

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

**CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE LA LACTATO
DESHIDROGENASA DEL CAMARÓN BLANCO**

Litopenaeus vannamei

Por:

Bertha Guadalupe Leal Rubio

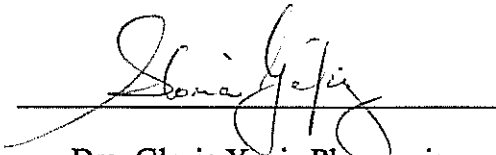
TESIS APROBADA POR LA:
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Bertha Guadalupe Leal Rubio, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Gloria Yepiz Plascencia

Director de Tesis



Dra. María Islas Osuna

Asesora



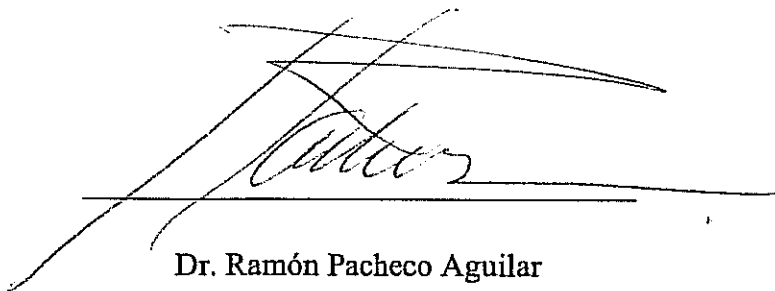
Dra. Teresa Gollas.

Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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 del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (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 o directora de tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

C.I.A.D., A.C.

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por haber proporcionado la beca de maestría y al proyecto 98507 aprobado a la Dra. Gloria Yepiz, por los fondos para realizar este trabajo de tesis.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo por permitirme ser parte de esta institución, a los que fueron mis maestros, gracias por transmitirme sus conocimientos y al mismo tiempo por brindarme su amistad.

A la Dra. Gloria Yepiz, gracias por todo su apoyo durante esta etapa de mi vida, estoy eternamente agradecida, por ser un gran ejemplo a seguir, porque con su experiencia me enseñó muchas cosas importantes. Ha sido una excelente mamá académica, me encanta trabajar a su lado.

A la M.C. Alma Peregrino por sus enseñanzas en el laboratorio, por tenerme paciencia y por estar al pendiente en el trabajo de mi tesis, mil gracias por todo su apoyo.

A los miembros de mi comité de tesis Dra. María Islas Osuna y a la Dra. Teresa Gollas por su disponibilidad e interés y por sus acertadas aportaciones a mi tesis.

A mis grandes amigos Salvador, Antonio, Gaby, Blanquita, Linda, Fátima, Oly, Claudia, Priscila por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, darme todo su apoyo y recibirme con un fuerte abrazo siempre que lo necesité, doy a gracias Dios haberme dado la oportunidad de conocerlos, los quiero mucho.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular: Antonio, José, Salvador, Oly, Aurora, Idania, Carlitos, Priscila, Manuel, Sandra, Enrique, por haberme brindado todo su apoyo durante esta etapa, por tenerme la paciencia y transmitirme su conocimiento

A mis compañeros de la maestría que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, siempre apoyándome

A mis sobrinos Ana Janeth, Noemí, Ana Karen, Edith, Chayito, Cirlita, Noyra, Fausto Jesús, Marito, Alberto, Alan y a los pequeñines Jermy, Edmir, Cirlita, Alejandrito, Luna por hacerme tan feliz y ser parte de mis fuerzas para salir adelante.

A mis tíos Tony y Mundo porque siempre han estado al pendiente y me han hecho parte de su familia, gracias por todo.

A la familia Romo Ruelas, Castro Ocaño, Montoya Gutiérrez, Moreno Ibarra, Espinoza Espinoza por estar al pendiente de mí y darme su apoyo incondicional, los quiero mucho.

A mis amigos Irving, Carlitos, Gerardo, Pamela, Mariana, Faby, Viridiana, Bianca y a todas las personas que han compartido conmigo esta etapa de mi vida y que por error omití.

DEDICATORIA

A Dios

A ti, agradezco que me hayas dado vida y salud, así como la oportunidad de disfrutar y compartir con mi familia y amigos una de las etapas más felices de mi vida, y porque nunca me dejaste flaquear ni perder la fé en los momentos más difíciles.

A mis padres Humberto y Ana María

Gracias por haber formado en mí el deseo de superación y anhelo de triunfo en la vida, por compartir mis pequeñas victorias y dolorosos fracasos, siempre recibiendo de ustedes una palabra de aliento que me dio la fuerza para seguir luchando

Gracias Mami por el apoyo incondicional que me has dado y por soportar mi ausencia a lo largo de este tiempo, porque siempre me recibes con un abrazo lleno de amor y felicidad

A mis hermanos Rosita , Ramoncita, Chayito y Mario

Doy gracias a Dios porque me permitió tenerlos como hermanos, porque siempre han estado conmigo en los momentos llenos de felicidad y de tristezas, gracias porque siempre tienen una palabra de aliento y un fuerte abrazo, por todo su apoyo, pero principalmente por tanto amor ...los AMO

ÍNDICE

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	14
Morfología y Anatomía del camarón.....	14
Músculo, hepatopáncreas y branquias	14
Vías centrales de metabolismo energético de carbohidratos	15
Glucólisis	16
Lactato Deshidrogenasa	18
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Extracción de DNA genómico	23
Diseño de oligonucleótidos específicos	24
Amplificación del gen de LDH.....	27
Clonación y secuenciación.....	28
Análisis de las secuencias nucleotídicas	28

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Extracción de DNA genómico	30
Diseño de oligonucleótidos para obtener el gen de la LDH	30
Caracterización y estructura del gen de la Lactato Deshidrogenasa.....	34
Preparación de dos fragmentos del gen de la LDH.....	34
Secuencia nucleotídica de cDNA de LDH de branquias	35
Secuencia nucleotídica de cDNA de LDH de músculo	37
Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen de la LDH de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	40
Composición de bases de los exones e intrones del gen de la LDH de camarón blanco <i>L.vannamei</i>	45
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Oligonucleótidos específicos utilizados para obtener el gen de la LDH.....	25
2	Condiciones de PCR para obtener los fragmentos de DNA.....	27
3	Oligonucleótidos específicos para cDNA de branquias y fragmento 3' del gen de la LDH.....	31
4	Oligonucleótidos para obtener el fragmento 5' del gen de la LDH.....	32
5	Identidad de la LDH a nivel de nucleótidos con proteínas homólogas de otras especies.....	38
6	Composición de bases de los exones	46
7	Composición de bases de los intrones.....	47
8	Posiciones de los exones, codones divididos y regiones de unión a ligandos en la LDH.....	49
9	Extremos 5' y 3' de los intrones y secuencias consenso.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Morfología externa del camarón blanco <i>L. vannamei</i>	14
2	Esquema general de la glucólisis aerobia y anaerobia	17
3	DNA genómico extraído de camarón blanco <i>L.vannamei</i>	30
4	Ubicación de oligonucleótidos usados en el gen de la LDH de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	33
5	Análisis de geles de agarosa al 1 % teñidos con SYBR-SAFE de los fragmentos 5 y 3' del gen de la LDH.....	35
6	Secuencia nucleotídica de cDNA de la LDH de branquias de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	36
7	Alineamiento entre las dos regiones diferentes entre los cDNAs de branquias y músculo.....	37
8	Secuencia parcial de cDNA de la LDH de músculo de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	39
9	Secuencia nucleotídica y deducida en aminoácidos de la LDH.....	43
10	Mapa del gen de la LDH de camarón blanco <i>L. vannamei</i>	44

RESUMEN

La lactato deshidrogenasa (LDH) (EC.1.1.1.27) es una enzima que cataliza la síntesis de lactato a partir de piruvato y cuya función es muy importante en condiciones anaerobias. La hipoxia (baja concentración de oxígeno) es un problema recurrente en los cultivos de camarón y también en los organismos silvestres. Existe poca información sobre las LDHs de crustáceos. Recientemente se caracterizaron dos cDNAs de la LDH, uno obtenido a partir de branquias y otro de músculo de *L. vannamei* (Rodríguez-Armenta, 2007) Soñanez-Organis *et al.*, (datos no publicados), pero se desconoce el gen, su estructura y los elementos involucrados en su regulación. Por lo anterior, en este trabajo se caracterizó el gen de la LDH de *L. vannamei*. Para obtener la secuencia nucleotídica se utilizaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación y secuenciación, seguido por análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas. El gen de la LDH se obtuvo a partir de dos fragmentos, un fragmento 5' de 4233 pb y el otro de 3' de 3338 pb, logrando obtener un tamaño de 7571 pb. El gen de la LDH de *L. vannamei* posee 8 exones y 7 intrones y al comparar el gen con los cDNAs de branquias y músculo de *L. vannamei* se pudo determinar la presencia de corte y empalme alternativo, que produce dos proteínas que solo difieren solo en una pequeña región y que corresponden a subunidades diferentes. El gen de la LDH de *L. vannamei* tiene estructura similar a los de vertebrados teniendo el mismo número de intrones y en posiciones similares, aunque con tamaños diferentes, demostrando alta conservación desde vertebrados hasta invertebrados.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad de gran desarrollo a nivel mundial, con un volumen global superior a los 50 millones de toneladas y un valor de alrededor de 50 mil millones de dólares anuales, contribuyendo con el 50 % en la producción de organismos acuáticos (<http://noticias.universia.es/ciencia-nn-tt/noticia/2006/05/24/598475/acuicultura-cultivo-mar.html>). En México, resalta la aportación económica de la camaronicultura en los estados de Sonora y Sinaloa; en particular en Sonora, en la última década se ha llegado a obtener hasta 130 mil 201 toneladas al año, contribuyendo con alrededor de 70 % de la producción nacional (http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2010/09/23/acuicultura_renovado_nicho_de_oportunidad_en_mexico.html).

El músculo de camarón es esencial para el movimiento, actividad que demanda gran cantidad de energía. Esta energía proviene principalmente de la hidrólisis del ATP que es usado para las contracciones musculares y que a su vez, es producido en la mayor proporción por la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones. A su vez, la producción de ATP es dependiente de la respiración (Hill, 2007). El principal combustible del músculo es la glucosa proveniente de los alimentos o de la degradación del glucógeno almacenado.

Los carbohidratos son la primer fuente de energía en la mayoría de los animales. El metabolismo de carbohidratos inicia con la glucosa que es metabolizada por medio de la glucólisis hasta la formación de dos moléculas de piruvato para la producción de energía en forma de ATP a nivel sustrato (Mathews *et al.*, 2003). El piruvato a su vez, es usado para la producción de acetil coenzima A que ingresa al ciclo de Krebs, y para que el ciclo de Krebs mantenga un flujo adecuado, es necesario el oxígeno como elemento aceptor final en la fosforilación oxidativa y transporte de electrones. La falta de oxígeno ocasiona la acumulación de piruvato. En esas condiciones anaerobias, el piruvato acumulado es reducido a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (Fukasawa *et al.*, 1986).

La lactato deshidrogenasa cataliza la conversión de piruvato a lactato en presencia de NADH principalmente en condiciones anaerobias, cuando el organismo se encuentra en condiciones extremas de movimiento o en condiciones bajas de oxígeno, obteniendo de esta forma ATP. La mayoría de los estudios que se han realizado en esta enzima han sido

en vertebrados, principalmente en humanos y ratones (Fukasawa *et al.*, 1986), mientras que en invertebrados la información aún es escasa.

Recientemente en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* se caracterizaron dos cDNAs de la lactato deshidrogenada que tienen pequeñas diferencias y fueron aislados de branquias y músculo (Rodríguez-Armenta, 2007) Soñanez-Organis *et al.*, (datos no publicados), pero se desconoce el gen y su estructura, y más aún los elementos involucrados en su regulación. Por lo anterior, en este trabajo se caracterizó el gen de la LDH contribuyendo con información básica sobre este gen en camarón.

ANTECEDENTES

Morfología y Anatomía del camarón

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* pertenece al Phylum arthropoda y a la familia penaeidae. Este crustáceo se encuentra distribuido en las aguas costeras del océano Pacífico. Al igual que en nuestro país, el cultivo de esta especie ha tenido un gran crecimiento en los países Asiáticos, siendo China el país líder de esta actividad (Martínez-Cordova *et al.*, 2009).

En el camarón se distinguen 3 segmentos principales: el cefalotórax, el abdomen y el telson (Figura 1). Los apéndices del cefalotórax son las anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y pereiópodos. El abdomen está constituido por seis segmentos y en cada uno hay un par de apéndices llamados pleópodos cuya función es natatoria. En el telson se encuentran los urópodos, que sirven también para la natación. La mayoría de los órganos que tienen alta actividad metabólica se encuentran en el cefalotórax, encontrándose también aquí, las extremidades que utilizan para su movimiento (periópodos), además del sistema respiratorio, sistema nervioso y sistema digestivo (Martínez-Cordova, 2002).

