



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

**“CARACTERIZACIÓN PARCIAL Y EVALUACIÓN DE
LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL INHIBIDOR
ENDÓGENO IF1 DE LA ATPASA MITOCONDRIAL
DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)”**

POR:

CINDY CHIMEO NUÑEZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

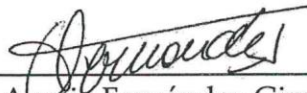
AGOSTO, 2013

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Cindy Chimeo Núñez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Directora de tesis



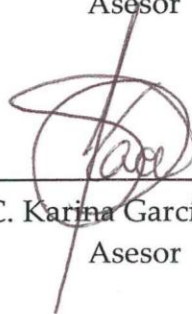
Dra. Anaía Fernández Gimenez
Asesor



Dra. Verónica Mata Haro
- Asesor



Dr. Arturo Sánchez Paz
Asesor



M.C. Karina García Orozco
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



Dr. Pablo Wong González

Director General

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto con clave 133174 titulado: "Estudio de la Bioenergética Mitocondrial del Camarón: Genes y Proteínas Involucradas en la Actividad Mitocondrial y en la Síntesis del ATP" y de una beca para estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Por su apoyo económico al proyecto con clave 133174 y por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

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

A la Coordinación de Programas Académicos, en especial a la Dra. Gloria Yepiz 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, por su paciencia y por contribuir en mi formación profesional y personal. Gracias por ser mi guía académica.

A cada uno de los miembros del comité de tesis: Dra. Analía Fernández, Dra. Verónica Mata, Dr. Arturo Sánchez y M.C. Karina García por su interés y disponibilidad.

A la Q.B. Sandra Araujo por su apoyo técnico en el laboratorio y enseñanzas diarias. Y a la MC Laura Jiménez por su apoyo durante mi formación. A la Dra. Oliviert Martínez por sus consejos y comentarios.

A la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna y al MC Magdalena Adelina Pacheco del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., por el apoyo técnico brindado.

Al Dr. Arturo Sánchez, al Biól. Trinidad Encinas y al MC Fernando Mendoza del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, por las facilidades para trabajar en su laboratorio y por el apoyo técnico brindado.

A mis compañeros de laboratorio Ofelia Méndez, Osiris Díaz, José Alfredo Martínez y Carlos Trasviña, gracias por haber hecho que mi estancia fuese agradable día con día.

A Juan Carlos E. Alvaradejo Fernández por su ayuda, apoyo, paciencia y amor durante estos años.

DEDICATORIA

A Dios, que guía mi sendero día con día.

A Juan Carlos, el amor de mi vida por hacer que cada momento contigo sea inolvidable.

A las familias Fernández Castellanos y Coronado Córdova, así como a todos mis amigos, muchas gracias por estar conmigo y apoyarme.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	ii
DECLARATORIA INSTITUCIONAL.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. El cultivo de camarón.....	3
2.2. El ciclo biológico del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i>	4
2.3. La hipoxia y sus efectos en los crustáceos.....	6
2.4. La mitocondria y el metabolismo energético.....	8
2.4.1. La cadena de transporte de electrones.....	10
2.4.2. La fosforilación oxidativa y la ATPsintasa.....	12
2.5. El inhibidor IF1.....	14
2.5.1. Características y función.....	14
2.5.2. Estudios de evaluación de la actividad del inhibidor.....	15
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPOTÉISIS.....	19
V. OBJETIVOS.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Particulares.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Secuenciación y caracterización del ADNc del inhibidor IF1 del camarón.....	20
6.1.1 Aislamiento, cuantificación e integridad del ARN total....	21
6.1.2 Eliminación de ADN genómico y síntesis de ADNc.....	21
6.1.3 Amplificación del ADNc de IF1 y secuenciación.....	22
6.2 Análisis filogenético del inhibidor IF1.....	23

CONTENIDO (Continuación)

6.3 Evaluación de los cambios en la expresión del gen del inhibidor IF1 del camarón en condiciones de hipoxia.....	24
6.3.1 Muestras de ARN total provenientes del bioensayo en condiciones de hipoxia.....	24
6.3.2 Cuantificación del ARNm de IF1 por PCR en tiempo real...	26
6.4 Análisis estadístico.....	28
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1 Caracterización parcial del inhibidor IF1 del camarón blanco...	29
7.2 Caracterización de la secuencia parcial de la isoforma 2 del camarón blanco.....	34
7.3 Análisis filogenético del inhibidor IF1 de vertebrados e invertebrados.....	37
7.4 La hipoxia influye en la expresión génica del inhibidor del complejo F1-ATP sintasa.....	40
7.4.1 Expresión relativa del inhibidor del complejo F1-ATP sintasa.....	40
VIII. CONCLUSIONES.....	45
IX. RECOMENDACIONES.....	46
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico del camarón.....	5
Figura 2. La mitocondria.....	8
Figura 3. Complejos enzimáticos que participan en la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.....	10
Figura 4. Estructura de F ₀ F ₁ -ATPasa y el inhibidor IF1.....	13
Figura 5. Estructura del dímero activo del inhibidor IF1 de bovinos.....	15
Figura 6. Diagrama de las conformaciones del inhibidor F1 dependiendo del pH.....	16
Figura 7. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de la proteína inhibidora IF1 del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	29
Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína inhibidora del complejo F1-ATP sintasa en diversas especies.....	31
Figura 9. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de la isoforma putativa de la proteína inhibidora IF1 del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	34
Figura 10. Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas inhibidoras del complejo F1-ATP sintasa del camarón <i>L. vannamei</i>	35
Figura 11. Alineamiento de las secuencias de las proteínas inhibidoras del complejo F1-ATPasa MAI-1 e IF1-2.....	36
Figura 12. Árbol filogenético resultado del análisis de la secuencia deducida de aminoácidos del inhibidor.....	38
Figura 13. Comparación de los rangos dinámicos de cada gen.....	40
Figura 14. Curva de disociación de los productos de PCR de L8 e IF1....	41
Figura 15. A) Expresión génica de la proteína inhibidora IF1 en músculo de camarón en respuesta a la hipoxia. B) Actividad ATPasa evaluado en los extractos mitocondriales del músculo de camarón bajo el efecto de la hipoxia.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores específicos diseñados para la amplificación de los transcritos del complejo F1-ATP sintasa.....	20
Tabla 2. Inhibidor IF1 de los organismos usados en el análisis filogenético.....	23
Tabla 3. Cebadores específicos utilizados para la cuantificación del ARNm de los genes IF1 y L8.....	26

RESUMEN

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es un crustáceo que enfrenta condiciones de hipoxia (baja concentración de oxígeno disuelto en el agua) tanto en estanques de cultivo, como durante su ciclo de vida en el ambiente marino. Se sabe que en condiciones de hipoxia, la F₀F₁-ATPasa hidroliza el ATP presente en la mitocondria del camarón para poder cubrir energéticamente sus funciones básicas. Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios para determinar la existencia de algún mecanismo que le permita al camarón blanco *L. vannamei* regular el consumo de ATP en condiciones de hipoxia. En esta investigación se realizó una búsqueda de una proteína inhibidora del tipo IF1 en el transcriptoma del camarón y se evaluaron los cambios en la expresión génica de la misma en camarones sometidos a condiciones de hipoxia. La secuencia completa del ADNc del inhibidor IF1 se caracterizó parcialmente y adicionalmente se logró identificar una isoforma putativa de esta proteína a la que se le denominó como isoforma 2 (IF1-2). Ambas secuencias cuentan con las características conservadas de las proteínas IF1. La evaluación de la expresión génica de IF1 mostró diferencias significativas por efecto de la hipoxia, sugiriendo que la respuesta de los organismos se encuentra regulada a nivel transcripcional. Por otro lado, la presencia de este transcrito en el transcriptoma del camarón sugiere la existencia del mecanismo que el camarón utiliza durante la hipoxia para cubrir sus funciones básicas hasta que los niveles de oxígeno se reestablezcan.

Palabras clave: Camarón *L. vannamei*, Inhibidor IF1, hidrólisis del ATP, hipoxia.

ABSTRACT

The white shrimp *Litopenaeus vannamei* is a crustacean that faces conditions of hypoxia (low concentration of oxygen dissolved in the water) both in culture ponds as during its lifecycle in the marine environment. It is known that under conditions of hypoxia the F_0F_1 -ATPase hydrolyzes the ATP present in the mitochondria of the shrimp to fulfill energetically their basic functions. However, to date there are not studies about the existence of any mechanism that allows the white shrimp *L. vannamei* to regulate the ATP uptake under hypoxic conditions. In this investigation, a search was performed to identify an inhibitory protein type IF1 in the transcriptome of the shrimp, as well as the evaluation of changes in the expression of this gene in shrimp subjected to hypoxic conditions. The complete sequence of the cDNA of the inhibitor IF1 was partially characterized, additionally a putative isoform of this protein (named as isoform 2, IF1-2) was identified. Both transcripts have conserved features of IF1 protein. The evaluation of gene expression of IF1 showed significant differences due to hypoxia, suggesting that the response of organisms is regulated at the transcriptional level. On the other hand, the presence of this transcript in the shrimp transcriptome suggests the existence of a mechanism used during hypoxia to cover its basic functions until oxygen levels are re-established.

Key words: Shrimp *L. vannamei*, Inhibitor IF1, hydrolyzes of ATP, hypoxia.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es una forma de producir alimentos a escala a través del uso de tecnologías aplicadas en espacios fijos y controlados (FAO ©,1991). En México, cerca del 97% del cultivo de camarón se desarrolla en el Golfo de California, en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit (Paez-Osuna et al., 2003). Sin embargo, en los últimos años diversas enfermedades y factores ambientales como la baja concentración de oxígeno disuelto en el agua, también conocida como hipoxia (Hendrickx, 2001), han provocado altos niveles de estrés en los organismos, ocasionando un incremento en las tasas de mortalidad y por lo tanto una reducción en la producción.

Se sabe que en los vertebrados bajo condiciones de hipoxia ocurre un incremento en el consumo de ATP celular, que es regulado en la mitocondria por una proteína inhibidora del complejo F1 de la ATPasa, denominada IF1 (García, 2006). La falta de oxígeno en la mitocondria ocasiona que se detenga la cadena de transporte de electrones provocando que no se forme el gradiente electroquímico que le brinda la energía a la F₀F₁-ATPsintasa para llevar a cabo la síntesis del ATP a partir de ADP + Pi; en estas condiciones la célula necesita energía para cubrir sus funciones básicas y requiere hidrolizar el ATP presente en la mitocondria, así en condiciones de hipoxia la ATPsintasa cambia su función a ATPasa (Di Lisa et al., 1998).

La hidrólisis del ATP que lleva a cabo la ATPasa puede ser inhibida por la acción de la proteína inhibidora del complejo F1 (IF1), la cual se une a uno de los tres sitios catalíticos en el dominio F1 de la enzima, deteniendo así su actividad rotatoria y con ella la hidrólisis del ATP (Bason et al., 2011). Esta proteína ha sido ampliamente estudiada y reportada en los vertebrados, usando como modelos organismos que van desde los peces hasta el hombre, siendo el modelo bovino el más estudiado hasta la fecha. A partir de que Pullman y Monroy en 1963 descubrieron esta proteína inhibidora se han realizado diversas investigaciones acerca de los genes y las proteínas que la codifican, se ha estudiado su función reguladora y la interacción entre la proteína y el complejo ATPasa.

En invertebrados marinos la información sobre las proteínas mitocondriales es escasa. A la fecha no existe información sobre la existencia de algún mecanismo que le permita al camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) adaptarse y sobrevivir en condiciones de hipoxia, evitando el gasto excesivo del ATP celular. De igual forma, tampoco se ha confirmado la existencia de una proteína mitocondrial inhibidora.

Así, el objetivo de esta tesis fue identificar al inhibidor endógeno IF1 mitocondrial del camarón blanco, caracterizar parcialmente la secuencia del ADNc y de la proteína deducida y evaluar los cambios en la expresión génica del inhibidor en camarones en condiciones de hipoxia.

II. ANTECEDENTES

2.1 El Cultivo del Camarón

Los sistemas de cultivo del camarón en México y el mundo han enfrentado serios problemas con patógenos que provocan altas mortalidades durante las dos últimas décadas (Lightner, 2011); aunado a esto, el ambiente marino también se ha visto afectado de manera creciente por el efecto de la hipoxia causada en los océanos por el exceso de los desechos que el hombre vierte al mar (Rabalais et al., 2010). Así, estos organismos se han visto sometidos a factores ambientales cambiantes que provocan estrés, afectando sus tasas de crecimiento y su sobrevivencia (Magallón et al., 2009).

Los sistemas de cultivo provocan que los camarones estén expuestos a variaciones ambientales tales como: fluctuaciones en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, temperatura, salinidad o acumulación de componentes potencialmente tóxicos como amonio o nitrito, mismas que constituyen una fuente potencial de estrés (Mugniera et al., 2008). El estrés es un fenómeno natural que está asociado a una condición desfavorable o fuera de lo estable y que puede ocasionar un estado de debilidad que impide el crecimiento normal y la sobrevivencia de los organismos (Abad-Rosales et al., 2001).

En un cultivo la variable de calidad del agua más crítica es la cantidad de oxígeno disuelto (Magallón et al., 2009). Cuando existen niveles reducidos de oxígeno, el camarón entra en un estado de estrés, provocando cambios en el metabolismo del organismo (Rosas et al., 1999).

En los estanques de cultivo, la concentración de oxígeno disuelto en el agua incrementa durante el día debido a la fotosíntesis de las microalgas, sin embargo, decrece durante la noche debido a la respiración de los organismos y a la descomposición de la materia orgánica acumulada. Durante este período nocturno, el camarón emplea gran cantidad de energía para mantener sus funciones vitales lo que provoca un estado de estrés (Jiang et al., 2009).

2.2 El Ciclo Biológico del Camarón *Litopenaeus vannamei*

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, es una especie de crustáceo de la familia Penaeidae. Nativo del oriente del Océano Pacífico, esta especie se distribuye en las costas desde el estado de Sonora, México hasta Tumbes, Perú, en áreas donde la temperatura es mayor a los 20°C a lo largo del año. Este organismo crustáceo habita aguas con fondos fangosos entre 0 y 72 m de profundidad (Wyban y Sweeny, 1991; Martínez-Córdova y Campaña, 1999).

