

Centro de Investigación e Implementación y Desarrollo Tecnológico

“ EXPRESIÓN DE LOS GENES MITOCONDRIALES DE LA ENZIMA
CITOCROMO C OXIDASA (Subunidades I-III) EN EL HEPATOPÁNCREAS

DE LA RATONAZA (RATTUS NORVEGICUS) EN EL HEPATOPÁNCREAS
DE LA RATONAZA (RATTUS NORVEGICUS)

por

IVÁN ANDURO CORONA

Presentado a la Comisión de Maestría y Doctorado
del Centro de Investigación e Implementación y Desarrollo Tecnológico

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

Trabajo de Maestría en Ciencias, presentado a la Comisión de Maestría y Doctorado del Centro de Investigación e Implementación y Desarrollo Tecnológico

MAESTRÍA EN CIENCIAS

C.I.A.D., A.C.
R ECIBID **O**
19 FEB. 2007
11774
BIBLIOTECA

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

Expresión de los genes mitocondriales de
la enzima citocromo c oxidasa
(subunidades I – III) en el hepatopáncreas
del camarón *Litopenaeus vannamei* en
respuesta al ayuno

POR:

IVÁN ANDURO CORONA

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

DICIEMBRE DEL 2006

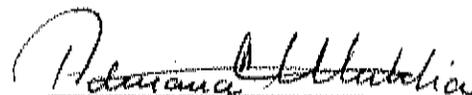
APROBACIÓN

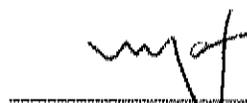
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Q.B. Iván Anduro Corona, la han encontrado satisfactoria y recomiendan ser aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias, dentro del programa de Maestría dentro de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.

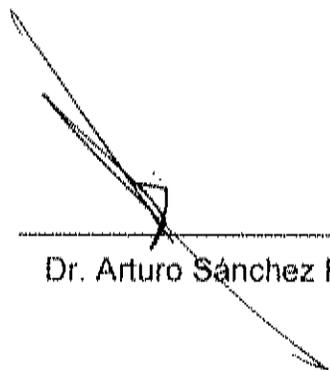

Directora de tesis

M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte


Dra. Gloria Yepiz Plascencia


Dra. Adriana Muhlia Almazán


Dra. María Islas Osuna


Dr. Arturo Sánchez Paz

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C. (CIAD), Apdo. Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, de la directora de tesis.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General

DEDICATORIA

A mi amigo el profesor Luna, por haber despertado en mí la inquietud por la ciencia, siempre le estaré agradecido por su apoyo, consejos y buen ejemplo.

A mis padres Héctor y Lupita con amor y respeto. Gracias por los consejos y el buen ejemplo que me han dado a lo largo de mi vida.

Con muchísimo cariño a mis hermanos Isaúl, Iris e Idalia, por apoyarme siempre en todas las decisiones que he tomado, los quiero.

A mis amigos Alejandra Clavero (Coco), José Guadalupe Soñanez (Brody), Adriana Montaña y Fco. Javier Morales que siempre han estado a mi lado.

Sobre todo a ti Carmelita porque estuviste conmigo en las buenas y en las malas cuando éramos novios, pero sobre todo ahora que eres mi esposa preciosa, te adoro corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., especialmente a la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal por permitirme desarrollar esta investigación en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos (LBMOA).

A CONACyT por su apoyo económico durante el desarrollo de la investigación, por permitirme participar en los proyectos 34348-B: Polimorfismo de los genes 12SrRNA, 16SrRNA, COI y COII de los camarones blanco (*Penaeus vannamei*), azul (*Penaeus stylirostris*) y café (*Penaeus californiensis*) del Pacífico Mexicano y 43566-Z: Expresión de genes y actividades de enzimas citosólicas y mitocondriales en hepatopáncreas de peneidos.

A los miembros de comité de tesis: Dr. J. Arturo Sánchez Paz, Dra. Adriana T. Muhlia Almazán, Dra. Gloria M. Yepiz Plascencia y Dra. María A. Istas Osuna. En especial a mi directora de tesis M.C. Alma Beatriz Peregrino Uriarte, por su apoyo y comprensión.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos: Adriana, Carmen, Arturo, Martín, Alejandro, Mariana, Rogerio, Karina, Martita, Aldo, **Coco, Brody**, Oly, Emmanuel y a todas aquellas personas que ayudaron de una u otra forma en la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique Ramos Salas por su valioso apoyo en el análisis estadístico de los resultados en este trabajo.

INDICE

APROBACIÓN	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE	vi
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES	4
Características Biológicas de los Peneidos	4
Características morfológicas	4
Muda y ayuno.....	4
Metabolismo Energético	6
Importancia de la mitocondria	6
Transporte de electrones y fosforilación oxidativa.....	7
Citocromo c oxidasa	8
Regulación de la Expresión Génica.....	9
Transcripción del DNA mitocondrial	9
Efecto del ayuno en la transcripción y la traducción.....	11
Coordinación de la regulación de la expresión génica núcleo-mitocondria.....	14
qRT-PCR en tiempo real.....	14
Genes de referencia.....	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Bioensayo y Obtención de Muestras	20

Análisis de la Integridad del RNA Total.....	20
Purificación de RNA Total.....	21
Detección de contaminación con DNA genómico.....	21
Eliminación de la contaminación de las muestras de RNA total.....	21
Transcripción Reversa y Amplificación por PCR Convencional.....	22
PCR en Tiempo Real.....	24
Preparación de la curva estándar para PCR en tiempo real.....	25
Cuantificación relativa de la expresión génica por qRT-PCR en tiempo real	25
Análisis de datos.....	26
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
Obtención del RNA total Hepatopancreático.....	29
Detección y Eliminación de la Contaminación con gDNA por PCR.....	30
Funcionalidad de la RT-PCR para COI, COII, COIII y 16S.....	32
Curvas Estándar de las Corridas de PCR en Tiempo Real.....	33
Efecto del Ayuno en la Expresión de los Genes COI, COII y COIII.....	33
CONCLUSIONES.....	45
RECOMENDACIONES.....	46
REFERENCIAS.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las mezclas de reacción de PCR para <i>COI</i> , <i>COII</i> , <i>COIII</i> y <i>16S</i>	23
Tabla 2. Características de los iniciadores específicos para PCR en tiempo real.....	23
Tabla 4. Tratamiento de los RNAs con DNasa I.....	31

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características externas de <i>Penaeus</i> spp.....	5
Figura 2. Esquema general de la cadena de transporte de electrones.....	8
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído del RNA total.....	29
Figura 4. Amplificación de un fragmento de 750 pb del gen <i>COIII</i>	30
Figura 5. Amplificación de un fragmento de ~ 200 pb de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> , <i>COIII</i> y <i>16S</i>	32
Figura 6-A. Cocientes de expresión de los genes de las subunidades <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i>	35
Figura 6-B. Cocientes de expresión del gen del RNA ribosomal <i>16S</i>	35
Figura 7. Expresión de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i> aplicando el análisis de cocientes contra el tiempo cero.....	36
Figura 8. Expresión de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i> analizados ignorando los controles de los tratamientos.....	37
Figura 9. Organización del genoma mitocondrial en <i>Daphnia pulex</i>	38
Figura 10. Expresión de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i> normalizada con la expresión del gen <i>16S</i> rRNA.....	39
Figura 11. Expresión de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i> normalizada con la expresión del gen <i>16S</i> rRNA aplicando el método de Pfaffl.....	39
Figura 12. Expresión de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i> normalizada con la expresión del gen <i>16S</i> rRNA aplicando el análisis de cocientes contra el tiempo cero.....	40
Figura 13. Expresión de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i> normalizada con la expresión del gen <i>16S</i> rRNA analizados ignorando los controles de los tratamientos.....	41
Figura 14. Expresión de los genes <i>COI</i> , <i>COII</i> y <i>COIII</i> normalizada con la expresión del gen de la proteína ribosomal L8.....	42