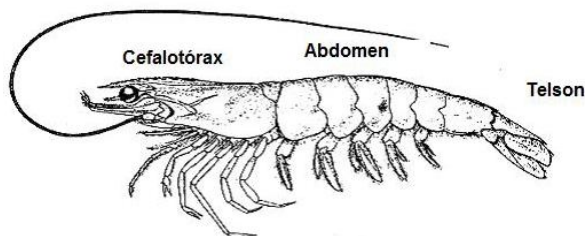


Figura 1. Morfología externa del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. (Martínez-Cordova, 2002).

Músculo, hepatopáncreas y branquias

El músculo es un tejido fibroso necesario para los movimientos del cuerpo que son realizados por medio de contracciones y durante los cuales, se utiliza energía en forma de

ATP. El principal combustible para el músculo es la glucosa que proviene de los alimentos o del glucógeno almacenado (Mathews *et al.*, 2003).

El hepatopáncreas o glándula digestiva es uno de los órganos de mayor importancia en el sistema digestivo de los decápodos. Este órgano realiza diferentes funciones como la absorción, secreción de enzimas, almacenamiento de nutrientes y eliminación de desechos a través de las vacuolas (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). Es también órgano central en el metabolismo, con funciones similares al hígado de los vertebrados (Dall *et al.*, 1990). El hepatopáncreas se localiza a un lado del estómago y está compuesto por una serie de lóbulos que se conectan con el ducto digestivo por conductos (Hill y Gordon, 2006).

Las branquias son el órgano respiratorio y tienen la capacidad de realizar el intercambio de gases, oxígeno y dióxido de carbono. Tiene una estructura en forma de láminas o filamentos muy vascularizados y posee cilios para crear corrientes de agua. Los crustáceos, carecen de cilios produciendo la ventilación por contracción muscular (Castelló Orvay, 1993). En decápodos el caparazón cubre los apéndices torácicos delimitando dos cámaras branquiales donde se sitúan las branquias que llegan a ser desde 3 a 26 de cada lado (Castelló Orvay, 1993).

Vías centrales de metabolismo energético de carbohidratos

Hasta hace pocos años, se pensaba que en los crustáceos la fuente primaria de energía eran las proteínas (Sánchez-Paz *et al.*, 2006), en contraste con los mamíferos y aves, que utilizan carbohidratos y lípidos como fuente de energía. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los carbohidratos también son la principal fuente de energía para los crustáceos (Sánchez-Paz *et al.*, 2006).

La glucosa es el principal monosacárido presente en la hemolinfa y fuente esencial para la síntesis de quitina, glucógeno, DNA, RNA (Sánchez-Paz *et al.*, 2006; Tacon, 1990). Además, la concentración de glucosa en la hemolinfa es estrictamente controlada por la hormona hiperglucémica (CHH), la cual también tiene un papel muy importante en la reproducción, muda y en otros procesos fisiológicos (Sánchez-Paz *et al.*, 2006; Soñanez-Organis, 2006; Verri *et al.*, 2001) El principal metabolito para la producción de energía es la glucosa, la cual es degradada a piruvato por la vía de la glucólisis. A partir del piruvato

se genera acetil coenzima A, la cual entra al ciclo de Krebs, en donde se produce poder reductor, que a su vez es usado durante la fosforilación oxidativa y transporte de electrones para la producción de ATP, que es la molécula universal proveedora de energía para la gran mayoría de las reacciones enzimáticas y para la contracción muscular (Mathews *et al.*, 2003).

Glucólisis

La glucólisis es una ruta metabólica que ocurre en el citoplasma celular y consta de 10 reacciones para producir 2 moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa (Figura 2). Algunas de las enzimas que participan en la glucólisis son finamente reguladas por moduladores alostéricos, concentración de sustratos y productos, así como por modificaciones postraduccionales (Gladden, 2004; Mathews *et al.*, 2003). Las enzimas con mayor regulación en esta vía metabólica son la hexocinasa (HK), fosfofructocinasa (PFK) y la piruvato cinasa (PK), las cuales son puntos clave en el metabolismo energético (Gladden, 2004; Mathews *et al.*, 2003).

El piruvato es el producto final de la glucólisis aerobia y es un metabolito central con distintos destinos metabólicos, los cuales dependen del estado de oxigenación de la célula. En algunas células aerobias con tasas de glucólisis muy elevadas, el NADH generado no puede reoxidarse a tasas semejantes en las mitocondrias, por lo que es necesario que el NADH que se produjo en la oxidación del gliceraldehído-3 fosfato se utilice para la reducción del piruvato a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. La reducción del piruvato a lactato es un punto clave de regulación que permite un equilibrio de óxido-reducción en la célula cuando existe un gasto elevado de energía (Fukasawa *et al.*, 1986; Hill y Gordon, 2006; Mathews *et al.*, 2003). Como antes se mencionó, cuando la célula se encuentra en bajas concentraciones de oxígeno se acumula NADH. Esta acumulación es contrarrestada con la producción de lactato a partir del piruvato y la generación de NAD. Esto se debe a que las mitocondrias solo pueden utilizar NADH en presencia de oxígeno, produciendo NAD, energía (ATP) y agua. Por lo anterior, se produce menor cantidad de energía por molécula de glucosa metabolizada (Mathews *et al.*, 2003). Este trabajo se enfoca a la enzima lactato deshidrogenasa que es punto clave cuando el

organismo se encuentra en condiciones extremas de movimiento o en bajas concentraciones de oxígeno.

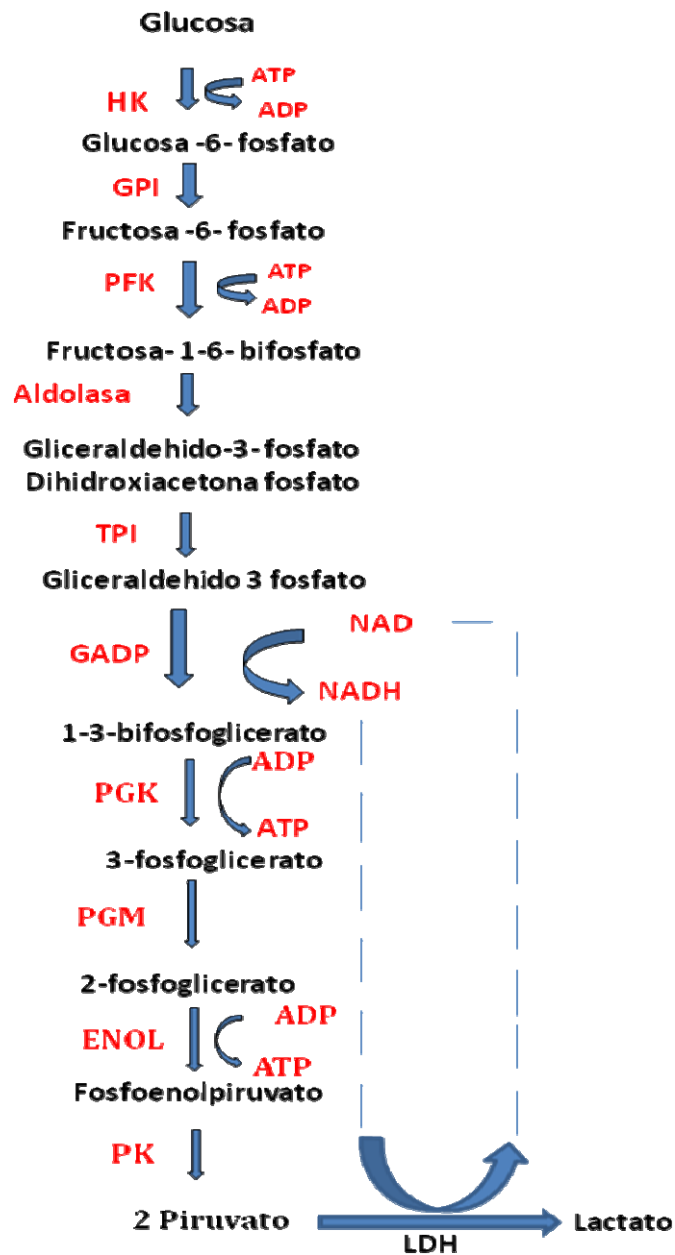


Figura 2. Esquema general de la glucólisis aerobia y anaerobia. Abreviaciones: HK, hexocinasa; GPI, glucosa fosfatoisomerasa; PFK, fosfofructocinasa; TPI, triosa fosfato isomerasa; GADP, gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa; PGK, fosfatoglicerato cinasa; PGM, fosfoglicerato mutasa; ENOL, enolasa; PK, piruvato cinasa; LDH, lactato deshidrogenasa. Modificado de (Mathews *et al.*, 2003; Soñanez-Organis, 2010).

Lactato Deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.27) es una oxido-reductasa que cataliza la reducción de piruvato a lactato en presencia de NADH en condiciones anaerobias (Gladden, 2004; Imagawa *et al.*, 2006). La LDH de vertebrados, es una proteína tetramérica de 140 KDa formada por tres subunidades llamadas LDH-A, LDH-B y LDH-C. En vertebrados, la LDH- A se ha encontrado en músculo e hígado, la LDH- B se ha reportado en el corazón y la LDH-C es típica de testículos (Imagawa *et al.*, 2006).

Las subunidades LDH-A y LDH-B forman 5 isoenzimas de LDH conocidas como LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 y LDH-5 en vertebrados. La subunidad A de humanos es de 274 a 361 aminoácidos, ya que existen diversas isoformas como la isoforma 1 de 332 aminoácidos, la 2 con 274, la 3 con 361, la 4 de 274 aminoácidos y por último la 5 es de 241 aminoácidos, mientras que la LDH-B es de 332 y la LDH-C es de 334 (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Además de las similitudes en los tamaños, estas subunidades tienen muy pocas diferencias en las secuencias primarias (Fukasawa *et al.*, 1986; Imagawa *et al.*, 2006).

La subunidad LDH-A difiere de la subunidad LDH-B de humanos en 90 aminoácidos, los cuales se encuentran en diferentes posiciones (GenBank No. Q5U077-1). En testículos se ha reportado una LDH específica que es un homotetrámero formado por la subunidad C que difiere de la A y la B en 80 aminoácidos localizados en distintas posiciones de la secuencia primaria (GenBank No.PO7864-1)(Takano *et al.*, 1989). Estas discrepancias derivan de las diferencias de las longitudes de los cDNAs. Por ejemplo, el cDNA de LDH-A de humanos es de 1,584 pb (Fukasawa y Li, 1987), mientras que el de LDH-B es de 1,418 pb (Takeno y Li, 1989) y el de LDH-C es de 1236 pb (Sakai *et al.*, 1987).

Las diferencias de las LDHs ocurren no solo a nivel de la secuencia primaria, sino también en los genes que son bastante grandes. Aunque existen pocos datos sobre las LDHs de invertebrados, se han reportado genes distintos para LDH-A, LDH-B y LDH-C en vertebrados. Por ejemplo, en el ratón *Mus musculus*, el gen de LDH-A tiene un tamaño de 12,851 pb y está interrumpido por 6 intrones o secuencias no codificantes y 7 exones o secuencias codificantes (Fukasawa y Li, 1987). Por otro lado, el gen de LDH-B de humanos tiene un tamaño de ~25,000 pb, es interrumpido por 6 intrones y contiene 7

exones (Takano *et al.*, 1989), mientras que el gen de LDH-C, que se expresa en los testículos en mamíferos, es de ~40,000 pb en humanos y es también, como el anteriormente mencionado de LDH A, interrumpido por 6 intrones y tiene 7 exones. La conservación de la estructura de los genes es también evidente en la posición y tamaño de los intrones en los genes de LDH-A, LDH-B y LDH-C en humanos.

El gen de humanos de LDH-B posee 7 exones. El exón 1 es de 43 aminoácidos y contiene los primeros 41 aminoácidos, el exón 2 corresponde a 40 aminoácidos y son las posiciones de 43 a 82, el exón tres es de 59 aminoácidos y son las posiciones 82 a 140, el exón 4 es de 59 aminoácidos y son las posiciones 140 a 198, el exón 5 es de 40 aminoácidos con las posiciones 198 a 237, el exón 6 es de 41 aminoácidos y se encuentra en las posiciones 237 a 278 y por último, el exón 7 es de 55 aminoácidos correspondiente a los residuos 279 a 333. La localización genómica ha demostrado, que 2 de éstos genes son localizados en el mismo cromosoma, pues los genes LDH-A y LDH-C se encuentran en el cromosoma 11, mientras que el gen de LDH-B se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 12 en humanos (Takeno y Li, 1989).

En contraste en invertebrados, poco se conoce sobre genes de LDH. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el gen de LDH es de tan solo 1,106 pb y contiene 2 pequeños intrones (57 y 47 pb) y 3 exones (Mannen *et al.*, 1995). Los dos intrones de *C. elegans* están localizados en posiciones similares a las del gen de LDH-B de humano (Takeno y Li, 1989), pero el intrón 1 de *C. elegans* corresponde a la posición del segundo intrón de humano, mientras que el intrón 2 de *C. elegans* es correspondiente al intrón 6 de humano. Lo anterior indica conservación de al menos, algunas de las posiciones de los intrones en las LDHs.

