP4 y LvUCP5 por Inmunodetección

Para confirmar la ubicación de las proteínas desacoplantes en las mitocondrias del camarón se solubilizaron las fracciones aisladas de los pleópodos con buffer RIPA y PEG 400 al 1%. La proteína soluble de las fracciones mitocondriales se midió por el método de Bradford (1976). Un total de 50 µg de proteína mitocondrial se diluyeron en buffer 4X (Tris 0.5 M, pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 10%, β-mercaptoetanol al 0.05% y azul de bromofenol al 0.01%), se hirvieron durante

5 min y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% (Laemmli 1970); la electroforesis se corrió a 15 mA.

Se realizó un análisis Western blot utilizando geles de acrilamida para la separación de las proteínas mitocondriales, las cuales fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF usando un sistema electroblotting húmedo (BioRad, USA) con un buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 7.0) (Towbin et al., 1979). Las membranas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-T (Tris 50mM, NaCl 104 mM, pH 7.6, Tween 20 al 0.1%) durante 1 h y se incubaron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos monoclonales primarios: UCP4 (A-5): sc-365295 IgM monoclonal de ratón ó BMCP1/KMCP1 (F-3): sc-376172 IgG₁ monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, USA) diluidos 1:1000 (v/v). Las membranas se lavaron con solución TBS-T y se incubaron a 37 °C durante 1 h con anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra (H+L) conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, USA) diluido en TBS-T 1:10000 (v/v). Las membranas se lavaron nuevamente y las bandas se desarrollaron por quimioluminiscencia utilizando un kit ECL (Amersham Biosciences, GE, Healthcare).

5.3. Determinación de las Tasas de Consumo de Oxígeno Mitocondrial del Camarón

Se utilizaron mitocondrias aisladas de los pléopodos del camarón para medir la tasa de consumo de oxígeno en el estado no fosforilante (IV) y fosforilante (III), utilizando un oxímetro acoplado a un electródo tipo Clark (Strathkelvin Instruments modelo 782, Escocia). Las mediciones se realizaron con la adición de 200 µg de proteína mitocondrial a un medio de respiración (sacarosa 0.125 M, D-sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, K-HEPES 20 mM pH 7.5) que contenía, MgCl₂ 1 mM, buffer fosfato 10 mM (NaHPO₄ y NaH₂PO₄) y succinato 10 mM como sustrato respiratorio.

En ausencia de ADP (estado IV), se midió el consumo de oxígeno mitocondrial en presencia de varios inhibidores específicos que incluyen rotenona 50 µM, oligomicina 2 mM y carboxiatractilósido 10 µM para excluir las actividades de la NADH deshidrogenasa, coenzima Q oxidorreductasa, ATP sintasa y el antiportador ADP/ATP, respectivamente. Las concentraciones

de estos inhibidores habían sido previamente establecidas en nuestro grupo de trabajo. La activación de las UCPs se evaluó en presencia de diferentes ácidos grasos libres (AG) y aldehídos reactivos (AR) como activadores para inducir el estado abierto de estas proteínas. Para cada uno de los activadores probados, previamente se realizaron experimentos de titulación para determinar las concentraciones óptimas a utilizar. Los análisis incluyeron: ácido palmítico (AP) 10 μM , ácido esteárico (AE) 10 μM , ácido linoleico (AL) 1 μM , ácido mirístico (AM) 10 μM , ácido láurico (ALa) 25 μM , N-terc-butil- α -fenilnitrona (PBN) 20 μM y 4-hidroxil-2-nonenal de 6.4 μM (HNE). Por otro lado, se determinó el efecto inhibitorio de 100 μM de GDP y 100 μM de GTP y se utilizó 0.6 μM de carbonil cianuro de 3-clorofenilhidracona (CCCP) como agente desacoplante. Finalmente, se añadió 100 μM de KCN para inhibir la actividad COX. El volumen final de reacciones fue de 200 μL , todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.4. Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial del Camarón ($\Delta\Psi_m$)

El potencial transmembrana mitocondrial se determinó utilizando safranina O como sonda de fluorescencia. La fluorescencia aumenta cuando el $\Delta\Psi_m$ se disipa (Figueira et al., 2012), los cambios se determinaron espectrofotométricamente a 495 y 586 nm para la excitación y emisión, respectivamente a temperatura ambiente en un lector de microplacas Varioskan Lux (Thermoscientific, USA). Las determinaciones se realizaron en medio respiratorio frío (sacarosa 0.125 M, D-sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, K-HEPES 20 mM pH 7.5) y se añadió a la solución 10 μM de safranina. Se utilizó un contenido total de proteína mitocondrial de 0.5 mg/mL en cada medición y se probaron diferentes activadores potenciales, incluyendo ALa 125 μM , AM 50 μM , AP 50 μM , AE 100 μM , AL 10 μM , PBN 80 μM , HNE 32 μM , y GDP 250 μM como inhibidor potencial. Al final, se añadió cianuro de carbonilo-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) a cada reacción para desacoplar y promover la disipación del $\Delta\Psi_m$.

5.5. Evaluación de la Permeabilidad Mitocondrial de Protones

El transporte de protones se determinó en las mitocondrias aisladas del camarón según el método descrito por Luévano-Martínez et al. (2012), con ligeras modificaciones. Brevemente, en una reacción de 250 μL de volumen final se incubaron por 1 min a temperatura ambiente 0.5 mg/mL de proteína mitocondrial en acetato de potasio 0.2 M, sacarosa 0.125 M, D-sorbitol 0.375 M, KCl 150 mM, K-HEPES 20 mM (pH 7.5), K_2HPO_4 5 mM, antimicina A 1 μM , oligomicina 2 mM, carboxiatractilósido 10 μM , MgCl_2 2 mM. El hinchamiento se indujo con valinomicina 1 μM . Se incluyó ácido esteárico 100 μM , GDP 0.5 mM o ácido mersalil 100 μM en el medio de incubación para determinar la actividad de transporte de protones de LvUCP. El hinchamiento mitocondrial se evaluó a 540 nm utilizando un lector de microplacas Varioskan Lux (Thermoscientific, USA). Todas las determinaciones fueron realizadas en triplicado.

5.6. Evaluación de la Producción de Anión Superóxido y Peróxido de Hidrógeno en Diferentes Órganos/Tejidos del Camarón

Para determinar la capacidad potencial de varios órganos/tejidos del camarón para producir anión superóxido endógeno (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se aclimataron camarones juveniles de la especie *L. vannamei* en condiciones óptimas de laboratorio y se les diseccionaron y analizaron individualmente las branquias, los pleópodos, la glándula digestiva y el músculo. La reducción del *ferricitocromo c* se usó como técnica para medir la producción de EROS en cada órgano como describió previamente Zenteno-Savín et al. (2006).

Se utilizó el kit Amplex[®] Red hydrogen peroxide/peroxidase assay (Invitrogen, USA) para detectar la liberación de H_2O_2 de acuerdo con los protocolos del fabricante. Brevemente, se colocaron 100 mg de cada tejido en 1 ml de buffer de Krebs (NaCl 0.11 M, KCl 4.7 mM, MgSO_4 12 mM, NaH_2PO_4 12 mM, NaHCO_3 25 mM, glucosa 1 mM). Cada tejido se homogeneizó con un Kontes[™] y las muestras se mantuvieron en hielo durante 30 min, luego se centrifugaron a 3500 \times g durante

10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó para cada órgano y la proteína soluble se cuantificó utilizando el método de Bradford (1976).

Cada mezcla de reacción (reactivo Amplex[®] Red 10 µM, peroxidasa de rábano picante (HRP) 0.1 U/ml en buffer de Krebs) se incubó a 37 °C durante 10 min y se agregaron 20 µg de proteína. Las determinaciones se midieron espectrofotométricamente a 530 y 580 nm para la excitación y emisión, respectivamente, en un lector de microplacas Varioskan Lux (Thermoscientific, USA) a 37 °C. Se construyó una curva estándar de H₂O₂ (0 a 7.5 nM). Las mediciones de cada tejido se realizaron por triplicado.

5.7. Ensayo de Hipoxia/Reoxigenación

Se evaluó el efecto de las variaciones en la concentración de oxígeno disuelto en la respuesta fisiológica del camarón y la expresión de las proteínas UCPs para inferir sobre la función de éstas. Se obtuvieron camarones juveniles sanos de la especie *L. vannamei* (13.18 ± 1.0 g) de granjas acuícolas de Cruz de Piedra, Empalme, Sonora y se mantuvieron en las instalaciones del CIAD, Hermosillo, Sonora. Un total de 180 organismos fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro tanques de plástico llenos con 80 L de agua de mar cada uno (28 °C, 35 ppt de salinidad, 5 mg/L O₂). Los camarones de cada tanque (n = 45) se alimentaron diariamente con alimentos granulados comerciales (35% de proteína). Se eliminó el alimento sin comer y las heces, el agua de mar se intercambiaba diariamente (60%).

Después del periodo de aclimatación de 14 días, los camarones se mantuvieron en ayuno por 24 h para uniformizar las condiciones metabólicas de los organismos. Los camarones se mantuvieron en normoxia (5 mg/L) en todos los tanques y se tomaron nueve camarones de cada tanque en esta condición. Posteriormente, un tanque se mantuvo en normoxia como control y las piedras aireadoras de los otros tres tanques se retiraron para inducir la hipoxia (1.5 mg/L). Las condiciones hipóxicas se establecieron cubriendo la superficie del agua de cada tanque y reemplazando el aire con gas nitrógeno (99% de pureza), que se introdujo burbujeando gradualmente el gas en el agua

de mar. La concentración de oxígeno en el agua se controló cuidadosamente y se monitoreó continuamente durante todo el ensayo con un oxímetro digital sumergible YSI 550A.

Una vez que se establecieron las condiciones hipóxicas (1.5 mg/L), se tomaron muestras de nueve camarones de cada tanque después de 6 h y se mantuvieron otras 6 h a esta condición sin toma de muestra. Luego, la concentración de oxígeno disuelto en el agua de mar se restableció gradualmente a 4 mg/L utilizando piedras de aireación y se tomaron muestras después de 1, 6 y 12 h de reoxigenación. El bioensayo de hipoxia-reoxigenación duró 24 h.

Los camarones muestreados se pesaron individualmente y su hemolinfa se extrajo de la base del tercer pereiópodo con una jeringa de tuberculina precargada con 500 μ L de solución anticoagulante (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, EDTA 10 mM, HEPES 10 mM a pH 7.3) de acuerdo con Vargas-Albores et al. (1993). Las muestras de hemolinfa se centrifugaron a 600 rpm durante 10 min a 4 °C, el plasma se separó de los hemocitos y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Después de la extracción de hemolinfa se disectaron cuidadosamente los pleópodos de los camarones en cada condición, una parte se almacenó individualmente a -20 °C hasta que se usó para cuantificar EROs y la otra se colocó en buffer de aislamiento frío para obtener las mitocondrias como se describió anteriormente.

5.7.1. Cuantificación de L-lactato en el Plasma

Para confirmar el efecto de la hipoxia-reoxigenación en los organismos experimentales se determinó la concentración de L-lactato en las muestras de plasma del ensayo, usando el kit comercial L-Lactate PAP (Randox, USA). Se siguió el protocolo descrito por Martínez-Cruz et al. (2012) para la determinación en microplaca. Brevemente, la reacción consistió en 200 μ L de solución de reactivo y 10 μ L de plasma de los camarones del ensayo o solución anticoagulante para el blanco. Se utilizó un lector de microplacas iMarkTM (Bio-Rad, USA) a una longitud de onda de 550 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

5.7.2. Determinación de Anión Superóxido (O_2^-) en Pleópodos del Camarón

Una vez comparados los datos previos, se decidió continuar la parte experimental únicamente con los pleópodos del camarón. Así, se determinó la producción del superóxido endógeno en los pleópodos de los organismos experimentales como se describió previamente por Zenteno-Savin et al. (2006). Brevemente, las mediciones individuales incluyeron 100 mg de tejido homogenizado en 1 mL de buffer de Krebs (NaCl 0.11 M, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 12 mM, NaH₂PO₄ 12 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 1 mM), después se agregó 15 μ M de ferricitocromo c y las reacciones se incubaron a 37 °C por 15 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3500 x g por 10 min a 4 °C, el sobrenadante fue recuperado y se adicionó 3 mM de N-etilmaleimida. La reacción se siguió a 550 nm usando un espectrofotómetro UV-6300PC. Cada muestra se analizó por triplicado.

5.7.3. Producción de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) Mitocondrial del Camarón

Se aislaron las mitocondrias de los pleópodos de los organismos del ensayo siguiendo el protocolo previamente descrito y se midió la producción de peróxido de hidrógeno en las fracciones mitocondriales de camarones expuestos a hipoxia-reoxigenación. Se utilizó el kit Amplex® Red hydrogen peroxide/peroxidase assay (Invitrogen, USA) como se describió anteriormente. La mezcla de reacción contenía buffer 1X (fosfato de sodio 0.25 M, pH 7.4), reactivo Amplex® Red 10 μ M, HRP 0.1 U/ml y 20 μ g de proteína mitocondrial en cada pozo, cada muestra se midió por triplicado.

5.7.4. Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) Mitocondrial del Camarón

La actividad superóxido dismutasa se determinó en las mitocondrias aisladas de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación utilizando un kit comercial RANSOD (Randox,

USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada reacción incluyó una concentración final de 20 µg de proteína, 170 µL del sustrato mixto y 25 µL de xantina oxidasa. La actividad de SOD se determinó a 490 nm en un lector de microplacas iMark™ (Bio-Rad, USA). Las mediciones se realizaron por triplicado.

5.7.5. Inmunodetección de LvUCPs en las Mitocondrias del Camarón

Las mitocondrias aisladas de los camarones expuestos al ensayo de hipoxia-reoxigenación se solubilizaron en buffer RIPA (Sigma, USA) y 1% de polietilenglicol 400 (Sigma, USA). Las muestras se lisaron por agitación en vórtex durante 1 h a 4 °C, luego se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. Un total de 100 µg de las proteínas solubilizadas se separaron por SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970). Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF usando un Transblot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad, USA) y buffer de transferencia (glicina 390 mM, Tris 48 mM, etanol al 20% y SDS al 20%). Las proteínas se transfirieron a 15 V durante 25 min y la membrana se bloqueó con Tween-20 al 2% en Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM a pH 7.2 durante 2 min a temperatura ambiente. La membrana se incubó durante toda la noche con 1% de leche en polvo sin grasa con buffer de lavado (Tris 50 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0.05% a pH 7.2); después, se lavó tres veces durante 5 min con buffer de lavado. La membrana se incubó con los anticuerpos monoclonales primarios de ratón: UCP4(A-5): sc-365295 IgM ó BMCP1/KMCP1 (F-3): sc-376172 IgG₁, ambos de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology diluidos 1: 500 (v/v) en buffer de lavado durante 2 h a temperatura ambiente, luego se incubó a 4 °C durante dos días.

Por último, la membrana se lavó tres veces durante 5 min cada una con buffer de lavado y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra (H+L) conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, USA) diluido 1: 2500 (v/v) y se lavó con buffer de lavado. La reacción de la peroxidasa se desarrolló incubando la membrana en una solución de 10 mg de diaminobencidina disuelta en Tris 20 mM y NaCl 50 mM a pH 7.6 con 12 µL de H₂O₂ recién preparada, hasta que se desarrolló la señal y la reacción se detuvo con agua. Se

detectó también la subunidad nuclear ATP β del complejo F₀F₁ATP-sintasa como control siguiendo la metodología descrita por Martínez-Cruz et al. (2012).

5.8. Silenciamiento de los Transcritos UCP en el Camarón

Para determinar la posible participación de las proteínas desacoplantes en la defensa antioxidante del camarón blanco se silenciaron los transcritos *LvUCP4* y *LvUCP5* utilizando técnicas de ARN de interferencia. Como primer paso se determinó la dosis de inyección del ARN de doble cadena (dsRNA) y el tiempo necesario para llevar a cabo el silenciamiento.