RESUMEN

El hepatopáncreas de los crustáceos es uno de los órganos con mayor actividad metabólica, requiriendo de una gran producción de energía para el mantenimiento de sus funciones; entre las que se encuentran la síntesis y secreción de las enzimas digestivas y el almacenamiento de reservas energéticas. Durante el ciclo de muda, el camarón ayuna y la alimentación se reanuda hasta que el exoesqueleto se ha formado nuevamente, El manejo de las fuentes energéticas (carbohidratos, lípidos y proteínas) en un organismo bajo estrés alimenticio, depende de la disponibilidad de metabolitos. Las reservas energéticas son hidrolizadas y usadas para producir ATP dentro de la mitocondria, en donde se encuentra el complejo enzimático de la citocromo c oxidasa que forma parte de la cadena de transporte de electrones. El objetivo general de este trabajo fue investigar el efecto del ayuno sobre la expresión de los genes mitocondriales de citocromo c oxidasa (subunidades I - III) en el hepatopáncreas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, por lo que se evaluó la expresión de los genes durante un período de ayuno de hasta 120 h por RT-PCR cuantitativo en tiempo real, comparando con los controles alimentados para cada tiempo de ayuno y con los niveles de expresión del gen mitocondrial 16S rRNA y el nuclear de la proteína ribosomal L8 nuclear como posibles genes de referencia. Los resultados del análisis de la expresión independiente de COI, COII y COIII sin normalizar y comparando con los controles alimentados, mostraron un aumento significativo a las 24 h de ayuno, que disminuyeron al nivel inicial a las 72 h y, posteriormente se recuperaron significativamente en los camarones realimentados. De la misma forma, en el análisis de la expresión normalizada con la del gen 16S, y comparada contra el tiempo cero, presentaron un aumento a las 24 h de ayuno, mientras que en los camarones realimentados el efecto fue diferente para cada gen. Los cambios observados en el nivel de los transcritos de estos genes durante el período de ayuno sugieren un posible sistema de regulación postranscripcional.

INTRODUCCIÓN

El aumento en la comercialización y demanda de algunas especies de peneidos como el camarón ha promovido su cultivo desde hace más de dos décadas, provocando una creciente necesidad por conocer sus aspectos biológicos (Martínez-Córdova, 1999). De este modo, en los últimos años se han venido realizando investigaciones con el objetivo de entender los aspectos biológicos importantes del camarón, sin embargo, el estudio del metabolismo energético empieza apenas a ser explorado.

Uno de los aspectos ya discutidos en trabajos anteriores de la biología de los peneidos al igual que de otros crustáceos, es el ciclo de la muda, los camarones necesitan mudar para poder crecer (Dall *et al.*, 1990; Petriella y Boschi, 1997). En esta etapa conocida también como ecdisis, los camarones no se alimentan hasta que el nuevo exoesqueleto se ha formado. Durante el período del ciclo de muda en el que los camarones no se alimentan por carecer de un exoesqueleto que les permita manipular el alimento, se utilizan sus reservas energéticas almacenadas en forma de glucógeno y ácidos grasos para mantener su funcionamiento celular. Por lo anterior, se presentan cambios en la expresión de algunos genes relacionados con la degradación y síntesis de las fuentes energéticas (Zinke *et al.*, 2002).

En el ciclo de Krebs se catabolizan diversas moléculas para generar poder reductor ($\text{NADH} + \text{H}$ y FADH_2). Estas coenzimas son reoxidadas en la cadena de transporte de electrones para producir ATP dentro de la mitocondria. La mitocondria contiene su propio genoma (Mathews *et al.*, 2002), que codifica trece proteínas participantes en la cadena de transporte de electrones, incluyendo las tres subunidades de la citocromo c oxidasa (I-III) que forman el núcleo catalítico de la enzima. La capacidad codificante del genoma mitocondrial es muy limitada y la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas en el núcleo, en donde se encuentran los genes del resto de las subunidades de la citocromo c oxidasa que forman la estructura enzimática.

Poco se conoce sobre la regulación de la expresión de los genes mitocondriales en animales, sin embargo, su expresión podría ser afectada por diferentes tipos de estrés. Por ejemplo, en los últimos años se han publicado varios estudios que reportan la sobreexpresión de algunas subunidades de la citocromo c oxidasa en vertebrados, por estímulos como el envejecimiento (Pich *et al.*, 2004), adaptación térmica (Ikegushi *et al.*, 2006) e hibernación (Hittel y Storey, 2002), entre otros. Sin embargo, a la fecha no se han encontrado reportes relacionados con la expresión de los genes mitocondriales bajo condiciones de ayuno en crustáceos.

Por lo anterior, la información generada en este estudio contribuirá al conocimiento integral de la expresión de los genes del metabolismo energético, y permitirá entender un poco sobre las estrategias de adaptación utilizadas por estos organismos ante condiciones de estrés alimenticio. En el presente trabajo se evaluó el efecto del ayuno sobre la expresión de los genes de la enzima citocromo c oxidasa (subunidades I - III), en el hepatopáncreas del camarón blanco *L. vannamei*, por qRT-PCR en tiempo real. Para lo anterior, se utilizaron muestras de RNA total de hepatopáncreas de camarones sometidos a diferentes tiempos de ayuno y sus controles alimentados. A partir de estas muestras se sintetizaron los cDNA para determinar el nivel estable de transcrito para cada gen, por PCR en tiempo real.

ANTECEDENTES

Características Biológicas de los Peneidos

Características morfológicas

En el cuerpo de los crustáceos se distinguen tres partes: telson, abdomen (que incluye los apéndices locomotores) y el cefalotórax. Este último segmento incluye los apéndices de alimentación (Barnes, 1996) como se muestra en la Figura 1, así como la mayor parte de los órganos vitales del animal (Dall *et al.*, 1990). El sistema digestivo de los crustáceos, incluye la boca, estómago y hepatopáncreas (Martínez-Córdova, 1999). El hepatopáncreas (Hp) del camarón, como el de otros crustáceos, es un órgano con gran actividad metabólica, y es responsable de la síntesis y secreción de las enzimas digestivas que realizan la degradación del alimento. El Hp sintetiza también todas las proteínas necesarias para mantener la integridad y función celular. Fisiológicamente, el Hp es similar al hígado y páncreas de vertebrados y al cuerpo graso de los insectos y almacena reservas energéticas como lípidos y carbohidratos (Dall *et al.*, 1990). Por lo anterior, el Hp podría verse directamente afectado por el ayuno, condición obligada para el camarón en una etapa de su ciclo de muda que se describirá a continuación.

Muda y ayuno

La muda o ecdisis se define como el evento por el cual un organismo cambia su exoesqueleto o cutícula exterior. Los crustáceos deben mudar para crecer continuamente durante su desarrollo, donde después de un rápido crecimiento en la muda sigue un periodo en el cual no crece hasta la próxima ecdisis (Dall *et al.*, 1990).