La LDH también se ha estudiado en diferentes organismos invertebrados a nivel de secuencia de nucleótidos. Hasta el momento se conocen secuencias nucleotídicas en especies como los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (GenBank No.001600167.1) y *Aedes aegypti* (GenBank No.001662100.1); las moscas de la fruta *Drosophila simulans* (GenBank No.002083821.1) y *Drosophila yacuba* (GenBank No.002093884.1), y el nemátodo *C. elegans* (GenBank No.U15420.1), entre otras.

También en parásitos se ha estudiado la LDH. En *Toxoplasma gondii* se han descrito dos genes que se expresan diferencialmente durante el ciclo de vida del parásito, y

que son llamados LDH1 y LDH2. La comparación del gen LDH1 con LDH2 a nivel nucleótidos, reveló un 64 % de identidad a nivel nucleótidos en la región codificante y 71.1 % de identidad en la secuencia deducida de aminoácidos (Yang y Parmley, 1997). En organismos más distantes, como es de esperarse, hay mas diferencias en las LDHs, de tal forma que es posible distinguir la LDH producida por el parásito *Taenia asiática*, en el suero de cerdo o de pacientes infectados (Huang *et al.*, 2008). Por lo tanto, la LDH es una enzima evolutivamente muy conservada, presente tanto en organismos relativamente sencillos como hasta en los más complejos, ya que su acción en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno o en condiciones de mucho movimiento, es esencial para la producción de energía como ATP a nivel sustrato.

En crustáceos, es poca la información sobre la LDH. Hasta el momento hay información para las secuencias de dos crustáceos *Daphnia pulex* y *Petrolisthes cinctipe* (Cristescu *et al.*, 2008). Además recientemente en camarón blanco *L. vannamei* se caracterizaron los cDNAs de la LDH obtenidos de branquias y músculo por Rodríguez-Armenta, 2007, y Soñanez-Organis *et al.*, (datos no publicado) pero se desconoce el gen y su estructura. Por lo anterior, en este trabajo se propuso caracterizar el gen de la LDH en camarón *L. vannamei*.

JUSTIFICACIÓN

En condiciones de bajas concentraciones de oxígeno o extremas de movimiento, se activa la glucólisis anaerobia con la producción de lactato que es generado por la enzima lactato deshidrogenasa, para poder producir energía por una vía alterna.

La LDH es una enzima heterotetramérica codificada por al menos tres genes diferentes, LDH-A, LDH-B y LDH-C en vertebrados. Las subunidades A, B y C, aunque similares, generan al combinarse, diversas isoenzimas que son tejido específicas.

La información sobre LDHs a nivel molecular en crustáceos es muy escasa. Recientemente se caracterizó un cDNA completo obtenido de branquias de *L. vannamei* de una LDH y se estudió su expresión durante la hipoxia, pero no existen datos de la estructura del gen y menos de las regiones codificantes y no codificantes. Por lo tanto, el caracterizar el gen de la LDH permitirá obtener información útil para llegar, en estudios posteriores, a entender la regulación de esta proteína en el camarón *L. vannamei*.

HIPÓTESIS

La estructura del gen de la lactato deshidrogenasa del camarón blanco *L. vannamei* es similar a la de vertebrados y posee varios intrones localizados en regiones equivalentes.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el gen de lactato deshidrogenasa en camarón blanco *L. vannamei*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener la secuencia nucleotídica del gen de LDH
- Comparar la secuencia del gen con los cDNAs de branquias y músculo.
- Identificar y caracterizar los intrones
- Describir la estructura del gen de LDH

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de DNA genómico

Actualmente existen diversas metodologías y sistemas comerciales para obtener DNA genómico (gDNA) que resultan en gDNA de calidad suficiente para diversas aplicaciones. Anteriormente se ha usado en el grupo de la Dra. Yepiz-Plascencia, con muy buenos resultados, un método que resulta en DNA genómico de muy buena calidad y que no usa un sistema comercial. Este método fue seleccionado ya que en experiencias anteriores, ha sido difícil amplificar fragmentos específicos de DNA genómico de camarón (Yepiz-Plascencia G., comunicación personal). En este método se usa la extracción de DNA basada en la digestión del tejido con proteinasa K para eliminar las proteínas, seguido de extracción con los solventes orgánicos fenol y cloroformo y la posterior precipitación con etanol del DNA.

Para el aislamiento de DNA genómico se usaron 2 g de músculo de *L. vannamei* siguiendo el método de (Bradfield y Wyatt, 1983), previamente usado para obtener DNA genómico de camarón (Gómez-Anduro, 2005). El tejido se homogenizó en un mortero estéril frío con 3 ml de buffer de homogenización frío (SDS 0.5%, EDTA 100 mM, pH 8, se agregó 200 µL de proteinasa K (200 µg/ml) y se incubó a 55 °C por 2 h. Posteriormente se centrifugó para remover el material insoluble a 800 g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se extrajo con 5 ml de fenol y 5 ml de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y centrifugó a 800 g por 10 min y este procedimiento se repitió dos veces. El sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 25 ml de etanol frío y al mismo tiempo se mezcló suavemente y se enredó en una varilla de vidrio las fibras formadas por el DNA. Posteriormente, se transfirió la varilla conteniendo el DNA y se resuspendió en 5 ml de NaCl 20 mM Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, y se colocó a 65 °C hasta que se disolvieron las hebras. Luego se agregó un volumen de RNasa A, libre de DNasa, teniendo una concentración final de 100 µg/ml y dejando incubar a 60°C durante 30 min. Se agregó después SDS al 0.5% y proteinasa K (100 µg/ml), respectivamente y se incubó a 55 °C durante 1 h. Posteriormente se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó durante 10 min a 800 g a temperatura ambiente, y se removió la fase acuosa superior a un tubo limpio. El sobrenadante se colocó en un tubo el cual

contenía dos volúmenes de etanol al 95 %, repitiéndose el paso de enredar el DNA en la varilla y lavar el DNA en 3 ml de etanol al 70% frío y por último resuspender el pellet en 1.5 ml de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0. La concentración se determinó por absorbancia a 260 nm y la pureza por las absorbancias a 260/280 nm. Este DNA genómico se utilizó como templado en reacciones de PCR para obtener los fragmentos correspondientes al gen de LDH.

Diseño de oligonucleótidos específicos

En base a la información obtenida previamente para el cDNA de branquias de la LDH de *L. vannamei* (Rodríguez-Armenta, 2007), se diseñaron oligonucleótidos correspondientes a diferentes regiones. Para el diseño se tomaron las siguientes consideraciones: 1) una temperatura de fusión (T_m) de 58 a 60 °C; 2) 50 % de guaninas (G) y citocinas (C); 3) un tamaño de 18 a 21 nucleótidos; y 4) que no formaran estructuras secundarias. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados de manera comercial por Integrated DNA Technologies (IDT), y las secuencias se muestran en la Tabla 1. Estos oligonucleótidos se utilizaron para obtener la secuencia completa del gen de LDH. También se diseñaron oligonucleótidos durante el avance del estudio de acuerdo a las secuencias nucleotídicas obtenidas y se incluyen en la misma tabla.

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos utilizados para obtener el gen de la LDH

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
LDHCBFw	GAATGGCCTGCGCCTTCT	LDHStRv	AATTCCGGCCTGAACGTCC
LDH2CBRTFw	ACTGAAGGGATACACCTCCT	LDHB2Rv	AGGAGGTGTATCCCTTCAGT
LDHrtMFw	GGGATACACTTCATGGGCC	LDHBL3Fw	GAGTCTCGTTTGTCCCTTGT
LDHrtMRv	GTAGACACGGCGTAAACAGTA	LDHBGFw	CACAAGGAAAGCATACGTTGC
LDH2rtFw	CCATGGTATCGACAAGGATG	LDHLB1Rv	CATAATTGCCACCATTTCGAGC
LDH2CBRTRv	GTTAGGGTCTGCTTGATGAC	LDHLARv	TCCTCTTTATTGTGGGGG
LDH2rtRv	CATTGTTGCATCACGCGCC	LDHRR2Fw	GCATAATGTATCCCAATCCAGG
LDH2CBRv	CTGGCCTTTAGGCACTCACAC	LDHABFw	CGTTGCATGGAAACTGTCTG
LDHCBRTFw	TGAAAAGTATGATGAACTCC	LDHBL2Rv	TGAGCCGATCACATGGTGC
LDHCBRTRv	AACACATCCTTGTCGATAC	LDHBA3Fw	ACGGATGGATCATTGGCGAG
LDHCBRv	GCCTTAGAACTGAATTCCGGC	LDHAM2Rv	ACGCACACCAGCAACATTAAC
LDH3CBRv	CTCTCCCTCCCTCTGACGAGC	LDHBG7Fw	GTTAATGTTGCTGGTGTGCGT

Número y nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Número y nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
LDHMinFw	ATGGCCTCTGTTCTGAAATG	LDHBL5Rv	TAGATATCGCCTTGGCTAGTG
LDHBLFw	AATGGCCTGCGCCTTCTCAC	LDHBG6Rv	TCCGTCTTTTATCAAACCTCTC
LDHAmFw	GTGTCAAACCCAGTGGATATC	BGLDH8Fw	TGAGACTCTGGAGCAATGTG
LDHAIRv	AGAAGGCGCAGGCCATTC	BGLDH9Rv	CAGACTTCCAGACCACACTG
LDHGrRv	ACAAGGGACAAACGAGACTC		

Amplificación del gen de LDH

El gen de LDH fue amplificado por PCR usando como templado gDNA y los diferentes oligonucleótidos diseñados, en un termociclador (DNA Engine Dyad, versión 2.0, BIORAD). La estrategia general consistió en obtener por PCR dos fragmentos grandes que se traslapan en una pequeña región. Uno de los fragmentos corresponde a la porción 5' y el otro a la 3'. Para esto se usaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos específicos, como se presenta más adelante. Para obtener el fragmento llamado 5', la reacción de PCR se preparó para tener un volumen final de 25 μ L conteniendo 1 μ L de cada oligonucleótido (20 μ M LDHMinFw y LDHB2Rv), 1 μ L de gDNA (100 ng/ μ L) y 22 μ L de SuperMix (Invitrogen). Las reacciones de PCR fueron realizadas en las condiciones de la Tabla 2 (programa 2 y 3). Para obtener el extremo 3' se utilizaron los oligonucleótidos LDH2CBRTFw y LDH2CBR, para lo cual se preparó una mezcla de reacción con un volumen total de 35 μ L, en la cual se usaron 1 μ L de cada oligonucleótido (20 μ M cada uno), 1 μ L de gDNA (100 ng/ μ L) y 32 μ L de SuperMix (Invitrogen). Las reacciones de PCR fueron realizadas en las condiciones de la tabla 2 (Programa 1) en el termociclador DNA Engine Dyad, (versión 2.0, BIORAD). Todos los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR-SAFE (Invitrogen).

Tabla 2. Condiciones de PCR para obtener los fragmentos de DNA

Programa 1		Programa 2		Programa 3	
1 ciclo	75°C 15 min	1 ciclo	75°C 15 min	1 ciclo	75°C 15 min
	94 °C 3 min		94 °C 3 min		94 °C 3 min
	94 °C 30 seg		94 °C 30 seg		94 °C 30 seg
36 ciclos	60°C 1 min	36 ciclos	57°C 1 min	36 ciclos	58°C 1 min
	68 °C 3 min		68 °C 4 min		68 °C 4 min
1 ciclo	68 °C 10 min	1 ciclo	68 °C 10 min	1 ciclo	68 °C 10 min
	4 ° C final		4 ° C final		4 ° C final

Clonación y secuenciación

Los amplicones obtenidos con las distintas combinaciones de oligonucleótidos, se clonaron en el vector de clonación p-GEM-T-Easy (Promega). Las características principales de este vector es que tiene sitios múltiples de restricción, un sitio múltiple de clonación, el promotor de la RNA polimerasa T7, genes de resistencia a la ampicilina. La clonación se inició con una reacción de ligación usando como templado los fragmentos obtenidos por PCR para la amplificación de los fragmentos 5' y 3' del gen de LDH. Posteriormente se realizó la transformación en células competentes de *Escherichia coli* TOP 10 siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Las colonias se analizaron por PCR para identificar el fragmento de interés, utilizando los oligonucleótidos universales T7 y SP6. Las colonias positivas fueron utilizadas para inocular 5 ml de caldo LB al que se agregó 5 μ L de ampicilina (100 mg/ml), se incubaron por 12-18 h a 37°C, se centrifugó a 12000 g por 5 min y el pellet bacteriano fue usado para el aislamiento del DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). El DNA plasmídico fue purificado con columnas GFX (Amersham Biosciences). En la columna de GFX se agregaron 500 μ L de buffer de captura e inmediatamente se agregó un volumen de 13 μ l de DNA plasmídico, evitando la saturación de la columna, posteriormente se mezcló el DNA plasmídico y se dejó incubando durante 1 min. Luego se centrifugó a 12000 g durante 1 min, se retiró el buffer de captura y se agregaron 500 μ L de buffer de lavado, luego la columna se centrifugó durante 1 min, se retiró el buffer de lavado y se agregaron 50 μ L de agua dejándose durante 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 1 min a 12000 g, se detectó el líquido conteniendo el DNA y por último se determinó la concentración del DNA plasmídico purificado por absorbancia a 260 y 280 nm.