A lo largo del ciclo biológico de *L. vannamei* existen estadios en los que está expuesto a condiciones de hipoxia y normoxia. Estas condiciones ocurren principalmente en las etapas larvaria y juvenil, en las que el organismo logra adaptarse a estos cambios constantes y concluir el ciclo (Hendrickx, 2001).

Los adultos copulan y desovan en aguas oceánicas costeras a profundidades entre 18 y 27 m. La copulación ocurre durante la muda cuando los machos se pegan a las hembras y les adhieren el saco espermático. Posteriormente, las hembras rompen este espermatóforo para fertilizar los huevos, los cuales son arrojados al agua. Los huevos fertilizados se van al fondo y eclosionan aproximadamente en un lapso de 24 h. Las larvas planctónicas permanecen en aguas oceánicas alrededor de 3 semanas, durante este tiempo se

desarrollan pasando generalmente por 5 fases de nauplio, 3 fases de zoea y 3 fases de mysis (Martínez-Córdova et al., 1999).

Para continuar su desarrollo en la etapa post-larvaria el organismo alcanza los sistemas estuarinos, ya que estas son zonas que tienen características fisicoquímicas, ambientales, y topográficas que le confieren a las larvas condiciones adecuadas, nutrientes y protección. En estas áreas, los camarones juveniles de aproximadamente 0.6 cm adquieren hábitos bentónicos. Los juveniles permanecen dentro o cerca de los sistemas estuarinos hasta alcanzar una talla entre 4 y 10 cm. Posteriormente migran hacia aguas oceánicas en donde completan su madurez para comenzar de nuevo el ciclo (Figura 1; Martínez-Córdova et al., 1999).

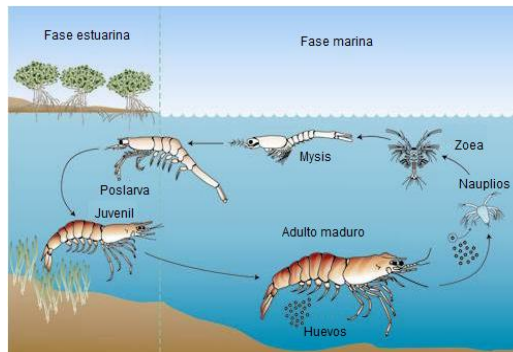


Figura 1. Ciclo biológico del camarón. Fuente: CSIRO (2011).

Los camarones enfrentan variaciones importantes en la concentración de oxígeno disuelto debido a la migración cíclica del mar hacia los estuarios, y a los patrones diarios de fluctuación en el agua. El ciclo de la hipoxia y normoxia en el ambiente marino ésta definido por la acción de las mareas y los vientos, por la estratificación de la columna de agua, como resultado de la fotosíntesis en el período de luz y de la respiración durante períodos de oscuridad (Brown-Peterson et al., 2008).

2.3 La Hipoxia y sus Efectos en los Crustáceos

La baja concentración de oxígeno en el ambiente, también conocida como hipoxia, puede afectar el crecimiento del camarón y cuando su duración se prolonga por varias horas e incluso días, su efecto puede ser letal (Hendrickx, 2001). El agua de mar se considera hipóxica cuando los niveles de oxígeno disuelto son menores a 2.8 mg O₂/L (Cisterna et al., 2008; Belley et al., 2010).

Los límites de tolerancia de oxígeno son variables entre las especies y existe un rango óptimo de tolerancia para cada una. Se conoce que una concentración de oxígeno disuelto en el agua inferior a 2 mg/L es un valor que a menudo se refiere como agua hipóxica (Magallón et al., 2009; Belley et al., 2010). En los camarones se sabe que los niveles letales de oxígeno disuelto oscilan entre 0.2 mg a 1.27 mg/L, y que los límites de tolerancia oscilan entre 2 - 7 mg/L (Pérez-Rostro et al., 2004; Zhang et al., 2006).

Durante el desarrollo de los crustáceos (estadios embrionario o larvario), la hipoxia puede ocasionar un conjunto de respuestas compensatorias en el organismo estas dependen de la duración, la periodicidad y severidad de las bajas concentraciones de oxígeno que podrían resultar en cambios a largo plazo o permanentes en la morfología y/o fisiología del animal y por ende modificar la respuesta a la hipoxia en los adultos (Harper y Reiber, 2006; Belley et al., 2010).

En los organismos, el oxígeno es utilizado en el metabolismo central durante el proceso de respiración y durante la producción de energía química en forma de ATP; sin embargo, en condiciones de hipoxia la energía es obtenida parcialmente del metabolismo anaerobio a través de la producción de lactato, que representa una adaptación fisiológica parcial o total para mantener todas la funciones metabólicas (Pérez-Rostro et al., 2004).

Todos los organismos poseen mecanismos para mantener la homeostasis y sobrevivir a cualquier condición adversa. En condiciones de hipoxia, cuando la demanda de oxígeno excede a la cantidad disponible en el ambiente, el organismo despliega respuestas como el incremento en la capacidad de acarrear el oxígeno de la hemolinfa hacia los tejidos, se altera el metabolismo celular y se facilita la producción de ATP por glucólisis a través de la vía anaerobia (Li y Brouwer, 2007).

Algunos crustáceos activan diferentes mecanismos para sobrevivir a la falta de oxígeno disuelto en el agua. Dichos mecanismos incluyen respuestas fisiológicas rápidas como la respuesta cardio-respiratoria observada en el camarón gigante de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* y en el triops *Triops longicaudatus*. En otras especies se han documentado respuestas a la hipoxia a nivel transcripcional, ya que se disminuye o se incrementa la expresión de genes con funciones específicas como se observa en el camarón de la hierba *Palaemonetes pugio* y en la jaiba azul *Callinectes sapidus* (Cheng et al., 2003; Brouwer et al., 2004; Harper y Reiber, 2006; Brown-Peterson et al., 2008).

Varios estudios han demostrado que cuando una célula es privada de oxígeno, la glucólisis se convierte en la única fuente de ATP celular, lo que provoca una reducción en el pH citosólico debido a los altos niveles de ácido pirúvico y a la acumulación de ácido láctico producida por la glucólisis anaerobia (Rouslin, 1987). Además, la función mitocondrial se ve afectada pues el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial se colapsa debido a la acumulación de moléculas de alta energía NADH , FADH_2^+ y protones, al no encontrarse disponible el aceptor de electrones al final de la cadena respiratoria (el oxígeno). Lo anterior, ocasiona que la actividad de la principal productora de ATP, la F_0F_1 -ATP sintasa se interrumpa, modifique su

actividad e hidroliza el ATP, convirtiéndose así en el principal consumidor de ATP presente en la célula (Green y Grover, 2000).

2.4 La Mitocondria y el Metabolismo Energético

En células de organismos eucariontes, la mitocondria es el organelo citoplasmático en el que se lleva a cabo la respiración celular y es el encargado de producir el 95% de la energía que un organismo requiere para cubrir sus funciones (Lehninger et al., 1995).

Las mitocondrias varían de tamaño y de forma, con frecuencia son elipsoidales con dimensiones de alrededor de $1.0 \times 2.0 \mu\text{m}$ (Figura 2). Una célula puede contener aproximadamente 2000 mitocondrias pero la cantidad de mitocondrias por célula puede variar de acuerdo al tejido y a su función (Voet y Voet, 2006).

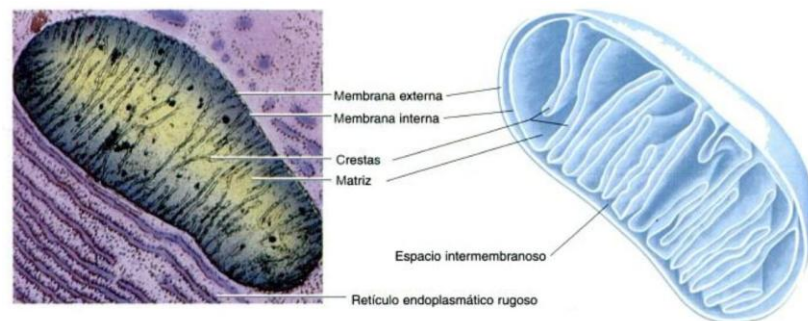


Figura 2. La mitocondria. Izquierda, microfotografía electrónica de una mitocondria animal. Derecha, diagrama de corte de una mitocondria. Fuente: Voet y Voet (2006).

La mitocondria está delimitada por dos membranas altamente especializadas que desempeñan un papel importante en su actividad energética. Las membranas externa e interna definen dos compartimientos: un espacio interno de gran tamaño denominado matriz mitocondrial y un espacio intermembranal que es mucho más estrecho (Alberts et al., 2006).

La membrana externa es una bicapa lipídica que contiene proteínas porinas que son canales por los que pasan iones, metabolitos y polipéptidos; también aquí se encuentran enzimas, receptores que reconocen proteínas citosólicas y proteínas antiapoptóticas. Esta membrana, funciona como un primer tamiz que delimita a la mitocondria logrando que el espacio intermembranal contenga solo líquido, moléculas que entran a través de las porinas, protones y componentes apoptóticos (Sánchez y Arboleda, 2008).

Por otro lado, la membrana interna es impermeable a iones debido a su alto contenido de cardiolipinas, característica que le permite soportar el gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética (Tornero et al., 2002), así como a la mayoría de moléculas pequeñas como el oxígeno, dióxido de carbono y agua, por lo que la matriz mitocondrial, sólo contiene moléculas que pueden ser transportadas selectivamente a través de la membrana mitocondrial interna y su contenido es muy especializado (Alberts et al., 2006).

La membrana mitocondrial interna, es el sitio donde se lleva a cabo la cadena respiratoria, en donde se produce el transporte de electrones y el bombeo de protones con el objetivo final de sintetizar el ATP durante la fosforilación oxidativa. Esta membrana, suele presentar numerosos pliegues denominados crestas, que se proyectan en dirección de la matriz y aumentan en gran medida la superficie donde puede llevarse a cabo la síntesis de ATP (Alberts et al., 2006).

En la mitocondria entran tanto el piruvato proveniente de la glucólisis, como los ácidos grasos provenientes de la β -oxidación y se transforman en acetil CoA para luego ser utilizados en el ciclo del ácido cítrico que reduce NAD^+ a NADH y FAD a FADH_2^+ . Los electrones de alta energía provenientes del NADH y FADH_2^+ son transferidos posteriormente a lo largo de la cadena de transporte

de electrones en la membrana interna hasta el oxígeno. Este transporte de electrones, genera un gradiente de protones a través de la membrana interna que se utiliza para estimular la producción de ATP por el complejo enzimático FoF1-ATP sintasa (Alberts et al., 2006).

2.4.1 La Cadena de Transporte de Electrones

La cadena de transporte de electrones está constituida por 4 complejos enzimáticos (Complejo I-IV, Figura 3), (Stryer, 1995).

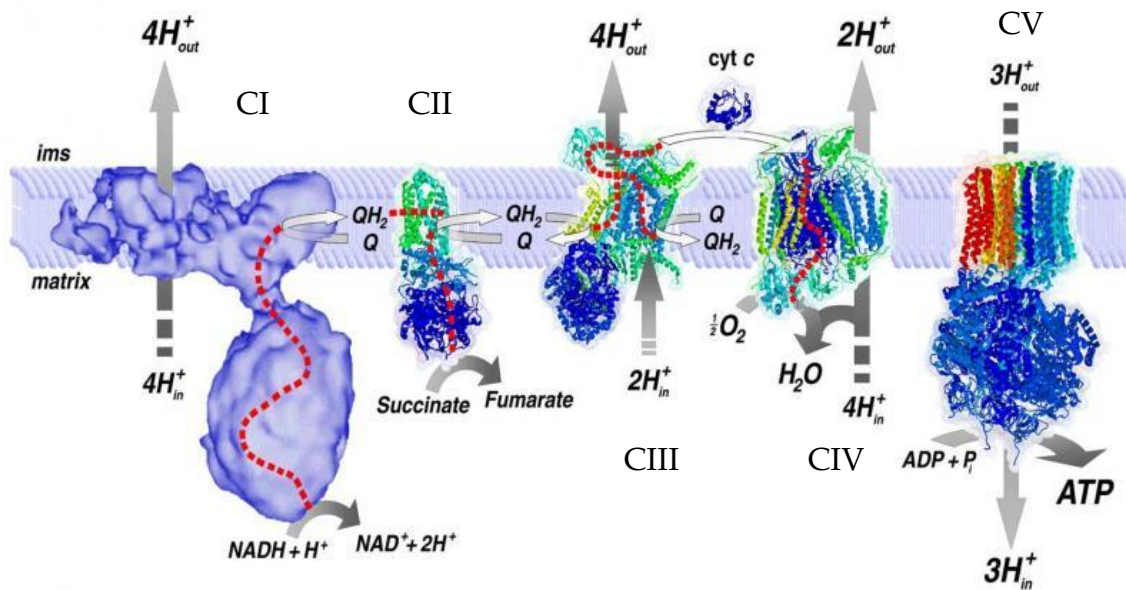


Figura 3. Complejos enzimáticos que participan en la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Modificado de Ugalde (2011). Cada uno de los complejos mitocondriales se encuentra marcado por una C y el número romano que le corresponde.

El complejo I, o NADH deshidrogenasa (EC 1.6.5.3), es la mayor y más compleja de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial (Cardol et al., 2005). Este es uno de los sitios de entrada de los electrones a la cadena respiratoria, que incluye una flavoproteína que contiene flavín mononucleótido o riboflavina-5'-fosfato (FMN) que oxida el NADH (proveniente de la glucólisis) y dos moléculas de ubiquinona, y utiliza la energía libre de Gibbs liberada en

esta reacción rédox para la translocación de cuatro protones a través de la membrana, de la matriz hacia el espacio intermembranal (Karp, 2010; Martínez-Cruz et al., 2012).