5.8.1. Síntesis de los ARNs largos de doble cadena (dsRNAs) de *LvUCP4* y *LvUCP5*

Para llevar a cabo el silenciamiento de los transcritos mediante la inyección de los ARNs de doble cadena (dsRNAs), primeramente, a partir de ARN total aislado de pleópodos se sintetizó ADNc, mismo que sirvió como templado para sintetizar dos productos de PCR para cada uno de los transcritos a silenciar, usando oligonucleótidos que incluyen la secuencia promotora T7 y oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada uno de los transcritos (Cuadro 1). La amplificación por PCR de estos se llevó a cabo en un DNA Engine Thermocycler® Peltier Cycler (Bio-Rad, USA). Cada reacción de PCR incluyó 12.5 μ L de Top Taq Master Mix 2X, 2.5 μ L de colorante coral 10X, 2 μ L de oligonucleótido 20 μ M con secuencia promotora T7 sentido o antisentido, 1 μ L de oligonucleótido específico 20 μ M sentido o antisentido, 123 ng de ADNc de pleópodos como templado y agua Milli Q hasta un volumen total de 25 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 3:00 min (1 ciclo), 95 °C por 0:30 min, 56 °C por 0:30 min y 72 °C por 0:30 (10 ciclos), 94 °C por 0:30 min, 62 °C por 0:30 min y 72 °C por 0:30 (35 ciclos) y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe DNA gel stain® (Invitrogen, USA). Estos productos de las reacciones de PCR se utilizaron posteriormente como templado para la síntesis de los ARN de cadena sencilla sentido y antisentido (ssRNAs).

Cuadro 1. Oligonucleótidos específicos utilizados para producir los productos de PCR para generar los ssRNA de *LvUCP4* y *LvUCP5*

Gen	Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición en el ADNc (nucleótidos)
UCP4	UCP4T7Fw	GCAAGGTATTACTCCAGCTGTATATAGGCATTAATATATTCTGGCAC	249-296
	UCP4T7Rv	TCACAAAGTATCTCTTGACTGAGTCGTAGGTGGTCA	643-608
	UCP4Fw8	CTGGCACACGTATGGTCCTTTATG	289-313
	UCP4Rv9	ACCCCAACTGTTACAAAG	655-636
UCP5	UCP5FwT7	TGATCCATGCTCTTCTCAAGATATCGAGTGAGGAAGGTG	158-196
	UCP5RvT7	TTGATGAAATAGTGTGTTGCACATGTCGTAAATTGGCAGC	581-543
	UCP5Fw4N	CCAAGCGATACAAGGGCATGAT	140-161
	UCP5Rv4N	GATATGAAGCTCGACAAGAAGTGG	635-612

Se usó el sistema T7 RiboMAXTM Express RNAi (Promega, USA) que produce dsRNA para la transcripción *in vitro* de ARN de cadena sencilla sentido y antisentido (ssRNA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada reacción de síntesis de ssRNA incluyó 10 µL de RiboMAXTM Express T7 2X Buffer, 1 µg de templado de ADN (generado por las reacciones de PCR anteriores), 2 µL de Enzyme Mix, T7 Express (T7 RNA Polymerase, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor and Recombinant Inorganic Pyrophosphatase Recombinant) y agua libre de nucleasas para un volumen total de 20 µL de cada reacción. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 30 min.

Finalmente, los dsLvUCPs (dsRNAs de UCPs) se obtuvieron mezclando los dos ssRNAs complementarios de cada gen, generados anteriormente para cada reacción, y el reconocimiento entre ambos se llevó a cabo por incubación a 70 °C durante 10 min y enfriando a temperatura ambiente durante 20 min. El templado de ADN y los ssRNAs presentes en cada reacción de dsLvUCP se eliminaron por digestión con RQ1 RNase-Free DNase (1 U/µL) incubados a 37 °C durante 30 min. Cada dsRNA se purificó usando 0.1 volúmenes de acetato sodio 3 M pH 5.2 y 1 volumen de isopropanol, las reacciones se mantuvieron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. El pellet de dsRNA se lavó con 500 µL de etanol-DEPC 70% frío.

Finalmente, el pellet de cada dsLvUCP se resuspendió en 2 volúmenes de agua libre de nucleasas y la concentración se determinó por absorbancia a 260 nm. Para confirmar los tamaños de los

dsRNAs, previamente calculados en base a la localización de los fragmentos en la secuencia nucleotídica de cada transcrito, se cargaron 3 µg de cada dsRNA en un gel de agarosa al 2% y se separaron por electroforesis en buffer TAE y se tiñeron con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA).

5.8.2. Bioensayo Preliminar de Silenciamiento

Se realizó un experimento preliminar con el objetivo de determinar las dosis de los dsLvUCP necesarias y el tiempo requerido para que se lleve a cabo el silenciamiento de los transcritos de las UCPs en el camarón. Se adquirieron 36 camarones adultos sanos (20 ± 1 g) de la especie *L. vannamei* en las instalaciones acuícolas de Cruz de Piedra ubicadas en Empalme, Sonora, México. Los camarones se mantuvieron y aclimataron durante una semana a condiciones de laboratorio en CIAD, Hermosillo, Sonora. Se distribuyeron aleatoriamente un total de seis camarones en seis cubetas de plástico llenas con 25 L de agua marina (25 °C, 35 ppt de salinidad, 5 mg/L OD). Los camarones se alimentaron diariamente con alimento granulado comercial (35% de proteína). Diariamente se eliminaron los residuos de alimento y las heces y se realizó un intercambio del 60% del total de agua marina.

5.8.3. Inyección del dsRNA

Para silenciar los genes *LvUCP4* y *LvUCP5*, los dsLvUCP concentrados de cada gen se diluyeron en una solución estéril de NaCl al 0.9% (PiSA® Farmaceutica, México) para obtener las dosis a probar: 15 µg/µL y 30 µg/µL. Los camarones experimentales se inyectaron por vía intramuscular (500 µL) con los dsRNAs en las dosis determinadas usando una jeringa de tuberculina incluyendo: seis camarones con solución de NaCl al 0.9% (como control positivo), seis con dsLvUCP4 y seis con dsLvUCP5 como grupos experimentales. Los camarones se mantuvieron en condiciones de laboratorio y se sacrificaron después de 12 y 24 h de la inyección de dsRNA. Se tomaron las

muestras disectando los pleópodos para utilizarlos en la posterior cuantificación de los transcritos.

5.8.4. Aislamiento, Integridad y Limpieza del ARN Total

Para confirmar el silenciamiento de cada uno de los transcritos en los organismos inyectados con el dsLvUCP, se aisló el ARN total de los pleópodos, se cuantificó y evaluó la integridad de cada una de las muestras. El aislamiento de ARN total se realizó con Trizol[®] (Invitrogen, USA) siguiendo la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). Brevemente, para la extracción del ARN total se utilizaron 100 mg de pleópodos, se homogenizaron con 1 mL de Trizol[®], después se adicionaron 200 μ L de cloroformo. La mezcla se incubó por 5 min en hielo a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se colectó y nuevamente se repitió la extracción adicionando 500 μ L de Trizol[®] y 100 μ L de cloroformo. A partir del homogenizado centrifugado se obtuvo la fase acuosa nuevamente y se adicionó un volumen de isopropanol frío, el cual se incubó por 10 min en hielo y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4 °C. Después, se descartó el sobrenadante del homogenizado y el pellet se lavó con 1 mL de etanol frío al 75% en agua tratada con 0.1% de dietilpirocarbonato (DEPC). Posteriormente, el pellet se centrifugó a 7500 rpm por 5 min a 4 °C y de nuevo se descartó el sobrenadante, se eliminó el exceso de etanol remanente y se adicionaron 30 μ L de agua DEPC al 0.1% para resuspender el pellet de ARN total.

El ARN total aislado se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000 v 3.5.2 (Thermo scientific, USA) a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La integridad del ARN total se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones nativas. Brevemente, a 2.5 μ g de ARN total se les agregaron 2.5 μ L de buffer carga 6X (glicerol 50% [v/v], EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0.25% [p/v], xileno cianol FF 0.25% [p/v]) y se incubó a 65 °C por 10 min; la muestra se cargó en un gel 2% de agarosa teñido con SYBR Safe[®] DNA gel stain (Invitrogen, USA). La electroforesis se corrió a 60 V durante 60 min en buffer TAE 1X. La visualización de las bandas del ARN ribosomal se realizó en un fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Bio-Rad, USA), empleando el software Image Lab[™] (Bio-Rad, USA).

La contaminación con ADN genómico (ADNg) de 6000 ng de ARN total de cada muestra, se eliminó utilizando la DNasa I recombinante libre de RNasas (10 U/ μ L, ROCHE, USA). Brevemente, se adicionó 1 μ L de buffer de incubación 10X (Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.9) y 2.3 μ L de DNasa para proceder a aforar a 10 μ L con agua DEPC, la muestra se incubó por 20 min a 35 °C y, para inactivar la reacción, se mantuvo 10 min a 75 °C. Después del tratamiento con la DNasa, se realizó un PCR para confirmar la ausencia de ADNg, usando el ARN total tratado como templado. Cada reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 200 ng de ARN total como templado, 12.5 μ L del Kit Taq PCR Master Mix[®] (250 U, QIAGEN, USA), 1 μ L de cada oligonucleótido 20 μ M. El volumen final de cada reacción de PCR fue de 25 μ L con agua milliQ. Como control positivo se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen de la proteína tripsina del camarón, ya probados y usando ADN genómico previamente aislado. Las condiciones de amplificación fueron de 95 °C por 3 min (1 ciclo), 95 °C por 45 seg, 50 °C por 1 min y 72 °C por 2 min (33 ciclos) y un tiempo de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe[®] DNA gel stain (Invitrogen, USA).

5.8.5. Cuantificación por qRT-PCR de *LvUCP4* y *LvUCP5* en los Camarones Silenciados

Se utilizaron 2.5 μ g de ARN total de cada muestra para sintetizar el ADN complementario (ADNc) utilizando el kit comercial GoScript[™] Reverse Transcription System (PROMEGA, USA) y siguiendo las indicaciones del fabricante. A cada reacción también se le adicionaron 0.5 μ L de una mezcla de Oligo (dT)15 (0.5 μ g/reacción) y la muestra se incubó por 5 min a 70 °C. Para inactivar la reacción se enfrió en hielo 1 min; después se le adicionaron 2 μ L de buffer de reacción GoScript[™] 5X, 2 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0.5 μ L de la mezcla dinucleótidos 10 mM, 0.5 μ L de inhibidor recombinante RNasin[®] de ribonucleasas y 0.5 μ L de GoScript[™] transcriptasa reversa. La reacción se mezcló e incubó a 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min y a 70 °C durante 15 min, después se colocó en hielo. Posteriormente, se verificó la correcta síntesis del ADNc mediante una PCR usando 50 ng equivalentes de ARN total como templado para cada una de las reacciones.

La cuantificación del ARNm de ambas UCPs en los pleópodos de los organismos control y silenciados, se realizó por qRT-PCR en tiempo real utilizando el equipo StepOne (Applied Biosystems®, USA). La cuantificación del ARNm se llevó a cabo por triplicado para cada muestra utilizando 5 µL de la mezcla iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA), 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos específicos 5 µM (Cuadro 2), 750 ng de ADNc y agua estéril hasta un volumen final de 10 µL. En cada corrida se incluyeron controles sin templado (NTCs). Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C (LvUCP4/LvUCP5/L8), 45 s a 72 °C, posteriormente 1 min a 95 °C y 1 min a 53 °C o 1 min a 61 °C, y un programa final de evaluación de la curva de disociación que incluye la detección de la fluorescencia, aumentando 0.3 °C hasta 95 °C y para finalizar 15 s a 95 °C; la fluorescencia se tomó en la temperatura de alineamiento de cada ciclo.

Cuadro 2. Oligonucleótidos específicos utilizados para amplificar en tiempo real.

Gen	Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición en el cDNA (nucleótidos)
UCP4	UCP4Fw9	CATATTGGACCCATGCTTTGTCAA	665-689
	UCP4Rv10	CGTAGGTGATCCAGAAGGTGAGG	919-897
UCP5	UCP5MCFw2	CCGAAGGTCTATGTGGCATTAAAGAA	975-999
	UCP5MitoRv3	TTTGTCCATTGCTTTCATCA	1188-1168

La eficiencia de la amplificación (E) se determinó a través de la construcción de una curva estándar que tuvo como templado una dilución serial 1:10 (v/v) de producto de PCR purificado, cuantificado y ajustado a una concentración determinada para cada gen. Las diluciones seriadas se prepararon con agua estéril cada dilución fue amplificada por triplicado. Las eficiencias fueron determinadas para cada gen siguiendo la fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})-1} \quad (1)$$

Se estimó el número de copias de cada gen usando la concentración del fragmento, el peso de los

nucleótidos y el tamaño del fragmento amplificado (pb), aplicando la fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{(\text{concentración del templado})(6.022 \cdot 10^{23})}{(\text{tamaño del fragmento})(1 \cdot 10^9)(650)} \quad (2)$$

Para determinar los cambios en la expresión génica se utilizó el método del $2^{\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y la eficiencia de amplificación. Este método está basado en el valor del ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la fluorescencia basal de cada muestra durante la amplificación. La fórmula general es:

$$2^{(\Delta CT)} = (Cq_{\text{Genx Inyección dsRNA}}) - (Cq_{\text{Genx Inyección salina}}) \quad (3)$$

En donde CqGenx es el promedio del Ct del gen evaluado

5.8.6. Producción de Anión Superóxido en Pleópodos de los Camarones Silenciados

La capacidad de producción de peróxido de hidrógeno de los pleópodos de los organismos silenciados se determinó como se describió anteriormente en la sección 5.7.2.

5.9. Análisis Estadístico

Todos los datos fueron analizados para normalidad y homogeneidad de varianzas usando la prueba de Levene. Posteriormente, las diferencias estadísticas fueron evaluadas por análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las diferencias significativas entre medias se evaluaron mediante una prueba de comparación múltiple de Fisher en $p < 0.05$. Los análisis se realizaron con el software

NCSS 2007 y los gráficos construidos con GraphPad Prism 6.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de LvUCP4 y LvUCP5 en las Mitocondrias del Camarón

Los resultados del análisis Western blot confirmaron que las mitocondrias de los pleópodos del camarón blanco cuentan con dos proteínas desacoplantes LvUCP4 y LvUCP5, según se determinó previamente por la expresión de ambos transcritos (Méndez-Romero et al., 2019). Ambas proteínas se identificaron en sus formas monomérica (~36 kDa) y dimérica (70 kDa) con pesos moleculares semejantes en los dos casos (Figura 6). El peso de las formas monoméricas de las proteínas desacoplantes del camarón se encuentra dentro del peso calculado anteriormente para LvUCP4 (35.349 kDa) y LvUCP5 (33.177 kDa) (Méndez-Romero et al., 2019); además, se encuentran dentro del rango reportado para otras proteínas desacoplantes de algunos insectos como las del escarabajo *Z. atratus* (36 kDa) y la cucaracha *G. coquereliana* (36 kDa) (Slocinska et al., 2011; Slocinska et al., 2012).

Por otro lado, la identificación de las formas diméricas de ambas proteínas desacoplantes podría indicar que las LvUCPs se encuentran activas en forma dimérica en los pleópodos del camarón, al igual que ocurre con la UCP1 en el tejido adiposo marrón de los mamíferos (Lin et al., 1980).