Análisis de las secuencias nucleotídicas

Los clones y los diferentes amplicones fueron secuenciados por el método de terminación de cadena con dideoxidos (Sanger *et al.*, 1977) en el Laboratory of Genomic Analysis and Technology Core de la Universidad de Arizona. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa DNASTAR (Lasergene software for Sequence Analysis y Assembly), el cual se utilizó para la depuración de las secuencias de clones o amplicones y el traslape de secuencias, permitiendo obtener el gen de LDH. Las secuencias de los

nucleótidos fueron comparadas con bases de datos, usado el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) del Nacional Center for Biotechnology Information Bethesda, MD (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). En este programa se llevaron a cabo alineamientos múltiples, (cDNA de LDH contra el gDNA) los cuales permitieron la identificación de las regiones codificantes y no codificantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de DNA genómico

Para la caracterización del gen de la LDH se usó DNA genómico de músculo de camarón obtenido con el método de extracción de DNA basado en la digestión con proteinasa K para la eliminación de proteínas, seguido de extracción con los solventes orgánicos fenol y cloroformo y la precipitación con etanol del DNA, con las modificaciones detalladas en la sección de materiales y métodos. El DNA obtenido fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. En la Figura 3 se muestra un gel de agarosa, en donde se presenta el gDNA teñido con SYBR-SAFE. En el gel se detectó una banda de alto peso molecular arriba de 12000 pb, que aunque es tenue, detecta el gDNA. La muestra de gDNA tuvo una concentración de 541.12 ng/μl y buena pureza de acuerdo a las absorbancias 260/280 nm que fue de 2.0. Este gDNA se utilizó como templado en reacciones de PCR para obtener el gen de la LDH.

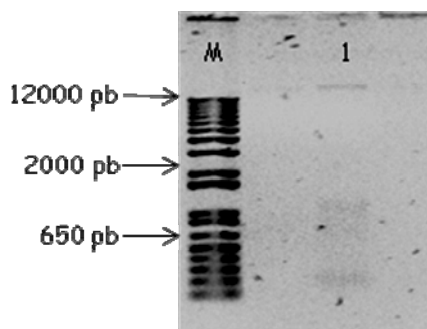


Figura 3. DNA genómico extraído de camarón blanco *L. vannamei*, analizado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBR-SAFE. Se cargaron 5.41 ug en el carril marcado como 1.

Diseño de oligonucleótidos para obtener el gen de la LDH

Partiendo de la información obtenida del cDNA de branquias de la LDH de *L. vannamei* (Rodríguez-Armenta, 2007) se probaron los oligonucleótidos ya existentes en el acervo del laboratorio utilizando como templado el gDNA de *L. vannamei* y se diseñaron

oligonucleótidos nuevos en base a las secuencias nucleotídicas obtenidas conforme avanzó el estudio. En la Tabla 3 se muestran los oligonucleótidos diseñados para obtener el cDNA de branquias anteriormente por (Rodríguez-Armenta, 2007), y que fueron aquí usados para obtener el fragmento 3' del gen de la LDH.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para cDNA de branquias y el fragmento 3' del gen de la LDH

Número y nombre del oligonucleótido		Secuencia (5' a 3')
1	LDHCBFw	GAATGGCCTGCGCCTTCT
2	LDH2CBRTFw	ACTGAAGGGATACACCTCCT
3	LDHrtMFw	GGGATACACTTCATGGGCC
4	LDHrtMRv	GTAGACACGGCGTAAACAGTA
5	LDH2rtFw	CCATGGTATCGACAAGGATG
6	LDH2CBRTRv	GTTAGGGTCTGCTTGATGAC
7	LDH2rtRv	CATTGTTGCATCACGCGCC
8	LDH2CBRv	CTGGCCTTTAGGCACTCACAC
9	LDHCBRTFw	TGAAAAGTATGATGAACTCC
10	LDHCBRTRv	AACACATCCTTGTCGATAC
11	LDHCBRv	GCCTTAGAACTGAATTCCGGC
12	LDH3CBRv	CTCTCCCTCCCTCTGACGAGC

Para obtener un fragmento correspondiente a la mitad 5' y algunos fragmentos internos del fragmento 3' del gen de la LDH, se diseñaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 4 y Figura 4, los cuales también poseen las características antes mencionadas. Para el diseño de estos oligonucleótidos se utilizó el cDNA de branquias (Rodríguez-Armenta, 2007) tomando en cuenta el fragmento 5' y diferentes fragmentos de regiones intrónicas del gen de la LDH.

Tabla 4. Oligonucleótidos para obtener el fragmento 5' del gen de la LDH

Número y nombre del oligonucleótido		Secuencia (5' a 3')	Número y nombre del oligonucleótido		Secuencia (5' a 3')
13	LDHMinFw	ATGGCCTCTGTTCTGAAATG	24	LDHRR2Fw	GCATAATGTATCCCAATCCAGG
14	LDHBLFw	AATGGCCTGCGCCTTCTCAC	25	LDHABFw	CGTTGCATGGAAACTGTCTG
15	LDHAMFw	GTGTCAAACCCAGTGGATATC	26	LDHBL2Rv	TGAGCCGATCACATGGTGC
16	LDHAIRv	AGAAGGCGCAGGCCATTC	27	LDHBA3Fw	ACGGATGGATCATTGGCGAG
17	LDHGrRv	ACAAGGGACAAACGAGACTC	28	LDHAM2Rv	ACGCACACCAGCAACATTAAC
18	LDHStRv	AATCCGGCCTGAACGTCC	29	LDHBG7Fw	GTTAATGTTGCTGGTGTGCGT
19	LDHB2Rv	AGGAGGTGTATCCCTTCAGT	30	LDHBL5Rv	TAGATATCGCCTTGGCTAGTG
20	LDHBL3Fw	GAGTCTCGTTTGTCCCTTGT	31	LDHBG6Rv	TCCGTCTTTTATCAAACCTCTC
21	LDHBGFw	CACAAGGAAAGCATACGTTGC	32	BGLDH8Fw	TGAGACTCTGGAGCAATGTG
22	LDHLB1Rv	CATAATTGCCACCATTTGCAGC	33	BGLDH9Rv	CAGACTTCCAGACCACACTG
23	LDHLARv	TCCTCTTTATTGTGGGGG			

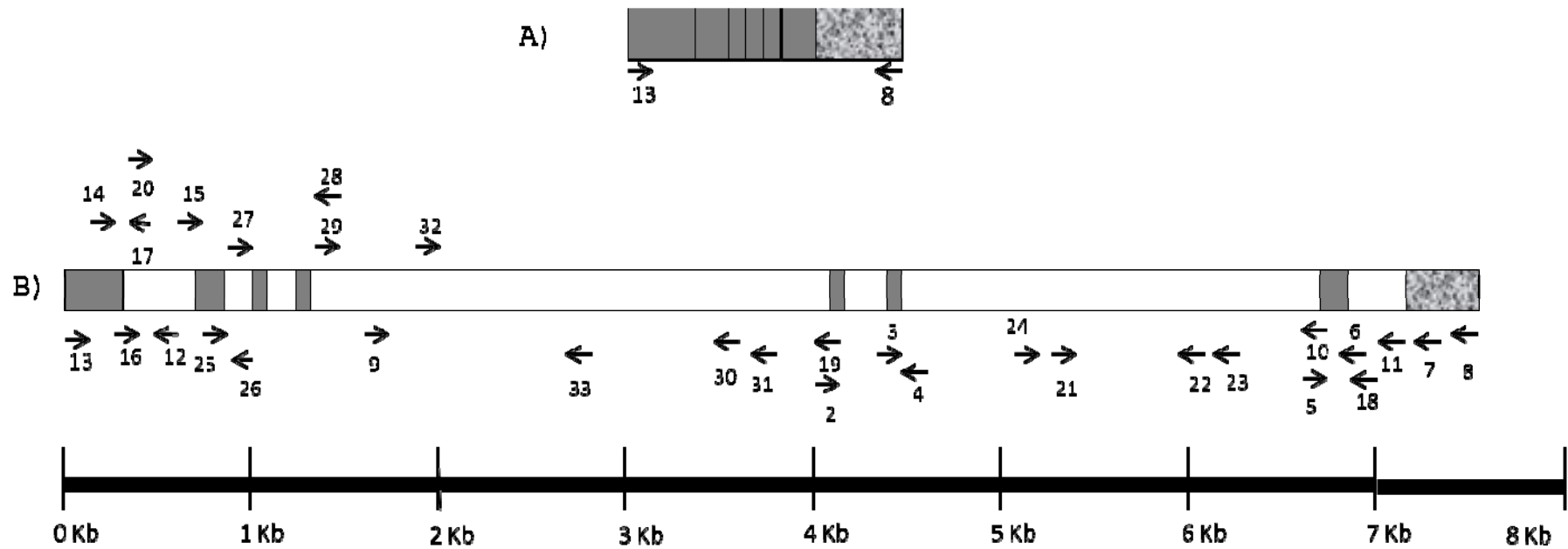


Figura 4. Ubicación de los oligonucleótidos usados en el mapa del gen de la LDH de camarón blanco *L. vannamei*. Los exones corresponden a los cuadros grises y los intrones a los blancos. El cuadro gris punteado corresponde al exón localizado en el 3'-UTR.

Caracterización y estructura del gen de la Lactato Deshidrogenasa

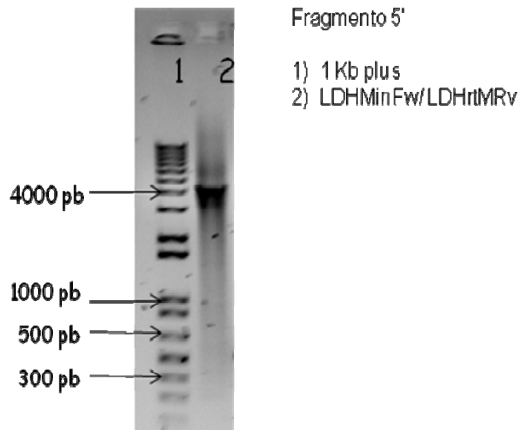
Preparación de dos fragmentos del gen de la LDH

Como previamente se mencionó en estudios anteriores se determinó la secuencia nucleotídica de un cDNA de branquias de LDH (Rodríguez-Armenta, 2007), pero no existe información sobre el gen de LDH y su estructura. Un fragmento de 4000 pb fue obtenido con los oligonucleótidos LDHMinFw y LDHrtMRv usando gDNA como templado por PCR y se muestra en la figura 5. En el panel A se muestra el fragmento 5' que corresponde al carril 2. Esta banda se intentó clonar en el vector p-GEM pero no se tuvo éxito, debido a que el tamaño del amplicon es grande. En el análisis de 20 colonias no se encontró ninguna con el inserto adecuado, por lo que se optó por obtener mayor cantidad de DNA del amplicon por PCR, el cual se purificó por columna GFX y se secuenció directamente.

Debido a que el tamaño del fragmento era muy grande, fue necesario obtener diferentes fragmentos internos del amplicon, utilizando distintas combinaciones de oligonucleótidos (Tabla 4). Para ello se obtuvo por reamplificación usando como templado el fragmento de 4 Kb, algunos fragmentos internos que fueron clonados, para posteriormente llevar a cabo el análisis de colonia por PCR; por lo general se obtuvieron de 2 a 3 colonias positivas, luego se preparó el DNA plasmídico a partir de cultivos inoculados con las colonias y para determinar la secuencia se purificó por columnas GFX y por último se secuenció.

En el panel B se muestra el fragmento 3' que corresponde al carril 2. Este fragmento se obtuvo con los oligonucleótidos LDHCBRTFw/LDH2CBRv y usando como templado gDNA y se obtuvo una banda muy abundante de un tamaño de 3000 pb. Esta banda se clonó usando el vector p-GEM, se analizaron 17 colonias de las cuales 1 colonia fue positiva, se aisló el DNA plasmídico, se purificó por columna GFX y por último se secuenció con diferentes oligonucleótidos (Tabla 3) hasta obtener todo el fragmento 3'.

Panel A)



Panel B

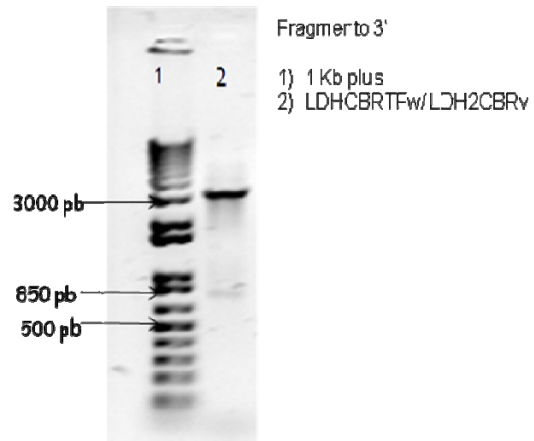


Figura 5. Análisis en geles de agarosa al 1 % teñidos con SYBR-SAFE de los fragmentos 5 y 3' del gen de LDH.