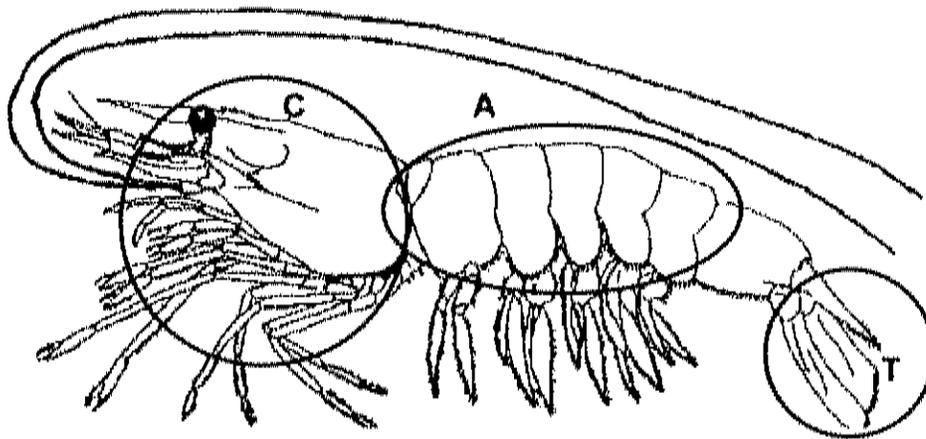


Figura. 1 Características externas de *Penaeus* spp. C: cefalotórax, A: abdomen y T: telson (Fuente: Whitaker, 2005).

El ciclo de muda está dividido en varias etapas, mismas que afectan la morfología, fisiología y comportamiento de los crustáceos. La duración de cada una de estas etapas varía considerablemente entre los diferentes crustáceos, aunque en los peneidos, el ciclo de muda tiende a ser un proceso homogéneo en tiempo (Dall *et al.*, 1990). El primero de los estadios del ciclo es la postmuda que dura de 1.5 a 2 días y se presenta cuando el animal acaba de abandonar el caparazón, continuando con la formación de la nueva cutícula y su endurecimiento. La siguiente etapa se denomina intermuda y dura aproximadamente 3.5 a 4.5 días, es aquí cuando el exoesqueleto se engrosa y endurece, hay crecimiento de tejidos y acumulación de reservas energéticas. La tercera etapa del ciclo de muda es la premuda que dura de 14.5 a 15.5 días, en esta etapa el organismo reabsorbe minerales y materiales orgánicos del exoesqueleto y mientras se prepara para liberarlo, genera el nuevo exoesqueleto debajo del anterior. Finalmente, se lleva a cabo la liberación del antiguo exoesqueleto o ecdisis en aproximadamente 30 a 40 s. Durante la última parte de la premuda, incluyendo la muda y una parte de la postmuda, el camarón ayuna por un periodo de hasta 5 días, ya que carece de soporte mecánico para la alimentación (Dall *et al.*, 1990; Petriella y Boschi, 1997).

Metabolismo Energético

El manejo de las reservas energéticas (carbohidratos y lípidos) en un organismo bajo estrés alimenticio, depende de la disponibilidad de metabolitos (Lindsley y Rutter, 2004). Los productos de su degradación, se usan como combustible en el ciclo de Krebs, donde se genera el poder reductor ($\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2), el cual es usado por la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa para producir ATP, dentro de la mitocondria (Mathews *et al.*, 2002).

Importancia de la mitocondria

Lynn Margulis propuso en 1968 que las mitocondrias son los descendientes modernos de antiguas células procariotas, mismas que se vieron obligadas a convertirse en endosimbiontes de otras células que evolucionaron junto a éstas (Keeton, 1972). La mitocondria es un organelo presente en las células de prácticamente todos los organismos eucariotas. La cantidad de mitocondrias es variable dependiendo del tejido, en las células hepáticas de rata hay alrededor de 1000 mitocondrias, mientras que en las células de huevo se pueden encontrar algunos miles (Lehninger, 1975). Este organelo tiene dos membranas, con un espacio intermembranal y una matriz rica en enzimas que incluye el DNA mitocondrial (mtDNA), distinto al que se encuentra en el núcleo (Stryer, 1995). En general el mtDNA se hereda maternamente (Ingman *et al.*, 2000), sin embargo, en estudios realizados en borrego *Ovis aries* (Zhao *et al.*, 2004) y en caballos (Royo *et al.*, 2005), se han reportado excepciones a esta regla.

Las membranas internas de la mitocondria proveen el soporte de los procesos de transporte electrónico que las células utilizan para la fosforilación oxidativa y producción de ATP (Alberts *et al.*, 2002). Mientras en la matriz mitocondrial se llevan a cabo procesos vitales como el ciclo de Krebs y la oxidación de ácidos grasos. Estos procesos generan intermediarios en la síntesis energética que serán aprovechados por

la célula (Stryer, 1995; Mathews *et al.*, 2002). La matriz tiene además, un potencial electroquímico directamente relacionado con procesos de apoptosis y proliferación. Por último, es responsable del estado redox intramitocondrial, que puede regular la expresión génica (Zorov *et al.*, 1997).

Transporte de electrones y fosforilación oxidativa

La cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se componen de cinco complejos enzimáticos, cada uno con varias subunidades (Figura 2). La biogénesis de los complejos enzimáticos, excepto el complejo II, requiere de la expresión de genes localizados en los genomas mitocondrial y nuclear. Los mecanismos que posiblemente coordinen la expresión de estos genes no son claros (Duborjal *et al.*, 2002). Los sustratos (NADH, NADPH, FADH₂) son usados por las enzimas participantes, produciendo equivalentes reducidos por medio de los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa). La ubiquinona (coenzima Q), transporta electrones desde los complejos I y II al complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa), el cual es reducido a citocromo c. Este último transfiere electrones al complejo IV (citocromo c oxidasa), conduciéndolos al complejo V (ATPasa) para la producción de ATP (Szuplewski y Terracol, 2001).

Trece de las proteínas participantes en la cadena del transporte de electrones, esenciales para la producción de ATP, son codificadas en el genoma mitocondrial. Estas comprenden las subunidades 6 y 8 de la ATP sintasa; las subunidades 1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6 de la NADH deshidrogenasa; el citocromo b y las subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa. Esta última, es la enzima objeto de este estudio y es la enzima terminal en la cadena respiratoria para la formación de ATP (Szuplewski y Terracol, 2001).

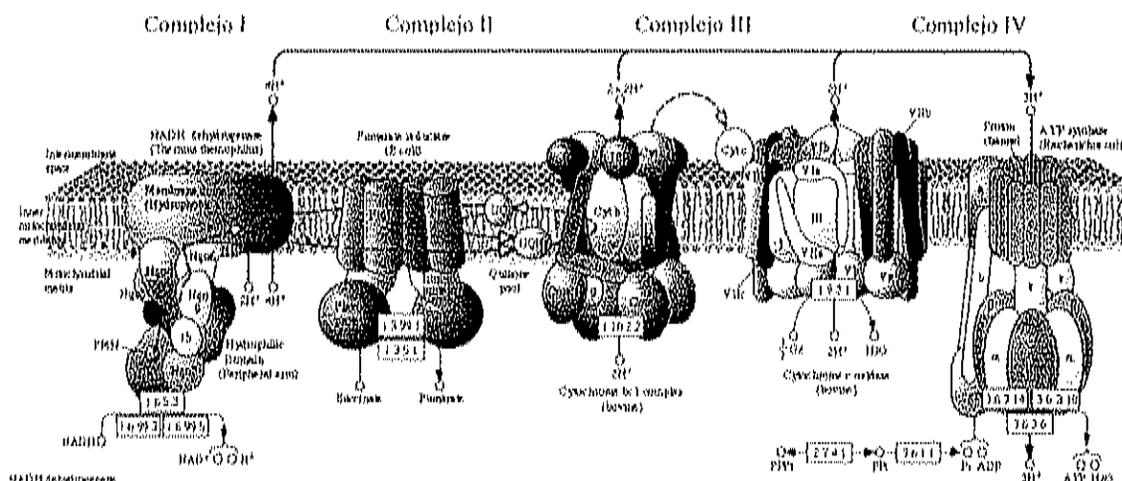


Figura 2. Esquema general de la cadena del transporte de electrones, modificada de <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00190.html>.