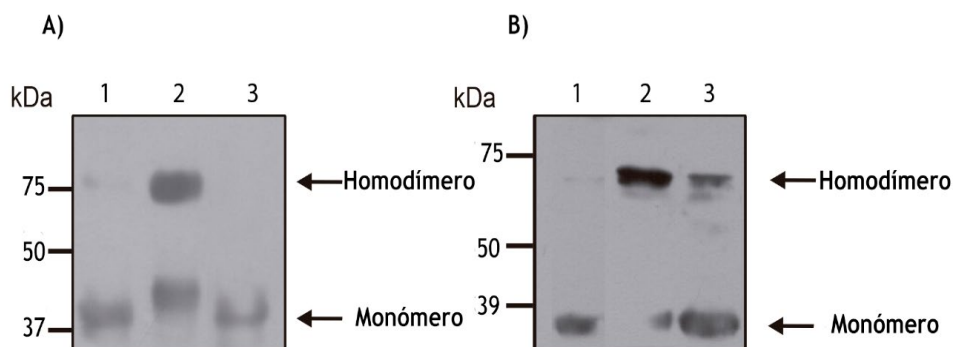


Figura 7. Inmunodetección de las proteínas desacoplantes del camarón en fracciones mitocondriales. A) Detección de LvUCP4 homodímero (75 kDa) y monómero (37 kDa). B) Detección de LvUCP5 homodímero (72 kDa) y monómero (35 kDa). Las mitocondrias aisladas se solubilizaron con buffer RIPA y PEG 400 al 1%. Carriles 1A y 1B mitocondrias de pleópodos de camarón; carriles 2A y 2B mitocondrias del hígado de ratón; Carriles 3A y 3B mitocondrias del cerebro de ratón.

Una vez confirmada la localización de las UCPs en las mitocondrias, se realizaron varios experimentos para verificar que las proteínas desacoplantes de *L. vannamei* son funcionales y las condiciones en que éstas se activan ó se inhiben. Se investigó el efecto de ácidos grasos libres y nucleótidos de purina en la actividad de las UCPs en fracciones mitocondriales aisladas de los pleópodos de animales no sometidos a estrés.

6.2. Características Funcionales de las UCPs en Mitocondrias del Camarón

6.2.1. Tasas de Consumo de Oxígeno Mitocondrial

Para confirmar que las mitocondrias aisladas se encontraban intactas, respirando y acopladas, se evaluó el consumo de oxígeno mitocondrial. Las figuras 7A y 7B muestran los trazos representativos de la tasa de consumo de oxígeno en los estados III y IV respectivamente, en presencia de succinato como sustrato respiratorio. Se observa que las mitocondrias cuentan con una tasa respiratoria basal (estado IV no fosforilante) y al agregar ADP (estado III fosforilante) ésta aumenta; después, en presencia del desacoplante CCCP que promueve la fuga de protones a través de la MIM, se presenta un incremento en la velocidad del consumo de oxígeno como respuesta de la mitocondria para mantener el potencial de membrana (Nicholls, 2013); mientras que, en presencia de KCN (inhibidor del complejo IV), este consumo disminuyó considerablemente.

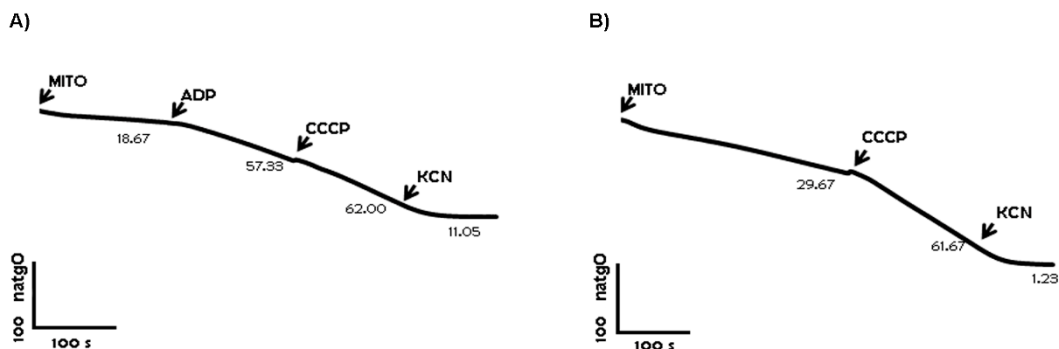


Figura 8. Tasas de consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas del camarón. A) En el estado III de fosforilación. B) En el estado IV no fosforilante. Los números en los trazos se refieren a las tasas de consumo de oxígeno $\text{natgO} \times \text{min} \times \text{mg}$ de proteína. Se utilizaron $200 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína mitocondrial (MITO), adenosín difosfato (ADP), carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) y cianuro (KCN) en cada experimento. Se muestran las medias obtenidas de tres experimentos independientes.

El valor del control respiratorio (RCR) (estado III/estado IV) de las fracciones mitocondriales fue de 3.07; lo que indica que el método de aislamiento es adecuado, permitiendo la obtención de mitocondrias acopladas y con una alta capacidad de oxidación del sustrato, recambio de ATP y una baja tasa de fuga de protones (Brand y Nicholls, 2011). Los valores del RCR obtenidos fueron similares o superiores a los reportados previamente para las mitocondrias del músculo y pleópodos de camarón (Jiménez-Gutiérrez et al., 2014; Rodríguez Armenta, 2018).

En este estudio, la capacidad de las UCPs para activarse en las mitocondrias de camarón se analizó midiendo los cambios en la tasa de consumo de oxígeno en estado no fosforilante (estado IV) en presencia del inhibidor del antiportador ADP/ATP, para excluir su participación en el desacoplamiento mitocondrial. El desacoplamiento se indujo activando a las UCPs con diferentes ácidos grasos y aldehídos reactivos como sucede en las mitocondrias de otras especies (Slocinska et al., 2011; Slocinska et al., 2012, Alves-Bezerra et al., 2014). Como muestra la Figura 8, el consumo de oxígeno aumentó en todas las mediciones en presencia de ácidos grasos. Específicamente con $10 \mu\text{M}$ de ácido esteárico ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$), el consumo de oxígeno mitocondrial aumentó un 23% ($p < 0.05$; Figura 8A). Por su parte, también los aldehídos reactivos (HNE y PBN) estimularon el consumo de oxígeno un 18 y 38%, respectivamente ($p < 0.05$; Figura 8B). Por otro lado, la inhibición de las UCPs por nucleótidos de purina di y trifosfato se observó mediante la adición de $100 \mu\text{M}$ de GDP o GTP. Estos nucleótidos de purina modificaron el efecto de los activadores, siendo el GDP el que provocó mayores porcentajes de inhibición respecto al GTP en

las UCPs del camarón. Sin embargo, no se observó algún efecto inhibitorio de estos nucleótidos de purina cuando se usó PBN como activador (Figura 8B).

Los niveles máximos de estimulación en el consumo de oxígeno mitocondrial derivado de las adiciones de los ácidos grasos en este estudio, son menores que los reportados en mitocondrias de algunos insectos como *Z. atratus* y *G. coquereliana* (Slocinska et al., 2011; Slocinska et al., 2012); lo anterior sugiere que existen diferencias en la sensibilidad de las UCPs a los diferentes ácidos grasos entre las especies.

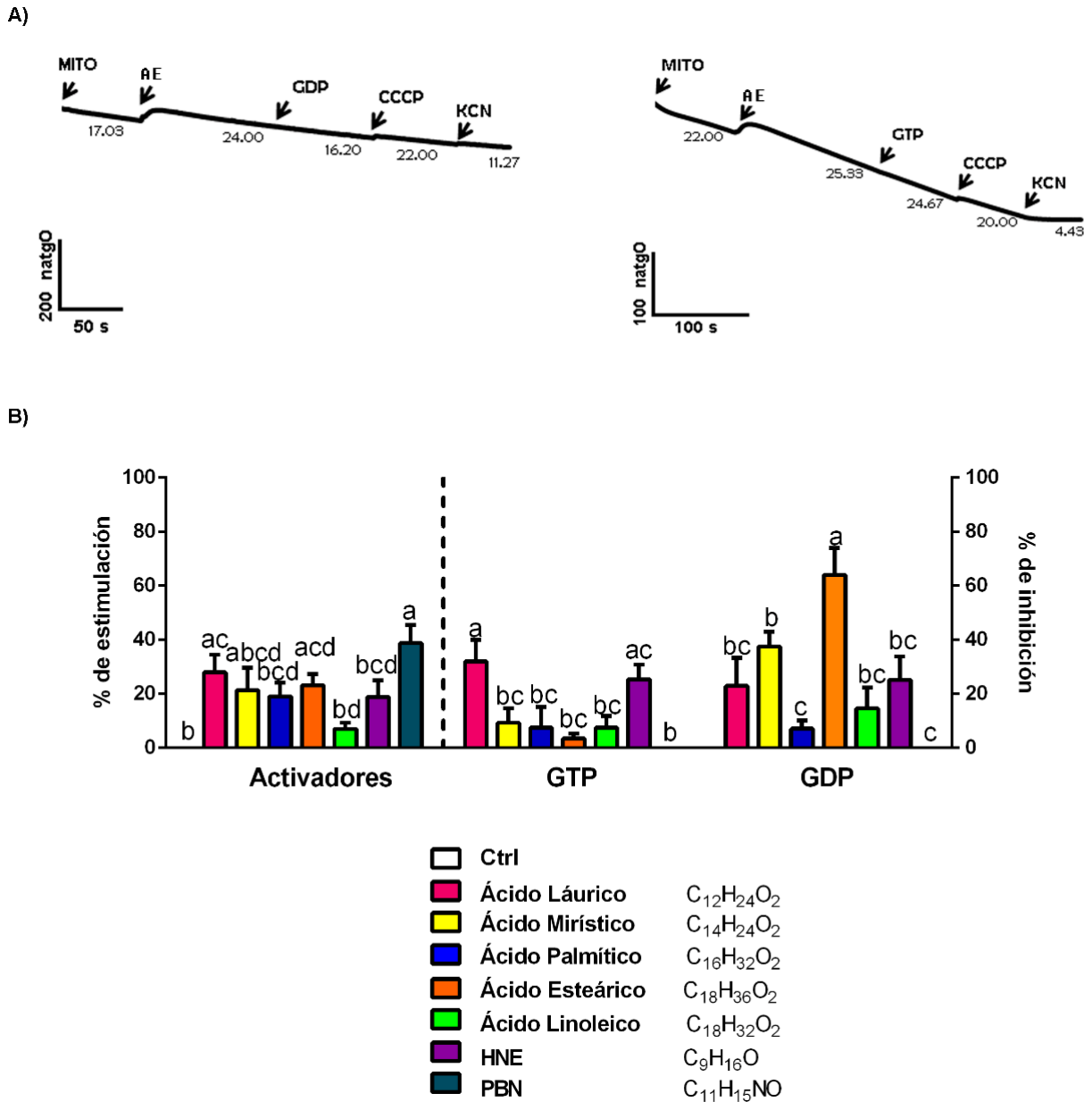


Figura 9. Activación/inhibición de las LvUCPs en las mitocondrias del camarón. A) Efecto del ácido esteárico (AE) como activador de las UCPs y de los inhibidores (GDP o GTP) en el consumo de oxígeno de las mitocondrias del camarón en estado IV. Los números debajo de los trazos se refieren a las tasas de consumo de oxígeno $\text{natgO} \times \text{min} \times \text{mg}$ de proteína. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. B) Porcentaje de estimulación del consumo de oxígeno mitocondrial en presencia de: ácido palmítico (AP) $1 \mu\text{M}$, ácido esteárico (AE) $1 \mu\text{M}$, ácido linoleico (AL) $0,1 \mu\text{M}$, ácido mirístico (AM) $1 \mu\text{M}$, ácido láurico $2,5 \mu\text{M}$ (ALa), $20 \mu\text{M}$ de N-terc-butil- α -fenilnitrona (PBN) y $6,4 \mu\text{M}$ de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Porcentaje de inhibición de la frecuencia respiratoria en presencia de $200 \mu\text{M}$ GTP o GDP. Los datos se muestran como medias \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se sabe que las UCPs activas median un ciclo protonoforético activado por ácidos grasos libres y que son inhibidas alostéricamente por nucleótidos de purina di y trifosfato (Klingenberg, 1988).

En este estudio se observó que los ácidos grasos saturados funcionan mejor como activadores de las UCPs del camarón que los ácidos grasos insaturados; adicionalmente, los productos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) resultantes del estrés oxidativo también funciona como activador para las LvUCPs (Shabalina et al., 2006). Además, se observó que el nucleótido difosfato (GDP) mostró mayores porcentajes de inhibición de las LvUCPs. Las variaciones tanto en la eficiencia de activación como de inhibición de las LvUCPs por los ácidos grasos y nucleótidos de purina probados en este estudio, posiblemente estén relacionados con las interacciones de estos con el sitio de unión a ácidos grasos (ubicado en la periferia de las TMH 1, 6 y parcialmente en las TMH 2 y 5) y los cambios conformacionales que ocurren en el sitio de unión a AG, así como en el cambio en la dinámica de las hélices al posicionarse el nucleótido de purina en su sitio de unión en el interior de la proteína (Berardi y Chou, 2014).

Específicamente en la UCP2 de murinos se ha observado que los aminoácidos básicos Arg60 y Lys271 son los responsables de la correcta orientación y aproximación del ácido graso; ya que estos residuos median las interacciones electrostáticas con el grupo carboxilo de la cabeza del ácido graso. Mientras que Arg88, Lys141 y Arg279 son los residuos que ayudan a la conducción del ácido graso a través de la cavidad. La mayoría de los residuos participan también en el "canal" de transporte de aniones, formando un campo potencial bastante grande. Los residuos de Gly281 están influenciados por cambios conformacionales inducidos por la unión de nucleótidos de purina de modo que podrían inhibir la translocación AG-anión (Berardi y Chou, 2014). Debido a que las proteínas desacoplantes del camarón cuentan con todos los aminoácidos esenciales y sitios descritos, se propone que las diversas interacciones se pudieran estar llevando en el camarón, ocasionando las variaciones observadas en la figura 8.

6.2.2. Potencial Transmembrana de la Mitocondria ($\Delta\Psi_m$)

Otro análisis que permitió confirmar el estado activo de las UCPs en las mitocondrias del camarón es la evaluación del $\Delta\Psi_m$. El experimento se realizó con la adición de ácidos grasos, aldehídos reactivos y el GDP como inhibidor; se usó el FCCP como control positivo del abatimiento del $\Delta\Psi_m$.

Los resultados mostraron que las mitocondrias aisladas formaron potencial de membrana (indicado como una disminución en la fluorescencia), mientras que al agregar el FCCP como agente desacoplante, la fluorescencia aumentó drásticamente afectando el $\Delta\Psi_m$ (Figura 9A).

Los resultados mostraron que, en presencia de ácidos grasos y aldehídos reactivos como activadores, las UCPs cambian a su conformación activa promoviendo el desacoplamiento mitocondrial que estimula la disipación de $\Delta\Psi_m$ en el siguiente orden descendente: AE> HNE> AM> AP> ALa> AL> PBN. La subsecuente adición de GDP inhibe la reacción dependiente del activador y promueve una recuperación del $\Delta\Psi_m$. Finalmente, después de la adición de FCCP se disipa el $\Delta\Psi_m$, confirmando que las mitocondrias habían recuperado su estado acoplado previo a ésta última adición (Figuras 9B).

La determinación y los cambios en el potencial transmembranal mitocondrial de los crustáceos es un área muy pobremente estudiada. Los resultados confirman la capacidad de las mitocondrias del camarón para modular el potencial de membrana cuando las LvUCPs se encuentran activas, misma que se puede comparar con las de los insectos, que como se mostró anteriormente, son el grupo más cercano filogenéticamente a los crustáceos. Los resultados observados son similares a lo reportado previamente para las UCPs en las mitocondrias del insecto *R. prolixus* (Alves-Bezerra et al., 2014). Las mitocondrias del intestino medio anterior de esta chinche en presencia de 1 mM de ácido palmítico son capaces de activar a las UCPs, causando una disminución del $\Delta\Psi_m$; la posterior adición de 0.2 mM de GDP inhibe la activación dependiente del ácido graso ocasionando un retorno del $\Delta\Psi_m$.

Algunos autores han propuesto que la habilidad de las UCPs para modular el potencial de membrana funciona como un mecanismo de protección contra las especies reactivas de oxígeno; tal es el caso de las mitocondrias aisladas de riñón de rata, en donde se ha observado que cuando se añade HNE, las UCPs se activan y disminuye la producción de EROS; esta disminución es consistente con la disminución en el potencial de membrana causada por HNE (Echtay, 2007).