Secuencia nucleotídica de cDNA de LDH de branquias

El cDNA de la LDH de branquias es de 1465 pb con una región codificante de 999 pb (Rodríguez-Armenta, 2007) (Figura 6). Esta secuencia tiene la metionina inicial en el extremo 5', el codón de terminación y la señal de poliadenilación en el extremo 3', siendo esta última característica particular del mRNA. El cDNA de branquias fue base para obtener y caracterizar el gen de la LDH.

AGAGCCAGTTCGAAACACCAGGTTGGTTGCACGCATCTCTTCAGCTCCTCGACACAAAAAGGAAACAAGATGGCCTCTGTTCTCTGAAA 87
 M L M E Q I Q P P L T T S G G K V S V V G V G Q V G M A C 35
 TGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGAGGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAGCCGGGAATGGCCTGCG 174
 A F S L L T Q H I C S E L A L V D V A A D K L R G E M M D 64
 CCTTCTCACTCCTGACACAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGGAGAGATGATGGATC 261
 L Q H G L T F L R N V K I D A N T D Y A V T A G S R V C I 93
 TCCAGCACGGACTTACATTCCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAACACCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATG 348
 V T A G A R Q R E G E S R L S L V Q R N V D I F K G M I P 122
 TTA^{CT}GTCTGGTGTCTCGTCAGAGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATGATTCCCC 435
 Q L V K H S P N C I L L I V S N P V D I L T Y V A W K L S 151
 AGCTGGTAAAGCATTCCCCTAACTGCATCCTCCTCATTGTGTCAAACCCAGTGGATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTGTCTG 522
 G L P K H H V I G S G T N L D S A R F R F H L S Q K L S V 180
 GCCTCCCCAAGCACCATGTGATCGGCTCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTG 609
 A P S S T H G W I I G E H G D S S V P V W S G V N V A G V 209
 CTCCTCGTCCACCCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTCTGGTCTGGCGTTAATGTTGCTGGTGTGC 696
 R L R D L N P K V G T P E D P E K Y D E L H K D V V N S A 238
 GTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAACTCCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAGATGTTGTGAACAGTGCAT 783
 Y E I I K L K G Y T S W A I G L S V A S L V S S I V K N M 267
 ATGAGATCATCAA^{ACT}GAAAGGATACACCTCCTGGCCATCGGTCTCTCTGTGCGCTCTCTGGTGTGTCATCTATCGTCAAGAACATGC 880
 R A C Y A V S V A V Q N Y H G I D K D V F L S L P V V L G 296
 GCGCCTGCTATGCTGTCTCTGTAGCTGTTTCTGAGATGTTTCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGGT 967
 E N G V T H V I K Q T L T E A E I A Q L Q K S A N T L W D 325
 AGAACGGTGTCACTCATGTGCATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAGTCTGCTAACACACTCTGGGACG1054
 V Q A G I Q F . * 333
 TTCAGGCCGGAATTCAGTTCTAAGGCGCGTGATGCAACAATGTGAAGCTCTAGAAAACAACCTGACCTTGAACGTTTACAGCAATGGTT 1141
 CACGCTGGTGGCACTGCTTGAAGGATCAAATTTTCGAGGAGTGTAAATATACTGCCAAACGAGAAGGAAGAGAGAGTTTACATGCTGC 1228
 TAATGTGCAATATTTATTTGAGGATAGAATGGTTCTTGATTGTACTAAGGATGAAGTATTAATATGCGGTTCCAATACAGTGTATT 1315
 TTGCATTCTGCTGCATGTGCTTTTATGTATTTCAGGAGATCATATAGAGTAATAACTGATTATGGCTTATTGGTATAAGAGTGTGAG 1402
 TGCTTAAAGGCCAGATATATGTGATGAATTAGAATGATATTCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1475

Figura 6. Secuencia nucleotídica del cDNA de la LDH de branquias de camarón blanco *L. vannamei* (Rodríguez-Armenta, 2007). En subrayado se señala la metionina inicial, el codón de terminación y la cola poliadenilada.

Secuencia nucleotídica de cDNA de LDH de músculo

Una secuencia nucleotídica del cDNA de la LDH fue obtenida a partir de músculo recientemente por Soñanez-Organis *et al.*, (datos no publicados). La secuencia parcial es de un tamaño de 1018 pb, y se identificó la metionina inicial y el codón de terminación (Figura 8). Al comparar la secuencia nucleotídica del cDNA de la LDH de branquias con la secuencia nucleotídica cDNA de la LDH de músculo, se encontró 96 % de identidad cuando se analizó usando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Estas secuencias parciales de cDNAs de las LDHs fueron clave para la caracterización del gen de la LDH de camarón blanco *L. vannamei*. Las secuencias del cDNA de branquias y músculo difieren en 48 pb, estas secuencias se analizaron llevando a cabo alineamientos múltiples usando el algoritmo CLUSTAL, y el resultado se presenta en la Figura 7. En estas regiones, la secuencias tienen una identidad de 84 % de identidad.

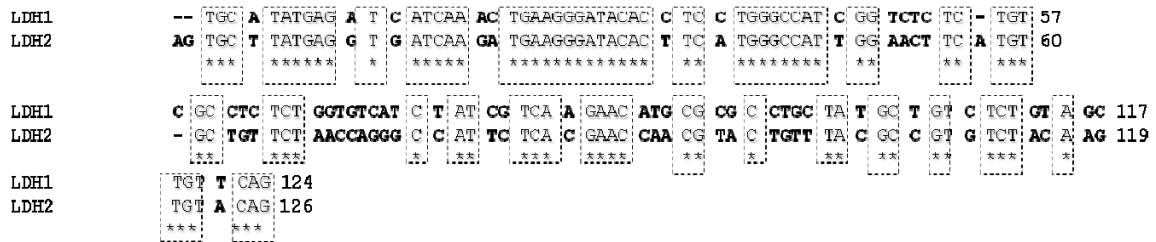


Figura 7. Alineamiento entre las dos regiones diferentes entre los cDNAs de branquias y músculo. En negritas se muestran las bases que son diferentes. Los recuadros representan las regiones idénticas.

Para facilitar la diferenciación de los cDNAs, se optó por llamarlas LDH1 a la obtenida de branquias y LDH2 a la derivada de músculo. Su comparación con secuencias reportadas en la base de datos GenBank usando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), detectó se un alto porcentaje de identidad de ambas, con diferentes especies (Tabla 5). Tanto LDH1 como LDH2 tienen un alto porcentaje de identidad con distintas LDHs de diferentes especies de moscas (Tabla 5), con 69 y 70 % de identidad. Ambas tienen también alta identidad con organismos vertebrados e invertebrados sin tener grandes diferencias, ya que se encuentran en 66 % de similitud de manera general (Tabla 5).

Tabla 5. Identidad de la LDH a nivel de nucleótidos con proteínas homologas de otras especies

Organismos	N° de acceso Genbank	% de identidad cDNA Branquias	% de identidad cDNA Músculo
Invertebrados			
<i>Culex quinquefasciatus</i>	XP 001866924.1	68 %	69 %
<i>Aedes aegypti</i>	XP 001662150.1	69 %	69 %
<i>Drosophila yakuba</i>	XP 002093920.1	69 %	69 %
<i>Drosophila virilis</i>	XP 0020047314.1	69 %	69 %
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_476581.1	69 %	70 %
<i>Drosophila mojavensis</i>	XP 002007947.1	69 %	70 %
<i>Drosophila erecta</i>	XP 001972110.1	69 %	70 %
<i>Glossina morsitans morsitans</i>	ADD18974.1	67 %	68 %
<i>Tribolium castaneum</i>	XP 968203.1	67 %	65 %
<i>Apis mellifera</i>	XP 394662.3	68 %	68 %
<i>Caenorhabditis remanei</i>	XP 003117501.1	67 %	67 %
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	XP 002631314.1	67 %	67 %
Vertebrados			
<i>Equus caballus</i>	NP 001138583.1	62 %	62 %
<i>Iguana iguana</i>	ANN05099.1	65 %	64%
<i>Macaca mulatta</i>	XP 00108554.1	62 %	64 %
<i>Mus musculus</i>	NP 001129541.2	60 %	64 %

M A S V P E M L M E Q I Q P P L T T S G G K V S V V G V G 29
ATGGCCTCTGTTCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCTGACCACCTCAGGAGGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGC 87
Q V G M A C A F S L L T Q H I C S E L A L V D V A A D K L 58
CAGGTGGGAATGGCCTGCGCCTTCTCACTCCTGACGCAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTG 174
R G E M M D L Q H G L T F L R N V K I D A N T D Y A V T A 87
CGTGGAGAGATGATGGATCTCCAGCATGGACTTACATTCTGAGGAACGTGAAGATTGATGCAAAACACCGATTATGCTGTGACAGCT 261
G S R V C I V T A G A R Q R E G E S R L S L V Q R N V D I 116
GGTCTCGTGTGTCATTGTTACTGCTGGTGCCTCGTCAGAGGGAGGGAGAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATC 348
F K G M I P Q L V K H S P N C I L L I V S N P V D I L T Y 145
TTCAAGGGCATGATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCCCTAACTGCATCCTCCTCATTGTCTCAAACCCCGTGGATATCCTGACCTAC 435
V A W K L S G L P K H H V I G S G T N L D S A R F R F H L 174
GTTGCATGGAAACTGTCTGGCCTCCCAAGCACCATGTGATCGGCTCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTG 522
S Q K L S V A P S S T H G W I I G E H G D S S V P V W S G 203
TCCCAGAAACTGAGTGTGCTCCCTCATCCACCACGGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGTACCTGTCTGGTCTGGC 609
V N V A G V R L R D L N P K V G T P E D P E K Y D E L H K 232
GTTAATGTTGCTGGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAACTCCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAA 696
D V V N S A Y E V I K M K G Y T S W A I G T S C A V L T R 261
GATGTTGTGAACAGTGTCTTATGAGGTGATCAAGATGAAGGATACACTTCATGGGCCATTGGAACCTTCATGTGCTGTTCTAACCCAGG 783
A I L T N Q R T V Y A V S T S V Q N Y H G I D K D V F L S 290
GCCATTCTCACGAACCAACGTACTGTTTACGCCGTGTCTACAAGTGTACAGAATTACCATGGTATCGACAAGGATGTGTTCTCTGAGC 870
L P V V L G E N G V T H V I K Q T L T E A E I A Q L Q K S 319
TTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGTGTCACTCATGTATCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCT 957
A N T L W D V Q A G I Q F * 333
GCTAACACACTCTGGGACGTTTCAGGCTGGAATTCAGTTCTAAGGCGCGTGATGCAACAATG 1018

Figura 8. Secuencia parcial de cDNA de la LDH de músculo de camarón blanco *L. vannamei* Soñanez- Organis *et al.*, (datos no publicados). En subrayado se muestra la metionina inicial y el codón de terminación.

Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen de la LDH de camarón blanco *L. vannamei*

La secuencia nucleotídica del gen de la LDH se obtuvo a partir de dos fragmentos grandes (Figura 10), un fragmento 5' de 4233 pb y un fragmento 3' de 3338 pb. Estos fragmentos se traslapan en la posición 4233 pb por 300 pb. Las secuencias de los cDNAs de branquias y de músculo fueron comparadas directamente con la secuencia genómica ensamblada de 7571 pb, usando BLAST y el programa DNASTAR, lo que permitió conocer la secuencia deducida en aminoácidos, facilitando con ello la identificación de las regiones codificantes y no codificantes. Así, se logró definir que la región coincide 100% con las secuencias de cDNA y de donde se deduce la región codificante de 1,125 pb, la cual corresponde a 373 aminoácidos más el triplete del codón de terminación. La gran diferencia en la longitud de estas secuencias permitió deducir que el gen de la LDH de camarón blanco *L. vannamei* tiene 8 exones y 7 intrones los cuales varían considerablemente en tamaño. En la secuencia del gen de la LDH *L. vannamei* se identificó la metionina inicial, algunos codones divididos y el codón de terminación (Figuras 9 y 10).

Entre las secuencias de los cDNAs de branquias y músculo existe una región única, es decir está presente en solo una de ellas. La región del cDNA de branquias está presente en la región 4282 a 4291 pb del gDNA, mientras que la de músculo se encuentra en la región 4565 a 4574 pb del gDNA. Lo anterior, permite deducir que en branquias está presente el exón 5, mientras que en músculo está presente el exón 6. La presencia de uno de ellos excluye la presencia del otro, permitiendo identificar la existencia de dos cDNAs derivados de los mRNAs generados por el corte y empalme, uno derivado del cDNA de músculo y otro, del cDNA de branquias, dando lugar a proteínas muy similares que difieren solo en una pequeña región. Estas proteínas deducidas son así, subunidades diferentes de la LDH. El corte y empalme alternativo también ocurre en el gen de la LDH-C de humanos, y resulta con dos mensajes diferentes que difieren en el extremo 5' en la región no traducida. Para generar el primer mensaje se excluye un intrón de 66 pb, y para el segundo mensaje se excluye un intrón de 27 pb (Cooker *et al.*, 1993).