El complejo II, o succinato deshidrogenasa (EC 1.3.99.1), el de menor peso molecular de la cadena respiratoria, considerado como una enzima bifuncional pues participa tanto en la cadena de transporte de electrones como en el ciclo de Krebs (Cardol et al., 2005), y se acopla a la oxidación del succinato a fumarato con la reducción de quinona a quinol (QH₂) (Martínez-Cruz et al., 2012). Vale la pena mencionar que este complejo no es una bomba de protones (Stryer, 1995).

El complejo III, o citocromo C oxidoreductasa, o BCI citocromo (EC 1.10.2.2) está formado por 10 subunidades altamente conservadas (Cardol et al., 2005), y funcionalmente está implicado en la transferencia de electrones desde el ubiquinol al citocromo C, y se acopla también a la transferencia de electrones a través de la membrana mitocondrial interna. El mecanismo catalítico protón-motriz del complejo enzimático incluye un ciclo Q que ofrece la eficiencia adicional de la conservación de energía de los electrones transferidos (Martínez-Cruz et al., 2012).

El complejo IV, o citocromo C oxidasa (EC 1.9.3.1), se compone de 12 ó 13 subunidades caracterizadas en levaduras (Cardol et al., 2005), y es la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones, que cataliza la reducción de oxígeno molecular a agua. La reducción de oxígeno por esta enzima también está relacionada con el desplazamiento de cuatro protones a través de la membrana. Este movimiento de los electrones generará el gradiente de protones a través de la membrana interna, el cual se utiliza para estimular la producción de ATP por la ATPsintasa. La citocromo C oxidasa (CO) es el complejo enzimático de la cadena de transporte de electrones cuya función se reduce o

incluso se detiene cuando bajan los niveles de oxígeno (Karp, 2010; Martínez-Cruz et al., 2012).

2.4.2 La Fosforilación Oxidativa y la ATPsintasa

La fosforilación oxidativa ocurre en la mitocondria, y es el proceso por el cual la energía es generada por la F_0F_1 -ATPsintasa, mediante la síntesis de ATP en presencia de oxígeno. Esta enzima, es un complejo multimérico que funciona como un motor molecular transmembranal que es dirigido por el potencial electroquímico (D_{cm}) derivado del gradiente de protones generado por la cadena de transporte de electrones, por lo que establece una relación con la membrana interna mitocondrial (Domínguez-Ramírez y Tuena, 2003; Campanella et al., 2008).

El complejo mitocondrial V o F_0F_1 -ATPsintasa (EC 3.6.1.3) cataliza al menos dos reacciones acopladas: el transporte de protones del espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial y la síntesis de ATP. Está ocurre por medio de la unión de un fosfato (P_i) por un enlace fosfodiéster a un ADP que procede sin la formación de un intermediario fosforilado mediante la fuerza protón-motriz (Domínguez-Ramírez y Tuena, 2003; Cardol et al., 2005).

La F_0F_1 -ATPsintasa mitocondrial comprende un sector F_1 catalítico (compuesto por las subunidades $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$) y un sector F_0 transmembranal hidrofóbico (compuesto al menos de tres subunidades: a, b₂, y C10-12), ambos unidos por una subunidad central y un tallo periférico (Figura 4; Gledhill y Walker, 2005; Martínez-Cruz et al., 2011).

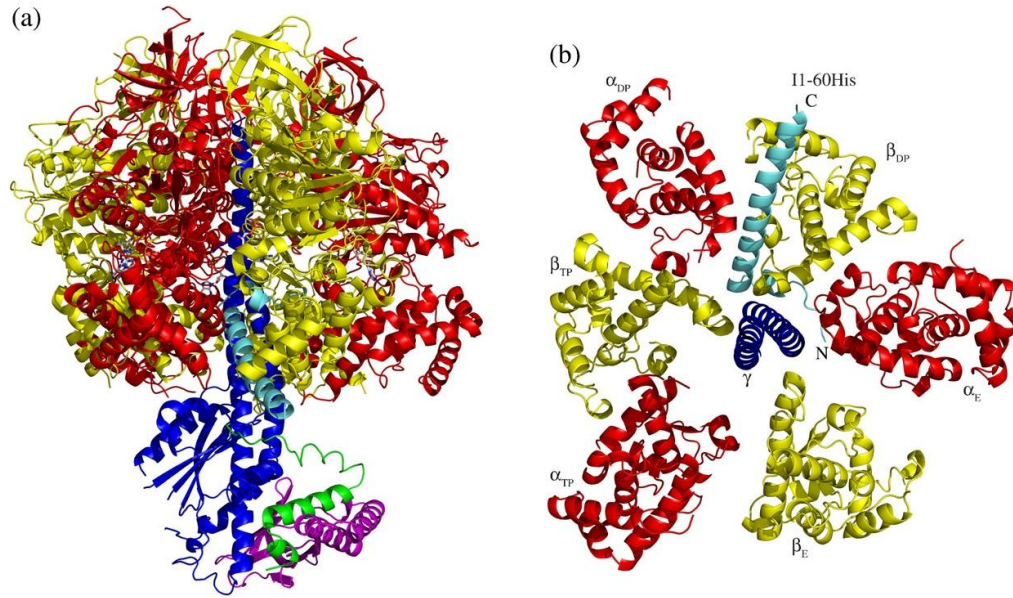


Figura 4. Estructura de F_0F_1 -ATPasa y el inhibidor IF1 bovino. (a) Vista lateral donde se muestran las subunidades α -, β -, γ -, δ -, y ϵ - representadas por la cinta en rojo, amarillo, azul oscuro, magenta y verde, respectivamente. El inhibidor es de color azul claro. (b) Vista transversal de los dominios C-terminales de las subunidades α - y β - de la ATPasa a lo largo del eje de la subunidad γ mostrando las interacciones de la proteína inhibidora con las subunidades de la enzimas. Fuente: Bason et al., (2011).

Debido a que la F_0F_1 -ATP sintasa es capaz de sintetizar el ATP celular en presencia de oxígeno, cuando la célula es privada de éste, la enzima cambia de ATP sintasa a ATPasa y empieza a hidrolizar el ATP presente en la célula (Cabezón et al., 2001).

La dirección en la que rota la F_0F_1 -ATP sintasa para sintetizar o hidrolizar ATP, se basa en el equilibrio entre los parámetros bioenergéticos (potencial de fosforilación y potencial electroquímico) de energía libre de Gibbs disponible. En la respiración normal de la mitocondria, el ATP es removido por la adenina nucleótido translocasa (ANT) garantizando que el potencial intramitocondrial de fosforilación sea relativamente bajo, mientras que el gradiente electroquímico sea alto (estimado entre 150 y 180 mV negativo al citosol), a favor de la fosforilación del ADP. Sin embargo, la disfunción mitocondrial promueve que la F_0F_1 -ATPasa pueda girar “hacia atrás” ó en el

sentido opuesto, actuando entonces como una bomba de protones que consume ATP (Campanella et al., 2009).

2.5 El Inhibidor IF1

En la mitocondria, la actividad hidrolítica de la ATPasa está regulada por una proteína inhibidora endógena llamada IF1 (Inhibidor del Factor 1 de la ATPasa). Este, es un inhibidor proteico pequeño y con composición básica, el cual se une al sector catalítico F1 del complejo enzimático, inhibiendo la actividad de hidrólisis del ATP pero no la síntesis de ATP (Bason et al., 2011).

En condiciones de hipoxia la disminución en el pH promueve que la proteína IF1 inhiba la hidrólisis del ATP deteniendo a la F₀F₁-ATPasa, ocasionado por la acumulación de ácido pirúvico en el citosol y por la acidificación de la matriz mitocondrial (Rouslin y Broge, 1989). Actualmente, se sabe que la unión del inhibidor a la enzima depende del pH y que debajo de la neutralidad se incrementa la capacidad inhibitoria de IF1 (Panchencko y Vinogradov, 1985).

2.5.1 Características y Función del Inhibidor IF1

En 1963, Pullman y Monroy descubrieron unas proteínas hidrosolubles y termoestables en mitocondrias de corazón de bovino que son capaces de inhibir la actividad hidrolasa del F₀F₁-ATPasa (Green y Grover, 2000). Estas proteínas, que constan de 84 aminoácidos básicos y que han sido caracterizadas en la mitocondria de bovinos, ratas, levaduras y plantas, son inhibidores endógenos de la ATPasa mitocondrial; se sabe que su secuencia primaria es altamente conservada, principalmente en los residuos que comprenden la región 14-47 de

la secuencia de bovino, que está definida como la secuencia mínima de inhibición (minimal inhibitory sequence) (Cabezón et al., 2001).

El inhibidor IF1 de los bovinos actúa en forma de dímero, constituido por dos monómeros que se mantienen unidos por una espiral antiparalela enroscada de α -hélices de los residuos 49 a 81 en la región C-terminal de cada uno. Las secuencias mínimas de inhibición, están en los residuos 10-60 de cada monómero y comprenden la región N-terminal que es en gran medida α -hélice. Los sectores de inhibición del dímero que se ubican en los extremos opuestos (el dímero tiene una longitud de extremo a extremo de 130 Å, mientras que la distancia entre las dos regiones inhibitoras es de 62 Å; Figura 5) y puede reaccionar con dos dominios F1 de la ATPasa simultáneamente. Cada sector de inhibición que tiene el dímero se inserta entre las subunidades α_{DP} y β_{DP} del complejo F1 de la ATPasa mediante un mecanismo en el que cada complejo hidroliza dos moléculas de ATP (Cabezón et al., 2000; Bason et al., 2011).

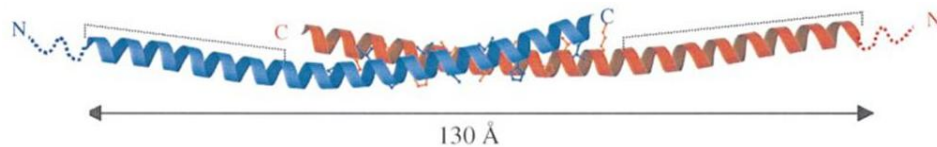


Figura 5. Diagrama de la estructura del dímero activo del inhibidor IF1 de bovinos. Fuente: Cabezón et al., (2001).

2.5.2 Estudio de la Evaluación de la Actividad del Inhibidor

En un estudio realizado por Cabezón et al. (2000) se demostró que la unión de IF1 y la ATPasa es dependiente del pH. Si se reduce el pH hacia la acidez, entonces la capacidad inhibitoria de IF1 aumenta. Cuando las mitocondrias respiran, el pH es relativamente bajo en el citosol y relativamente alto dentro de la matriz donde se lleva a cabo el bombeo de protones para la generación de

ATP. Mientras, que en condiciones de hipoxia o en presencia de un desacoplante de la fosforilación oxidativa, la ATPsintasa hidroliza el ATP siendo la única fuente de ATP la glucólisis anaerobia.

A la fecha, aún se desconoce el mecanismo por el cual el sector F1 de la ATPasa se une al inhibidor IF1 cuando el pH es bajo. Se sugiere, que la proteína de IF1 existe en dos conformaciones, cuando el pH es menor de 6.7 está en dímeros activos cuya estructura es pobre en α -hélices y cuando está a un pH por encima de la neutralidad (7.0 a 8.0), los dímeros pueden ensamblarse formando tetrámeros inactivos u oligómeros superiores mediante la formación de una espiral enroscada antiparalela de las regiones N-terminal (Figura 6; Cabezón et al., 2000).

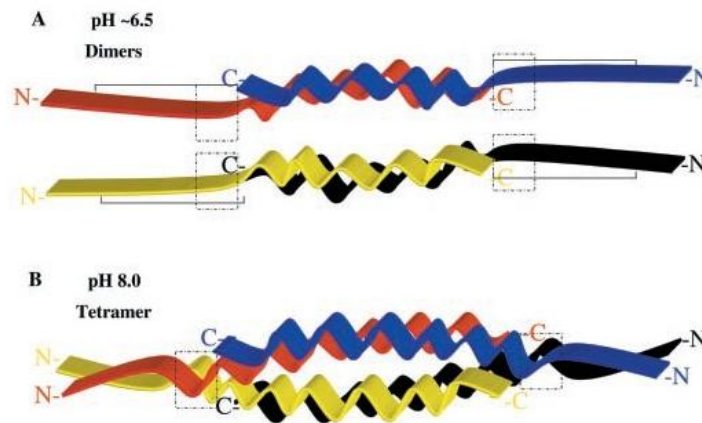


Figura 6. Diagrama de las conformaciones del inhibidor F1 dependiendo del pH. A) Dímeros del inhibidor en un ambiente con un pH de 6.5 en su forma activa; B) Tetrámeros del inhibidor en un ambiente con un pH básico (8.0) en su forma inactiva. Fuente: Cabezón et al., (2000).

En 2011, Bason y colaboradores demostraron que existe una alta afinidad en la unión de IF1 a la F1-ATPasa, basándose en el estudio de mutaciones puntuales en la región N-terminal de la secuencia de aminoácidos del inhibidor IF1, esto es debido a que el proceso de inhibición es altamente

específico y selectivo por especie en el control de la actividad ATPasa. Este hallazgo ofrece la posibilidad de que mediante el uso de mutantes, se puedan diseñar nuevas conformaciones de IF1 y estudiar como inhiben la F1-ATPasa bovina en otros estados aún no caracterizados y determinar los intermedios mediante análisis estructural (Bason et al., 2011).

En los crustáceos, existen escasos estudios sobre las proteínas mitocondriales que conforman la cadena respiratoria. Recientemente Martínez-Cruz et al., (2012) reportaron que en condiciones de hipoxia el camarón responde a la falta de oxígeno incrementando la actividad hidrolítica de la ATPasa mitocondrial, llegando a un punto en donde esta actividad hidrolítica disminuye considerablemente permitiéndole al organismo regular su consumo de ATP y evitando que sufra una pérdida de sus reservas energéticas. En consecuencia esto le permitirá cubrir sus funciones metabólicas básicas y sobrevivir hasta que el oxígeno ambiental se reestablezca.

Basados en lo anterior, y en el hecho de que no existen reportes sobre la existencia de esta proteína inhibidora del tipo IF1 en los crustáceos y tomando en cuenta que los organismos en condiciones de cultivo, enfrentan eventos de hipoxia-normoxia constantemente. Es que este estudio pretende identificar al inhibidor endógeno IF1 mitocondrial del camarón blanco, caracterizar parcialmente las secuencias de su ADNc y de su proteína deducida, y evaluar los cambios en la expresión génica del inhibidor en camarones en condiciones de hipoxia.