Citocromo c oxidasa

Las tres subunidades más grandes de la citocromo c oxidasa (I, II y III) forman el núcleo catalítico de la enzima (Hittel y Storey, 2002). Estas tres subunidades son altamente conservadas entre diferentes organismos eucariotas. Sus homólogos en procariotas constituyen la enzima funcional (Khalimonchuk y Rodel, 2005); por lo que se cree que las 10 subunidades nucleares de la citocromo c oxidasa (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII), que forman la estructura enzimática, han evolucionado después de la endosimbiosis (Vijayasarithy *et al.*, 2003). Algunas de las subunidades nucleares actúan como reguladores de la formación enzimática (Ludwing *et al.*, 2001).

La enzima citocromo c oxidasa se clasificó como *E.C. 1.9.3.1* por la Comisión de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB). Es una enzima oxidoreductasa que actúa sobre un grupo donador hemo y tiene como aceptor final al oxígeno. El complejo IV contiene dos citocromos, el citocromo a y el a_3 y dos centros cobre, el Cu_A y el Cu_B . El sitio de unión del sustrato citocromo c y el centro Cu_A se encuentran en la subunidad II. El centro binuclear a_3/Cu_B donde se lleva a cabo la

reducción del oxígeno se localiza en la subunidad I, por otra parte, la subunidad III de la enzima está directamente relacionada con la relación H^+/e^- (Ludwing *et al.*, 2001). Se sabe que el cianuro y el óxido nítrico se unen con gran afinidad a la enzima inhibiendo su funcionamiento que resulta en una sofocación química. La reacción general es indicada esquemáticamente (Jensen *et al.*, 1984; Torres *et al.*, 1995).



Regulación de la Expresión Génica

La expresión de los genes mitocondriales que codifican para las proteínas participantes en la producción de ATP, así como los del genoma nuclear, es regulada por diferentes mecanismos, que actúan a nivel de transcripción, procesamiento del transcrito, transporte al citoplasma, traducción del mRNA y por último a nivel postraducciona (Lewin, 2001). En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se ha descrito además un mecanismo mediado por la proteína TOR (blanco de rapamicina), cuya disminución permite hacer el uso de las reservas energéticas y es capaz de detener el ciclo celular. Probablemente, el sistema actúe ajustando el metabolismo y la expresión génica de las moscas en ayuno, logrando que utilicen las reservas de energía para mantener sus funciones vitales (Scott *et al.*, 2004).

Transcripción del DNA mitocondrial

La transcripción es el proceso por el cual el DNA se copia a una molécula de RNA complementario para posteriormente utilizarse, ya sea como tRNA, rRNA o bien mRNA (Mathews, 2002). En contraste con este proceso en el núcleo celular, el inicio de la transcripción del mtDNA en vertebrados es bidireccional y se inicia en el D-loop o región control (Carrodegua y Vallejo, 1997). En la región control existe un promotor de la transcripción para cada cadena de mtDNA y cada uno de éstos es reconocido por un factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA), mismo que se une al DNA inespecífico con gran afinidad. Sin embargo, para llevar a cabo la transcripción se requieren dos

factores adicionales; mtTFB1 y mtTFB2, el primero actúa como dominio activador de mtTFA, mientras que el segundo reconoce y se une al mtTFA y a la RNA polimerasa mitocondrial. Es en sí este complejo tetramolecular el responsable de la transcripción mitocondrial (Kelly y Scarpulla, 2004).

Las unidades de transcripción mitocondrial definidas como la distancia entre dos puntos de iniciación y terminación reconocidos por la RNA polimerasa, mismas que pueden incluir más de un gen (Lewin, 2001) (cadenas H pesada y L ligera), difieren de la mayoría de los genes nucleares en que son poligénicas (Kelly y Scarpulla, 2004). La composición de los policistrones depende del arreglo génico en el mitogenoma. El mtDNA de los crustáceos presenta un arreglo muy diferente al de vertebrados. Asimismo, el orden que siguen los genes en el mtDNA entre los diferentes artrópodos es más conservado que en los vertebrados superiores. En crustáceos se conocen 3 arreglos, por ejemplo, el orden génico de *Artemia franciscana* (Batuecas *et al.*, 1988) es semejante al de la mosca *D. melanogaster* (Garesse, 1988); por su parte, el arreglo de genes en el camarón tigre *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000) es idéntico al que presenta el copépodo *Daphnia pulex* (Crease, 1999) y por último, en el cangrejo ermitaño *Pagurus longicarpus* (Hickerson y Cunningham, 2000) muestra 8 rearrreglos con respecto al orden génico de *D. melanogaster*. No obstante, en todos ellos se sigue una regla general, los genes de la citocromo c oxidasa se encuentran en la cadena opuesta a los genes 12S rRNA y 16S rRNA en el mtDNA.

Durante la adaptación al estrés fisiológico hay un aumento en la transcripción de los mensajes mitocondriales policistrónicos, cuyos productos individuales son liberados del transcrito primario mediante la acción de endonucleasas muy específicas (Leary *et al.*, 1998). En un estudio realizado con fibroblastos humanos, emplearon técnicas de mutagénesis dirigida para determinar el efecto de la delección de dos nucleótidos en la transcripción de un policistrón mitocondrial, se encontró que la nucleasa no reconoció el sitio de

corte entre *ATP6* y *COIII* por lo cual no se formaron los RNAs precursores correspondientes (Jesina *et al.*, 2004), lo que posiblemente esté relacionado con la alta especificidad de las nucleasas.

La información existente en invertebrados es aún escasa. En la mosca *D. melanogaster* se reportó un cDNA homólogo al mtTFA de humano, mismo que se une a la secuencia consenso 5' TTATC/G. Esta secuencia se encuentra en la región control donde se localizan los promotores de la transcripción mitocondrial (Brehm *et al.*, 2001; Takata *et al.*, 2001). Además, recientemente se publicó la clonación y el análisis molecular del gen del factor de transcripción mitocondrial B2 en *D. melanogaster* (d-mtTFB2) como una molécula con una implicación importante en la transcripción y en la proliferación mitocondrial (Matsushima *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha identificado la RNA polimerasa mitocondrial de *A. franciscana*, así como su principal sitio de inicio de la transcripción (Santiago y Vallejo, 1998).

Efecto del ayuno en la transcripción y la traducción

Los procesos de transcripción y traducción de genes relacionados con el metabolismo energético pueden ser afectados por el ayuno en ratas (Zhang *et al.*, 2001; Mi-Hyun-Ryu *et al.*, 2005). El ayuno provoca la síntesis de proteínas incompletas impidiendo la producción innecesaria de la maquinaria de traducción, así como de la estabilidad de las subunidades ribosomales. Este fenómeno se presenta debido a la carencia de aminoácidos necesarios para la traducción (Mathews, 2002), evitando la formación de ribosomas y la síntesis innecesaria de proteínas.

Existen experimentos en procariotas y eucariotas que reportan una clara disminución en la formación de las subunidades ribosomales (Lewin, 2001), y un aumento en las proteínas involucradas en la síntesis

de algunos aminoácidos, por efecto de su privación (Fafournoux *et al.*, 2000). En la mosca *D. melanogaster* se conoce que en respuesta al ayuno y alimentación con azúcar la proteína similar a L7A de la subunidad 60S ribosomal, así como la proteína L20 del ribosoma mitocondrial son reprimidas (Zinke *et al.*, 2002).