M A S V P E M L M E Q I Q P P L T T S G G K V S V V G V G Q 30
ATGGCCTCTGTTCTGAAATGCTTATGGAGCAAATCCAGCCTCCCCTGACCACCTCAGGAGGCAAAGTGTCTGTGGTGGGTGTTGGCCAG 90
V G M A C A F S L L T Q H I C S E L A L V D V A A D K L R G 60
GTGGGAATGGCCTGGCCTTCTCACTCCTGACGCAGCACATCTGCTCTGAGCTGGCCCTGGTTGATGTTGCTGCTGACAAGCTGCGTGG 180
E M M D L Q H G L T F L R 73
GAGATGATGGATCTCCAACATGGACTTACATTCCTGAGgtggggttttcttgatcttaggcatcagtcaccttaatgtcttgttttatact 270
ctcatttgttgttattctgttttactttgtgttcagttttacctttttctttttcttctcggtcaatttcctctccccctaattcttaca 360
cccaacccactcccaagctgtgttttcttcttcttttcttctctcttacaataataactaaaaacacctgcctattactacagG 449
N V K I D A N T D Y A V T A G S R V C I V T A G A R Q R E G 103
AACGTGAAGATTGATGCAAAACCCGATTATGCTGTGACAGCTGGCTCTCGTGTGTGCATTGTTACTGCTGGTGCCTCGTCAGAGGGAGGGA 539
E S R L S L V Q R N V D I F K G M I P Q L V K H S P N C I L 133
GAGTCTCGTTTGTCCCTTGTACAGCGCAACGTGGACATCTTCAAGGGCATGATTCCCCAGCTGGTAAAGCATTCCCCTAACTGCATCCTC 629
L I V S N P 139
CTCATTGTCTCAAACCCCgtgagttttgttattgtctaatattgagaatattgataatatttcttggaaaattattaaaaaaaaaaaa 719
aaccttctcattaaaagtagtattgtgagcagtgctagacaattttgtactaactatacattacagaggctatgaagggttatgctaaaa 809
V D I L T Y V A W K L S G L P K H 156
tctatttctcttaaggaaccccttcttcttttttctcagTGGATATCCTGACCTACGTTGCATGGAAACTGTCTGGCCTCCCCAAGCAC 897
H V I G S G T N L D S A R F R F H L S Q K L S V A P S S T H 186
CATGTGATCGGCTCAGGCACCAACCTGGACTCTGCCAGATTCCGCTTCCACCTGTCCCAGAAACTGAGTGTGCTGCCCTCATCCACCCAC 987
G W I I G E H G D S S 197
GGATGGATCATTGGCGAGCATGGTGACTCCTCTGgtaaggaaacttgagattttaaatatttctgaaacatgtaagatgtgacagaaa 1077
catggaatataggaagatggctaaagagatgtatgtaagggttgcatgtggttaaaagctaaaaatttgatagttttaaagcaatgcatt 1167
V P V W S G V N V A 207
tattattgtgtaggtgtgaggttgaactgatctgtttgtttaaccacctcattttccacagTACCTGTCTGGTCTGGCGTTAATGTTGCT 1257
G V R L R D L N P K V G T P E D P E K Y D E L H K D V V N 236
GGTGTGCGTCTGCGTGACTTGAACCCAAAAGTGGGAATCCAGAAGATCCTGAAAAGTATGATGAACTCCACAAAAGATGTTGTGAACAGg 1347
taaatttctcctttcccttgagccttcggtataatttataaagtagcagaggtttctttatcttctgtcataagttcactactcat 1437
gatcgtttttaaaacggtgtactaaatttccattttatttttgatttagaattactctgtggatgaaacttatgacatgtaa 1527
ataatgtctcatctgggtcatgagcttgccaatttcttgccatctttttcacactgtattaatttggaaatcatgagatattcagctgtg 1617
cttgggtcaagcagttggcttcatcacgcaccttttgtattattattaatattttattttatttttttttttttttttttttttttttttt 1707
tttttctgctcctaaccattgagatttatattcatatttctgtatcaggtggtatagagtaggaattttacctagagcatgatttccact 1797
ttttgtattagttatttgaatattaagataaatttttctggttcgagcatgtttgtagaatgtaataatgtattttttacctgatgatt 1887
tatattcttcatctagtttaattgaatagcagtcgtcttactactcagtttactacagagctgttattaataatcattgtgtgctcat 1977
atagttctaataagtttttgatagtttaaagaataaactgctaagcttagagatgagactctggagcaatgtggtgagcattccctacct 2067
gactaaaggtaaggggtgggttcagaattcacccttaactcgactgagagctacaagcagatggttttgccccatgggaaaggaagaaaat 2157
aatagatgtggctttgcttctgactaaagtttatttctgttgcctcctgtgtccctaataatgtgataaatttgcttaaaattttgtttgttt 2247
tgttttttgatacttgagttaaattcaccactacttgcgaatcaccgcatgccccttgcttaagttccattttttttttctgctcatctg 2337
tgttttttgatacttgagttaaattcaccactacttgcgaatcaccgcatgccccttgcttaagttccattttttttttctgctcatctg 2427
cttttgccttagctttactttgatgctttactcagacactgtagatacatcacctcatatctttattcatgctaatgattcagacaatga 2517
ttaagtttaagggcttactgtaatgatcatctatgtgcacatacgtgtattttatttctatctatttatatcttggttttataatggt 2607
taaaatgattgttttagttaaattagttctgatttgcagtgtagattaaagattgttaaagaattatgcaatttttttttttttttttttt 2697
tttatttttagaagaggtgcaattgtctctgtattgaggttgatgaattaggctgttctccctatccatgaaatgagcattgttagag 2787
agttacctccgagtcagaagacaacactgtagtttaacagctcttgacatatttctttttaaagcaaatcctcaaacgtgggtccttt 2877
tttcatgttagaaattttgattgttttccatatagaaatgagaatggagaaatggaataggtgttttttactgcagattcagtggtgtc 2967
tggagctctgtatgaaaaatgcatttaaagtgataaaacatgtcaaaagcaccatgaaatgagaatgtcaggacaactttgtagcaaaaa 3057
tgcactatgatgtagatgaagcctgaaagctcctgtcacttttctcctccttctttccaaaacttttaaaatggggagttgcattcac 3147

ttcagacccaaaattagatgtaaatatgccataatcatagggcaaaaaagagaagaaaagaaaaatataaaaaactgagggaaagaagt 3237
atctgaaaatattttgtgagtaaaagatctttttgttacacaataatggattttggtaaaactactaaaaagtgctgatacttctgaaaaaaa 3327
gaataaataaaataaaaataaatttgaaactaaaaataaagagcataaaaatgagaaagctgcagggaaagagagatactttataactattgtt 3417
atataatatttccacacccatagctaataagtgcttataagttctcataggttttttaaatatgtagtagactatcacttataagatggatgc 3507
acaaggccagcattttcatcagagaagagaattatgttgtacacagaaaagcagatagcatgaagcttaccattctattgtctgtct 3597
tatgttaatgatcttgacgacgtacttttcttt 3687
ctttatacatgagagcgcattttagatcttattttctctagctactatatacactagccaaaggcgatatacacaataataggttaattgtgg 3777
gctggccaaaacttgtccaaaagggtatcagtagcttggctgttttctctccatagtgccgactcattaagataaaaggcgacatttgagag 3867
ggtttgctttgcttctgtcctttcagctcaaaaatttctctttattctgtgtacaatcttttttttttttttttttttttttttttttttttttt 3957
tgatataagcataatccactttactggtaaaattatgttctaaattaatgtgtaggttaacactagcttagacagcctaccgaataacttttag 4047
aagagattgatgaaaaaggaagatcaatgagagccatagataaagctaaagtttaagatttcatttttttgtttcaagaaacaagctcata 4137

S A Y E 240

ttcttaagaaagagaatagtggtgtgtctatttcccttgccatgatattatgcttggcattgtactctgagtggtttgagTGCATATGAG 4225

I I K L K G Y T S W A I G L S V A S L V S S I V K N M R A C 270

ATCATCAAAGTGAAGGGATACACCTCCTGGCCATCGGTCTCTCTGTGCGCTCTCTGGTGTCTATCTATCGTCAAGAACATGCGCGCTGC 4315

Y A V S V A V Q 278

TATGCTGTCTCTGTAGCTGTTTCAGgtatgtgggtaacgacttttcttaagtttagtggcagggcagggttatcttccagcaaaaaaaaggcaa 4405
gcagaacagatggctggctatgtaccagcttcaagcaagcaagcaaacagtaaaagggtaaaaatcacattttatgaattgggtgcactta 4495

S A Y E V I K M K G Y T S W A I G T S C A V L T R A I L T 307

cAGTGCTTATGAGGTGATCAAGATGAAGGGATACACTTTCATGGCCATTGGAACCTTCATGTGCTGTTCTAACAGGGCCATTCTCACG 4583

N Q R T V Y A V S T S V Q 320

AACCAACGTACTGTTTACGCCGTGTCTACAAGTGTACAGgtaccagatgatagctggaggagctgcagtgctcctgctgtgtattttcttt 4673
tgtttttccctcctttttcatctctgaaagctctgcatttttcttttccctctggtgcattttgagccagtttttaaaatcttttcccttg 4763
atccccgctcctttttcatgactcagagagaaaagaaaaaaagataatcatgctgatgattccaaaaatttcagaataaatcttttgttaa 4853
tcattggactaatgccaatattggctgaaacttactcctaagccattttataccatgtcagaaaaagaaaaaaaggagaaacattgcctctt 4943
tgaacagctogtgatgatggtagtagcatggtagcttttcttcaatgtatttgaagacaatttcttaatttagaaaaaaaggaaaaaatcaa 5033
atgggtccatgaaaactacatacttgccctctgtgttacoggtatgcagtttagatattaccaagttaaactttaacagaggtttcagattct 5123
atatttgttaccctgacttgggttcttagatttagatatttcttataattttaaatttttttattacctttatataatttttagtgatagctt 5213
tgatgtgcataatgtatcccaatccaggaataacaagtttctgacaacccatataccagataaaagcagtgatttttcttttctctctttcc 5303
actttctacttcttttgccatctcattgtgaagcattatcctttgcaatgctatttatacattgtttgtcccaagaatagtggttgca 5393
aggaaagcataacgtttgacattgtctgttagtcaaatcttttagccatgttcagcaacttagatttttagcagtgataccctttcagatga 5483
ttaaagctacgtttctgcccactgtacacaccagcttgcaagattggcatatctattaggaaaaagatgccaaagactactgcagatga 5573
aagaaattgtatttttctaaatttttttatatactatgtattctagaatataatcttccaaatattgcgattagtgtgaaggttatactg 5663
tacatattgtgagatgaattatttgaagagtgaaataatttttaggttaccttagtggttatgaaattcacctttgaggtttgtagctgag 5753
aggaggacataatactagggatatttttgataattctgcaactaaatgagtgatataatctgaaatgatatttgtggaaaagggtataat 5843
gactcagcaaatatctactttaaatataagcctacagctaaatgtgcccgtgatatgacaaaattgccaagttttaggtagtaagcact 5933
atgacatactacaaggtaggataatattaggattatataattggtaagttagaatagtagtctcatcattaagagagagaataacatttatca 6023
cagtttgaagataaagatgttatttctatatttaggaatataaggcattattaaagtttaagaaggctaagtgatgtattttgagcagataaa 6113
gagttggataaattgcctaaatttggctgaaacagtggaatagatgacatagtagacagtaagatgttagaaatgctgacatagttgtata 6203
tagtagtgctgcaaatgggtggcaattatgtatataatttttttagttaggattaattgtctctttagaagtgtagcatagaaaagt 6293
ttccccacaataaagaggaaataactattataattcaaaagtgatttgagtaaatatgttaagaatttacacaatgagacttaagttct 6383
tataaatttgatcttgaattttgtcttaaacctaaagtcaggtataatttcttggattaacataacctttttgtttttggaatgtttata 6473
ccatgtcccgtttttggcacaagatccatgaatatcataatttctaaataaatgccccctcaagctctgacagtaaatcaataact 6563
accgagtggtactttgagagtggaacacataagtaaaagaacaatttttttcaggaatagatataaaaaattggatcagtttaataattcat 6653
gattttttctgcattgttctggtagtt 6743
ttatttataagtgatagtagcgttaaccataaggcaaatttctccatcatctgatattttaaagaatagtttatagtttggggcattattg 6833

N Y H G I D K D V F L S L P V V L G E N G 341

ctataatacctgttctctttgcatagAATTACCATGGTATCGACAAGGATGTGTTCCTGAGCTTGCCTGTGGTCTTGGGTGAGAACGGT 6923

V T H V I K Q T L T E A E I A Q L Q K S A N T L W D V Q A G 371

GTCACCTCATGTCAAGCAGACCCTAACAGAAGCTGAAATTGCTCAGCTGCAAAAAGTCTGCTAACACACTCTGGGACGTTTCAGGCTGGA 7013

```

ATTCAGTTCTAAggcgcgatgcaacaatggtaatgtgtggtagttccttattacaagtgaagatttctgttgctttctccatthg 7103
atgcatgtaataaaaaaacaagtcttggtcacatggtgaatcattagaaggcattttgctggtcatttattatcatagatggaatctta 7193
attaatgttggtccagtgcggtgtcctaatgacttacgaaattttctttctccacaGTGAAGCTCTAGAAAACAACCTGACCTTGAACGT 7283
TCAGCAATGGTTCACGCTGGTGGCACTGCTTGAAGGATCAAATTCGAGGAGTGAAATATACTGCCAAACGAGAAGGAAGAGAGAGTTT 7373
ACATGCTGCTAATGTGCAATATTTACTTTGAGGATAGAATGGTCTTGATTGTACTAAGGATGAAGTATTAACATGCAGTTCCAATACAG 7463
TGTATTTTGCATTCTGCTGCATGTGCTTTTTATGTATTCAGGAGATCATATAGAGTAATAACTGATTATGGCTTATTGGTATAGGGAGTG 7553
TGAGTGCCTAAAGCCAG 7571

```

Figura 9. Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del gen de la LDH. La secuencia de los exones se presenta en mayúsculas y la de los intrones en minúsculas. La numeración a la derecha corresponde a la secuencia nucleotídica o de aminoácidos. Los codones divididos y el aminoácido correspondiente están subrayados.