III. JUSTIFICACIÓN

Basados en los reportes de la incidencia de eventos hipóxicos en granjas camaronícolas del estado de Sonora y debido a la importancia de la función que cumple la proteína inhibidora IF1 de la ATPasa mitocondrial, se hace imperativo el avance en el conocimiento sobre la biología básica del camarón. Especialmente sobre las funciones mitocondriales y las proteínas que participan en la regulación de la bioenergética del organismo, permitiéndole cubrir sus funciones metabólicas básicas y sobrevivir hasta que el oxígeno ambiental se reestablezca.

IV. HIPÓTESIS

Si la ATPasa mitocondrial del camarón, es capaz de hidrolizar ATP en condiciones de hipoxia, entonces existirá un gen que codifica una proteína inhibitoria del tipo IF1 cuyos niveles de expresión génica variarán en dichas condiciones

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar al inhibidor endógeno IF1 mitocondrial del camarón blanco, caracterizar parcialmente las secuencias de ADNc y evaluar los cambios en la expresión génica en el músculo del camarón en condiciones de hipoxia.

Objetivos Particulares

- 1) Caracterizar parcialmente el ADNc del inhibidor IF1 del camarón blanco y su proteína deducida.
- 2) Evaluar los cambios en la expresión del gen del inhibidor IF1 en el músculo del camarón en condiciones de hipoxia por PCR en tiempo real.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Secuenciación y Caracterización del ADNc del Inhibidor IF1 del Camarón

Utilizando la secuencia de la proteína IF1 bovina se realizó una búsqueda de marcadores de secuencias expresadas (ESTs por sus siglas en inglés) depositadas en la base de datos GenBank para el camarón blanco *L. vannamei* y para otras especies. Se construyó un alineamiento múltiple de secuencias usando el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), donde se analizaron las regiones conservadas y se diseñaron cebadores específicos usando el programa FastPCR (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores específicos para la amplificación de los transcritos del inhibidor del complejo F1-ATP sintasa del camarón blanco *L. vannamei*.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición en el ADN (nucleótidos)
IF1	IF1Fw3	GAAAGGGCGAGCCAGGTGAT	103-122
IF1	IF1Fw4	CTTCAGGAAATTGGAGCAAG	212-231
IF1	IF1Fw5	CGAGTTCACAAGGAGCAAG	272-291
IF1	IF1Fw6	AATTCATTCATCGTCATC	18-35
IF1	IF1Fw7	GAAATTTGGGGATATCCATCTG	361-382
IF1	IF1Rv3	GGATATCCCCAAATTCAGCA	377-357
IF1	IF1Rv4	GATGGCATCTTTGTGAGCC	314-296
IF1	IF1Rv5	CTTGCTCCTTGTTGGAAGCTCG	291-272
IF1	IF1Rv6	CACTGCTACTTTACTAAGTTG	579-559
IF2	IF2Fw1	CCAGTCAAGGGAAGGAGAAG	203-222
IF2	IF2Rv1	TCAGCTCATTGACGTTCC	392-373

6.1.1 Aislamiento, Cuantificación e Integridad del ARN Total

Para amplificar los transcritos de IF1 del camarón se extrajo ARN total a partir de 150 mg de hepatopáncreas de organismos sanos utilizando el reactivo TRIzol® reagent (GIBCO, Life Technologies, USA) (Chomczynski y Sacchi, 1987). El pellet de ARN total se resuspendió en 30 µL de agua dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% y se cuantificó por triplicado en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (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% (agarosa-SYBR® Safe (GIBCO, Life Technologies, USA)) y libre de RNAsas. Se utilizó 1 µg de ARN total y 3 µL de buffer carga 6X, la mezcla se incubó por 10 min a 65 °C en un thermomixer comfort (Eppendorf, Alemania) y el total de la muestra se cargó en el gel, el cual se corrió a 60 volts por 1 h con buffer TAE 1X.

6.1.2 Eliminación del ADN Genómico y Síntesis del ADNc

Para eliminar la contaminación por ADN genómico (ADNg) de las muestras de ARN total, se utilizó la enzima recombinante DNAsa I (2.5 U/µg de ARN) (ROCHE, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y 1.5 µg de ARN total. Una vez terminado el tratamiento, se realizó un PCR para verificar la eliminación de ADNg, usando el kit comercial TopTaq DNA polymerase (QIAGEN, USA), cada reacción incluyó: 2.5 µL de buffer 10X TopTaq PCR, 2.5 µL de colorante, 5 µL de solución Q, 0.5 µL de dNTPs 200 µM, 0.5 µL de cada uno de los cebadores específicos 20 µM, 0.125 µL de la enzima TopTaq, 150 ng de ARN total tratado y agua hasta un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 3 min a 95 °C (1 ciclo); 45 s a 95 °C, 1 min a 50 °C y 2 min a 72 °C (35 ciclos) y una extensión de 10 min a 72 °C en un

termociclador DNA Engine ® Peltier Thermal Cyler (Bio-Rad, USA). La síntesis de ADN complementario (ADNc), se realizó utilizando el kit comercial QuantiTect® Reverse Transcription (QIAGEN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y 1 µg de ARN total tratado.

6.1.3 Amplificación del ADNc de IF1 y Secuenciación

Una vez sintetizado el ADNc, éste se utilizó como templado para amplificar diferentes fragmentos de IF1 usando los cebadores específicos y siguiendo el protocolo previamente descrito. En cada reacción se usaron 150 ng de ADNc y las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 2 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 3 min a 72 °C, 1 min a 94 °C, 1 min a 42 °C y 1 min a 72 °C (1 ciclo); 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C (33 ciclos) y una extensión de 10 min a 72 °C. Posteriormente, los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con SYBR Safe ® DNA gel stain (Invitrogen, CA). Posteriormente fueron purificados utilizando columnas NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los diferentes productos amplificados se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática de la Universidad de Arizona (USA).

Las secuencias nucleotídicas y las secuencias deducidas de aminoácidos, se compararon con las bases de datos de nucleótidos no redundantes y de proteínas utilizando el algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990); los alineamientos fueron realizados con el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994). Las secuencias deducidas de aminoácidos se obtuvieron usando las herramientas del software Expasy (<http://au.expasy.org/tools/>). Para el análisis de las secuencias de las proteínas mitocondriales fue empleado el software Mitoprot (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros y Vincens, 1996).

6.2 Análisis Filogenético del Inhibidor IF1

Se llevó a cabo un análisis filogenético usando la secuencia completa de aminoácidos del inhibidor IF1 de vertebrados e invertebrados. Para elaborarlo, se realizó una comparación con la base de datos de proteínas que tuvieran el dominio IATP utilizando el algoritmo BLASTx (Altschul et al., 1990). Las secuencias del inhibidor IF1 analizadas se muestran en la Tabla 2. La secuencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizada para enraizar el árbol.

Tabla 2. Inhibidor IF1 de los organismos usados en el análisis filogenético.

Nombre común	Nombre científico	No. Referencia GenBank
Vertebrados		
Toro	<i>Bos taurus</i>	NP_787010.1
Ratón	<i>Rattus norvegicus</i>	AAA41360.1
Puerco	<i>Sus scrofa</i>	NP_001090955.1
Hombre	<i>Homo sapiens</i> isoforma 1	NP_057395.1
Invertebrados		
Piojo	<i>Pediculus humanus corporis</i>	XP_002433204.1
Acaro	<i>Metaseiulus occidentalis</i>	XP_003745769.1
Garrapata	<i>Ixodes scapularis</i>	XP_002399280.1
Garrapata	<i>Ornithodoros parkeri</i>	ABR23451.1
Mosquito	<i>Culex quinquefasciatus</i>	XP_001842173.1
Mosquito	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001648854.1
Mosca de la fruta	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAL48937.1
Mosca de la fruta	<i>Drosophila erecta</i>	XP_001976392.1
Polilla	<i>Bombyx mori</i>	NP_001091821.1
Abejorro	<i>Bombus terrestris</i>	XP_003401492.1
Abejorro	<i>Bombus impatiens</i>	XP_003487447.1
Avispa	<i>Nasonia vitripennis</i>	XP_001602785.2
Abeja	<i>Apis florea</i>	XP_003695926.1
Gorgojo	<i>Tribolium castaneum</i>	XP_971550.1
Hormiga	<i>Solenopsis invicta</i>	EFZ13965.1
Hydra	<i>Hydra magnipapillata</i>	XP_002164073.1
Anemona de mar	<i>Nematostella vectensis</i>	XP_001625547.1
Erizo de mar	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_785704.2
Cangrejo	<i>Procambarus clarkii</i>	AEB54654.1
Camarón	<i>Litopenaeus vannamei</i>	KF306266
Fungi		
Levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010100.1

El análisis filogenético se realizó con el método Neighbor-joining que permite inferir la historia evolutiva, basado en la matriz Jones-Taylor-Thornton que calcula las distancias evolutivas y 1000 réplicas en la prueba bootstrap para calcular el porcentaje de árboles replicados en la que los taxones asociados se agrupan usando el software MEGA versión 4 (Tamura et al. 2007).

6.3 Evaluación de los Cambios en la Expresión del Gen del Inhibidor IF1 del Camarón en condiciones de Hipoxia

6.3.1 Muestras de ARN Total Provenientes del Bioensayo en Condiciones de Hipoxia

Las muestras de ARN total de músculo de camarón que se utilizaron en esta parte del estudio se obtuvieron del bioensayo previamente realizado en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., localizado en la ciudad de la Paz, B.C.S., México, hecho y descrito por Martínez-Cruz et al. (2012).

Dicho bioensayo se llevó a cabo con camarones adultos (*L. vannamei*) con un peso de 30 ± 1 g cada uno. Los organismos fueron distribuidos aleatoriamente en 3 tanques circulares de plástico (100 cm de diámetro) con 300 L de agua de mar, y se mantuvieron durante 8 días bajo condiciones controladas a 28°C, 35 ppm de salinidad, y 6 mg/L de oxígeno disuelto en normoxia durante la aclimatación. Los camarones de cada tanque (n=30) fueron alimentados dos veces al día con alimento comercial (35% de proteína), y el alimento no consumido y las heces se removieron todos los días por sifoneo y el 70% del volumen total de agua se cambió diariamente.

Después de la aclimatación, se muestrearon tres camarones de cada uno de los tres tanques en normoxia (6.0 mg/L) como controles, y subsecuentemente los camarones fueron expuestos a hipoxia. Las condiciones hipóxicas se

establecieron en los tanques experimentales usando una cubierta plástica y reemplazando el suministro de aire por gas nitrógeno (99% de pureza) burbujeado gradualmente. La concentración de oxígeno en el agua fue cuidadosamente controlada a lo largo del experimento en cada tanque y controlada continuamente con un oxímetro digital sumergible. Durante la fase de hipoxia se tomaron muestras de organismos en tres diferentes tiempos de exposición: 1) la concentración de oxígeno se redujo gradualmente de 6 a 2 mg/L durante 3 h, los organismos se mantuvieron bajo esta condición 3 h más y luego de cada tanque se tomaron 3 camarones como muestra; 2) la concentración de oxígeno se redujo a 1.5 mg/L durante 6 h y se tomaron muestras nuevamente, posteriormente 3) la concentración de oxígeno se restableció inyectando de nuevo oxígeno hasta 2 mg/L y se mantuvo esta condición durante 6 h, pasado este tiempo se tomaron muestras. Finalmente, durante la re-oxigenación los tanques fueron aireados vigorosamente durante 3 h hasta que la concentración de oxígeno en el agua alcanzó 7.0 mg/L. Los camarones se mantuvieron en estas condiciones por 3 h y se tomaron las muestras. El bioensayo tuvo una duración de 24 h totales desde la normoxia.

Cada camarón fue pesado y se le extrajo hemolinfa. Posteriormente cada uno fue decapitado y el músculo abdominal fue disectado, pesado y preservado en nitrógeno líquido para después ser almacenado a -20°C hasta su uso. A partir de cada muestra de músculo se extrajo el ARN total y se cuantificó siguiendo la metodología antes mencionada. Un total de 20 muestras (4 muestras por cada tratamiento) se utilizaron para evaluar la integridad del ARN total y se eliminó la contaminación por ADN genómico (ADNg) y se sintetizó el ADN complementario (ADNc) siguiendo las metodologías antes mencionadas. Los ADNcs sintetizados se utilizaron para realizar la cuantificación del inhibidor IF1 a través de PCR en tiempo real (qPCR).

6.3.2 Cuantificación del ARNm de IF1 por PCR en Tiempo Real

La cuantificación del ARNm del inhibidor IF1 en el músculo del camarón se realizó por qPCR, usando un sistema de detección de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied biosystems, USA). Se evaluó la expresión del inhibidor IF1 y del gen de la proteína ribosomal L8 (DQ316258) como control interno (Tabla 3), usando el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Para cumplir con los requisitos del método se realizaron los rangos dinámicos de cada gen, a partir de diluciones seriadas 1:5 de ADNc (v/v). Para construir el rango dinámico del gen ribosomal L8 se utilizaron 150 ng de ADNc como concentración inicial, mientras que en el caso del inhibidor IF1 se utilizó una concentración inicial de 100 ng de ADNc. Las diluciones se prepararon con agua estéril cada dilución fue amplificada por triplicado.

Las condiciones de amplificación fueron: 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 53 °C (IF1) ó 1 min a 61 °C (L8), 35 s a 72 °C, posteriormente 1 min a 95 °C y 1 min a 53 °C ó 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.