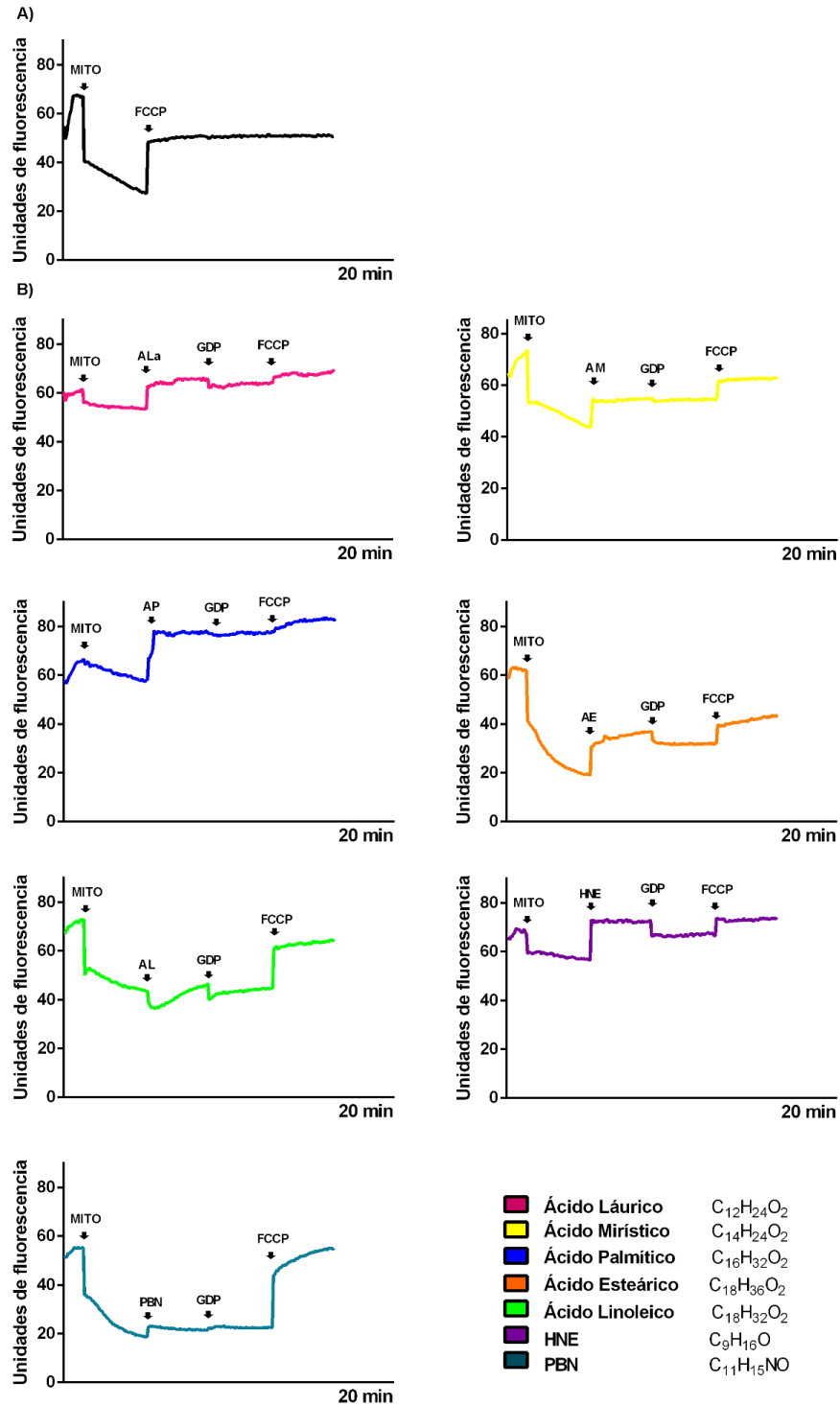


Figura 10. Efecto de los activadores de las UCPs en el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) de las mitocondrias aisladas del camarón. A) $\Delta\Psi_m$ en estado de reposo IV. B) $\Delta\Psi_m$ en presencia de: 125 μ M ácido láurico (ALa), 50 μ M ácido mirístico (AM), 50 μ M ácido palmítico (AP), 100 μ M ácido esteárico (AE), 10 μ M ácido linoleico (AL), 32 μ M 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y 80 μ M N-terc-butil- α -fenilnitrona (PBN). Las variaciones de la línea discontinua del $\Delta\Psi_m$ en el gráfico resultan de la adición de cada reactivo, las mesetas formadas después de cada adición deben considerarse. Los resultados son gráficos representativos de tres experimentos independientes.

6.2.3. Transporte de Protones a través de la MIM

Las UCPs catalizan la conductancia de protones que disipan el gradiente electroquímico formado en la MIM. La inhibición de esta conductancia por nucleótidos de purina se ha considerado como un diagnóstico de actividad de UCPs (Sluse et al., 2006). En el presente estudio se evaluó la actividad de las UCPs en mitocondrias aisladas del camarón mediante la evaluación del transporte de protones activado por ácidos grasos e inhibido por GDP (Figura 10). Los resultados muestran que la adición de ácido mirístico no produjo cambios significativos ($p > 0.05$), mientras que en presencia de 100 μM de ácido esteárico ó 32 μM de HNE se estimuló el transporte de protones un 16.96 y 26.64 %, respectivamente, en comparación con los controles (conductancia de protones basal, $p < 0.05$); estos resultados confirman lo observado previamente acerca de la capacidad de LvUCP para la disipación del $\Delta\Psi_m$. A su vez, como se muestra en la Figura 10, la permeabilidad de protones inducida por la adición de ácido esteárico fue inhibida un 29.27 % por GDP.

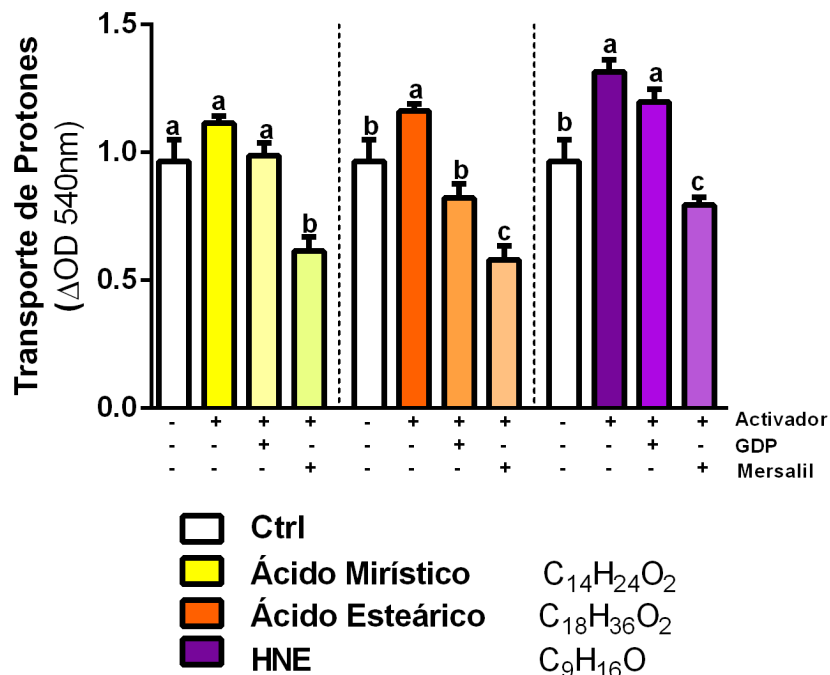


Figura 11. Efecto de los activadores de las UCPs en el transporte de protones en las mitocondrias aisladas de camarón. En presencia de ácido mirístico, ácido mirístico + GDP, ácido mirístico + ácido mersalil, ácido esteárico, ácido esteárico + GDP, ácido esteárico + ácido mersalil, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), HNE + GDP y HNE + ácido mersalil. Los datos se muestran como medias \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los resultados son gráficos representativos de tres experimentos independientes.

Los resultados también mostraron que en presencia de HNE como activador, hubo sólo una disminución de 9.75% en la permeabilidad de los protones, sin que la diferencia fuera significativa ($p > 0.05$). Por otro lado, cuando se determinó el transporte de protones en presencia del activador y el ácido mersalil, que inhibe una variedad de acarreadores mitocondriales de la familia SLC25 como el de fosfato, citrato y dicarboxilato (Reynafarje y Lehninger, 1978); se observó una disminución en la conductancia de protones inducida por ácidos grasos en las mitocondrias de los camarones ($p < 0.05$).

De acuerdo a estudios previos, el músculo del camarón está compuesto esencialmente por ácidos grasos poliinsaturados (ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linoleico (C18:3) y, en menor medida, por ácidos grasos saturados (ácidos palmítico (C16:0), linoleico (C18:0) y mirístico (C14:0); (Sriket et al., 2007). Debido a lo anterior, se sugiere que la activación de las LvUCPs tenga lugar de forma natural. De acuerdo con un estudio de Shabalina y Nedergaard (2011), la eficiencia de los ácidos grasos y su aparente afinidad con las UCPs no dependen del grado de saturación, sino del grupo carboxilo de cada ácido, el cual es el requisito más importante para activar a las UCPs; ya que este grupo es el que interactúa con los aminoácidos Lys16, Arg60, Lys271, Lys241, y Arg279 los cuales participan en el uniportador de los ácidos grasos (Shabalina y Nedergaard, 2011; Ježek et al., 2018). Todos estos residuos se encuentran presentes en las LvUCPs.

En cuanto al mecanismo de activación de las UCPs por los aldehídos reactivos como el HNE, Ježek et al. (2018) identificaron que el HNE puede formar un enlace covalente con los residuos de lisina, histidina o cisteína (His217, Cys216 y Lys201) ubicados en la periferia de las α -hélices transmembrana de la UCP2 murina. Debido a que todos estos residuos se encuentran presentes en las UCPs del camarón (Méndez-Romero et al., 2019) se explica el efecto de activación por HNE observado en este estudio al igual que en vertebrados (Echtay et al., 2003). Por su parte, la nula acción inhibitoria por parte de GDP o GTP cuando se usa PBN como activador, puede deberse al mecanismo de acción del inhibidor, ya que la unión de GDP induce un cambio conformacional en los residuos Gly281 y Gly19. Estos cambios conformacionales desplazan al activador del sitio de unión ubicado en la parte externa de las UCPs (Berardi y Chou, 2014).

Estudios previos en mitocondrias aisladas han reportado que la activación de las UCPs aumenta la conductancia de protones, disminuye el potencial transmembranal ($\Delta\Psi_m$) (Wolkow y Iser, 2006) y aumenta el consumo de oxígeno (Divakaruni y Brand, 2011). En conjunto, los resultados de este estudio muestran que los ácidos grasos y los aldehídos reactivos activan a las UCPs del camarón, promoviendo un aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial, el transporte de protones y una disminución de $\Delta\Psi_m$, mientras que la adición de GDP inhibe parcialmente el efecto como se observó anteriormente en los UCP de vertebrados (Brand et al., 2004; Jarmuszkiewicz et al., 2010). Todos estos datos respaldan la presencia de actividad tipo UCP en las mitocondrias de *Litopenaeus vannamei*, siendo éste el primer mecanismo de desacoplamiento fisiológico reportado en esta especie hasta la fecha.

6.3. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en Diferentes Órganos/Tejidos del Camarón

Los resultados anteriores confirmaron la presencia de UCPs activas en las mitocondrias del camarón blanco; sin embargo, el rol fisiológico de estas proteínas en los crustáceos aún se desconoce. Para evaluar la posible participación de las UCPs mitocondriales en la regulación de especies reactivas de oxígeno como ocurre en los insectos (Slocinska et al., 2016), primero se determinó la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en cuatro diferentes tejidos/órganos del camarón blanco: músculo, glándula digestiva, branquias y pleópodos.

Los resultados mostraron que la glándula digestiva produce mayor cantidad de anión superóxido (O_2^-) que los otros tejidos/órganos utilizados, en segundo lugar, se encontraron los pleópodos y las branquias, mientras que el músculo fue el tejido que produjo menor cantidad de superóxido (Figura 11; $p < 0.05$). La alta capacidad para producir O_2^- de la glándula digestiva del camarón se debe, esencialmente, a que este órgano presenta una alta actividad celular y un alto contenido de lípidos. Además, participa en la producción de enzimas digestivas, metabolismo de lípidos y carbohidratos, desintoxicación y procesos de absorción (Zenteno-Savín et al., 2006).

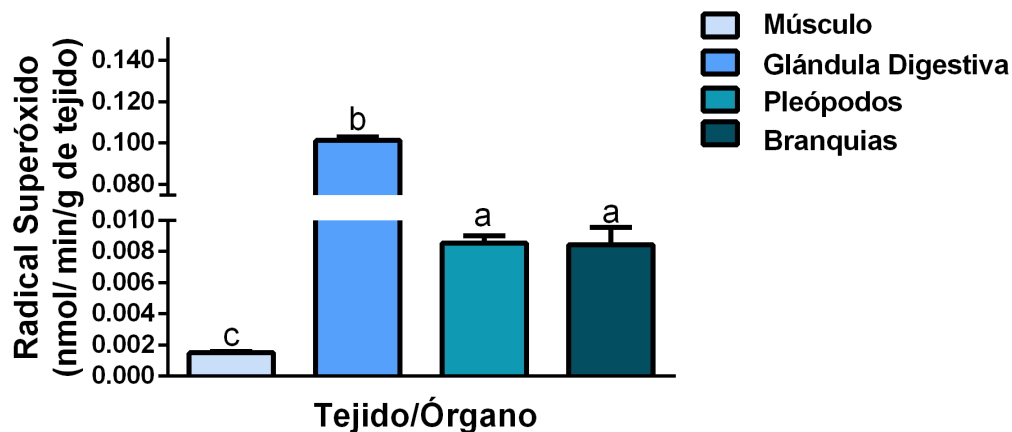


Figura 12. Producción del anión superóxido en los diferentes órganos/ tejidos del camarón. Los datos se muestran como media \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, el H_2O_2 liberado en los tejidos/órganos fue detectado utilizando el producto de oxidación del rojo fluorescente, resorufina que se genera a partir de la reacción acoplada del reactivo Amplex[®] Red con la peroxidasa de rábano picante (HRP). Los pleópodos fueron el tejido que produjo más peróxido de hidrógeno, seguido de branquias, músculo y finalmente la glándula digestiva (Figura 12; $p < 0.05$). Basados en resultados previos, se sabe que los pleópodos contienen grandes cantidades de mitocondrias en sus células para hacer frente a la alta demanda energética que los organismos requieren para nadar en comparación con otros tejidos/órganos del camarón (Chimeo-Nuñez, 2017).

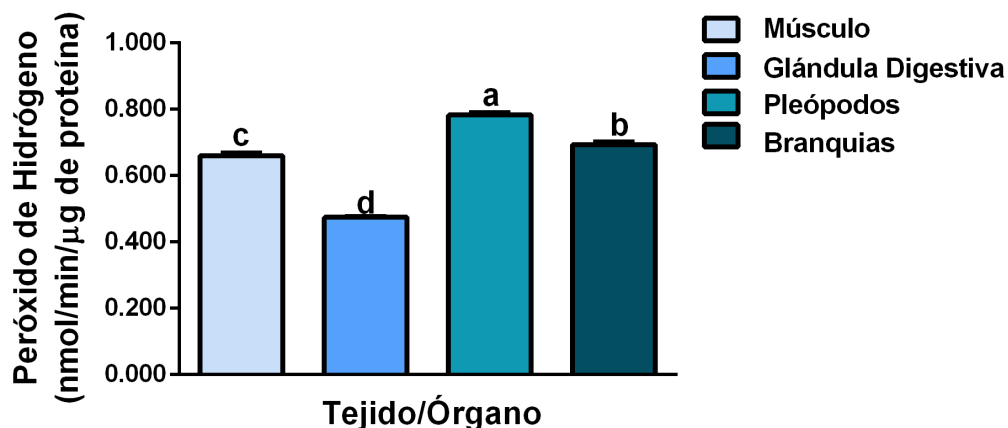


Figura 13. Producción de peróxido de hidrógeno en los diferentes órganos/ tejidos del camarón. Los datos se muestran como media \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y la capacidad previamente analizada de las mitocondrias aisladas de los pleópodos para consumir oxígeno, estos apéndices natatorios se seleccionaron para realizar las siguientes determinaciones y evaluar el efecto de la hipoxia/reoxigenación en la función mitocondrial del camarón.