De la misma forma, el ayuno afecta la expresión de algunos genes que participan en el metabolismo de carbohidratos, que además es el primer metabolito en ser utilizado durante el ayuno (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). En *Penaeus monodon*, el hepatopáncreas es el órgano de síntesis y secreción de las enzimas como la amilasa y quitinasa-1. Los genes que codifican para estas enzimas se transcriben activamente durante periodos de ayuno de 48 h de la misma forma que los camarones alimentados, indicando la importancia de estas enzimas en el metabolismo energético (Lehnert y Johnson, 2002), y sus productos actúan reduciendo los polisacáridos a sus estructuras precursoras, para usarlas como fuente de energía (Mathews *et al.*, 2002).

Al estudiar el metabolismo energético en larvas del gusano del tabaco *Manduca sexta* en ayuno de hasta dos días, se observó una disminución en la concentración de glucosa en la hemolinfa. Asimismo, se encontró una disminución de la fructosa-2,6-bifosfato en el cuerpo graso, correlacionada con la activación de la glucógeno fosforilasa en el mismo órgano. Se sugiere que la hormona adipocinética y la octopamina (neurotransmisor débil) pueden estar involucradas en la activación de la glucógeno fosforilasa, controlada hormonalmente durante el ayuno en las etapas larvarias iniciales de *Manduca sexta* (Meyer-Fernandes *et al.*, 2000). Por otra parte, la realimentación de las larvas de *Manduca sexta* condujo al efecto contrario observado en el ayuno (Meyer-Fernandes *et al.*, 2001).

Retomando la importancia de las fuentes de energía utilizadas durante el ayuno, es importante recalcar que la degradación de ácidos grasos es el segundo mecanismo utilizado por los animales para el mantenimiento de la homeostasis energética durante el ayuno (Zinke *et al.*, 2002). La liberación de la grasa es controlada hormonalmente, y

utiliza al adenil monofosfato cíclico (cAMP) como segundo mensajero que actúa como mediador de la cascada de fosforilaciones para activar a la triacilglicerol lipasa (Mathews *et al.*, 2002). Se ha reportado que en *D. melanogaster* los genes de algunas lipasas como lip3 y CG6113 son inducidos por efecto del ayuno; mientras que la expresión de los genes del anabolismo de ácidos grasos se reprimió (Zinke *et al.*, 2002).

De la misma forma, se induce la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa) que es una enzima que sintetiza HMG-CoA a partir de acetoacetil-CoA, intermediario inicial de la síntesis de colesterol en el citosol, pero que puede ser reducido para formar cuerpos cetónicos en la mitocondria. En ausencia de carbohidratos, los cuerpos cetónicos se pueden utilizar como fuente de energía alterna (Le May *et al.*, 2000; Mathews *et al.*, 2002). Se ha observado un aumento en la expresión de la HMG-CoA sintasa en las mitocondrias hepáticas de lechones durante un período de ayuno, mientras los niveles de expresión de la misma enzima en ratas permanecen estables (Adams *et al.*, 1997).

Algunos genes que codifican a proteínas del recambio proteico definido como biosíntesis y degradación continua de proteínas, también se ven influenciados por el ayuno (Muhlía-Almazán y García-Carreño, 2002). Por ejemplo, el nivel de expresión de tripsina se incrementó en los camarones después de 24 horas de ayuno, seguido por una disminución en la expresión, comparado con los camarones alimentados (Sánchez-Paz *et al.*, 2003). Asimismo, en hígado de ratas en ayuno de 48 h, se observó la sobreexpresión de las proteínas L14 y L38 de la subunidad ribosomal 60S y la proteína S9 de la subunidad 40S, así como la glutamil-prolil-tRNA sintasa, que participan en la síntesis de otras proteínas, comparadas contra la expresión en el hígado de las ratas control alimentadas (Zhang *et al.*, 2001). También en ratas en ayuno en condiciones similares al estudio anterior, se encontró la sobreexpresión de las proteínas S19, S17 y S4 de la subunidad 40S ribosomal (De Lange *et al.*, 2004). Los estudios presentados sugieren un incremento en el recambio para al menos una parte de la población de proteínas.

Por otra parte, Hittel y Storey (2002) reportaron el efecto de la hibernación, que indirectamente conlleva un ayuno sobre la expresión de los genes mitocondriales en la ardilla *Spermophilus tridecemlineatus*. Ellos encontraron la sobreexpresión de los genes mitocondriales *COI*, *ATP6/8*, la cual puede estar involucrada en la protección del funcionamiento celular para contrarrestar el efecto de la hibernación.

Coordinación de la regulación de la expresión génica núcleo-mitocondria

La poliadenilación de los transcritos mitocondriales codificantes se ha relacionado con la desestabilización y disminución del tiempo de vida media en *Artemia franciscana* (Eads y Hand, 2003), en contraste con la función de la poliadenilación en los mensajes nucleares (Mathews *et al.*, 2002). Se ha reportado poliadenilación en transcritos ribosomales nucleares en *Saccharomyces cerevisiae*, lo que podría implicar un mecanismo de control de calidad en la biogénesis de los RNA ribosomales (Kuai *et al.*, 2004), sin embargo, no se sabe si esto ocurre en transcritos ribosomales mitocondriales.

Por otra parte, la biogénesis mitocondrial requiere la expresión coordinada de los genes nucleares y mitocondriales que participan en la cadena respiratoria mitocondrial (Sylvestre *et al.*, 2003). El control de la biogénesis y la función mitocondrial depende de procesos muy complejos que requieren de una gran variedad de mecanismos regulatorios (Allen, 2003). Entre ellos, mediadores específicos, como señales intracelulares y extracelulares, incluyendo hormonas y estímulos ambientales (Garesse y Vallejo, 2001).

qRT-PCR en tiempo real

Para evaluar la expresión génica se han desarrollado varias metodologías: Las basadas en hibridación (Northern blot, hibridación en solución y ensayos de protección

de RNasa), así como la transcripción reversa de moléculas de RNA, acoplada a PCR (RT-PCR). La RT-PCR es la más sensible de las técnicas antes mencionadas, ya que amplifica exponencialmente pequeñas cantidades de ácido nucleico. Esta sensibilidad permite detectar mRNAs poco abundantes en pequeñas cantidades de tejido (Schmittgen et al., 2000). Además, la PCR en tiempo real es una metodología de nueva generación, más sensible y exacta que la RT-PCR convencional.

La PCR en tiempo real detecta el producto de PCR durante cada ciclo de la reacción, eliminando la necesidad de aplicar análisis post-PCR, además, la mayoría de los sistemas cuentan con un programa especializado para simplificar el análisis. Para este fin, se han desarrollado algunos fluoróforos para detectar el DNA de doble cadena generado por la PCR en tiempo real, el más sencillo es el SYBR Green I que se une al surco menor del DNA de doble cadena (Wittwer, et al., 1997). Este reactivo fluoresce muy poco cuando se encuentra libre, pero su fluorescencia incrementa hasta 1000 veces cuando se une al DNA. Entonces la señal de fluorescencia en la reacción, es proporcional a la cantidad de DNA de doble cadena generada en cada ciclo (Bio-Rad, 2006).

La PCR en tiempo real se ha empleado para cuantificar los mRNAs de citocinas que son muy limitadas en los tejidos bajo investigación (Giulietti et al., 2001). Asimismo, la sensibilidad de esta técnica ha llegado al límite de detectar la expresión de una sola célula neuronal, al diseñar una estrategia para eliminar la posibilidad de que la reacción fuese inhibida por la RT utilizando una precipitación alcohólica del cDNA (Liss, 2002). Además, ha resultado una técnica idónea para la identificación temprana de algunos microorganismos patógenos en muestras clínicas (Corless et al., 2000). Sin embargo, para obtener una amplificación por PCR en tiempo real eficiente es importante partir de cDNAs sintetizados a partir de la misma cantidad de RNA total, así como el uso del mismo tipo de iniciador (ya sea hexámeros al azar, oligo dT ó reverso específico) en la transcripción reversa (Stahlberg et al., 2004).