Tabla 3. Cebadores específicos utilizados para la cuantificación del ARNm de los genes IF1 y L8

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Posición en el ADN (nucleótidos)	Tamaño de amplicón
IF1	IF1Fw7	GAAATTTGGGGATATCCATCTG	361-382	177 pb
IF1	IF1Rv6	CACTGCTACTTTACTAACTTG	579-559	
L8	L8Fw4	CAGAACGTCATGGATACC	145-162	134 pb
L8	L8Rv4	CCGCAGTAGACAAACTG	313-297	

Una vez obtenida la ecuación lineal a la que se ajustó cada grupo de datos, se calculó la eficiencia de amplificación (E) de cada gen usando la fórmula $E = [(10^{(-1/\text{pendiente})}) - 1] \times 100$ y se compararon las eficiencias de ambos genes de acuerdo al método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Para evaluar las muestras del bioensayo, se llevó a cabo la cuantificación por triplicado y cada reacción consistió en 10 μL de mezcla iQ SYBR® green supermix 2 X (Bio-Rad, USA), 0.7 μL de cada uno de los cebadores específicos 5 μM , 50 ng de ADNc (equivalentes a 50 ng de ARN total) y agua estéril hasta un volumen final de 20 μL . En cada corrida de PCR se incluyeron controles negativos sin templado.

Se utilizó el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para calcular los cambios en la expresión génica del inhibidor IF1 (Livak y Schmittgen, 2001). Brevemente, el cálculo está basado en el valor del C_q (ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la fluorescencia basal) de cada muestra durante la amplificación y la fórmula general utilizada fue: $2^{-((C_q\text{IF1}-C_q\text{L8})\text{Xmg/L}-(C_q\text{IF1}-C_q\text{L8})6\text{mg/L})}$ en donde:

- C_q IF1 = C_q del inhibidor IF1
- C_q L8 = C_q del gen ribosomal L8
- Xmg/L = Condición experimental (durante hipoxia)
- 6mg/L = Condición control (normoxia)

Los resultados fueron expresados como el cambio en la expresión génica del inhibidor IF1 normalizada con respecto a la expresión del gen ribosomal (L8) y relativa a la condición de normoxia (6 mg/L).

6.4 Análisis Estadístico

Se realizaron pruebas para determinar la distribución normal de la muestra y se verificó la homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos mediante la prueba de Levene. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y para la comparación de las medias se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey utilizando el programa estadístico NCSS 2007, considerando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización del Inhibidor IF1 del Camarón Blanco

A partir del hepatopáncreas se obtuvo una secuencia completa de ADNc del inhibidor IF1 de 550 pb que incluye en la posición 1 el codón de inicio (ATG) y el codón de término (TAA) en la posición 316. La región codificante de 315 pb comprende en su extremo 5' - al péptido señal de 63 pb (nucleótidos 1 a 63) y a la proteína madura que corresponde a 252 pb (nucleótidos 64 a 315). El extremo 3'-UTR de la secuencia comprende una región de 256 pb, que incluye la señal de poliadenilación de la posición 501 a 506 y la cola poli A (Figura 7).

```
-35 GTGGAGCGGCCCTTCAAGAATTCATTCATCGTCATCATGGCTCTGCGACAGACTTCTCTTTTGGCCCTTCGCTCACCCCTG
  1      M A L R Q T S L L R L R S P L
46 GCTGTGTGTGTGCGAAGCATGGGAAAGGGCGAGCCAGGTGATGGGGCTGGCCGTGGTGGAGGAAGTGGTGGCACAATCAGG
 16 A V C V R S M G K G E P G D G A G R G G G S G G T I R
127 GATGCTGGTGGTGCCTTCGGCAAGCGTGAGGCAGCACAAGAAGAACAGTACTTCAGGAAATTGGAGCAAGAACAGTTGAAA
 43 D A G G A F G K R E A A Q E E Q Y F R K L E Q E Q L K
208 AAGTTAAAAAAGGGCCCTCAAAGGAAATCGAGTTCACACAAGGAGCAAGTGGAGGCTCACAAAGATGCCATCAAAGGCAC
 70 K L K K G L Q K E I E F H K E Q V E A H K D A I K R H
289 GAGGAACGTCTGAATGAGCTGAAGTAAAGAGGATGCTGAAATTTGGGGATATCCATCTGTATTGCAACTGCATCATTCTG
 97 E E R L N E L K *
370 GGAAGAAGTAATTACAAGGAGAAAAAATGCATCTATTTTCAGTTTTTGTCTTTTACTGATTCAAAAAAGATGCATTATTTTC
450 ATGGTAAAAAATATATATACATATATATATATATAAATGGTATGATGTTAATATAATGGCTTTGATTATCAAGTTAG
532 TAAAGTAGCAGTGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Figura 7. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de la proteína inhibidora IF1 del camarón blanco *L. vannamei*. Los codones de inicio y término se encuentran enmarcados; la señal de poliadenilación y la cola poli A se encuentran doblemente subrayadas; los aminoácidos que corresponden al péptido señal se encuentran subrayados. Los aminoácidos resaltados en negro indican el dominio de inhibición IATP. Enmarcados, se encuentran los aminoácidos flanqueantes que están implicados en estabilizar al complejo formado entre IF1 y FoF₁-ATPasa.

La secuencia del ADNc del inhibidor IF1 del camarón blanco, presenta un 68% de identidad con el langostino *Procambarus clarkii* (HQ414578.1) y que es la única secuencia reportada en el GenBank para un crustáceo. Así como con algunas especies de insectos, tiene un 51% de identidad con la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (AY071315.1) y un 50% con el mosquito *Aedes aegypti* (XM_001648804.1). Se encontró menor identidad con algunas especies de vertebrados, un 43% con el toro *Bos taurus* (NM_175816.3) y un 45% con el humano *Homo sapiens* isoforma 1 (NM_016311.4).

La proteína deducida del inhibidor IF1 del camarón está conformada por 104 residuos y presenta un 71% de identidad con el langostino *Procambarus clarkii* (AEB54654.1), y con algunas especies de insectos como *D. melanogaster* (55%, AAL48937.1) y *A. aegypti* (52%, XP_001648854.1); también se encontró identidad con algunas especies de vertebrados como *B. taurus* (44%, NP_787010.1) y *H. sapiens* isoforma 1 (43%, NP_057395.1).

El péptido señal de la proteína inhibidora, comprende de los residuos 1 al 21 de los cuales 4 están cargados positivamente y ninguno cargado negativamente, esta secuencia de aminoácidos le indica a la proteína, el organelo al cual debe dirigirse para cumplir su función y le proporciona estabilidad para que interactúe con la membrana del organelo. Cuando la proteína ha atravesado la membrana, una peptidasa procesa el péptido señal para generar a la proteína madura (Sánchez y Guerrero, 1982). Asimismo, se encontró una diferencia importante en el tamaño del péptido señal, entre las especies de vertebrados que se encuentran establecidos y el camarón, siendo la proteína madura de los crustáceos, como el camarón blanco y el langostino, de un tamaño ligeramente mayor que el del resto de las especies incluidas en este análisis (Figura 8).

La proteína madura del camarón blanco *L. vannamei* está codificada por 83 residuos (22 a 104), tiene una masa molecular calculada de 9.24 kDa y un punto isoeléctrico de 8.93. Lo anterior concuerda con lo reportado por Faccenda y Campanella (2012) para las proteínas inhibidoras IF1, puesto que están formadas por una secuencia de 81 a 84 aminoácidos. En la secuencia IF1 del camarón, también se identificó el dominio conservado IATP (Mitochondrial ATPase Inhibitor) que pertenece a las proteínas inhibidoras del tipo IF1 de la posición 40 a la 73 que corresponde a 34 residuos (Figura 8).



Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína inhibidora del complejo F1-ATPasa en diversas especies animales. En el extremo N-terminal los aminoácidos subrayados indican el péptido señal. Las histidinas (H) relacionadas con el cambio conformacional del inhibidor están doblemente subrayadas, y los residuos que forman el dominio IATP están enmarcados. Los residuos esenciales para la capacidad inhibidora están sombreados en negro. Los residuos idénticos se encuentran marcados con asterisco, los que presentan similitud alta con dos puntos y los residuos con similitud débil con punto.

La proteína deducida del inhibidor IF1 del camarón *L. vannamei* cuenta con cinco de los seis aminoácidos esenciales para la actividad inhibitoria que se encuentran en las posiciones F48, R51, E52, A53, E56 y Y59, los cuales son homólogos a los residuos F22, R25, E26, Q27, E30 y Y33 de la secuencia IF1

bovina reportados por Faccenda y Campanella (2012). Entre los aminoácidos mencionados se encontró que F22, E26 y E30 pueden interactuar con los residuos de la subunidad β de la F_0F_1 -ATPasa, que son importantes en la catálisis y/o regulación de la enzima y de esta manera detener la hidrólisis del ATP (Ichikawa et al., 2005).

En la secuencia de la subunidad β del camarón blanco *L. vannamei* reportada por Martínez-Cruz y colaboradores (2011) (GenBank no. GQ848644) se identificó a los residuos β R408 y β E454 que se encuentran en sitios conservados, y que se sugiere son los sitios de contacto de la ATPasa con los residuos F48, E52 y E56 del inhibidor IF1 del camarón, que permiten la inhibición de la hidrólisis del ATP.

De manera adicional, se identificaron en la proteína deducida del inhibidor del camarón varios residuos que flanquean el dominio IATP y que en el modelo bovino parecen estar implicados en dar estabilidad al complejo formado entre IF1 y F_0F_1 -ATPasa (Cabezón et al., 2003). Así mismo se detectó, hacia el extremo N-terminal a los residuos G36, S37, G38, G39 y hacia el extremo COOH-terminal se detectaron nueve residuos (G74, L75, Q76, K77, E78, I79, E80, F81 y H82); sin embargo, al ser secuencias no conservadas entre especies, será necesario determinar la posible participación de estos aminoácidos de la proteína del camarón en la interacción mediante el análisis de su estructura terciaria.

Basados en lo anterior se sugiere que el inhibidor de *L. vannamei* posee una estructura dimérica y no como un tetrámero como ha sido reportado previamente para las proteínas inhibitoras de los mamíferos, (Panchenko y Vinogradov, 1985). Esto, debido a que la secuencia del camarón carece de los residuos de histidina en las posiciones H48, H49, H55, H56 y H70 de la secuencia bovina teniendo en su lugar los residuos G74, L75, F81, H82 y H89. De

acuerdo a lo reportado por Schnizer y colaboradores (1996), el residuo H49 es esencial para el cambio de conformación de la proteína, en el caso del inhibidor de *L. vannamei* se encontró en la posición homóloga un residuo L75, por lo que se desconoce si la proteína es capaz de realizar un cambio conformacional.

Como un resultado interesante, se detectó en la secuencia IF1 del camarón un residuo H89 que se encuentra conservado sólo en las secuencias de IF1 de invertebrados (Figura 8) y en una región cercana al sitio donde se localizan los residuos H que permiten el cambio conformacional de la proteína de dímero a tetramero, por lo que se sugiere el análisis de este residuo en particular en la secuencia plegada del camarón a través de un modelo predictivo basado en la estructura de la proteína bovina.

En 1985, Panchenko y Vinogradov reportaron que las proteínas inhibitoras pueden actuar sólo como dímeros por lo que se sugiere que la proteína del camarón se active cuando baja el pH como lo reportan Ichikawa y colaboradores (2001) y Ando e Ichikawa (2008). Ambos trabajos mencionan que los residuos E26 y E30 de la secuencia bovina y E21 de *Saccharomyces cerevisiae* homóloga a E26 bovina, le confieren a la proteína la sensibilidad al pH para actuar sólo cuando este sea menor a 6.5. En la proteína inhibidora IF1 del camarón, se encuentran presentes estos dos residuos (E52 y E56), por lo que le podrían conferir la sensibilidad al pH para cumplir su función.

Ando e Ichikawa (2008) estudiaron la secuencia IF1 bovina y propusieron que el aminoácido E26 provoca la disociación (pH básico) o asociación (pH ácido) de su grupo carboxilo, afectando la conformación o la dirección de la cadena lateral del E30, y como resultado se observa que el complejo desestabiliza o estabiliza la interacción entre el inhibidor IF1 y el complejo F1 de la F₀F₁-ATPasa, ambos aminoácidos se encuentran en la secuencia del camarón en las posiciones E52 y E56.

7.2. Caracterización de la Secuencia Parcial de la Isoforma 2 de IF1 del Camarón Blanco

La secuencia parcial de ADNc de una isoforma putativa de la proteína inhibidora del tipo IF1 del camarón, denominada isoforma 2 (IF1-2). Está incluye el codón de inicio (ATG) en la posición 1 y el codón de término (TAG) en la posición 195. La región codificante de 195 pb, comprende a la proteína madura que corresponde a 99 pb (nucleótidos 54 a 153). El extremo 3'-UTR de la secuencia comprende una región de 397 pb, que incluye la señal de poliadenilación de la posición 541 a 546 (Figura 9).