6.4. Respuestas del Camarón Ante la Hipoxia-Reoxigenación

A la fecha, varios estudios han demostrado que los camarones son tolerantes a la hipoxia, con la capacidad de hacer frente a los cambios continuos en las concentraciones de oxígeno disuelto del agua de mar y al estrés oxidativo que genera la reoxigenación. Por lo anterior, se expusieron camarones a un evento de hipoxia-reoxigenación con el fin evaluar la respuesta fisiológica y los cambios en la expresión de las LvUCPs en las mitocondrias para inferir sobre la función de estas proteínas.

Se aislaron las mitocondrias de los pleópodos de los camarones después del ensayo de hipoxia-reoxigenación y se midió el contenido de proteína soluble de las fracciones mitocondriales. Los resultados variaron de acuerdo con los tratamientos siendo 811 µg/g de tejido en normoxia, 828.5 µg/g de tejido en hipoxia (expuestos 6 h) y 799.1, 456.4, 840.8 µg/g de tejido después de 1, 6 y 12 h de reoxigenación, respectivamente. Estos cambios en las concentraciones de proteína mitocondrial presente en organismos sometidos a hipoxia-reoxigenación coinciden con lo previamente reportado para esta especie por Jiménez-Gutiérrez et al. (2014). Estos autores describen que la hipoxia promueve respuestas celular complejas las cuales reducen las funciones mitocondriales de los organismos y que podrían afectar al número de mitocondrias presentes.

6.4.1. Producción de L-Lactato y Activación del Metabolismo Anaeróbico

Para verificar el efecto de la hipoxia (12 h a 1.5 mg/L OD) a través de la activación del metabolismo

anaerobio, se cuantificó el L-lactato en el plasma de los camarones experimentales. Los resultados mostraron que los niveles de este metabolito aumentaron ligeramente en el grupo sometido a hipoxia 6 h, pero el incremento no fue significativo sino hasta las 12 h; sin embargo, el incremento en los niveles ambientales de oxígeno que impone la reoxigenación provocó el aumento más marcado en los niveles de L-lactato, esto en los organismos que estuvieron expuestos a 6 y 12 h de reoxigenación con un aumento de 1.86 y 1.93 veces en comparación con los camarones en normoxia ($p < 0.05$; Figura 13).

Los cambios en los niveles de L-lactato en plasma confirmaron el efecto de la hipoxia y reoxigenación a través de un cambio metabólico hacia el metabolismo anaeróbico cuando los camarones fueron expuestos a estas condiciones. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en el camarón blanco (Martínez-Cruz et al., 2012; Jiménez-Gutiérrez et al., 2014; Martínez-Cruz et al., 2015). Además, se ha propuesto que en las células del camarón blanco pudiera producirse un efecto tipo Warburg, en donde las concentraciones plasmáticas de lactato aumentan incluso en presencia de oxígeno después de un evento hipóxico (Chimeo-Nuñez, 2017; Gonzalez-Leyva, 2019).

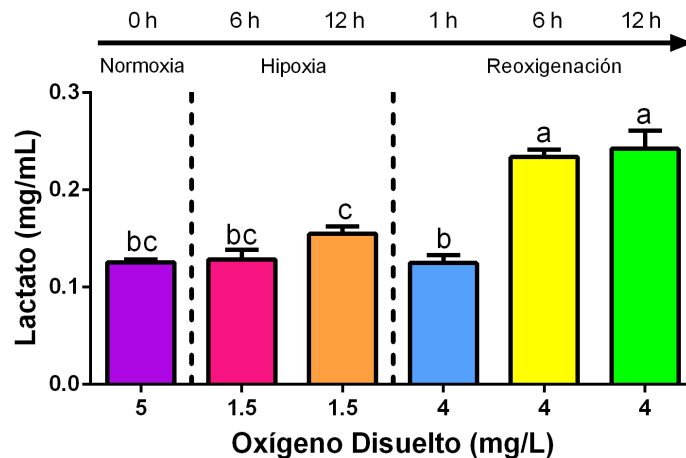


Figura 14. Concentraciones de L-Lactato en el plasma de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación. Los datos se muestran como medias \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Según la hipótesis de Lynen, el efecto Warburg puede ser el resultado de la oxidación de ácidos

grasos o glutamina para favorecer el uso de piruvato como sustrato respiratorio y energético. Como se mencionó anteriormente, la oxidación de los ácidos grasos ha demostrado estar asociada también con el desacoplamiento mitocondrial por las UCPs (Lynen, 1942; Samudio et al., 2009). Por lo tanto, en este estudio se pudo demostrar que las LvUCP son activadas por ácidos grasos y productos de la β -oxidación, lo cual sugiere que la activación de las UCPs y el efecto tipo Warburg que muestran las células de camarón en la hipoxia-reoxigenación pueden estar relacionados; sin embargo, deben realizarse estudios adicionales para comprender mejor estas respuestas fisiológicas.

6.4.2. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

En este estudio se determinó la capacidad de los pleópodos para producir anión superóxido después de un evento de hipoxia-reoxigenación. Se detectó que la producción de O_2^- disminuyó significativamente por efecto de la hipoxia (1.5 mg/L; $p < 0.05$), pero aumentó una vez que los niveles de oxígeno en el ambiente incrementaron después de 1 h de reoxigenación (Figura 14; $p < 0.05$). La disminución en la producción de O_2^- durante la hipoxia puede deberse a los bajos niveles de oxígeno ambiental, pues existe evidencia de que los camarones pueden responder rápidamente a los cambios que les pueden producir estrés oxidativo (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Zenteno-Savín et al., 2006).

Por su parte, los cambios observados en la producción del anión superóxido en los pleópodos del camarón durante la reoxigenación muestran un incremento inicial que está estrechamente relacionado con la respuesta mitocondrial. Diversos estudios en mamíferos, han demostrado que la producción de este anión por los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones aumenta frente a eventos de reperfusión, cuando existe un incremento súbito en la cantidad de moléculas de oxígeno disponibles en la mitocondria (Berry et al., 2018).

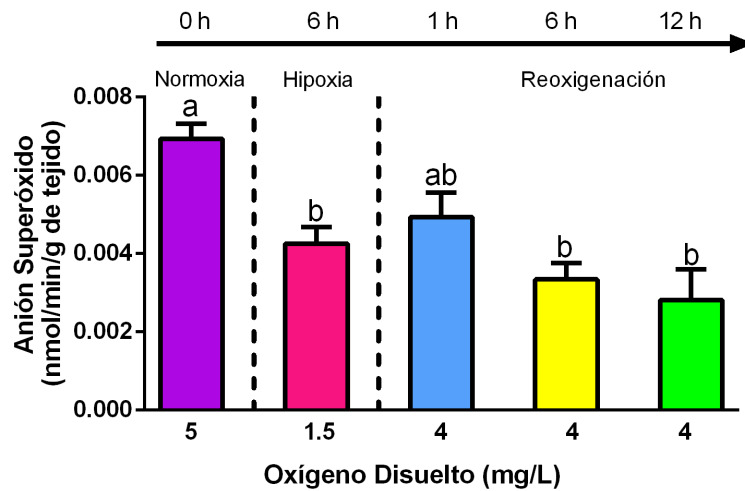


Figura 15. Producción de anión superóxido en los pleópodos de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación. Los datos se muestran como medias \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

De acuerdo con lo anterior, una respuesta para proteger el contenido mitocondrial interno del daño que provocan las EROs es la rápida dismutación de O_2^- a H_2O_2 por la enzima SOD mitocondrial. La concentración de H_2O_2 varió significativamente a medida que los organismos fueron expuestos a hipoxia-reoxigenación ($p < 0.05$). Se detectó una disminución durante la hipoxia y después de 1 h de reoxigenación; sin embargo, después de 6 h de reoxigenación, se detectaron concentraciones mayores de H_2O_2 (2.75 veces) en comparación con las de normoxia ($p < 0.05$; Figura 15).

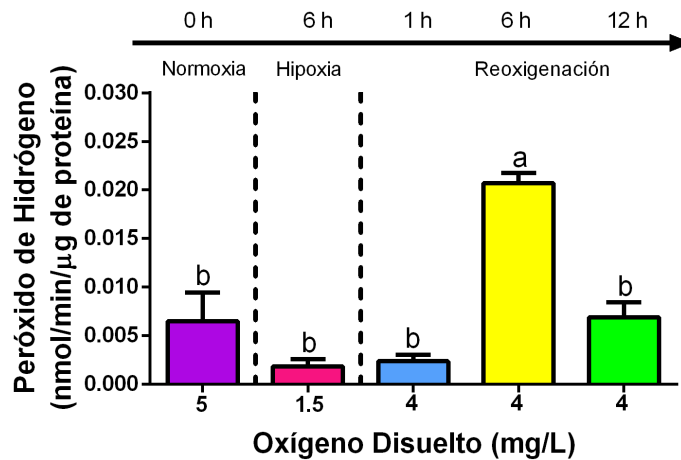


Figura 16. Producción de peróxido de hidrógeno mitocondrial de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación. Los datos se muestran como medias \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los cambios observados en los niveles de producción de EROs en el camarón se encuentran relacionados con las variaciones de oxígeno disuelto en el agua, pues las concentraciones más elevadas de EROS se detectaron durante la reoxigenación. Así, se procedió a evaluar la actividad de la enzima SOD mitocondrial en los pleópodos, como la primera línea de defensa del sistema antioxidante.

6.4.3. Actividad de la Superóxido Dismutasa Mitocondrial

Para confirmar los resultados anteriores, se evaluó la actividad SOD en las mismas fracciones mitocondriales. Los resultados indicaron que, durante la hipoxia, la actividad de SOD disminuyó en comparación con la normoxia ($p < 0.05$); sin embargo, se detectaron aumentos significativos en la actividad de la enzima cuando los camarones se expusieron a reoxigenación por 1, 6 y 12 h siendo 1.99, 3.07 y 7.56 veces más alta que en las mitocondrias de los organismos en normoxia ($p < 0.05$; Figura 16).

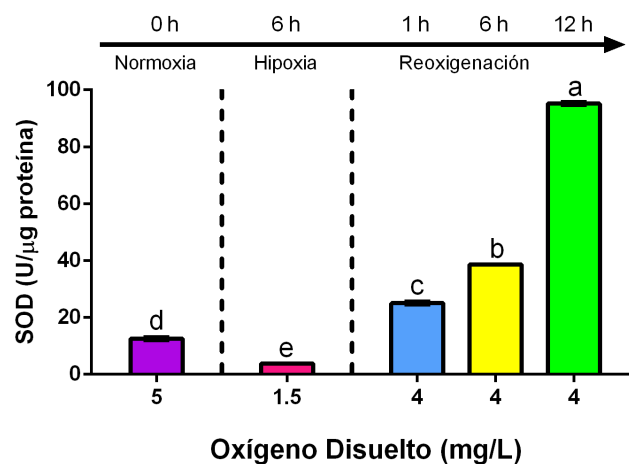


Figura 17. Actividad mitocondrial de SOD en los pleópodos de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación. Los datos se muestran como medias \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se observó que los cambios detectados en la producción del anión superóxido en los pleópodos y en los niveles de peróxido de hidrógeno concuerdan con lo encontrado para la actividad SOD

mitocondrial, pues la mayor actividad de la enzima se detectó durante la reoxigenación. Los resultados mostraron que la reoxigenación indujo varios cambios inmediatos en las mitocondrias aisladas, como el aumento de la producción de EROS así como la activación del sistema antioxidante (Xu et al., 2018). Estudios anteriores han confirmado que las enzimas antioxidantes del camarón responden de manera específica en cada órgano, tiempo y en concentraciones de oxígeno diferentes (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savin, 2011). El aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes se ha reportado en los crustáceos como respuesta al estrés oxidativo ambiental; esto incluye a las enzimas mitocondriales superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), siendo estas últimas dos las que convierten el H_2O_2 en agua y oxígeno (Abele y Puntarulo, 2004).

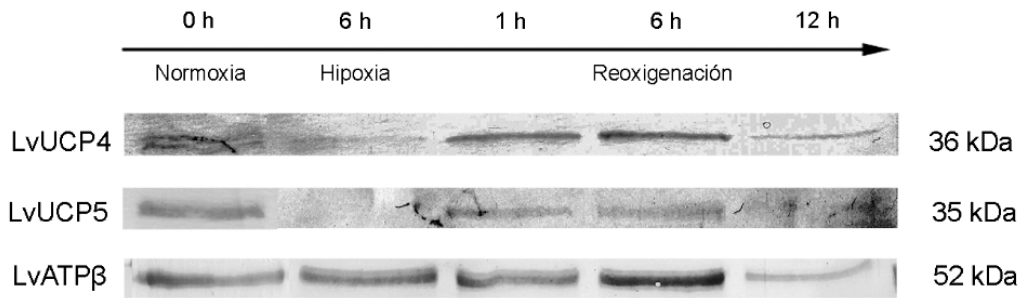
6.4.4. Inmunodetección de las LvUCPs y el Desacoplamiento Leve

Diversos estudios han confirmado que la hipoxia promueve una respuesta celular compleja desde el genoma hasta el proteoma (cambios en los niveles de los transcritos de algunas proteínas y la presencia de las mismas), incluyendo a la mitocondria (desde la biogénesis de los organelos hasta la respuesta de algunas proteínas específicas) (Bousquet et al., 2015; Thomas y Ashcroft, 2019); sin embargo, poco se sabe sobre la reoxigenación y su efecto en el organismo. En este estudio se evaluó la expresión de las proteínas LvUCPs ante un evento de hipoxia-reoxigenación a través de un ensayo de inmunodetección utilizando las fracciones mitocondriales aisladas de los pleópodos de camarones sometidos bajo ambas condiciones. Se utilizó la subunidad $ATP\beta$ catalítica del complejo V para normalizar, debido a que esta proteína no se ve afectada por la hipoxia (Martínez-Cruz et al, 2012).

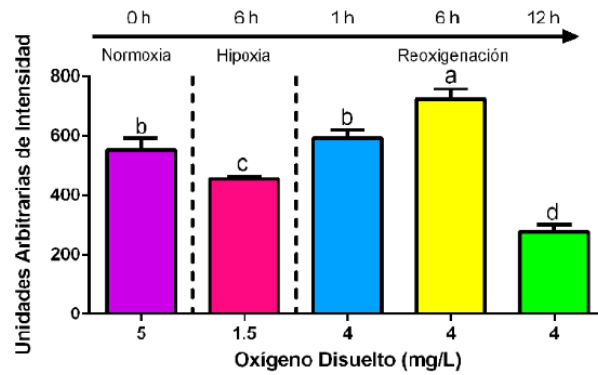
Los resultados mostraron que los niveles de LvUCP4 disminuyeron 0.85 veces en los camarones expuestos a hipoxia (1.5 mg/L) en comparación con los expuestos a normoxia (5 mg/L; Figura 17A), mientras que LvUCP5 no se detectó en la hipoxia (Figura 17B). Después, durante la reoxigenación se detectó un aumento significativo en ambas LvUCPs. El valor máximo de LvUCP4 se detectó después de 6 h (1.58 veces) y el de LvUCP5 se detectó después de 1 h (120 veces)

comparados con la hipoxia. Después de 12 h de reoxigenación, los niveles de ambas UCPs y la ATP β disminuyeron significativamente (Figura 17; $p < 0.05$). Estos cambios observados durante la reoxigenación prolongada (12 h) podrían indicar que esta condición podría ser generalizada a nivel celular, sin embargo, se requiere de más estudios para confirmarlo.

Los cambios observados después de un evento de hipoxia-reoxigenación, sugieren que el aumento en la expresión de las LvUCPs podría ser parte de la respuesta para controlar la producción de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias aisladas de camarones durante las primeras horas de reoxigenación.