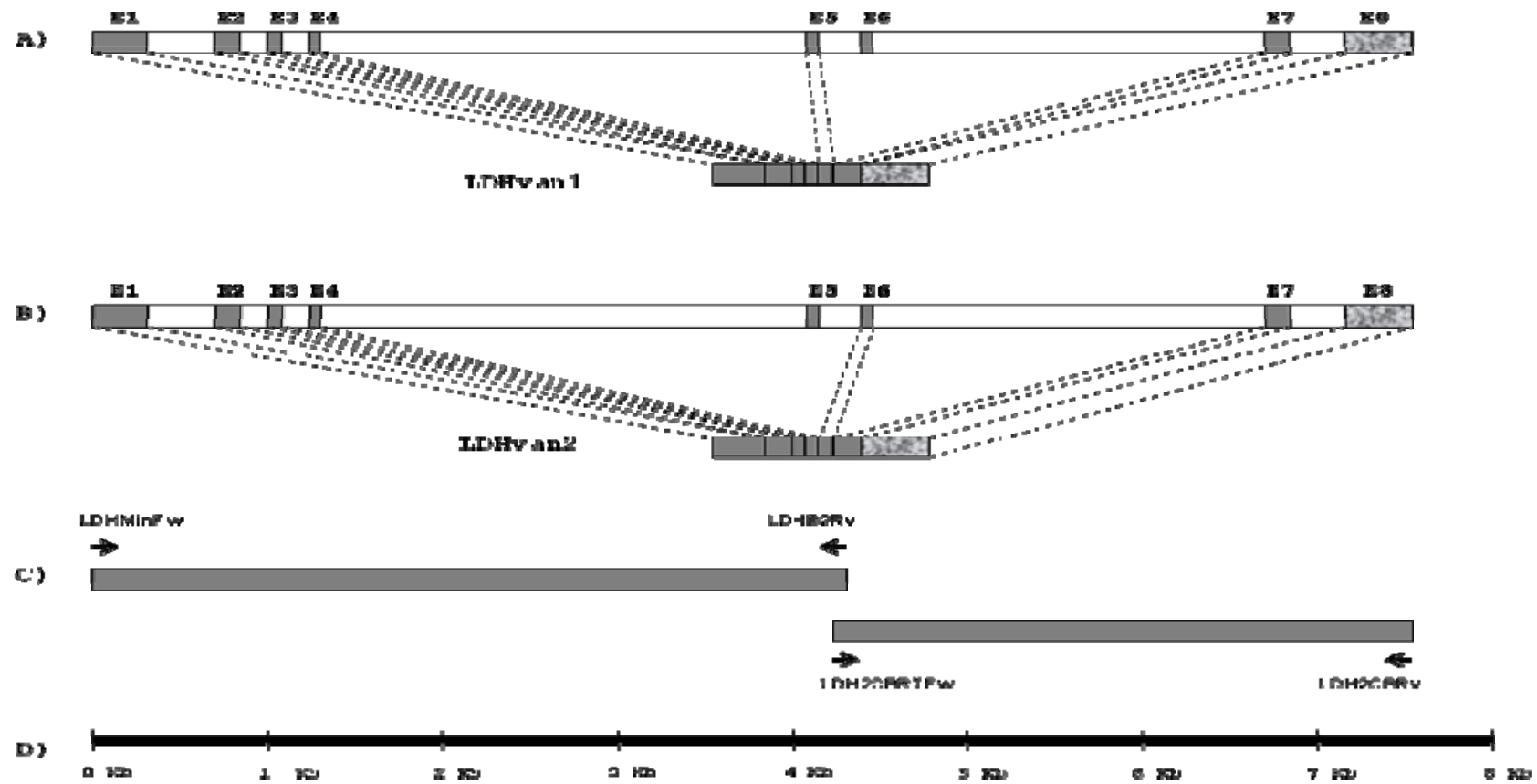


Figura 10. Mapa del gen de la LDH de camarón blanco *L. vannamei*. Diagrama de corte y empalme alternativo de los mensajes de LDH1 y LDH2. Ubicación de oligonucleótidos e identificación de los fragmentos 5' y 3'. En gris oscuro en los paneles A y B se presentan los exornes, mientras que los intrones se muestran en blanco. El cuadro gris punteado corresponde al exón localizado en el 3''-UTR.

En la Figura 10 se muestra el mapa del gen de la LDH del camarón blanco *L. vannamei* mostrándose la existencia de corte y empalme que da lugar a dos proteínas diferentes. En el inciso A se muestra el cDNA de la LDH de branquias (LDH1), el cual tiene una región codificante de 999 pb y al comparar con el gen de LDH se identificaron 6 exones los cuales dan lugar a una proteína de 333 aminoácidos. En el inciso B se muestra el cDNA de la LDH que se expresa en músculo (LDH2), el cual tiene una región codificante de 999 pb dando lugar a una proteína diferente a la que se traduce con el cDNA de la LDH de branquias. El exón 5 se encuentra presente en el cDNA de branquias (LDH1) y no el cDNA de músculo (LDH2), mientras que el exón 6 se encuentra presente en el cDNA de músculo y no en el cDNA de branquias. El gen de la LDH da lugar a dos proteínas de 333 aminoácidos. Este gen posee un exón 8 (Figura 10), el cual no es codificante para aminoácidos, pero se encuentra en la región 3'-UTR del gen de la LDH. En el inciso C se muestran los dos fragmentos obtenidos del gen de la LDH, ubicando las posiciones y los oligonucleótidos con los que se obtuvo los dos fragmentos. En el inciso D se muestra la escala usada en el mapa.

Composición de bases de los exones e intrones del gen de la LDH de camarón blanco *L.vannamei*

El gen de la LDH de camarón blanco *L. vannamei* posee 8 exones de distintos tamaños (Tabla 6), de los cuales solo 7 codifican para cada una de las dos proteínas diferentes, debido a la presencia de corte y empalme alternativo (Figura 10). El número, tamaños y localización de los exones (Tabla 6) son similares a lo encontrado en *Homo sapiens*. En humanos hay 7 exones con tamaños de 150, 118, 174, 176, 118, 124 y 162 pb. El tamaño del exón 3 de *L. vannamei* corresponde al tamaño del exón 3 de *Homo sapiens* indicando una alta conservación (Chung *et al.*, 1985). La composición de bases de los exones e intrones del gen de LDH es diferente. La base más abundante en promedio es T, seguida de G, C y A. El promedio general de G+C es de 49.53 %, mientras que el de A+T es de 50.46 % teniendo una diferencia en porcentaje de 0.93%. Tomando en cuenta que el exón 8 no se encuentra presente en la región codificante de la proteína, pero si en el gen de LDH de *L. vannamei*, es interesante encontrar que en este caso, la composición de bases es mas desigual, teniendo un porcentaje de G+C de 39.44 % comparado con los otros exones. Este

valor es por debajo de 46 % que corresponde al exón 6 y que después del exón 8, el valor de G+C es más bajo. Si se omite el exón 8, el promedio de G+C de los exones sube hasta 50.97%.

Tabla 6. Composición de bases de los exones

Exones	Tamaño						
	(nt)	% A	% G	% T	% C	% A+T	% G+C
1	218	19.27	28.90	25.23	26.61	44.29	55.71
2	200	21.50	25.50	26.50	26.50	48.48	51.52
3	174	20.11	22.99	22.99	33.91	43.10	56.90
4	118	27.12	27.12	26.27	19.49	52.99	47.01
5	124	19.35	23.39	29.03	28.23	48.41	51.59
6	126	26.19	24.60	26.98	22.22	53.17	46.83
7	165	26.67	24.85	26.06	22.42	52.73	47.27
8	322	30.12	24.84	30.43	14.60	60.56	39.44
Promedio		23.79	25.27	26.69	24.25	50.46	49.53

En invertebrados es poco lo que se conoce de genes de la LDH. Como ya se mencionó anteriormente, el nemátodo *C. elegans* tiene 2 pequeños intrones de un tamaño de 57 y 47 pb, que están localizados en posiciones similares a los intrones 2 y 6 de los genes de LDH de vertebrados, demostrando conservación de la estructura de este gen (Mannen *et al.*, 1995). En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* también se han realizado estudios del gen de la LDH, el cual tiene 4 exones y 3 intrones. La región codificante del gen de la LDH *Drosophila* tiene un 58 a 61 % de identidad y un 71 a 75 % de similitud con la LDH-A, -B y -C de humanos (Robin *et al.*, 1997). Al comparar el gen de LDH de *D. melanogaster* con el gen de LDH de *L. vannamei* se observó que el exón 3 de *D. melanogaster* tiene 80 % de identidad con el exón 7 de *L. vannamei*. La LDH de humanos posee 7 intrones en posiciones muy conservadas, mientras que el gen de la LDH de *Drosophila* tiene 3 intrones (Robin *et al.*, 1997), siendo ambos así, genes interrumpidos

por intrones. El gen de la LDH de *L. vannamei* tiene 7 intrones y 8 exones, el último localizado en la región 3' no traducida (3'UTR) y por lo tanto no codificante para aminoácidos. Solo 7 exones están en los mRNA maduros. La LDH1 tiene los exones 1, 2, 3, 4, 5 y 7; mientras que la LDH2, tiene los exones 1, 2, 3, 4, 6 y 7. Así, una tiene solo el exón 5, mientras la otra el exón 6, generados por el corte y empalme alternativo. En la comparación en los tamaños de los intrones y posiciones de los genes de LDH de vertebrados (Cooker *et al.*, 1993; Fukasawa *et al.*, 1986; Takano *et al.*, 1989; Takeno y Li, 1989) se encontró que son similares y que aunque *L. vannamei* pertenece al grupo de los invertebrados, este gen es también interrumpido por 6 intrones en la región codificante, al igual que los de vertebrados.

La composición de bases de los intrones es diferente a la de los exones (Tabla 7), con el valor más alto para T, seguido de A, G y finalmente C. Las regiones intrónicas tienen un promedio general de A+T de 66.14 % y de G+C de 33.86 % con una diferencia de 32.28 %. Esto contrasta con la composición de exones de G+C con 49.53 %, mientras para los intrones es de 33.86 %, características clásicas de las regiones codificantes de tener un mayor contenido de C+G (Lewin, 2008).

Tabla 7. Composición de bases de los intrones

Intrones	Tamaño						
	(nt)	% A	% G	% T	% C	% A+T	% G+C
1	230	16.96	10.00	46.96	26.09	63.91	36.09
2	199	33.67	15.58	38.69	12.06	72.36	27.64
3	207	33.82	22.71	33.82	9.66	67.63	32.37
4	2869	30.05	17.11	37.96	14.88	68.00	32.00
5	157	34.39	24.84	22.29	18.47	56.69	43.31
6	2238	31.81	16.62	37.40	14.16	69.21	30.79
7	224	27.23	20.09	37.95	14.73	65.18	34.82
Promedio		29.70	18.14	36.44	15.72	66.14	33.86

Las posiciones de las regiones codificantes del gen de LDH de *L. vannamei* se muestran en la Tabla 8, indicando el inicio y final de los diferentes exones, su tamaño, la existencia de cuatro codones divididos, su respectivo aminoácido y la región correspondiente de unión a ligandos en la proteína. El primer codón dividido ocurre entre el primer y segundo exón produciendo un codón dividido con las bases AG en el exón 1 y G en el exón2; este codón da lugar a arginina, siendo interrumpido por el intrón 1. El segundo codón dividido ocurre entre el exón 3 y exón 4 y corresponde a valina, al igual que el tercer codón dividido el cual se encuentra entre el tercer exón y el cuarto. El cuarto codón dividido se encontró en entre el cuarto y quinto exón y corresponde a serina.