```

-39 GGAGTAAAGACGCATTAACCTTCATTGTGTGTGCGAAGCATGGGAAAGGGCGAGCCAGGTGATGGGGCTGGCCGTGGTGGAA
  1                                     M G K G E P G D G A G R G G

43  GGAAGTGGTGGCACAATCAGGGATGCTGGTGGTGCCTTCGGCAAGCGTGAGGCAGCACAAGAAGAACAGTACTTCAGGAAA
15  S G G G T I R D A G G A F G K R E A A Q E E Q Y F R K

124 TTGGAAGAAGAGCAGATGAAGAAGCTGAAGGATTTACAGTCCAGTCAAGGGAAGGAGAAGAAACCAAAATAGTGATAGCTT
42  L E E E Q M K K L K D L Q S S Q G K E K K P K *

205 CAAGATTGAATGTTTTCAATGACGTATGGAGCAAGAACCAGTTGAAAAAGTTAAAAAAGGGGCTTCAAAGGAAATCGAGT
286 TTCCTCAAGGAGCAAGTGGAGGCTCACAAAGATGCCATCAAAAGGCACGAGGAACGTCTGAATGAGCTGAAGTAAAGAGGA
367 TGCTGAAATTTGGGGATATCCATCTGTATTGCAACTTGCATCATTCTGGGAAGAGTAATTACAAGGAGAAAAAATGCAT
448 CTATTTTCAGTTTTTGTTTTTTACTGATTCAAAAAAGATGCATTATTTTCATGGTAAAAAATATATATACATATATATATA
529 TATAATTGGTATGATGTAAATATAAATGGCTTTGATTATCAAGTTAGTAAAGTAGCAGTGCCTAAC

```

Figura 9. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de la isoforma putativa IF1-2 de la proteína inhibidora IF1 del camarón blanco *L. vannamei*. El codón de término se encuentra enmarcado; la señal de poliadenilación se encuentra doblemente subrayada.

La secuencia parcial del ADNc de la IF1-2 del camarón blanco presenta un 32% de identidad con el langostino *Procambarus clarkii* (HQ414578.1), un 30% con algunas especies de insectos como *D. melanogaster* (AY071315.1) y *Apis florea* (XP_003695926.1); y, 33% con el vertebrado *B. taurus* (NM_175816.3) y 34% con la anémona de mar *Nematostella vectensis* (XP_006125547.1).

Las proteínas deducidas del inhibidor IF1 y IF1-2 del camarón presentan una identidad del 50% entre ellas, este valor es bajo debido a que IF1-2 carece de péptido señal (Figura 10) y la proteína está constituida de sólo 64 aminoácidos mientras que IF1 tiene un péptido señal y está constituida de 83 residuos. Ambas proteínas cuentan con el dominio conservado IATP, y también con los residuos que son esenciales para la función inhibidora que se encuentran en IF1-2 en las posiciones F27, R30, E31, A32, E35 y Y38, mientras que en IF1 se localizan en las posiciones F48, R51, E52, A53, E56 y Y59. Así mismo, los residuos flanqueantes implicados en estabilizar el complejo formado entre IF1 y F₀F₁-ATPasa se localizaron en la secuencia de IF1-2 en las posiciones G15, S16, G17, G18 del extremo N-terminal estando conservadas entre las dos isoformas del camarón, mientras que en la región que flanquea el extremo C-terminal del dominio IATP se encontraron en IF1-2 los residuos D52, L53 Y Q54 a E80, F81 y H82 del inhibidor del camarón (Figura 10).

```

L.vannameiIF1-2      -----MGKGE PGDGAGRGG GSGG TIRDAGGAFGKREAAQEEQYF 39
L.vannamei IF1      MALRQTSLRLRLRSPLAVCVRS MGKGE PGDGAGRGG GSGG TIRDAGGAFGKREAAQEEQYF 60
                      *****

L.vannameiIF1-2      RKLEEEQMKLK-----DLQSSQGKEKKPK----- 64
L.vannamei IF1      RKLEQEQLKLLKGLQKEIEFHKEQVEAHKDAIKRHEERLNLK 104
                      ****:*:*:*:*          :...*  : :*

```

Figura 10. Alineamiento de las secuencias deducidas de las proteínas inhibidoras del complejo F₁-ATPasa del camarón. En el extremo N-terminal se encuentra el péptido señal subrayado, los residuos flanqueantes que parecen estar implicados en estabilizar el complejo formado entre IF1 y F₀F₁-ATPasa enmarcados, los residuos que forman la proteína madura (negro) y los residuos que son esenciales para la actividad inhibidora están doblemente subrayados. Los residuos idénticos se encuentran marcados con asterisco, los que presentan similitud alta con dos puntos y los residuos con similitud débil con punto.

La proteína putativa de esta isoforma del inhibidor de *L. vannamei* presenta similitud con las proteínas MAI-2 y MAI-1 del nematodo *Caenorhabditis elegans* reportadas por Ichikawa y colaboradores (2006), quienes determinaron

que ambas proteínas cumplen con la función de inhibidor a la F₀F₁-ATPasa mitocondrial de la misma forma que lo hacen las proteínas inhibidoras del tipo IF1. En el estudio mencionado, se localizaron las proteínas usando un anticuerpo marcado con la proteína verde fluorescente, sus resultados indican que MAI-2 es una proteína mitocondrial y MAI-1 es una proteína citosólica (carece de péptido señal), basados en esta información los autores proponen que MAI-1 al entrar en contacto con la proteína calmodulina (CaM) puede actuar sobre las ATPasas exógenas de la mitocondria. Basados en nuestros resultados se sugiere que IF1-2 tiene similitud con MAI-1 debido a que ambas proteínas carecen de péptido señal y existe una identidad del 20% entre ellas (Figura 11).

```

C.elegansMAI1      MSGSGSGAGHGGGSGGSIREAGGSLGMMGATREEEYFRRQQKDQLDNLKKKLEADMTQ 60
L.vannameiIF1-2   MGKGEPGDGAGRGGGSGGTIRDAGGAFGKREAAQEEQYFRKLEEEQMKKLK-----DLQS 55
                  * . . . * . * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

C.elegansMAI1      SQQEIRDHEKVLEQHQQRLKEIEKGHGT 88
L.vannameiIF1-2   SQG-----KEKKPK----- 64
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de las proteínas inhibidoras del complejo F1-ATPasa MAI-1 del nematodo *C. elegans* y IF1-2 del camarón *L. vannamei*. Los residuos idénticos se encuentran marcados con asterisco, los que presentan similitud alta con dos puntos y los residuos con similitud débil con punto.

De acuerdo a lo reportado por Liang y colaboradores (2010) en *L. vannamei* existe una proteína BP53 que es homóloga a la subunidad β de la ATPasa mitocondrial, la cual se ubica en la membrana plasmática. De acuerdo a sus resultados, estos autores propusieron que BP53 podría cumplir con la misma función de la subunidad β debido a que contiene tres dominios conservados. Basándonos en esta evidencia, y en nuestros resultados se sugiere que la proteína putativa IF1-2 podría participar en la inhibición de la proteína ATPasa exógena a la mitocondria, tal y como sucede en *C. elegans* (Ichikawa et al., 2006)

En 2012, Wang y colaboradores reportaron que en *L. vannamei* se encuentran presentes V-H ATPasas y NaK-ATPasas en las membranas plasmáticas e intracelulares que tienen diferentes respuestas al estrés ambiental. Así mismo, esta reportado por Futai y colaboradores (2000) que las V-ATPasas funcionan como hidrolasas del ATP, debido a que bombean protones de un compartimiento citoplasmático a otro, por lo que se sugiere que la proteína putativa IF1-2 podría interactuar sobre las V-ATPasas e impedir que hidrolicen el ATP cuando exista alguna condición adversa para la célula.

7.3. Análisis Filogenético del Inhibidor IF1 de vertebrados e Invertebrados

El análisis filogenético de 25 secuencias deducidas de aminoácidos del inhibidor IF1 de vertebrados e invertebrados, incluyendo la de *L. vannamei*, resultó en un árbol óptimo con la suma de la longitud del ramal de 7.79136907 y el porcentaje de la prueba bootstrap que se muestra adyacente a cada rama (Figura 12).

La figura 12 muestra que el árbol filogenético está constituido por tres grandes clados: Unicelulares (A), vertebrados (B) e invertebrados (C). Específicamente el inhibidor del camarón se agrupó en un clado que incluye invertebrados marinos, separado de los vertebrados con un 97% de soporte. El clado que incluye a todas las especies de invertebrados marinos está separado de los invertebrados terrestres con un 45% de soporte. El inhibidor IF1 de *L. vannamei* fue incluido en un subclado con el 96% de soporte que agrupa al único crustáceo reportado hasta la fecha, el langostino *P. clarkii*, mientras que en un subclado diferente se encuentran los demás invertebrados marinos como el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*, la anémona de mar *Nematostella vectensis*, y la proteína del cnidario *Hydra magnipapillata* se localiza independiente aunque en el mismo clado, indicando la distancia filogenética de estas especies. Es

interesante observar que el ácaro *Metaseiulus occidentalis* se agrupó en el clado de los invertebrados marinos y no en el de los insectos con un 58% de soporte, debido a que es un quelicerado y no comparten un ancestro común.

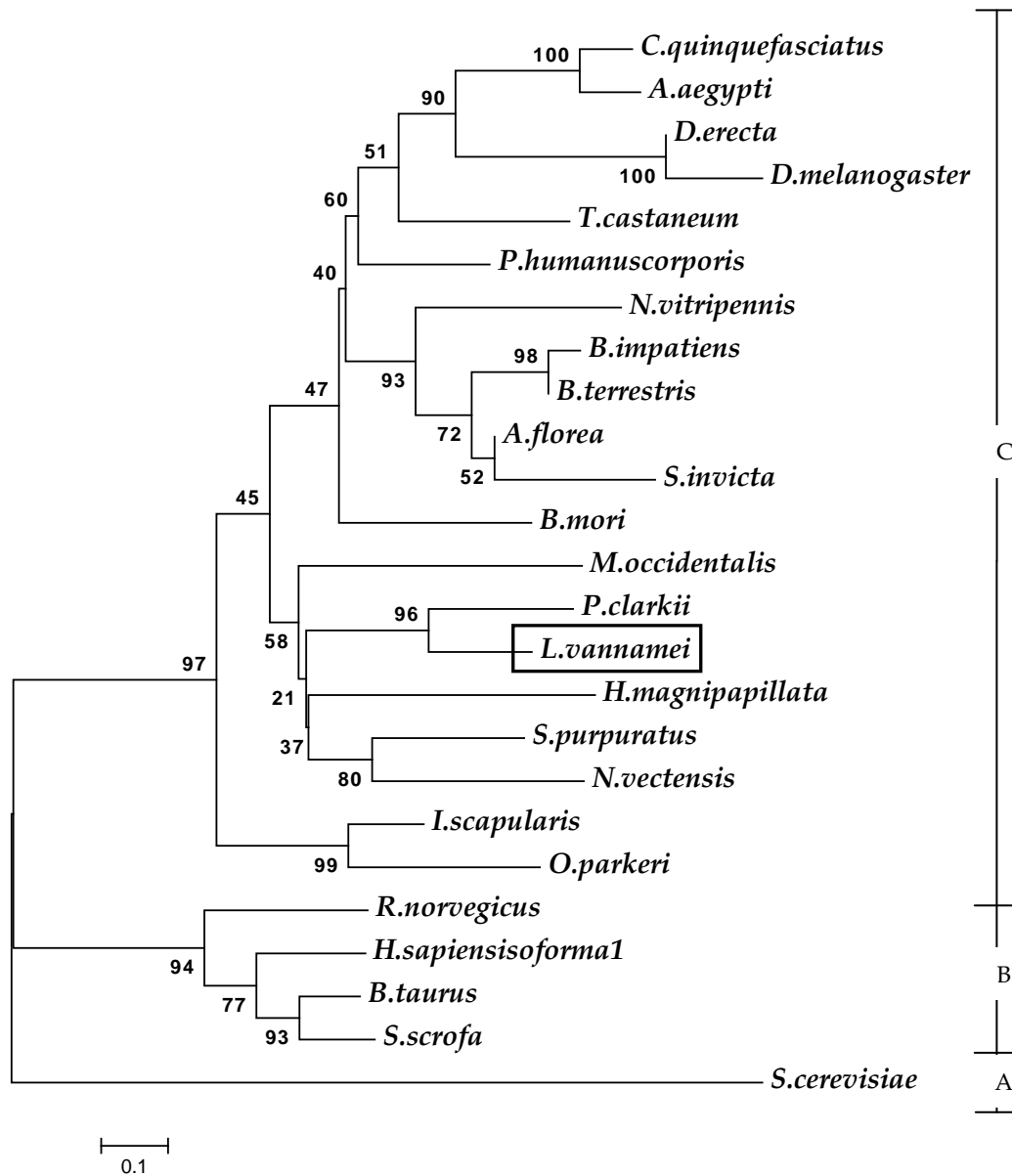


Figura 12. Árbol filogenético resultado de análisis de secuencia deducida de aminoácidos del inhibidor. El método utilizado fue el de Neighbor Joining con una matriz de Jones-Taylor-Thorton, usando 1000 réplicas en la prueba bootstrap.

Los crustáceos y los insectos comparten un ancestro común, estos son grupos hermanos llamados Pancrustacea o Tetraconata. Eriksson y Stollewerk (2010) utilizando el análisis de neurogénesis demostraron que el sistema nervioso de los insectos y los crustáceos superiores (malacostráceos) es generado a partir de células madre similares (neuroblastos), esto hace que la relación filogenética entre estos grupos sea más estrecha comparándolos con los miriápodos y quelicerados. Esto, se confirma en el árbol filogenético obtenido, ya que los quelicerados (las garrapatas *Ixodes scapularis* y *Ornithodoros parkeri*) se encuentran filogenéticamente separados de los insectos y los crustáceos.

De acuerdo a los porcentajes de identidad reportados y a lo observado en el árbol filogenético, nuestros resultados indican que a pesar de las distancias taxonómicas entre vertebrados, invertebrados y fungi, el inhibidor es una proteína mitocondrial altamente conservada a lo largo de la evolución, con homólogos encontrados en bacterias, hongos, levaduras, nematodos, aves, mamíferos y plantas, por lo que se sugiere que desempeña un papel importante en la biología celular y mitocondrial (Campanella et al., 2008; Campanella et al 2009; Fujikawa et al., 2012).

Matsubara y colaboradores (1983), propusieron que un gen ancestral común se duplicó, dando origen a dos genes en los que ocurrieron mutaciones puntuales que originaron diferentes factores proteicos que divergieron en diversas proteínas parálogas (la subunidad ϵ de *E. coli*, la subunidad δ bovina, el inhibidor de la ATPasa de levadura y el factor de estabilización de la levadura (9K y 15K)), que comparten similitudes pero tienen diferentes funciones ocasionadas por la sustitución de aminoácidos en la región amino terminal y a la diferencia de carga en los sitios catalíticos.

7.4. Efecto de la Hipoxia en la Expresión Génica del Inhibidor (IF1) del Complejo F₀F₁-ATPasa

7.4.1. Expresión relativa del Inhibidor IF1 de la F₀F₁-ATPsintasa

Se realizó la cuantificación relativa del ADNc de IF1 y L8 (como gen de referencia) en las muestras de músculo de camarón sometido a condiciones de normoxia e hipoxia, para lo cual se construyeron los rangos dinámicos de cada uno de los genes y se realizó una comparación de la eficiencia de amplificación de ambos. La eficiencia del gen L8 fue 106% y la del gen IF1 fue 104%, por lo que se cumple el supuesto establecido por Livak y Schmittgen para el análisis de los resultados por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (que indican los cambios relativos en la expresión de genes que hayan estado sometidos a ciertas condiciones).