Aunque la qRT-PCR en tiempo real es sumamente sensible, los efectos de la contaminación resultan en un serio problema ya que cuantifican los productos inespecíficos (Corless *et al.*, 2000; Liss, 2002), y también la contaminación con gDNA que es aislado junto con el RNA total al realizar su extracción, puede generar resultados erróneos por sobreestimación de la cantidad de transcrito (Zhang *et al.*, 1997; Suslov y Steindler, 2005; Bacca *et al.*, 2005).

Genes de referencia

En los estudios de evaluación de la expresión génica por métodos de cuantificación absoluta y/o relativa, la cantidad de transcrito obtenida de un experimento de PCR en tiempo real debe ser normalizada de tal forma, que los resultados adquieran un significado biológico. Esto se ha realizado a través del uso de genes de referencia o constitutivos, que son aquellos cuyo nivel de expresión es constante en todas las muestras y su expresión no es afectada por el tratamiento experimental bajo estudio (Zaid *et al.*, 2004). El objetivo de la normalización en la cuantificación relativa, es asegurar que se parte de la misma cantidad de muestra para las muestras control y las tratadas (Bio-Rad, 2006), y que el efecto sobre la expresión de los genes es debido al tratamiento.

En el genoma mitocondrial se codifican genes estructurales como el 16S RNA ribosomal, mientras que en el genoma nuclear además existen genes que codifican a proteínas ribosomales como L8. Ambos, 16S RNA ribosomal y la proteína L8 forman parte de la estructura ribosomal, por lo que probablemente se expresen en cualquier condición, aunque éste último forma parte de los ribosomas citoplasmáticos y el primero de los ribosomas mitocondriales (Susuki, *et al.*, 2001; Mathews *et al.*, 2002). Esta característica se aprovechó para utilizarlos como genes de referencia para normalizar la expresión de los genes *COI*, *COII* y *COIII*.

Algunos estudios indican la factibilidad de utilizar este tipo de genes para la normalización de los datos debido a que no se han observado cambios importantes en su expresión. Por ejemplo, el gen nuclear 18S rRNA se usó para normalizar las evaluaciones de los transcritos de las subunidades I, II, IV y Vb de la citocromo c oxidasa en ratas bajo condiciones hipóxicas y se encontró que éste es adecuado para su evaluación empleando Northern blots (Vijayasathy *et al.*, 2003).

Por otro lado, la expresión del gen de la proteína ribosomal L8 se utilizó para normalizar los niveles del transcrito de HDL-BGBP en hepatopáncreas de *L. vannamei* sin encontrar diferencias significativas para L8 entre los tratamientos de dieta y ayuno (Muhlía-Almazán *et al.*, 2005), aunque esto se realizó utilizando RT-PCR semicuantitativo. También en *L. vannamei* sometido a ayuno de hasta 120 h, se utilizó el gen 16S rRNA para normalizar la concentración de transcrito de tripsina, encontrando diferencias significativas entre los diferentes periodos de ayuno en la concentración de transcrito del gen constitutivo utilizando ensayo de manchas (Sánchez-Paz *et al.*, 2003). Además, en un estudio con fibroblastos humanos utilizaron a los genes mitocondriales Cyt b y ND1 para normalizar la expresión de *ATP6-COIII* utilizando qRT-PCR en tiempo real generando buenos resultados (Jesina *et al.*, 2004) y utilizando la misma técnica, se empleó L8 para normalizar el nivel estable de transcrito para la *cMnSOD* en *L. vannamei* al investigar el efecto de una infección viral (Gómez-Anduro *et al.*, 2006).

JUSTIFICACIÓN

El estudio del efecto del ayuno por un tiempo corto sobre la expresión de los genes mitocondriales que codifican a las subunidades I, II y III del complejo citocromo c oxidasa, en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*, aportará información al conocimiento integral de la expresión de los genes que participan en el metabolismo energético. Lo anterior, permitirá entender de forma más amplia las estrategias de adaptación utilizadas por estos organismos ante diversas condiciones ambientales.

HIPÓTESIS

La expresión de los genes mitocondriales de la enzima citocromo c oxidasa (subunidades I – III) en el hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, es afectada por el ayuno.

OBJETIVOS

Objetivo General

Investigar el efecto del ayuno sobre la expresión de los genes mitocondriales de la enzima citocromo c oxidasa (subunidades I – III) en el hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos Específicos

- i. Seleccionar los genes de referencia adecuados como control interno para realizar el análisis de los niveles de expresión de los genes *COI*, *COII* y *COIII*.
- ii. Cuantificar los niveles estables de los transcritos de *COI*, *COII* y *COIII* a los distintos tiempos para los camarones ayunados, controles alimentados y realimentados, para determinar si durante los 5 días de ayuno se observan cambios en los niveles de expresión de estos genes en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioensayo y Obtención de Muestras

El bioensayo se realizó en el laboratorio húmedo del CIBNOR, Unidad Hermosillo (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). Se obtuvieron 135 camarones *Litopenaeus vannamei* (peso medio 21 g) seleccionados en el estadio de intermuda, de acuerdo al método descrito por Chan *et al.* (1988); los camarones fueron distribuidos aleatoriamente en tres tanques de 70 L, aclimatados por 5 días a 28 °C y 34 ppm y alimentados *ad libitum* dos veces al día con Camaronina[®]. Al culminar este período 50 camarones fueron alimentados permanentemente (grupo control) y a 60 se les mantuvo en ayuno hasta por 120 horas (grupo ayunado). Tres organismos de cada grupo (control, C; ayunados, A) se muestrearon a diferentes tiempos (2, 24, 72 y 120 horas). Un grupo de 25 organismos fue ayunado por 96 h y realimentado, para sacrificarlo a las 122 horas (grupo realimentado). El peso total de cada uno de los camarones se registró *in vivo*. Se sacrificó y disecó el hepatopáncreas de forma individual y se extrajo RNA total, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), basado en Chomczynsky y Sacchi, (1987).

Análisis de la Integridad del RNA Total

La concentración del RNA total se determinó por espectrofotometría (CARY 50 Bio, VARIAN). Las muestras de RNA total se analizaron en condiciones desnaturizantes por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1%, en solución amortiguadora MOPS 0.02 M (ácido 3-(N-Morfolino)-propanosulfónico) libre de RNAsas, conteniendo formaldehído 1.15 M final. Se cargaron 5 µg de RNA total en el gel, con 1 volumen igual de solución amortiguadora de muestra (0.75 mL de formamida desionizada, 0.15 mL de MOPS 0.2 M, 0.24 mL de formaldehído, 0.1 mL H₂O-DEPC, 0.1 mL de

glicerol, 0.08 mL de azul de bromofenol al 10% (p/v)). La muestra se incubó a 65 °C por 15 min, se enfrió en hielo, se adicionaron 3 µL de bromuro de etidio (1.0 mg/mL) y se corrió la electroforesis con solución amortiguadora MOPS 0.02 M a 40 V por aproximadamente 1 h (Fourney *et al.*, 1988).

Purificación de RNA Total

Detección de contaminación con DNA genómico

Debido a que el método del reactivo de TRIzol usado para la extracción del RNA total no garantiza que las muestras se obtengan libres de contaminación con DNA genómico (gDNA), se probó la amplificación por PCR convencional de las muestras de RNA total usando ~ 500 ng del RNA total aislado como templado. Para la amplificación se usaron los iniciadores específicos COIII^HFwCAM 5' ATGACATCATCTCACGGACACC 3' y COIII^RvCAM 5' TATCAYGCGGCAGCTTCAAATC 3', que producen un fragmento de aproximadamente 700 pb, los componentes de la reacción se describen en la Tabla 1. La PCR se llevó a cabo en 30 ciclos con una desnaturalización de 94 °C por 3 min, un alineamiento de 60 °C por 1 min, una extensión de 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min.