A) LvUCP4



B) LvUCP5

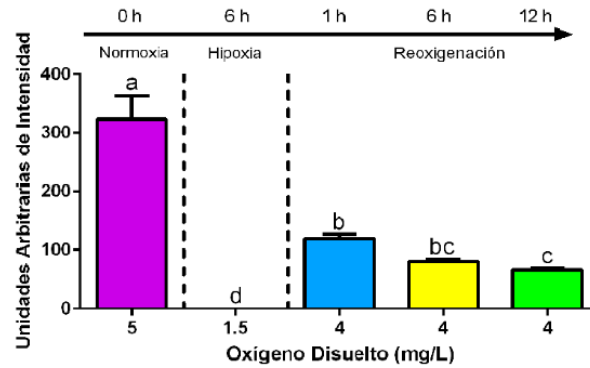


Figura 18. Inmunodetección de las LvUCPs y ATPβ en las mitocondrias de camarones expuestos a normoxia, hipoxia y reoxigenación. Las mitocondrias aisladas se solubilizaron con buffer RIPA y PEG 400 al 1%. Valores de densitometría normalizados de A) LvUCP4 y B) LvUCP5 ($p < 0.05$).

De manera específica, se confirmó la expresión ubicua de LvUCP4, no sólo en todos los órganos evaluados del camarón, sino también en todas las condiciones probadas en este estudio (Méndez-Romero et al., 2019). Aunque se detectaron diferentes cantidades de la proteína en las diferentes condiciones, se sugiere que tanto el transcrito como la proteína de UCP4 siempre se expresan en las células de los pleópodos del camarón (bajo las condiciones utilizadas en este estudio). Por otro

lado, las proteínas LvUCP5 incrementaron en número en las mitocondrias de los pleópodos durante la reoxigenación, sugiriendo que la función de esta proteína está relacionada con una respuesta antioxidante y que además su expresión es oxígeno-dependiente. Estos resultados apoyan la correlación que existe entre la producción mitocondrial de EROS y el potencial de membrana mitocondrial, sugiriendo que las vías de fuga de protones como las UCPs, pueden por lo tanto, minimizar el daño oxidativo por desacoplamiento leve (Aguirre y Cadenas, 2010; Divakaruni y Brand, 2011).

La acumulación de las proteínas desacoplantes en condiciones de estrés oxidativo se ha observado previamente en otro invertebrado, la chinche *R. prolixus*, en donde se sugiere que RpUCP4 tiene un efecto antioxidante (Alves-Bezerra et al., 2014). Adicionalmente, cuando el camarón *L. vannamei* es expuesto a una reoxigenación prolongada, se ha encontrado que existe una disminución significativa de los niveles de ATP tanto en el plasma como en las mitocondrias aisladas de pleópodos, a pesar del aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial (Chimeo-Núñez, 2017), sugiriendo que la actividad desacoplante de las UCPs se encuentra activa durante esta condición, ya que las UCPs son el único mecanismo de desacoplamiento fisiológico reportado a la fecha para el camarón.

La suma de resultados encontrados en este estudio sugiere que las UCPs de los camarones son parte de los mecanismos mitocondriales para controlar la producción de EROs y pueden activarse temprano durante la reoxigenación en presencia de altas concentraciones de superóxido. Respecto a los tiempos de respuesta, los resultados sugieren que la activación de las UCPs mitocondriales del camarón y su capacidad de controlar la producción de EROS suceden antes de que la SOD mitocondrial alcance su actividad máxima para agotar las EROs mitocondriales. Hasta la fecha, no existen datos sobre otros crustáceos y sus mitocondrias aisladas en condiciones de hipoxia-reoxigenación prolongada; sin embargo, los datos confirman que la reoxigenación induce mecanismos de respuesta antioxidante, incluida la activación de las UCPs.

6.5. Silenciamiento de los Transcritos de las *LvUCPs*

Para confirmar la participación de las proteínas desacoplantes como parte de la respuesta antioxidante del camarón, en este estudio se silenciaron los transcritos de ambas proteínas. Para ello se generaron los templados necesarios para la posterior síntesis de los ssRNA para cada una de las proteínas desacoplantes como se muestra en la Figura 18. En el carril 1 se observa a la banda que corresponde al producto de PCR de 354 pb de la reacción UCP4Fw8+UCP4T7Rv cuya temperatura de alineamiento fue de 56 y 62 °C, en el carril 2 la banda de 407 pb de la reacción UCP4T7Fw+UCP4Rv9 (60 y 62 °C), en el carril 3 el producto correspondiente a UCP5Fw4N+UCP5RvT7 (50 y 63 °C) de 478 pb y finalmente en el carril 4 la banda de 442 pb de UCP5FwT7+UCP5Rv4N (65 y 68 °C).

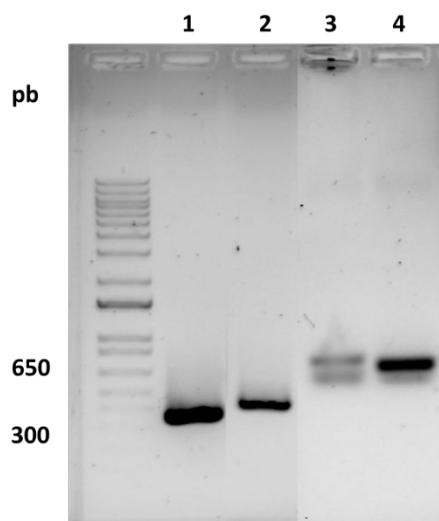


Figura 19. Productos de PCR generados para la síntesis de los ssRNAs de las *LvUCPs*. Donde 1) UCP4Fw8+UCP4T7Rv, 2) UCP4T7Fw+UCP4Rv9, 3) UCP5Fw4N+UCP5RvT7 y 4) UCP5FwT7+UCP5Rv4N.

Consecutivamente se obtuvieron los dsRNAs para cada uno de los transcritos a silenciar (Figura 19). En el carril 1 se observa la única banda del dsLvUCP5 de aproximadamente 381 pb y en el carril 2 la banda de 354 pb correspondiente al dsLvUCP4. Estos dsRNAs fueron inyectados intramuscularmente (15 y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para determinar la dosis y el tiempo necesario para que se llevara a cabo el silenciamiento. Después de la inyección, se observó una supervivencia del 100%

en todos grupos inyectados. Finalmente, los pleópodos de cada camarón se recuperaron después de 12 y 24 h post-inyección.

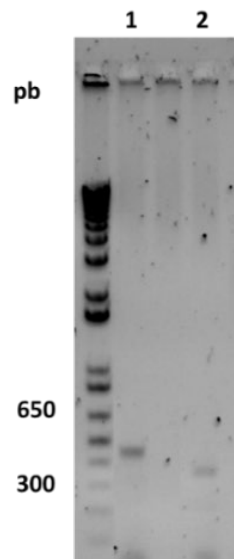


Figura 20. dsRNAs de las UCPs del camarón generados usando el sistema T7 RiboMAX™ Express RNAi. Donde 1) dsRNA UCP5 (381 pb) y 2) dsRNA UCP4 (354 pb).

6.5.1. Integridad del ARN Total

Se realizaron las extracciones de ARN total de los pleópodos de los organismos silenciados. La Figura 20 muestra el patrón de bandeo de ARN ribosomal similar en todas las muestras, en donde la presencia de las subunidades 28S y 18S observadas corroboran la integridad del ARN total aislado.

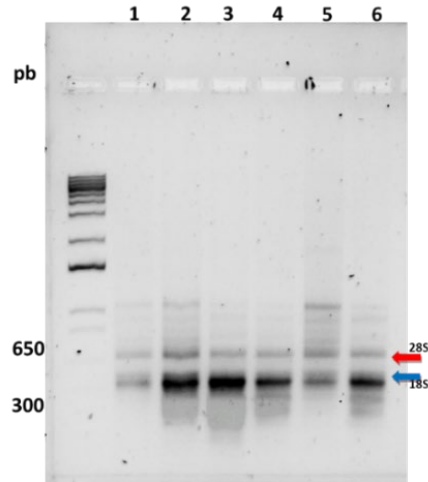


Figura 21. Integridad del ARN total aislado de los pleópodos de los camarones silenciados. Donde los camarones fueron inyectados con: (1) 15 μg dsLvUCP4, (2) 30 μg dsLvUCP4, (3) 15 μg dsLvUCP5, (4) 30 μg dsLvUCP5, (5) 15 μg solución salina y (6) 30 μg solución salina.

El ADNg contaminante se eliminó de las muestras de ARN total como se describió en la sección de materiales y métodos. Una vez corroborado que el ARN total se encontraba libre de contaminación, se realizó la síntesis de ADNc de todas las muestras para después amplificar los fragmentos de las proteínas de interés.

6.5.2. Cuantificación del ARN de las *LvUCPs* por qRT-PCR

El efecto del silenciamiento de los transcritos de *LvUCP4* y *LvUCP5* en los camarones inyectados se determinó por qRT-PCR. Se construyó una curva estándar para cada uno de los transcritos con un producto de PCR específico en diluciones seriadas. La eficiencia calculada de amplificación fue 107.7% para *LvUCP4* y 108% para *LvUCP5* (Figura 21).

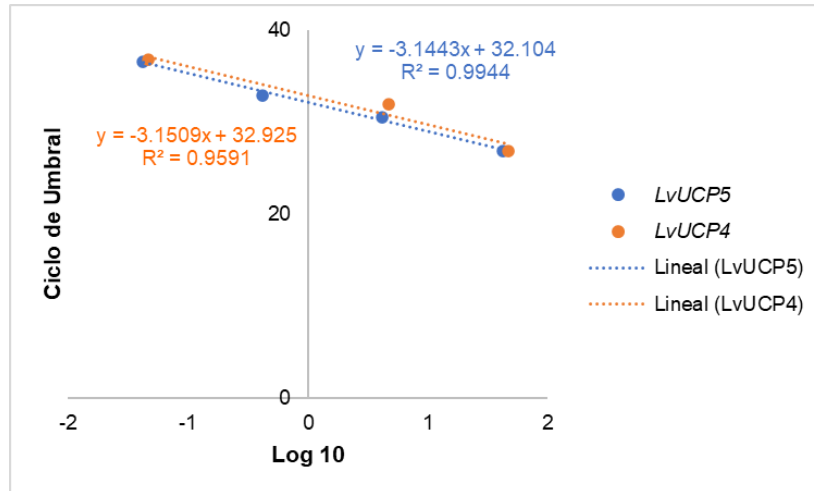


Figura 22. Comparación de las curvas estándar de cada transcrito. Se presentan las ecuaciones de ajuste a un modelo lineal y los datos para calcular la eficiencia de amplificación de cada transcrito.

La figura 22 muestra la amplificación de un producto específico durante la reacción de PCR, indicando la especificidad emitida por la formación del producto específico de cada transcrito.

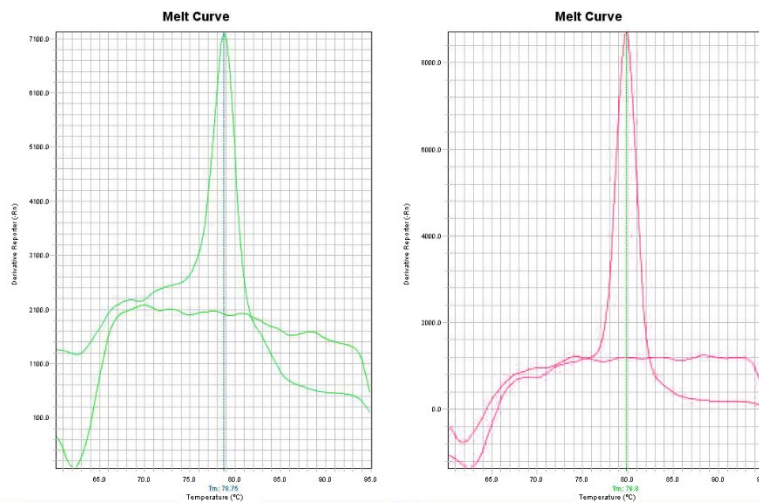


Figura 23. Curva de disociación de los productos de PCR de *LvUCP4* y *LvUCP5*.

La figura 23 muestra los resultados del experimento preliminar de silenciamiento. Los resultados obtenidos demuestran que la inyección intramuscular de dsRNA específico de LvUCPs disminuye la cantidad de los transcritos correspondientes en los pleopoditos de los camarones mantenidos en normoxia (5 mg/L OD). Se detectaron diferencias significativas en la expresión génica de *LvUCP4*

en los pleópodos de los organismos silenciados ($p < 0.05$). Los resultados mostraron que las concentraciones de 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA (12 h post-inyección) y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA (24 h post-inyección) fueron las dosis más efectivas para silenciar la expresión *LvUCP4* en un 42 y 20% comparados con el control este gen, respectivamente (Figura 23A).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica de *LvUCP5* en los organismos silenciados (Figura 23B; $p > 0.05$); sin embargo, se observó una disminución en el número de copias de *LvUCP5* en los organismos inyectados con 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA (24 h post-inyección) y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA (12 h post-inyección), en ambos casos la expresión disminuyó un 58% en comparación con el control. Los resultados muestran que se logró el silenciamiento de *LvUCP4* y *LvUCP5* aproximadamente en un 50% en las condiciones utilizadas para este estudio. Sin embargo, el porcentaje de silenciamiento de ambos genes se podría mejorar por lo que se recomienda realizar nuevos análisis para determinar si existen dosis más efectivas para conseguir un mayor porcentaje de silenciamiento en ambos transcritos.

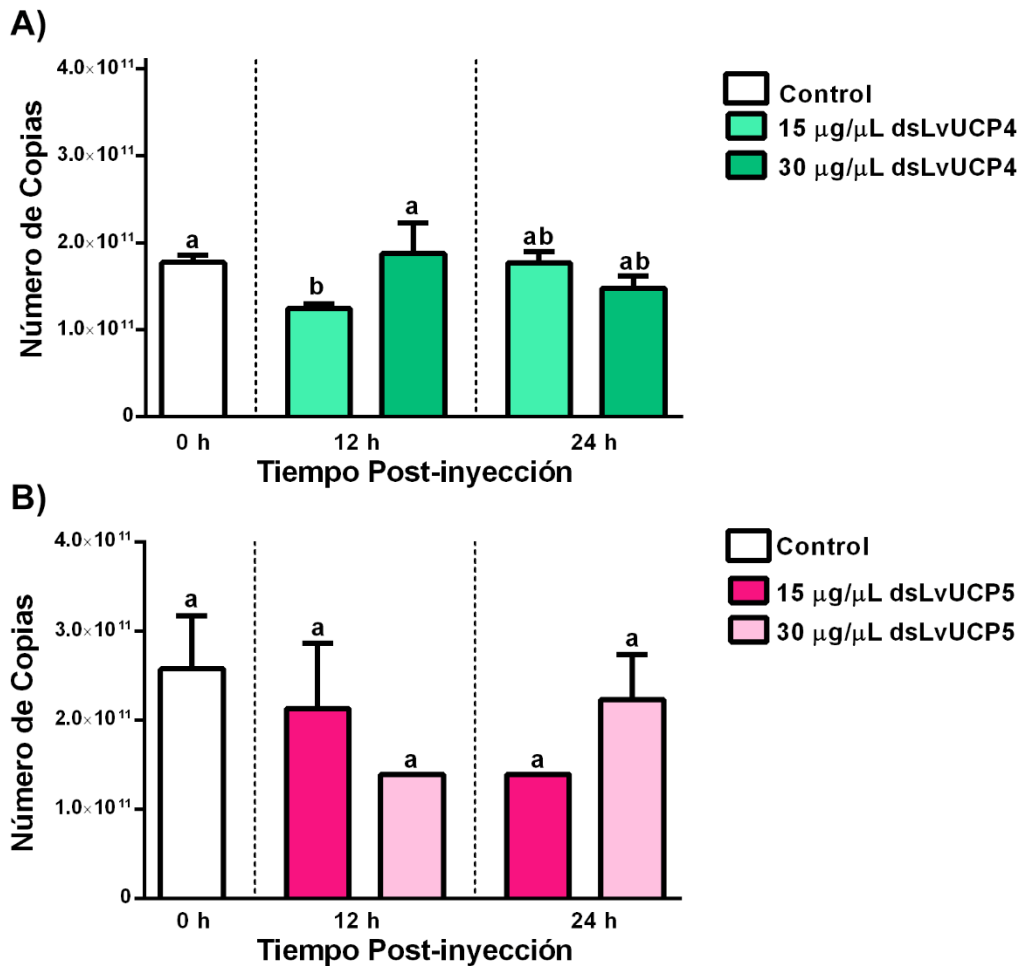


Figura 24. Expresión génica de las proteínas desacoplantes *LvUCP4* y *LvUCP5* en los pleópodos del camarón en respuesta a la inyección de dsRNAs. Donde A) *LvUCP4*. B) *LvUCP5*. Los datos se muestran como medias ± DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La tecnología del ARN de interferencia ha sido utilizada previamente en camarones para evaluar el proceso de infección de agentes patógenos como el virus de la mancha blanca (WSSV). Las variaciones en las eficiencias de silenciamiento de estos estudios varían desde un 44% hasta un 94% (Robalino et al., 2004). Adicionalmente, esta técnica es una herramienta útil para investigar las funciones específicas de las proteínas. En este estudio, se utilizaron dsRNAs para silenciar dos proteínas desacoplantes mitocondriales presentes en el camarón blanco, dsLvUCP4 y dsLvUCP5. Nuestros resultados demuestran que las UCPs presentes en el camarón pueden ser silenciadas usando esta técnica y que la eficiencia de silenciamiento es dosis dependiente y su efecto se modula con respecto al tiempo. Otros estudios han demostrado que la eficiencia del silenciamiento utilizando dsRNAs puede diferir dependiendo del tamaño del gen objetivo, la concentración

utilizada de dsRNA y el tiempo post-inyección, así como el tiempo de la toma de las muestras de los organismos silenciados (Papic et al., 2015).