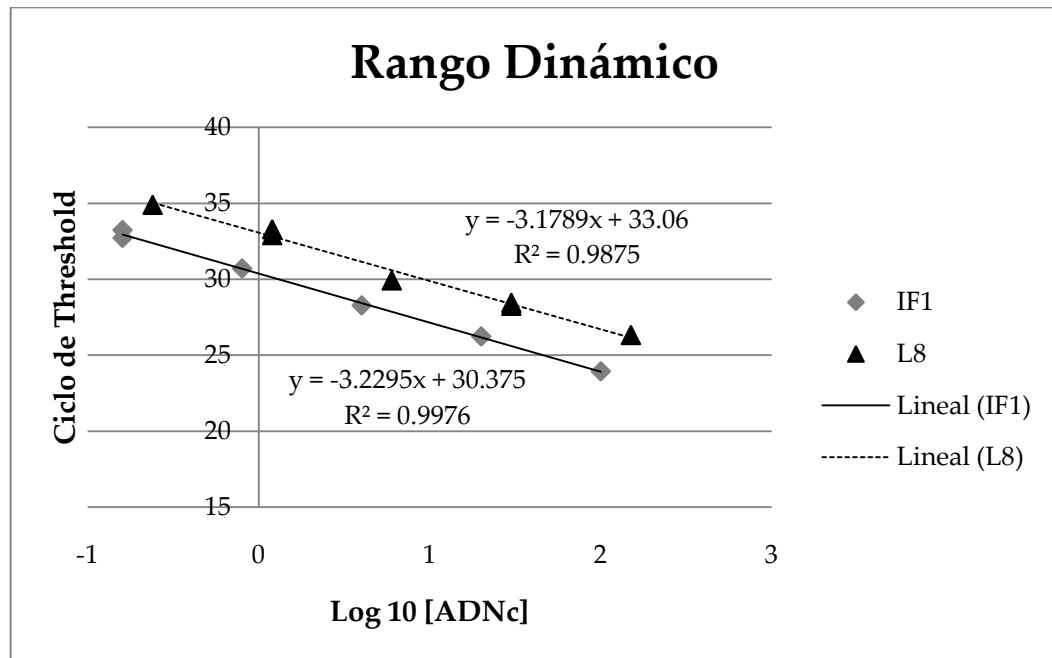


Figura 13. Comparación de los rangos dinámicos de cada gen.

La figura 14 muestra la amplificación de un producto único durante la reacción de PCR, indicando la especificidad emitida por la formación del producto específico de cada gen.

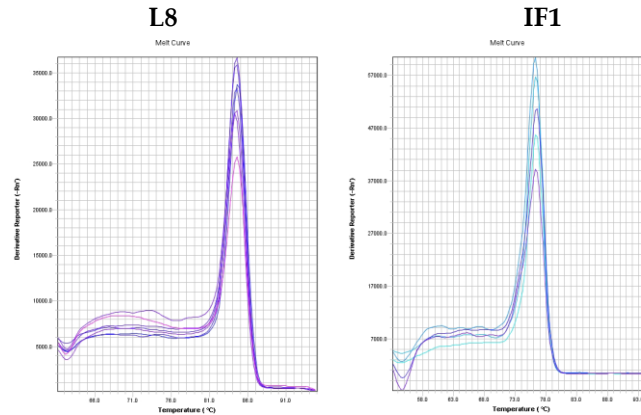


Figura 14. Curva de disociación de los productos de PCR de L8 e IF1.

En el músculo de *L. vannamei* se detectaron cambios significativos en la expresión relativa de la proteína inhibidora del tipo IF1 por efecto de la hipoxia ($p<0.05$). Se detectó una reducción respecto a la normoxia del 45 y 98% en los niveles de ARNm de IF1 en 2 y 1.5 mg/L, respectivamente. También, se observó un incremento durante la reoxigenación a 7 mg/L del 32% con respecto a los organismos en 2 mg/L (Figura 15 A). Estos cambios en la cantidad de ARNm del inhibidor IF1 sugieren una respuesta a nivel transcripcional de la célula ante la falta de oxígeno.

Existen reportes previos que demuestran el efecto de la hipoxia en las proteínas mitocondriales, en particular, Brown-Peterson y colaboradores (2008) evaluaron los cambios en la expresión de genes mitocondriales bajo el efecto de la hipoxia crónica en el camarón de la hierba *Palaemonetes pugio*, encontrando que este organismo se adapta a los efectos de la hipoxia disminuyendo la síntesis de proteínas, debido a que esto le permite conservar energía.

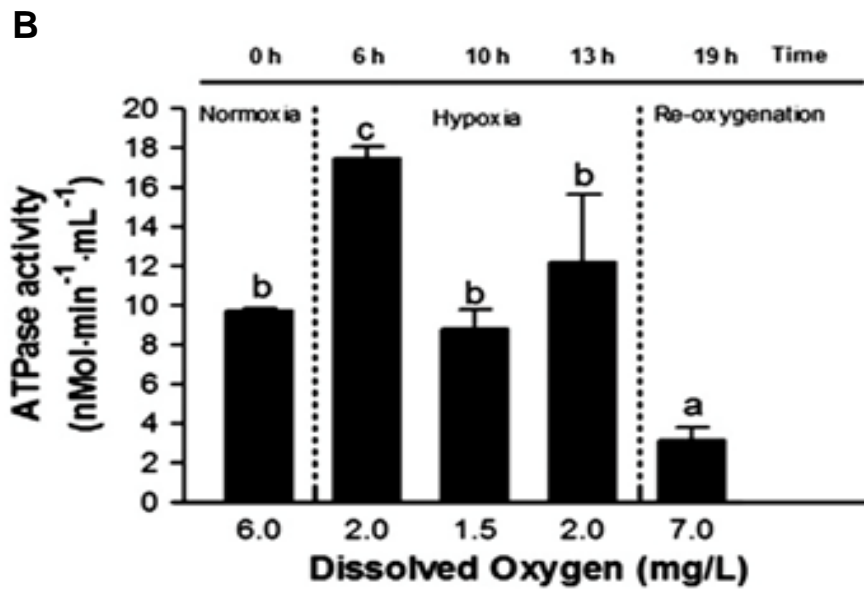
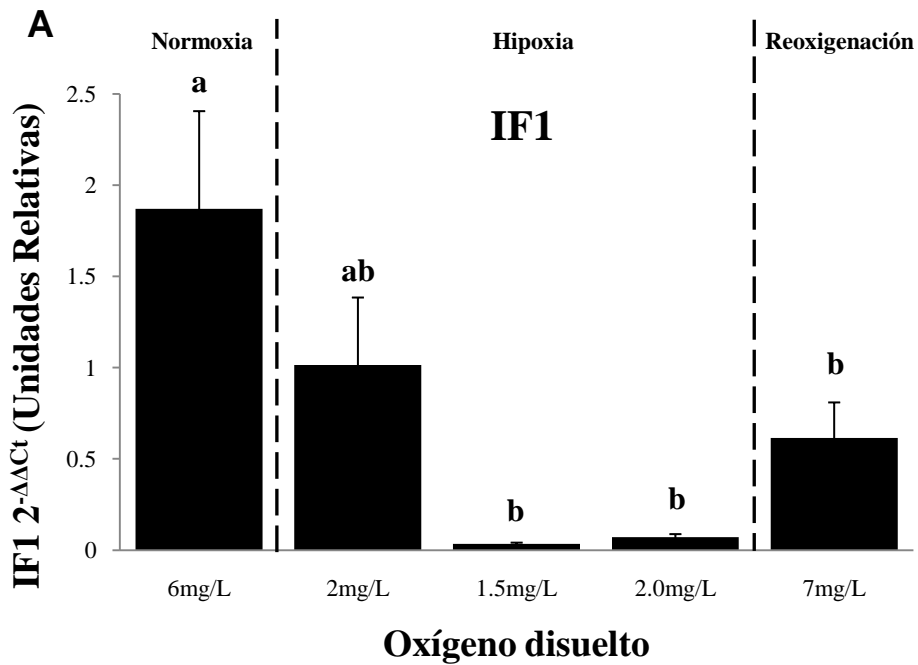


Figura 15. A) Expresión génica de la proteína inhibidora IF1 en el músculo de camarón en respuesta a la hipoxia. B) Actividad ATPasa evaluado en los extractos mitocondriales del músculo de camarón bajo el efecto de la hipoxia. Tomado de Martínez-Cruz et al., 2012. Las diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). Las barras representan media \pm EE.

De acuerdo a los resultados observados por Martínez-Cruz y colaboradores (2012) en condiciones de hipoxia el camarón *L. vannamei* responde incrementando la actividad hidrolítica de la ATPasa mitocondrial (Figura 15 B); posteriormente, esta disminuye permitiéndole al organismo regular su consumo de ATP. Esto evita que sufra una pérdida de sus reservas energéticas lo que le permitirá cubrir sus funciones metabólicas básicas y sobrevivir hasta que el oxígeno ambiental se reestablezca.

Así, de acuerdo a lo observado en este estudio se sugiere que la síntesis de ARNm del IF1 del camarón está regulada a nivel transcripcional, debido a los cambios significativos que se observaron en las diferentes condiciones evaluadas ($p < 0.05$). Se propone que al iniciar la hipoxia, cuando la actividad ATPasa incrementa a 2 mg/L, el nivel de ARNm del inhibidor IF1 se reduce gradualmente, sugiriendo que parte de los transcritos presentes en la célula, fueron traducidos a una proteína funcional para poder llevar a cabo la inhibición de la hidrólisis del ATP, mientras que a 1.5 y 2 mg/L se observa una reducción drástica en los niveles de transcritos lo cual sugiere la degradación del ARNm, posiblemente debido a la acción de las nucleasas citoplasmáticas (Brandan et al., 2002) o por la desnaturalización del ARN ocasionado por la acidificación del pH citoplasmático (Garrido et al., 2006).

Al reoxigenarse el sistema, la actividad de la ATPasa disminuye y el nivel de ARNm del inhibidor IF1 se reestablece aunque no a sus niveles iniciales. Aunado al proceso de regulación post-traducciona l en el que ya se sabe, para otras especies de animales, que la proteína madura está presente en la mitocondria en forma inactiva de un tetramero u oligómero. La existencia de cambios a nivel transcripcional podrían sugerir un mecanismo complementario regulado a diferentes niveles que le permite al camarón controlar la hidrólisis

del ATP, y de esta forma explicar cómo este hace frente a la falta de oxígeno constante, sin agotar sus reservas energéticas (Brandan et al., 2002).

Existen antecedentes que confirman los resultados de este estudio donde se encontraron cambios en el nivel de ARNm de las proteínas mitocondriales que son codificadas en el genoma nuclear por efecto de la hipoxia, como los reportados por Martínez-Cruz et al., (2011) quienes encontraron que la hipoxia afecta significativamente los niveles de transcritos de la subunidad *atpβ* de la F₀F₁-ATPasa mitocondrial del camarón. En 2007, Martínez-Cruz y colaboradores reportaron cambios significativos en la cantidad de ARNm de los genes de las subunidades ATP6 (genoma mitocondrial) y ATP9 (genoma nuclear) en el camarón blanco en condiciones de hipoxia. Por otro lado Soñanez-Organis y colaboradores (2011) reportaron que no existen cambios en los niveles de transcritos de hexocinasas en *L. vannamei* expuesto a condiciones de hipoxia. En otros crustáceos, están reportados cambios en la expresión de genes mitocondriales, como los reportados por Brouwer et al., (2004) en la jaiba azul *Callinectes sapidus*, quienes encontraron que la hipoxia incrementa el ARNm de la proteína manganeso-superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD).

VIII. CONCLUSIONES

- En el genoma del camarón blanco *L. vannamei* existe un gen que expresa un transcrito codificante de una proteína inhibidora de la ATPasa mitocondrial del tipo IF1, la cual contiene el dominio conservado IATP (Mitochondrial ATPase Inhibitor) y cuenta con los residuos específicos para interactuar con la ATPasa del camarón, sugiriendo una proteína funcional.
- Se encontró además una isoforma putativa de la proteína de IF1, denominada isoforma 2 (IF1-2), que comparte características con IF1 por lo que se sugiere podría actuar sobre las ATPasas exógenas de la mitocondria para regular el consumo de ATP en condiciones adversas.
- Se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de los transcritos del inhibidor IF1 del camarón, disminuyendo en condiciones de hipoxia, probablemente a causa de la acidificación celular.
- Con base en lo anterior, se sugiere que la proteína IF1 podría funcionar como un mecanismo que le permite al camarón controlar la hidrólisis del ATP en condiciones de hipoxia, y enfrentar la falta de oxígeno prolongada, sin agotar sus reservas energéticas.

IX. RECOMENDACIONES

- Realizar un modelo predictivo para determinar la estructura de esta proteína.
- Evaluar la función de este inhibidor en la actividad de la ATPasa mitocondrial.
- Determinar por medio de un ensayo de ELISA, los cambios en la cantidad de la proteína IF1 en camarones sometidos a estas condiciones de hipoxia y reoxigenación.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abad-Rosales S.M., Betancourt-Lozano M., Vargas-Albores F. y Roque A. 2001. Interacción de factores físicos, químicos y biológicos en el cultivo de camarón. En: Ruiz-Luna A., Berlanga-Robles C.A. y Betancourt-Lozano M. (eds.). Avance en acuicultura y manejo ambiental. Editorial Trillas, México, 304 p.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., y Walter P. 2006. Generación de energía en mitocondrias y cloroplastos. En: Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., y Walter P. (eds.). Introducción a la biología celular. Editorial Médica Panamericana, 740 p. Disponible en: http://books.google.com.mx/books?id=qrrYZJhrRm4C&printsec=frontcover&dq=alberts&hl=es&sa=X&ei=zj2DT_7xO4WL2AXH7rXmBg&ved=0CDUQ6AEwAA#v=onepage&q=mitocondria&f=false (Fecha de acceso 03-30-2012)

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., y Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.

Ando C. e Ichikawa N. 2008. Glutamic acid in the inhibitory site of mitochondrial ATPase inhibitor, IF1, participates in pH sensing in both mammals and yeast. *The Journal of Biochemistry*. 144: 547–553.