También en la secuencia del gen de la LDH se identificaron los aminoácidos correspondientes a las regiones de unión a ligandos (Tabla 8). En humanos, en los genes de la LDH-A, LDH-B y LDH-C se encuentran presentes 4 codones divididos, el primer codón dividido se encuentra ubicado entre el los exones 2 y 3, correspondiendo al aminoácido asparagina, mientras que el segundo codón dividido se encuentra entre los exones 3 y 4 y corresponde a valina; al igual que el tercer codón dividido, éste se encuentra ubicado entre el cuarto y quinto exón y por último el cuarto codón dividido se encuentra entre el quinto y sexto exón, correspondiendo a serina (Chung *et al.*, 1985; Takano *et al.*, 1989; Takeno y Li, 1989). Al comparar los cuatro codones divididos de *L. vannamei* con los de humano, se pudo observar que el segundo y tercer codón corresponden al mismo aminoácido el cual es valina, al igual que el cuarto codón el cual corresponde a serina (Chung *et al.*, 1985; Takano *et al.*, 1989; Takeno y Li, 1989).

Tabla 8. Posiciones de los exones, codones divididos y regiones de unión a ligandos en la LDH

Exones	Posición	Tamaño (nt)	Codón dividido/aminoácido	Región específica y aminoácidos	
1	1-218	218	AG_G/R	NAD (unión a)	M33 al K57
2	449-648	200	G_TG/V		R99 y N138
3	848-1021	174	G_TA/V		
4	1229-1346	118	AG_T/S	Piruvato (unión a)	R106,R169,T248
5	4216-4339	124			
6	4497-4622	126		Sitio Activo	H193
7	6861-7025	165			
8	7249-7571	322	UTR - 3'		

Respecto a sitios específicos de la proteína deducida, se identificaron los sitios de unión a NAD que corresponden al aminoácido M33 y K57, así como los aminoácidos R99 y N138. Los sitios de unión a piruvato se encuentran en los aminoácidos R106, R169, T248, mientras que el del sitio de activo se encuentra en H193.

Los intrones del gen de la LDH de *L. vannamei* tienen regiones consensos comunes a la mayor parte de los intrones, las cuales son GT en el extremo 5' y AG en el extremo 3'. En la Tabla 9 se muestra una secuencia corta del inicio 5' y termino 3' de cada uno de los intrones. El análisis de estas secuencias encontró que las bases con mayor frecuencia en el extremo 5' son G con 100 % y T con 90 % mientras que en el extremo 3' la base A tuvo un 90 % y G un 80 % y que en comparación con las bases intermedias, éstas tienen un porcentaje mucho menor, de aproximadamente 65 %. En humanos en los genes LDH-A,

LDH-B y LDH-C también hay conservación de las secuencias consenso de GT en 5' y AG en 3' (Chung *et al.*, 1985; Takano *et al.*, 1989; Takeno y Li, 1989). Como se mencionó anteriormente en invertebrados es poco lo que se conoce. Sin embargo, en el gen de la LDH de *Drosophila* también cuenta con las regiones conservadas GT en el 5' y AG en el 3' (Robin *et al.*, 1997).

Por lo anterior, el gen de la LDH del camarón tiene las secuencias aceptoras y donadores canónicas de los intrones de eucariotas, a pesar de las grandes diferencias entre los grupos de invertebrados y vertebrados. Por otro lado, de forma interesante y como se ha visto con otras proteínas de camarón como la GST Mu (Contreras- Vergara *et al.*, 2004), la LDH de camarón parece ser mas similar a los homólogos de vertebrados que a los de invertebrados como la del nemátodo *C. elegans* (Mannen *et al.*, 1995). En estudios realizados por (Cristescu *et al.*, 2008) se comparó la evolución de la LDH de vertebrados con la LDH de invertebrados y al igual que en este trabajo se concluyó que la LDH de invertebrados tiene una alta similitud con la LDH de vertebrados. Por lo anterior, es importante que se realicen más estudios relacionados a la estructura y función de esta enzima que permitan discernir no solo las similitudes, sino también sean útiles para explorar si forman parte de mecanismos específicos de tolerancia o adaptación de las especies de camarones peneidos o de crustáceos a las bajas concentraciones de oxígeno.

Tabla 9. Extremos de 5' y 3' de los intrones y secuencias consenso

Intrones	Inicio											Termino										
	Posición 5'												Posición 3'									
1	219 pb	g	t	g	g	g	t	t	t	t	c	448 pb	a	t	t	a	c	t	a	c	a	g
2	649 pb	g	t	g	a	g	t	t	t	t	g	847 pb	t	t	t	t	t	t	t	c	a	g
3	1022 pb	g	t	a	a	g	g	a	a	a	c	1228 pb	t	t	t	t	c	c	a	c	a	g
4	1347 pb	g	t	a	a	a	t	t	t	c	t	4215 pb	t	g	g	t	t	t	g	c	a	g
5	4340 pb	g	t	a	t	g	t	g	g	g	t	4496 pb	t	g	c	c	a	c	t	t	a	c
6	4623 pb	g	t	a	c	c	a	g	a	t	g	6860 pb	t	t	t	g	c	a	t	t	a	g
7	7026 pb	g	g	c	g	c	g	t	g	a	t	7249 pb	t	t	t	c	t	c	c	a	c	a
Secuencia consenso		g	t	a	a	g	t	t	t	t	t		t	t	t	t	c	c/t	t	c	a	g
Porcentaje		100	90	70	60	70	70	70	60	60	60		90	80	80	60	60	60	60	70	90	80

CONCLUSIONES

El gen de la lactato deshidrogenasa de camarón blanco *L. vannamei*, es de 7571 pb y tiene 7 intrones y 8 exones. Los primeros 7 exones corresponden a la secuencia codificante, mientras que el exón 8 se encuentra en el extremo 3' UTR, o región no codificante. Los intrones tienen las secuencias canónicas en los brazos aceptores y donadores de los intrones. Los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 generan dos mRNAs diferentes en una pequeña región y que se generan por corte y empalme alternativo, mientras que el exón 8 se encuentra en la región 3' UTR. El exón 5 se encuentra presente en el cDNA aislado de branquias (LDH1) y no en el aislado de músculo (LDH2), mientras que el exón 6 se encuentra presente en el cDNA aislado de músculo y no en el cDNA de branquias.

La estructura del gen de la LDH de *L. vannamei* tiene alta similitud con los genes homólogos de vertebrados, ya que este gen es interrumpido por el mismo número de intrones y en posiciones muy similares aunque varían en sus tamaños. Estudios posteriores son necesarios para profundizar en el conocimiento del promotor y su forma de regulación a nivel transcripcional y a nivel de proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Bradfield, J.Y., Wyatt, G.R. (1983). X-linkage of a vitellogenin gene in *Locusta migratoria* *Chromosoma* 88, 190-193
- Castelló Orvay, F. (1993). Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción Primera Ed (Barcelona, España Universitat de Barcelona).
- Contreras-Vergara, C.A., Harris-Valle, C., Sotelo-Mundo, R., Yepiz- Plascencia, G. (2004). A Mu- Class Glutathione S-Transferase from the Marine Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular Cloning and Active- Site Structural Modeling *J Biochem Mol Toxicol* 18, 245-252.
- Cooker, L.A., Brooke, C.D., Kumari, M., Hofmann, M.C., Millán, J.L., Goldberg, E. (1993). Genomic structure and promoter activity of the human testis lactate dehydrogenase gene. *Biol Reprod* 48, 1309-1319.
- Cristescu, M.E., Innes, D.J., Stillman, J.H., Crease, T.J. (2008). D- and L-lactate dehydrogenases during invertebrate evolution. *BMC Evol Biol* 1, 268.
- Chung, F.Z., Tsujibo, H., Bhattacharyya, U., Sharief, F.S., Li, S.S. (1985). Genomic organization of human lactate dehydrogenase-A gene. *Biochem J* 231, 537-541.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., Sharples, D.J. (1990). *The Biology of the Penaeidae* (Academic Press, London).
- Fukasawa, K.M., Li, S.S. (1987). Complete nucleotide sequence of the mouse lactate dehydrogenase-A functional gene: comparison of the exon-intron organization of dehydrogenase genes. *Genetics* 116, 99-105.
- Fukasawa, K.M., Li, W., Yagi, K., Luo, C.C., Li, S.S. (1986). Molecular Evolution of Mammalian Lactate Dehydrogenase-A Genes and Pseudogenes: Association of a Mouse Processed Pseudogene with a B1 Repetitive Sequence. *Mol Biol Evol* 3, 330-342.
- Gladden, L.B. (2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium *J Physiol* 558, 5-30.
- Gómez-Anduro, G.A. (2005). Caracterización y expresión de los genes de superóxido dismutasa con manganeso en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Hill, R. (2007). Fisiología Animal Comparada: un enfoque ambiental (Ed. Reverté, S.A. Barcelona, España).
- Hill, R.W., Gordon, A. (2006). Fisiología Animal (Ed. Médica Panamericana. Madrid, España).
- Huang, J., Wu, X., Du, W., Yu, X. (2008). Identification, expression, characterization, and immunolocalization of lactate dehydrogenase from *Taenia asiatica*. *Parasitol Res* 104, 287-293.

- Imagawa, T., Yamamoto, E., Sawada, M., Okamoto, M., Uehara, M. (2006). Expression of Lactate Dehydrogenase-A and -B Messenger Ribonucleic Acids: Chick Glycogen Body. *Poultry Sci*: 85, 1232-1238.
- Lewin, B. (2008). *Genes IX*, Novena Ed. (Cambridge University).
- Mannen, H., Steven, S.L., Li (1995). The lactate dehydrogenase gene from nematode *Caenorhabditis elegans* contains only two of six introns conserved in the protein-encoding sequence of LDH genes from bird and mammals. *Biochem Mol Biol Int* 37, 1057-1061.
- Martínez-Cordova, L.R. (2002). *Camaronicultura avances y tendencias*, Primera Ed (AGT Editores, S.A. México, D.F.).
- Martínez-Cordova, L.R., Martínez, P., Cortés, J. (2009). *Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante?* *Rev Int Contam Ambient* 25, 181-196.
- Mathews, C.K., Holde, K.E., Ahern, K.G. (2003). *Bioquímica*, Tercera edn (Ed. Pearson Educación, S.A., Madrid).
- Robin, L., Abu, S., Fristom., J.W. (1997). IMP-L3, A 20- Hydroxyecdysone-Responsive Gene Encodes *Drosophila* Lactate Dehydrogenase: Structural Characterization and Developmental Studies. *Dev. Genet.* 20 11-22
- Rodríguez-Armenta, M. (2007). *Caracterización del Gen de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Expresión de Genes en Branquias del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* bajo cambios agudos de oxígeno y salinidad*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (Hermosillo, Sonora).
- Sakai, I., Sharief, F.S., Li, S.S. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA for sperm-specific lactate dehydrogenase-C from mouse. *Biochem J* 242, 619-622.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Peregrino-Uriarte, A.B., Hernández-López, J., Yepiz-Plascencia, G. (2006). Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem Mol Biol* 36, 241-249.
- Sanger, F., Nickell, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminator inhibitors *Proc. Nat. Acad. Scie. USA* 74, 5463-5467.
- Soñanez-Organis, J.G. (2006). *Caracterización y expresión de los genes de Hexocinasa, Fosfofructosinasa y Piruvato Cinasa de Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei**. Tesis de Maetría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (Hermosillo, Sonora).
- Soñanez-Organis, J.G. (2010). *Regulación de los genes glucolíticos hexocinasa y lactato deshidrogenasa por el factor inducido por hipoxia 1 en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei** Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (Hermosillo, Sonora).
- Tacon, A.G.J. (1990). *Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp Vol 1* (Redmond, Washington U.S.A. , Argent Laboratories Press).

- Takano, T., Steven, S., Li, S. (1989). Human testicular lactate dehydrogenase-c gene is interrupted by six introns at positions homologous to those of LDH-A (muscle) and LDH-B (heart) genes. *Biochem Biophys Res Comm* 159, 579-583.
- Takano, T., Li, S.S. (1989). Structure of the human lactate dehydrogenase B gene. *Biochem J* 257, 921-924.
- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., Zonno, V., Vilella, S., Ahearn, G.A., Storelli, C. (2001). D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas *Comp Biochem Physiol* 130A, 585-606.
- Yang, S., Parmley, S.F. (1997). *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts *Gene* 184, 1-12.
- (<http://noticias.universia.es/ciencia-nn-tt/noticia/2006/05/24/598475/acuicultura-cultivo-mar.html>) consultado el 02-12-10
- (http://www.panoramaacuicola.com/noticias/2010/09/23/acuicultura_renovado_nicho_de_oportunidad_en_mexico.html) consultado el 02-12-10