6.5.3. Efecto del Silenciamiento de *LvUCPs* en la Producción de O_2^- en Pleópodos

Para corroborar el efecto del silenciamiento logrado, se determinó la producción de anión superóxido en los pleópodos de los organismos silenciados. Se observó un aumento significativo de 35 y 16% en las concentraciones de este anión cuando los camarones fueron inyectados con 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dsRNA tanto para *LvUCP5* como para *LvUCP4* en comparación con el control después de 12 horas post-inyección, respectivamente ($p < 0.05$). También, se observó un aumento de 20 y 22% en las concentraciones del anion superóxido después de 24 horas post-inyección en los organismos inyectados con 15 y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de *dsLvUCP4* en comparación con el control, respectivamente ($p < 0.05$; Figura 22). En contraste, se observó que en los organismos inyectados con concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de *dsLvUCP5* a las 24 horas post-inyección; en el cual el silenciamiento no es tan efectivo como en las otras dosis probadas, las concentraciones de anión superóxido disminuyeron comparadas con el control.

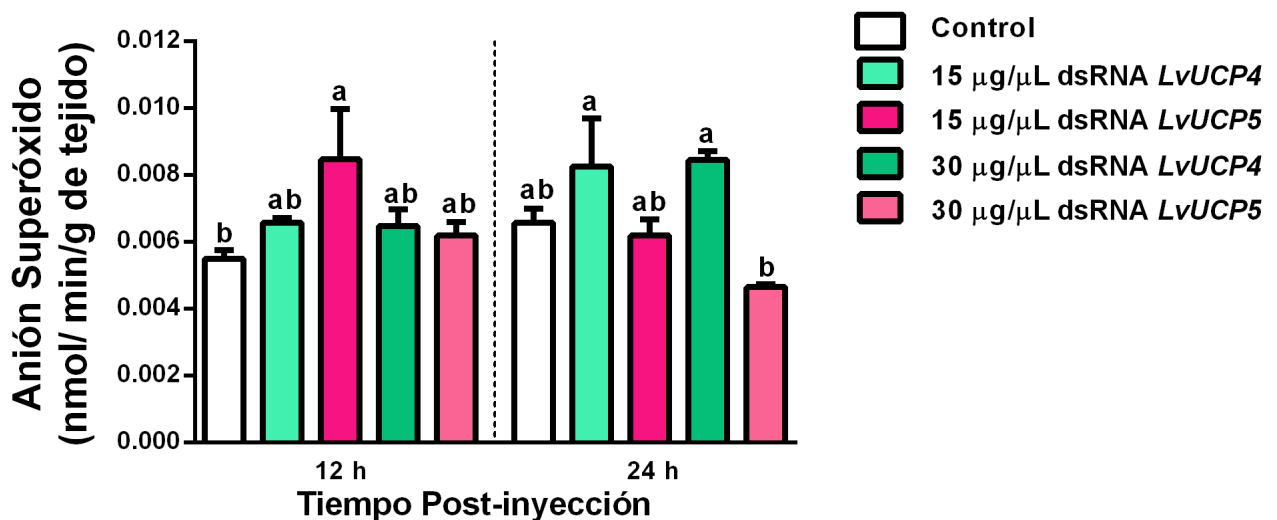


Figura 25. Producción de anión superóxido en los pleópodos de camarones silenciados. Los datos se muestran como medias \pm DE. Diferentes letras denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Las variaciones en las concentraciones del anion superóxido observadas en este estudio podrían estar estrechamente relacionadas con la disminución del número de proteínas desacoplantes presentes en las mitocondrias de los pleópodos de los camarones; producto de la inyección intramuscular de los dsUCPs. En base a lo anterior se sugiere que estas proteínas podrían tener un papel importante en la regulación de las especies reactivas de oxígeno en el camarón como sucede en otros insectos.

Se ha demostrado anteriormente y en otros organismos, que las UCPs tienen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis de la mitocondria bajo condiciones normales y de estrés (Chen et al., 2014; Zheng et al., 2015; Berry et al., 2018; Esfandiary et al., 2019). En este estudio se demostró por primera vez que el silenciamiento de las proteínas desacoplantes del camarón genera cambios en las concentraciones de EROs generadas. Sin embargo, se requieren mas evidencias para confirmar esta respuesta incluyendo los niveles de H₂O₂ mitocondrial, así como la actividad de la enzima SOD mitocondrial para confirmar la participación de las UCPs en la regulación de la producción de EROS en el camarón cuando este se encuentra en condiciones de estrés oxidativo.

7. CONCLUSIONES

Las proteínas desacoplantes son, hasta la fecha, el único mecanismo de desacoplamiento funcional reportado en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Las mitocondrias de esta especie cuentan con dos proteínas desacoplantes en sus membranas mitocondriales internas, LvUCP4 y LvUCP5. Estas proteínas son activas en presencia de ácidos grasos saturados (C12-C16) ó de un producto de la β -oxidación, mismos que promueven un aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial, transporte de protones y una disminución en el potencial transmembranal ($\Delta\Psi_m$).

Ambas proteínas desacoplantes del camarón cambian su expresión en condiciones de hipoxia y reoxigenación. LvUCP4 cuenta con expresión ubicua, mientras que LvUCP5 cuenta con expresión específica y depende de la presencia de oxígeno ambiental. Lo que sugiere un papel en la respuesta de la mitocondria para controlar la producción de EROs. La activación de las UCPs del camarón se presenta como un mecanismo de respuesta previo a la activación del sistema antioxidante.

El silenciamiento de los transcritos demostró que se generan cambios en la producción de EROS, por lo que se sugiere que los UCP de camarones pueden participar durante la respuesta temprana al estrés oxidativo en la disminución de la producción de EROS con el sistema antioxidante, jugando un papel clave contra los daños que la producción de EROS provoca durante los eventos de hipoxia y reoxigenación.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere continuar con el estudio las UCPs, ya que este es el único mecanismo de desacoplamiento fisiológico presente a la fecha en las mitocondrias del camarón. Por lo que el estudio del silenciamiento de los transcritos de *LvUCP* bajo un evento de hipoxia-reoxigenación podría ayudar a esclarecer las estrategias utilizadas por este crustáceo para enfrentar eventos adversos.

9. REFERENCIAS

- Abele, D., Philipp, E., Gonzalez, P. y Puntarulo, S. (2007). Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Frontiers in Bioscience*, 12, 933-946.
- Abele, D. y Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 138(4), 405-415. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>
- Aguirre, E. y Cadenas, S. (2010). GDP and carboxyatractylate inhibit 4-hydroxynonenal-activated proton conductance to differing degrees in mitochondria from skeletal muscle and heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(10), 1716-1726. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.009>
- Alves-Bezerra, M., Cosentino-Gomes, D., Vieira, L. P., Rocco-Machado, N., Gondim, K. C. y Meyer-Fernandes, J. R. (2014). Identification of uncoupling protein 4 from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* and its possible role on protection against oxidative stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 24-33.
- Azzone, G. F., Zoratti, M., Petronilli, V. y Pietrobon, D. (1985). The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 23(3), 349-356.
- Berardi, Marcelo J. y Chou, James J. (2014). Fatty acid flippase activity of UCP2 is essential for its proton transport in mitochondria. *Cell Metabolism*, 20(3), 541-552.
- Berry, B. J., Trewin, A. J., Amitrano, A. M., Kim, M. y Wojtovich, A. P. (2018). Use the protonmotive force: Mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species. *Journal of Molecular Biology*, 430(21), 3873-3891.
- Bouillaud, F., Alves-Guerra, M.-C. y Ricquier, D. (2016). UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2443-2456.
- Bousquet, P. A., Sandvik, J. A., Arntzen, M. Ø., Edin, J., Nina, F., Christoffersen, S., Kregel, U., Pettersen, E. O. y Thiede, B. (2015). Hypoxia strongly affects mitochondrial ribosomal proteins and translocases, as shown by quantitative proteomics of HeLa cells. *International Journal of Proteomics*, 2015.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L. y Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(6), 755-767.
- Brand, M. D. y Esteves, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell metabolism*, 2(2), 85-93.

- Brand, Martin D. y Nicholls, David G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297-312.
- Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Félix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus, M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A. y Uribe-Carvajal, S. (2014). The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: Components and supramolecular organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(1), 73-84.
- Cabrera-Orefice, A., Ibarra-García-Padilla, R., Maldonado-Guzmán, R., Guerrero-Castillo, S., Luévano-Martínez, L. A., Pérez-Vázquez, V., Gutiérrez-Aguilar, M. y Uribe-Carvajal, S. (2015). The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial unselective channel behaves as a physiological uncoupling system regulated by Ca^{2+} , Mg^{2+} , phosphate and ATP. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(6), 477-491.
- Carraro, M., Checchetto, V., Szabó, I. y Bernardi, P. (2019). F-ATP synthase and the permeability transition pore: fewer doubts, more certainties. *FEBS Letters*, 593(13), 1542-1553.
- Clarke, K. J. y Porter, R. K. (2018). The importance of calcium ions for determining mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity when measuring uncoupling protein 1 (UCP1) function in mitochondria isolated from brown adipose tissue. En C. M. Palmeira y A. J. Moreno (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols* (pp. 325-336). New York, NY: Springer New York.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*, 341(2), 233-249.
- Chen, K., Sun, G., Lv, Z., Wang, C., Jiang, X., Li, D. y Zhang, C. (2010). Molecular cloning of amphioxus uncoupling protein and assessment of its uncoupling activity using a yeast heterologous expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400(4), 701-706.
- Chen, S., Liu, A., Ji, D., Lin, X., Liu, Z., Xia, X., Liu, D. y Ahammed, G. J. (2014). Silencing of tomato mitochondrial uncoupling protein disrupts redox poise and antioxidant enzymes activities balance under oxidative stress. *Journal of Plant Biology*, 57(1), 9-19.
- Chen, S., Xie, S., Chen, M., Mi, Z., He, Q., Yang, F., Niu, J., Liu, Y. y Tian, L. (2019). Hypoxia-induced changes in survival, immune response and antioxidant status of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with graded levels of dietary myo-inositol. *Aquaculture Nutrition*, 25(2), 518-528.
- Chimeo-Nuñez, C. (2017). *El inhibidor endógeno IF_1 del complejo mitocondrial ATPasa y su papel en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante la hipoxia-reoxigenación*. Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Da-Ré, C., De Pittà, C., Zordan, M. A., Teza, G., Nestola, F., Zeviani, M., Costa, R. y Bernardi, P. (2014). UCP4C mediates uncoupled respiration in larvae of *Drosophila melanogaster*. *EMBO reports*, 15(5), 586-591.
- Del-Saz, N. F., Ribas-Carbo, M., McDonald, A. E., Lambers, H., Fernie, A. R. y Florez-Sarasa, I.

- (2018). An *in vivo* perspective of the role(s) of the alternative oxidase pathway. *Trends in Plant Science*, 23(3), 206-219.
- Ding, Y., Zheng, Y., Huang, J., Peng, W., Chen, X., Kang, X. y Zeng, Q. (2019). UCP2 ameliorates mitochondrial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *International Immunopharmacology*, 71, 336-349.
- Divakaruni, A. S. y Brand, M. D. (2011). The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology*, 26(3), 192-205.
- Dutra, M. R. H., Feliciano, R. d. S., Jacinto, K. R., Gouveia, T. L. F., Brigidio, E., Serra, A. J., Morris, M., Naffah-Mazzacoratti, M. d. G. y Silva, J. A. J. (2018). Protective role of UCP2 in oxidative stress and apoptosis during the silent phase of an experimental model of epilepsy induced by pilocarpine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 12.
- Echtay, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, 43(10), 1351-1371.
- Echtay, K. S., Bienengraeber, M., Mayinger, P., Heimpel, S., Winkler, E., Druhmman, D., Frischmuth, K., Kamp, F. y Huang, S.-G. (2018). Uncoupling proteins: Martin Klingenberg's contributions for 40 years. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 657, 41-55.
- Echtay, K. S., Esteves, T. C., Pakay, J. L., Jekabsons, M. B., Lambert, A. J., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A. J., Wang, S., Roebuck, S. J. y Brand, M. D. (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *The EMBO Journal*, 22(16), 4103-4110.
- Echtay, K. S., Winkler, E., Bienengraeber, M. y Klingenberg, M. (2000). Site-Directed Mutagenesis Identifies Residues in Uncoupling Protein (UCP1) Involved in Three Different Functions. *Biochemistry*, 39(12), 3311-3317. doi: 10.1021/bi992448m
- Esfandiary, A., Kutsche, H. S., Schreckenberger, R., Weber, M., Pak, O., Kojonazarov, B., Sydykov, A., Hirschhäuser, C., Wolf, A., Haag, D., Hecker, M., Fink, L., Seeger, W., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Weißmann, N., Schulz, R., Rohrbach, S., Li, L., Sommer, N. y Schlüter, K.-D. (2019). Protection against pressure overload-induced right heart failure by uncoupling protein 2 silencing. *Cardiovascular Research*, 115(7), 1217-1227.
- Feniouk, B. A., Mulikidjanian, A. Y. y Junge, W. (2005). Proton slip in the ATP synthase of *Rhodobacter capsulatus*: induction, proton conduction, and nucleotide dependence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1706(1), 184-194.
- Figueira, T. R., Melo, D. R., Vercesi, A. E. y Castilho, R. F. (2012). Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. En C. M. Palmeira y A. J. Moreno (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols* (pp. 103-117). Totowa, NJ: Humana Press.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S. y Ricquier, D. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genetics*, 15(3), 269-272.
- Fridell, Y.-W., Sánchez-Blanco, A., Silvia, B. y Helfand, S. (2004). Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(3), 219-228.