Bason J.V., Runswick M.J., Fearnley I.M. y Walker J.E. 2011. Binding of the inhibitor protein IF1 to bovine F1-ATPase. *Journal of Molecular Biology*. 406: 443–453.

Brandan N., Juaristi J., Aguirre V. y Romero M. 2002. Regulación de la expresión genética. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina. Cátedra de Bioquímica. Disponible en: <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/expresion.htm> (Fecha de acceso 24-06-2013).

Belley R., Archambault P., Sundby B., Gilbert F., y Gagnon J.M. 2010. Effects of hypoxia on benthic macrofauna and bioturbation in the Estuary and Gulf of St. Lawrence, Canada. *Continental Shelf Research*. 30: 1302–1313.

Brouwer M., Larkin P., Brown-Peterson N., King C., Manning S., y Denslow N. 2004. Effect of hypoxia on gene and protein expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine environmental research*. 58: 787-792.

Brown-Peterson N.J., Steve-Manning C., Patel V., Denslow N.D. y Brouwer M. 2008. Effects of Cyclic Hypoxia on Gene Expression and Reproduction in a Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. *The Biological Bulletin*. 214: 6-16.

Cabezón E., Butler P.J.G., Runswick M.J. y Walker J.E. 2000. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *The Journal Biological Chemistry*. 275: 25460–25464.

Cabezón E., Runswick M.J., Leslie A.G.W. y Walker J.E. 2001. The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F1-ATPase. *The EMBO Journal*. 20: 6990–6996.

Cabezón E., Montgomery M.G., Leslie A.G.W. y Walker J.E. 2003. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nature Structural Biology*. 10 (9): 744-750.

Campanella M., Casswell E., Chong S., Farah Z., Wieckowski M.R., Abramov A.Y., Tinker A. y Duchon M.R. 2008. Regulation of mitochondrial structure and function by the F0F1-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metabolism*. 8: 13-25.

Campanella M., Parker N., Hong Tan C., Hall A.M. y Duchon M.R. 2009. IF1: setting the pace of the F0F1-ATP synthase. *Trends in Biochemical Sciences*. 34: 343-350.

Cardol P., González-Halphen D., Reyes-Prieto A., Baurain D., Matagne R.F., y Remacle C. 2005. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiology*. 137: 447-459.

Cheng W., Liu C.H., y Kuo C.M. 2003. Effect of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture*. 220: 843–856.

Chomczynski P. y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-159.

Cisterna J.A., Saldía G.S. y Cáceres C.W. 2008. Efecto de la hipoxia en la conducta de forrajeo de *Cancer setosus* (Molina, 1782) (Custacea: Depacoda) alimentado con *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43(002): 419-423.

Claros M.G. y Vincens P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*. 241: 779-786.

CSIRO. 2011. Prawn fishing industry in the Gulf of Carpentaria. En: CSIROpedia. Disponible en: <http://www.csiropedia.csiro.au/display/CSIROpedia/Prawn+fishing+industry+in+the+Gulf+of+Carpentaria> (Fecha de acceso 03-09-2012).

Di Lisa F., Menab R., Canton M., y Petronilli V. 1998. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1366: 69-78.

Domínguez-Ramírez L. y Tuena de Gomez-Poyou M. 2003. Virtudes y Pecados de una enzima: la FOF1 ATP sintasa. En: Fernández G.A., Jaimes I.B., Patlán C.C., Fonseca J.G. y Meza H.V. (eds.). *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVII. Depto Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/MensajeBioquimico/Volumen2003> (Fecha de acceso 10-19-2011)

Eckert R., Randall D. y Augustine G. 1990. El significado de la Fisiología. En: Eckert R., Randall D. y Augustine G. (eds.). *Fisiología animal, Mecanismos y Adaptaciones*. Editorial Interamericana McGraw-Hill. España. 683 p.

Eriksson B.J., y Stollewerk A. 2010. Expression patterns of neural genes in *Euperipatoides kanangrensis* suggest divergent evolution of onychophoran and euarthropod neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (52): 22576-22581.

Faccenda D. y Campanella M. 2012. Molecular Regulation of the Mitochondrial F1Fo-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF1). *International Journal of Cell Biology*. 2012, ID 367934.

FAO © 1991. Diagnostico Integral de las Granjas Acuícolas Camaroneras en el estado de Sinaloa. En: Depósito de Documentos de la FAO. Disponible en: www.fao.org/docrep/field/003/AC598S/AC598S06.htm (Fecha de acceso el 03-29-2012)

Fujikawa M., Imamura H., Nakamura J., y Yoshida M. 2012. Assessing Actual Contribution of IF1, Inhibitor of Mitochondrial FoF1, to ATP Homeostasis, Cell Growth, Mitochondrial Morphology, and Cell Viability. *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (22): 18781-18787.

Futai M., Oka T., Sun-Wada G.H., Moriyama Y., Kanazawa H. y Wada Y. 2000. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 107-112.

García J.T. 2006. Vida y Obra del monómero y el dímero de la F0F1-ATP sintasa mitocondrial y de sus sucursales en la membrana plasmática. En: Oria J.H. (ed.). *Mensaje Bioquímico*, Vol XXX. Depto Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/MensajeBioquimico/Volumen2006> (Fecha de acceso 04-16-2012).

Garrido A., Teijón J.M., Blanco D., Villaverde C., Mendoza C. y Ramírez J. 2006. Desnaturalización e hibridación. En: Teijón J.M. y Garrido A. (eds). *Fundamentos de Bioquímica estructural*. Editorial Tébar. España. 444 p.

Green D.W. y Grover G.J. 2000. The IF1 inhibitor protein of the mitochondrial F0F1-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1458: 343-355.

Gledhill J.R. y Walker J.E. 2005. Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry Journal*. 386: 591-598.

Harper S.L. y Reiber C.L. 2006. Metabolic respiratory and cardiovascular responses to acute and chronic hypoxic exposure in tadpole shrimp *Triops longicaudatus*. *The Journal of Experimental Biology*. 209: 1639-1650.

Hendrickx M.E. 2001. Taxonomía, Biología y zoogeografía de los Peneidos de Importancia Comercial del Pacífico Mexicano. En: Paez-Osuna F. (ed.). *Camaronicultura y Medio ambiente*. Editorial Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. México. 452 p.

Ichikawa N., Karaki A., Kawabata M., Ushida S., Mizushima M., y Hashimoto T. 2001. The region from phenylalanine-17 to phenylalanine-28 of a yeast mitochondrial ATPase inhibitor is essential for its ATPase inhibitory activity. *Journal of Biochemistry*. 130(5):687–693.

Ichikawa N., Chisuwa N., Tanase M., y Nakamura M. 2005. Mitochondrial ATP synthase residue β Arginine-408, which interacts with the inhibitory site of regulatory protein IF1, is essential for the function of the enzyme. *Journal of Biochemistry*. 138: 201–207.

Ichikawa N., Ando C. y Fumino M. 2006. *Caenorhabditis elegans* MAI-1 protein, which is similar to mitochondrial ATPase inhibitor (IF1), can inhibit yeast F₀F₁-ATPase but cannot be transported to yeast mitochondria. *Journal Bioenergetic Biomembrans*. 38: 93-99.

Jiang H., Li F., Xie Y., Huang B., Zhang J., Zhang J., Zhang C., Li S., y Xiang J. 2009. Comparative proteomic profiles of the hepatopáncreas in *Fenneropenaeus chinensis* reponse to hypoxic stress. *Proteomics*. 9: 3353-3367.

Karp G. 2010. Aerobic respiration and the mitochondrion. En: Karp, G. (ed.). *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments*. Editorial John Wiley & Sons Inc. USA. 189-190 p.

Lehninger A., Nelson D. y Cox M. 1995. Biomoléculas y células. En: Lehninger A., Nelson D. y Cox M. (eds.). *Bioquímica*. Editorial Omega, S. A., México. 1013 p.

Li T. y Brouwer M. 2007. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palamonetes pugio*: Molecular characterization and response to hipoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 147: 11-19.

Liang Y., Cheng J.J., Yang B., y Huang J. 2010. The role of F₁ ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Virology Journal*. 7: 144.

Lightner D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106: 110–130.

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: 402-408.

Magallón F.J., Arreola A., Portillo G., Casillas R., Lechuga C., Oliva M., y Porchas M.A. 2009. Capacidad de carga y capacidad ambiental en la camaronicultura. En: Martínez-Córdova R.C. (ed.). Camaronicultura sustentable. Editorial Trillas. México. 176 p.

Martínez-Córdova L.R. y Campaña A. 1999. Especies de peneidos actúales y potenciales para el cultivo. En: Martínez-Córdova, L.R. (ed.). Cultivo de camarones peneidos, Principios y prácticas. AGT Editor, S. A. México. 27 p.

Martínez-Córdova L.R., Villarreal H. y Cortés E. 1999. Biología del camarón. En: Martínez-Córdova, L.R. (ed.). Cultivo de camarones peneidos, Principios y prácticas. AGT Editor, S. A. México. 10-13 p.

Martinez-Cruz O. 2007. Expresión génica de las subunidades ATP6 mitocondrial y ATPc nuclear del complejo ATP-sintasa en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de hipoxia. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Martínez-Cruz O., García-Carreño F., Robles-Romo A., Varela-Romero A., y Muhlia-Almazán A. 2011. Catalytic subunits *atp α* and *atp β* from the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* F₀F₁ATP-synthase complex: cDNA sequences, phylogenies, and mRNA quantification during hypoxia. Journal Bioenergetic Biomembrans. 43: 119-133.

Martinez-Cruz O., Calderon de la Barca A.M., Uribe-Carbajal S. y Muhlia-Almazan A. 2012. The mitochondrial F₀F₁ ATP-synthase function from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hipoxia. Comparative Biochemistry and Physiology, part B. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096495912000486> (Fecha de acceso 05-05-2012).

Martinez-Cruz O., Sanchez-Paz J.A., Garcia-Carreño F.L., Jimenez-Gutierrez, L.R., Navarrete del Toro M.A. y Muhlia-Almazan A. 2012. Invertebrates Mitochondrial Function and Energetic Challenges. En: Clark, K. B. (ed.). Bioenergetics. Editorial INTECH. 272 p. ISBN: 979-953-307-383-4.

Matsubara H., Inoue K., Hashimoto T., Yoshida Y., y Tagawa K. 1983. A Stabilizing Factor of Yeast Mitochondrial F₀F₁-ATPase-Inhibitor Complex: Common Amino Acid Sequence with Yeast ATPase Inhibitor and *E. coli* ϵ and Bovine δ Subunits. The Journal of Biochemistry. 94 (1): 315-318.

Mugniera C., Zippera E., Goaranta C. y Lemonniera H. 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*. 274: 398-407.

Panchenko M.V. y Vinogradov A.D. 1985. Between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Letters*. 184: 226-230.

Paez-Osuna F., Gracia A., Verdugo F.F., Fritch L.P.L., Rodriguez R.A., Roque A. y Fernandez A.R. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 806-815.

Pérez-Rostro C.I., Racotta I.S. e Ibarra A.M. 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 302: 189-200.

Pullman M.E. y Monroy G.C. 1963. A naturally occurring inhibitor of Mitochondrial adenosine Triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*. 238 (11): 3762-3769.

Rabalais N.N., Díaz R.J., Levin L.A., Turner R.E., Gilbert D. y Zhang J. 2010. Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*. 7: 585-619.

Rosas C., Martinez E., Gaxiola G., Brito R., Sánchez A. y Soto L.A. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 234: 41-57.

Rouslin W. 1987. Factors affecting the reactivation of the oligomycin-sensitive adenosine 5'-Triphosphatase and the release of ATPase inhibitor protein during the re-energization of intact mitochondria from ischemic cardiac muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 262 (8): 3472-3478.

Rouslin W., y Broge C.W. 1989. Regulation of mitochondrial matrix pH and Adenosine 5'-Triphosphatase activity during ischemia in slow Heart-rate Hearts. *The Journal of Biological Chemistry*. 264 (26): 15224-15229.

Sánchez R. y Arboleda G. 2008. Mitochondria y muerte celular. *NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 6 (10): 101-236.

Sánchez A.J. y Guerrero R. 1982. Ciclo celular en bacterias. En: Sánchez A.J. y Guerrero R. (eds). Genética molecular bacteriana. Editorial Reverte. España. 457 pp.

Schnizer R., van Heeke G., Amaturio D. y Schuster S.M. 1996. Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F1-ATPase inhibitor protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1292 (2):241-248.

Stryer L. 1995. Oxidative phosphorylation. En: Stryer L. (ed.). *Biochemistry*. Editorial W. H. Freeman and Company. USA. 1064 p.

Tamura K.J., Dudley M., Nei y Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24(8): 1596-1599.

Thompson J.D., Higgins D.G., y Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.

Tornero D., Ceña V., Gonzáles-García C. y Jordán J. 2002. Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Revista de Neurología*. 35 (4): 354-361.

Ugalde C. 2011. Defectos de ensamblaje como causa del déficit enzimático de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. En: Institut de Recerca. Disponible en: http://www.ir.vhebron.net/easyweb_irvh/Activitats/Confeiseminaris/Institut/IR2007/CristinaUgalde/tabid/650/Default.aspx (Fecha de acceso 04-06-2012).

Voet D. y Voet J. 2006. La vida. y Transporte de electrones y Fosforilación oxidativa. En: Voet D. & Voet J. (eds.). *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana. España. 1756 p. Disponible en: http://books.google.com.mx/books?id=r5bedH_aST0C&printsec=frontcover&dq=voet&hl=es&sa=X&ei=SUCDT7CbJOaM2gWZ6KnuAg&ved=0CDgQ6AEwAQ#v=onepage (Fecha de acceso 11-08-2011).

Wang L., Wang W.N., Liu Y., Cai D.X., Li J.Z. y Wang A.L. 2012. Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress. *Molecular Biology Reports*. 39(6): 6427-6438.

Wyban J.A. y Sweeney J.N. 1991. Intensive shrimp production technology. High Health Aquaculture Inc., hawaii. 158 pp.

Zhang P., Zhang X., Li J. y Huang G. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture. 256: 579-587.