Eliminación de la contaminación de las muestras de RNA total

Con el fin de eliminar el gDNA contaminante incluido en las muestras de RNA total, éstas se trataron con DNasa I 1 U/µL (Desoxirribonucleasa I, SIGMA), sin embargo la concentración de las muestras de RNA total y las cantidades requeridas para la transcripción reversa, no permitieron trabajar con las condiciones que recomienda el fabricante para todas las muestras (1 U DNasa I / 1 µg RNA), por lo que se utilizaron también las proporciones 1:2 y 1:4

dependiendo del grado de contaminación de las muestras. Además, se realizaron ajustes en el volumen total de reacción siempre tomando en cuenta las cantidades estequiométricas de cada componente para asegurar la funcionalidad de la reacción y la integridad del RNA total. Para verificar la efectividad del tratamiento se probó la amplificación por PCR en tiempo real del gDNA contaminante utilizando iniciadores específicos para *COII* bajo las condiciones descritas para la cuantificación relativa de la expresión génica.

Transcripción Reversa y Amplificación por PCR Convencional

Los cDNAs se sintetizaron con el sistema de SuperScript II™ First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen, 2003) utilizando 5 µg de RNA total, usando hexámeros al azar en un volumen final de 21 y 31 µL, dependiendo de la concentración del RNA total tratado obteniendo 240 y 160 ng/µL de cDNA equivalentes de RNA total, respectivamente. Finalmente, todas las muestras se ajustaron a una concentración de 160 ng/µL de cDNA equivalentes de RNA total.

Para verificar la funcionalidad de los cDNAs, se usaron 480 ng de cDNA equivalentes de RNA total como templado para la amplificación por PCR convencional utilizando un termociclador PTC200 DNA Engine (MJ Research). Se utilizaron iniciadores específicos para los genes *COI*, *COII*, *COIII* y *16S* (10 µM c/u), diseñados para PCR en tiempo real, con base en las secuencias nucleotídicas para los genes en estudio de *L. vannamei* obtenidas en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos (LBMOA) del CIAD, A.C. Las características de los iniciadores y los tamaños esperados para los amplicones se especifican en la Tabla 2. La composición de las reacciones se describe en la Tabla 1 y las condiciones del programa se indicaron previamente en la detección de contaminación con gDNA.

Los productos de la amplificación por PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con SYBR Safe™ (Molecular Probes, Eugene Oregon, EUA), el gel se corrió a 75 volts constantes, los productos fueron detectados en un fotodocumentador de luz UV Gel Logic 200 Imaging System con el programa Molecular Imaging System V. 4.0.2. (Kodak, Rochester NY, EUA).

Tabla 1. Composición de las mezclas de reacción de PCR convencional para *COI-III* y *16S*

Componente y Concentración	Volumen (μ L)
Iniciador Sentido (20 μ M)	1.25
Iniciador Antisentido (20 μ M)	1.25
Templado (~ 480 ng de cDNA equivalentes de RNA total)	2 o 3
Solución amortiguadora para PCR 10X	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTPmix (2.5 mM c/u)	2
Taq DNA polimerasa (5 u/ μ L)	0.25
H ₂ O-milliQ estéril	c.b.p. 25
Volumen Final	25

Tabla 2. Características de los iniciadores específicos para PCR en tiempo real

NOMBRE	SECUENCIA 5'- 3'	Tm °C	Tamaño del Amplicón
CO1CBRTFW2	AGGTATTGCCCACTGATTCC	62.6	208 pb
CO1CBRTRV2	TACCGTTGATCCAATGGAAG	62.3	
CO2CBRTFW1	TATTCAGACTTCCTCCAAGTCG	62.1	196 pb
CO2CBRTRV1	ATGGCATCTGCCCTTAACACC	63.7	
CO3CBRTFW2	TCCATTCCAAATTCCTCTCC	62.7	191 pb
CO3CBRTRV2	GCAATTGTAAATGGGGCTTC	63.0	
16SCBRTRV2	GAAGCTCTTCCTCCTACTC	58.6	230 pb
16SRV3	GTACCTTGTTATTAGGGAGG	56.6	

PCR en Tiempo Real

Para una amplificación por PCR en tiempo real eficiente se deben tomar en cuenta algunas consideraciones (Bio-Rad, 2006):

- Diseñar un amplicón con un tamaño entre 75 y 200 pb. Los amplicones más pequeños son amplificados con altas eficiencias que pueden indicar coamplificación de productos inespecíficos, además, pueden ser confundidos con dímeros de iniciadores. Por otro lado, amplicones mayores de 200 pb no aseguran la procesividad de la polimerasa con lo cual posiblemente no se pudiera generar el amplicón completo.
- Mantener un contenido de GC del 50 al 60% en amplicones e iniciadores.
- Mantener temperatura de alineación (T_m) entre 50°C y 65°C.
- Evitar diseñar los iniciadores en regiones del gen que formen estructuras secundarias.
- Evitar repeticiones de G o C de más de tres bases.
- Elegir iniciadores con G o C en la última base del extremo 3'.
- Asegurarse de que los iniciadores sentido y antisentido no sean complementarios.

Se ha observado que los iniciadores pueden contaminarse fácilmente con partículas de polvo que se encuentren en forma suspendida. Por lo anterior, conviene realizar la preparación de las reacciones para la PCR en tiempo real en un lugar libre de contaminación con gDNA y sin flujo de aire. Para la eliminación del gDNA del área de trabajo se ha usado la solución removedora de DNA contaminante DNA-OFF™ (CPG Inc.). La manipulación del material, los reactivos y las muestras se realizó con guantes libres de talco, ya que éste emite fluorescencia a la misma longitud de onda que el SYBR green (530 nm) y puede interferir con la cuantificación de la muestra.

Preparación de la curva estándar para PCR en tiempo real

Es necesario contar con una curva estándar para cuantificar los productos obtenidos a partir de la amplificación por PCR en tiempo real de los cDNAs. Para lo cual, los amplicones obtenidos por PCR convencional anteriormente se purificaron en una columna GFX (Amersham Pharmacia Biotech) y se cuantificaron espectrofotométricamente (NanoDrop ND1000) para realizar la reamplificación a partir de ~ 5 ng totales de cada amplicón bajo las mismas condiciones de la amplificación original. Los reamplicones se purificaron, cuantificaron y se prepararon diluciones seriadas para las curvas estándar a evaluar por qRT-PCR en tiempo real. Las curvas estándar incluyeron 5 puntos en un intervalo de 5×10^{-3} a 5×10^{-9} ng/ μ L para cada gen.