- Garlid, K. D., Jabůrek, M., Ježek, P. y Vařecha, M. (2000). How do uncoupling proteins uncouple? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1459(2), 383-389. doi: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00175-4)
- Garlid, K. D., Orosz, D. E., Modrianský, M., Vassanelli, S. y Ježek, P. (1996). On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2615-2620.
- Gaudry, M. J. y Jastroch, M. (2019). Molecular evolution of uncoupling proteins and implications for brain function. *Neuroscience Letters*, 696, 140-145.
- Gonzalez-Leyva, M. d. l. A. (2019). *Respuesta tipo Warburg en el camarón blanco (Litopenaeus vannamei) ante una infección viral o en condiciones de hipoxia-reoxigenación*. Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora.
- Guerrero-Castillo, S., Araiza-Olivera, D., Cabrera-Orefice, A., Espinasa-Jaramillo, J., Gutiérrez-Aguilar, M., Luévano-Martínez, L. A., Zepeda-Bastida, A. y Uribe-Carvajal, S. (2011). Physiological uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Studies in different yeast species. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 43(3), 323-331.
- Gutiérrez-Aguilar, M., López-Carbajal, H. M., Uribe-Alvarez, C., Espinoza-Simón, E., Rosas-Lemus, M., Chiquete-Félix, N. y Uribe-Carvajal, S. (2014). Effects of ubiquinone derivatives on the mitochondrial unselective channel of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 46(6), 519-527.
- Hanák, P. y Ježek, P. (2001). Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis – UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *FEBS Letters*, 495(3), 137-141.
- Hourton-Cabassa, C., Rita Matos, A., Zachowski, A. y Moreau, F. (2004). The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(4), 283-290.
- Iser, W. B., Kim, D., Bachman, E. y Wolkow, C. (2005). Examination of the requirement for ucp-4, a putative homolog of mammalian uncoupling proteins, for stress tolerance and longevity in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(10), 1090-1096.
- Jarmuszkiewicz, W., Woyda-Ploszczyca, A., Antos-Krzeminska, N. y Sluse, F. E. (2010). Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6), 792-799.
- Ježek, P., Holendová, B., Garlid, K. D. y Jabůrek, M. (2018). Mitochondrial uncoupling proteins: Subtle regulators of cellular redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(7), 667-714.
- Ježek, P., Žáčková, M., Růžička, M., Škobisová, E. y Jabůrek, M. (2004). Mitochondrial uncoupling proteins—facts and fantasies. *Journal of Physiology Reserchs*, 53(1), S199-S211.
- Ji, L. L., Yeo, D., Kang, C. y Zhang, T. (2020). The role of mitochondria in redox signaling of muscle homeostasis. *Journal of Sport and Health Science*.
- Jiménez-Gutiérrez, L. R., Uribe-Carvajal, S., Sánchez-Paz, A., Chimeo, C. y Muhlia-Almazán, A. (2014). The cytochrome c oxidase and its mitochondrial function in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 46(3), 189-196.

- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. y Wood, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1504(2), 179-195.
- Kadenbach, B. (2003). Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1604(2), 77-94.
- Kern, B., Ivanina, A. V., Piontkivska, H., Sokolov, E. P. y Sokolova, I. M. (2009). Molecular characterization and expression of a novel homolog of uncoupling protein 5 (UCP5) from the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Bivalvia: Ostreidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 4(2), 121-127.
- Klaus, S. y Ost, M. (2020). Mitochondrial uncoupling and longevity – A role for mitokines? *Experimental Gerontology*, 130, 110796.
- Klingenberg, M. (1988). Nucleotide binding to uncoupling protein. Mechanism of control by protonation. *Biochemistry*, 27(2), 781-791.
- Kowaltowski, A. J. y Vercesi, A. E. (2002). Reactive oxygen generation by mitochondria. En J. J. Lemasters y A.-L. Nieminen (Eds.), *Mitochondria in Pathogenesis* (pp. 281-300). Boston, MA: Springer US.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- LeMond, G. y Hom, M. (2015). 3 - Amazing Mitochondria. En G. LeMond y M. Hom (Eds.), *The Science of Fitness* (pp. 39-50). Boston: Academic Press.
- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., Song, Q., Zhou, H., Han, Q. y Diao, X. (2016). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 144, 234-240.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Luévano-Martínez, Luis A., Barba-Ostria, C., Araiza-Olivera, D., Chiquete-Félix, N., Guerrero-Castillo, S., Rial, E., Georgellis, D. y Uribe-Carvajal, S. (2012). A critical tyrosine residue determines the uncoupling protein-like activity of the yeast mitochondrial oxaloacetate carrier. *Biochemical Journal*, 443(1), 317-325.
- Luévano-Martínez, Luis A., Moyano, E., de Lacoba, M. G., Rial, E. y Uribe-Carvajal, S. (2010). Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(1), 81-88.
- Lynen, F. (1942). Die Rolle der Phosphorsäure bei Dehydrierungsvorgängen und ihre biologische Bedeutung. *Naturwissenschaften*, 30(25), 398-406.
- Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97-103.
- Macher, G., Koehler, M., Rupprecht, A., Kreiter, J., Hinterdorfer, P. y Pohl, E. E. (2018). Inhibition of mitochondrial UCP1 and UCP3 by purine nucleotides and phosphate. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1860(3), 664-672.

- Mailloux, R. J. y Harper, M.-E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6), 1106-1115.
- Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H. y Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS letters*, 443(3), 326-330.
- Martínez-Cruz, O., Calderon de la Barca, A. M., Uribe-Carvajal, S. y Muhlia-Almazán, A. (2012). The function of mitochondrial F₀F₁ ATP-synthase from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle during hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 162(4), 107-112.
- Martínez-Cruz, O., Chimeo, C., Rodríguez-Armenta, C. y Muhlia-Almazán, A. (2017). Crustacean Bioenergetics: Mitochondrial Adaptive Molecular Responses to Face Environmental Challenges. *Journal of Shellfish Research*, 36(3), 771-786, 716.
- Martínez-Cruz, O., Muhlia-Almazán, A., Sanchez-Paz, A., Garcia-Carreño, F., Jiménez-Gutierrez, L. y Navarrete del Toro, M. d. I. A. (2012). *Invertebrates mitochondrial function and energetic challenges*: INTECH Open Access Publisher.
- McDonald, A. E. y Gospodaryov, D. V. (2019). Alternative NAD(P)H dehydrogenase and alternative oxidase: Proposed physiological roles in animals. *Mitochondrion*, 45, 7-17.
- McDonald, A. E. y Vanlerberghe, G. C. (2004). Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. *IUBMB life*, 56(6), 333-341.
- Méndez-Romero, O., Uribe-Carvajal, S., Chiquete-Felix, N. y Muhlia-Almazán, A. (2019). Mitochondrial uncoupling proteins UCP4 and UCP5 from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 51(2), 103-119.
- Miller, A. D., Murphy, N. P., BurrIDGE, C. P. y Austin, C. M. (2005). Complete mitochondrial DNA sequences of the decapod crustaceans *Pseudocarcinus gigas* (Menippidae) and *Macrobrachium rosenbergii* (Palaemonidae). *Marine Biotechnology*, 7(4), 339-349.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144-148.
- Morales-García, N. L. (2020). *Estudio del Canal Inespecifico Mitocondrial en levadura S. cerevisiae*. Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad de México.
- Nabben, M., Hoeks, J., Briedé, J. J., Glatz, J. F. C., Moonen-Kornips, E., Hesselink, M. K. C. y Schrauwen, P. (2008). The effect of UCP3 overexpression on mitochondrial ROS production in skeletal muscle of young versus aged mice. *FEBS Letters*, 582(30), 4147-4152.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2015). *Lehninger: principios de bioquímica*.
- Nicholls, D. G. (1976). Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 62(2), 223-228.
- Nicholls, D. G. (2013). *Bioenergetics*: Academic Press.
- O'Connor, T. y Whittall, D. (2007). Linking hypoxia to shrimp catch in the northern Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 54(4), 460-463.

- Ogunbona, O. B. y Claypool, S. M. (2019). Emerging roles in the biogenesis of cytochrome c oxidase for members of the mitochondrial carrier family. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 3-3.
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflügers Archiv*, 447(5), 689-709.
- Palmieri, F. (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2), 465-484.
- Palmieri, F. (2014). Mitochondrial transporters of the SLC25 family and associated diseases: a review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(4), 565-575.
- Papic, L., García, K. y Romero, J. (2015). Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias de control y prevención de enfermedades virales en sistemas acuícolas. *Latin american journal of aquatic research*, 43, 388-401.
- Parrilla-Taylor, D. P. y Zenteno-Savín, T. (2011). Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*, 318(3-4), 379-383.
- Pfeiffer, M., Kayzer, E.-B., Yang, X., Abramson, E., Kenaston, M. A., Lago, C. U., Lo, H.-H., Sedensky, M. M., Lunceford, A., Clarke, C. F., Wu, S. J., McLeod, C., Finkel, T., Morgan, P. G. y Mills, E. M. (2011). *Caenorhabditis elegans* UCP4 protein controls complex II-mediated oxidative phosphorylation through succinate transport. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37712-37720.
- Pohl, E. E., Rupprecht, A., Macher, G. y Hilse, K. E. (2019). Important trends in UCP3 investigation. [Review]. *Frontiers in Physiology*, 10(470).
- Puente-Carreón, E. (2009). *Respuesta fisiológicas de juveniles de camarón blanco Litopenaeus vannamei, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura*. Doctorado en Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional La Paz, La Paz, Baja California Sur.
- Ramsden, D. B., Ho, P. W. L., Ho, J. W. M., Liu, H.-F., So, D. H. F., Tse, H.-M., Chan, K.-H. y Ho, S.-L. (2012). Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain and Behavior*, 2(4), 468-478.
- Rasmusson, A. G., Soole, K. L. y Thomas, E. E. (2004). Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), 23-39.
- Reynafarje, B. y Lehninger, A. L. (1978). An alternative membrane transport pathway for phosphate and adenine nucleotides in mitochondria and its possible function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10), 4788-4792.
- Robalino, J., Browdy, C. L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P. y Warr, G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology*, 78(19), 10442-10448.
- Rodríguez-Armenta, C., Uribe-Carvajal, S., Rosas-Lemus, M., Chiquete-Felix, N., Huerta-Ocampo, J. A. y Muhlia-Almazan, A. (2018). Alternative mitochondrial respiratory chains from two crustaceans: *Artemia franciscana* nauplii and the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(2), 143-152.

- Rodríguez Armenta, C. M. (2018). *Estudio de los mecanismos de desacoplamiento fisiológico mitocondrial de los crustáceos*. Doctorado, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora.
- Rosas-Lemus, M., Uribe-Alvarez, C., Contreras-Zentella, M., Luévano-Martínez, L. A., Chiquete-Félix, N., Morales-García, N. L., Simón, E. E., Muhlia-Almazán, A., Escamilla-Marván, E. y Uribe-Carvajal, S. (2016). Oxygen: from toxic waste to optimal (Toxic) fuel of life. *Free Radicals and Diseases*, 1.
- Rosas Lemus, M. (2015). *Efecto de la Glucosa-6-fosfato, Fructosa-6-fosfato y Fructosa-1,6-bifosfato en la modulación del canal mitocondrial inespecífico de Saccharomyces cerevisiae (scMUC)*. Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Ruprecht, J. J. y Kunji, E. R. S. (2019). The SLC25 mitochondrial carrier family: Structure and mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Samudio, I., Fiegl, M. y Andreeff, M. (2009). Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Research*, 69(6), 2163-2166.
- Sánchez-Blanco, A., Fridell, Y.-W. C. y Helfand, S. L. (2006). Involvement of *Drosophila* uncoupling protein 5 in metabolism and aging. *Genetics*, 172(3), 1699-1710.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Goubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S. y Lévi-Meyrueis, C. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34611-34615.
- Scheffler, I. E. (2011). *Mitochondria*: John Wiley & Sons.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, S. (2020). Atlas Agroalimentario 2018, 2020, de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Shabalina, Irina G. y Nedergaard, J. (2011). Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not? *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1305-1309.
- Shabalina, I. G., Petrovic, N., Kramarova, T. V., Hoeks, J., Cannon, B. y Nedergaard, J. (2006). UCP1 and defense against oxidative stress: 4-hydroxy-2-nonenal effects on brown fat mitochondria are uncoupling protein 1-independent. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 13882-13893.
- Slocinska, M., Antos-Krzeminska, N., Golebiowski, M., Kuczer, M., Stepnowski, P., Rosinski, G. y Jarmuszkiewicz, W. (2013). UCP4 expression changes in larval and pupal fat bodies of the beetle *Zophobas atratus* under adipokinetic hormone treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166(1), 52-59.
- Slocinska, M., Antos-Krzeminska, N., Rosinski, G. y Jarmuszkiewicz, W. (2011). Identification and characterization of uncoupling protein 4 in fat body and muscle mitochondria from the cockroach *Gromphadorhina cocquereliana*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*,

43(6), 717-727.

- Slocinska, M., Antos-Krzeminska, N., Rosinski, G. y Jarmuszkiewicz, W. (2012). Molecular identification and functional characterisation of uncoupling protein 4 in larva and pupa fat body mitochondria from the beetle *Zophobas atratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 162(4), 126-133.
- Slocinska, M., Barylski, J. y Jarmuszkiewicz, W. (2016). Uncoupling proteins of invertebrates: A review. *IUBMB Life*, 68(9), 691-699.
- Sluse, F. E., Jarmuszkiewicz, W., Navet, R., Douette, P., Mathy, G. y Sluse-Goffart, C. M. (2006). Mitochondrial UCPs: New insights into regulation and impact. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(5), 480-485.
- Sokolova, I. (2018). Mitochondrial adaptations to variable environments and their role in animals' stress tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 58(3), 519-531.
- Sokolova, I. M. y Sokolov, E. P. (2005). Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS Letters*, 579(2), 313-317.
- Sriket, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. y Kijroongrojana, K. (2007). Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. *Food Chemistry*, 103(4), 1199-1207.
- Thomas, L. W. y Ashcroft, M. (2019). Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(9), 1759-1777.
- Tian, X. Y., Ma, S., Tse, G., Wong, W. T. y Huang, Y. (2018). Uncoupling protein 2 in cardiovascular health and disease. [Review]. *Frontiers in Physiology*, 9(1060).
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Tuena de Gómez Puyou, M. y Trejo, J. d. J. G. (2015). La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa. *Revista Digital Universitaria [en línea]*, 16(1).
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.-A. y Ochoa, J.-L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(2), 299-303.
- Vercesi, A. E., Borecký, J., Maia, I. d. G., Arruda, P., Cuccovia, I. M. y Chaimovich, H. (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 383-404.
- Wang, W., Zhong, P., Yi, J.-Q., Xu, A.-X., Lin, W.-Y., Guo, Z.-C., Wang, C.-G., Sun, C.-B. y Chan, S. (2019). Potential role for microRNA in facilitating physiological adaptation to hypoxia in the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84, 361-369.
- Wolkow, C. A. y Iser, W. B. (2006). Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan. *Ageing Research Reviews*, 5(2), 196-208.

- Woyda-Ploszczyca, A. M. y Jarmuszkiewicz, W. (2017). The conserved regulation of mitochondrial uncoupling proteins: From unicellular eukaryotes to mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(1), 21-33.
- Xu, Z., Regenstein, J. M., Xie, D., Lu, W., Ren, X., Yuan, J. y Mao, L. (2018). The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 72, 564-571.
- Zenteno-Savín, T., Saldierna, R. y Ahuejote-Sandoval, M. (2006). Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(3), 301-308.
- Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L. y Yu, Z.-B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3-15.
- Zheng, G., Lyu, J., Liu, S., Huang, J., Liu, C., Xiang, D., Xie, M. y Zeng, Q. (2015). Silencing of uncoupling protein 2 by small interfering RNA aggravates mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes under septic conditions. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1525-1536.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1.

Méndez-Romero, O., Uribe-Carvajal, S., Chiquete-Felix, N., y Muhlia-Almazan, A. (2019). Mitochondrial uncoupling proteins UCP4 and UCP5 from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 51(2), 103-119. <https://doi.org/10.1007/s10863-019-09789-5>

10.2. ANEXO 2.

Mendez-Romero, O., Rodriguez-Armenta, C., Uribe-Carvajal, S., y Muhlia-Almazan, A. (2020). Functional characterization of the mitochondrial uncoupling proteins from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1861(8), 148209. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148209>

10.3. ANEXO 3.

Méndez Romero O. A., y A. Muhlia Almazán. 2018. Mitochondrias – El “ying-yang” de la vida. Recursos Naturales y Sociedad, 2018. Vol. 4 (1): 12-21. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2018.04.04.01.0001>