Cuantificación relativa de la expresión génica por qRT-PCR en tiempo real

La qRT-PCR en tiempo real se llevó a cabo por triplicado para cada muestra, en un termociclador iQTM 5 (Bio-Rad). Se usaron 10 μ L de iQTM Supemix 2X (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM, pH 8.4, dNTP [dATP, dCTP, dGTP y dTTP] 0.4 mM, iTaq DNA polimerasa 50 U/mL, MgCl₂ 6mM, SYBR Green I 20 nM, fluoresceína y estabilizadores Bio-Rad); además, se agregaron 0.5 U de *Taq* polimerasa recombinante (5 U/ μ L, Invitrogen) por reacción, iniciadores específicos sentido y antisentido (Tabla 2), a una concentración final de 400 nM cada uno, 1 μ L de cDNA derivado de 160 ng de RNA total y se llevaron a un volumen final de 20 μ L con H₂O milli Q estéril. Después de la activación de la iTaqTM DNA polimerasa a 95 °C por 5 min, la amplificación se llevó a cabo con 40 ciclos de 30 seg a 95 °C, 35 seg a 63 °C para *COI*, *COII* y 165 y 64°C para *COIII*, seguido por 55 seg a 72°C, continuó con otro paso de desnaturalización por 1 min a 95 °C y finalmente, una etapa para determinar la temperatura de disociación del producto, disminuyendo 0.3 °C cada 20 seg de 95 °C a 60 °C, esta se calculó como la primera derivada del cambio en la intensidad de fluorescencia graficada en función de la temperatura. Cada corrida incluyó reacciones sin templado y sin iniciadores como controles negativos para cada par de iniciadores.

Análisis de datos

Para el cálculo de la expresión génica, se utilizó el valor de ciclos del umbral (Ct) para cada reacción, definido como el número de ciclos en el que se supera la fluorescencia base ± 10 SD. La eficiencia (E) de la reacción de PCR en tiempo real se determinó para cada par de iniciadores, utilizando la pendiente de la curva estándar obtenida a partir de las diluciones seriadas (1×10^{-3} a 1×10^{-9}) de los amplicones purificados de los genes de interés con la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ o expresado diferente % Eficiencia = $(10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$. La E se define como el porcentaje de templado amplificado en cada ciclo (Bio-Rad, 2006).

La expresión relativa de los genes blanco (*COI*, *COII* y *COIII*) se analizó usando la concentración expresada en cada caso como ng/ μ L de los niveles estables de transcrito para los distintos tiempos de ayuno, así como los valores de Ct correspondientes a los mismos tratamientos. A continuación, se describe con detalle las distintas formas de comparación de los datos.

El primer grupo de análisis se refiere al de la expresión génica individual de *COI*, *COII*, *COIII* y *16S*, sin normalizar con el gen de referencia.

a) Análisis del comportamiento de las concentraciones estables de transcrito para cada gen independiente (*COI*, *COII*, *COIII* y *16S*) de los camarones ayunados, comparados con los respectivos tiempos de los camarones alimentados usados como controles y expresados como cocientes. Para esta comparación, se requirió obtener las medianas de los controles de cada tiempo de ayuno para generar un cociente con cada una de las muestras de los organismos ayunados. Esta estrategia permitió obtener la expresión neta por efecto del ayuno, por lo que el cociente inicial a las 2 h del inicio del experimento o tiempo cero siempre será uno. De esta forma se están eliminando otros efectos que no sean el ayuno.

b) Análisis de cocientes contra el tiempo cero, para este propósito, se utilizaron solo los datos de las muestras de los camarones ayunados y se obtuvo un cociente con respecto a la mediana del tiempo cero.

c) Análisis de la expresión de los genes *COI*, *COII* y *COIII*. Para este propósito, se utilizaron solo las medianas de las concentraciones de las muestras de los camarones ayunados a las diferentes horas, sin comparar con los controles.

Un segundo grupo de análisis se realizó normalizando con el gen de referencia (*16S* o *L8*) la concentración (ng/ μ L) de los transcritos de los genes *COI*, *COII* y *COIII*.

d) Normalización de la concentración del transcrito obtenido a partir de la curva estándar del gen blanco con la del gen constitutivo correspondiente (*16S* o *L8*). Es decir, obteniendo el cociente de las medianas del nivel estable de transcrito del gen de interés entre el del gen de referencia y después el cociente entre ayunados y controles, para cada gen.

e) Análisis de cocientes contra el tiempo cero, para este propósito, se utilizaron solo los datos de las muestras de los camarones ayunados, normalizados con el gen *16S*, y a partir de ese valor se obtuvo un cociente con respecto a la mediana del tiempo cero.

f) Análisis de la expresión de los genes *COI*, *COII* y *COIII* normalizados con el gen *16S*, para este propósito se utilizaron solo las medianas de las muestras de los camarones ayunados a las diferentes horas, sin considerar los controles alimentados.

g) Análisis por el método de Pfaffl, (2001). Éste, se llevó a cabo utilizando los valores de Ct y sus respectivas eficiencias de reacción, aplicando la siguiente reacción:

Ecuación de Pfaffl.

$$\text{Cociente} = \frac{(E_{\text{gen problema}})^{\Delta Ct_{\text{gen problema (control - tratado)}}}}{(E_{\text{gen de referencia}})^{\Delta Ct_{\text{gen de referencia (control - tratado)}}}}$$

Análisis estadístico

Se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución normal y la prueba de Levene para confirmar la homogeneidad de varianzas utilizando el programa estadístico Statistica 5.5 (StatSoft, Inc). Los datos obtenidos no cumplen con los supuestos de normalidad y homocedasticidad por lo cual se aplicaron pruebas no paramétricas, por lo tanto, se utilizaron las medianas de las observaciones para los diferentes análisis. Las diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tiempos de ayuno fueron evaluados usando el ANOVA de una vía en intervalos de Kruskal-Wallis. Cuando hubo diferencias significativas se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis usando el valor Z, los análisis de medianas se realizaron con el paquete estadístico NCSS, 1997.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del RNA total Hepatopancreático

Para verificar la calidad de las muestras de RNA total de hepatopáncreas de *L. vannamei* provenientes del bioensayo, se determinó la concentración e integridad en un trabajo previo (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). Las concentraciones de las muestras de RNA total se encontraron en el rango de 2.3-10.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Mediante el análisis de la integridad de las muestras de RNA total por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído en condiciones desnaturizantes, se observaron bandas bien definidas que indican que el RNA total obtenido a partir de hepatopáncreas fue de buena calidad e integridad. En la figura 3 se pueden observar las bandas más abundantes correspondientes a los RNAs ribosomales, así como una masa uniforme de menor tamaño que corresponde a los tRNAs.

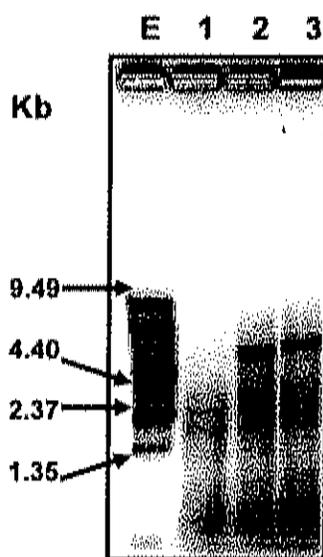


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído del RNA total obtenido a partir de hepatopáncreas de *L. vannamei*. En el carril E: Estándar de masa molecular 0.24-9.5 Kb RNA Ladder; carriles 1-3: 3.25 μg de RNA total de hepatopáncreas de tres muestras diferentes.

Detección y Eliminación de la Contaminación con gDNA por PCR

En las técnicas tradicionales para evaluar la expresión de genes, como Northern y dot blot, la contaminación con gDNA no presenta un grave problema. Sin embargo, cuando se usa qRT-PCR en tiempo real, la sensibilidad del sistema puede detectar pequeñas cantidades de contaminación, provocando la sobrestimación de la concentración de transcrito en las muestras problema. Por lo anterior, se probó la presencia de contaminación con gDNA con la amplificación por PCR convencional, usando las muestras de RNA total como templados y utilizando los iniciadores específicos para el gen mitocondrial *COIII*, obteniéndose un producto del tamaño esperado (~700 pb) en todas las muestras del bioensayo (Figura 4). Debido a lo anterior, el gDNA fue eliminado por el tratamiento con DNasa I ya que en el gel se observaron niveles variables de contaminación entre las muestras de RNA total.

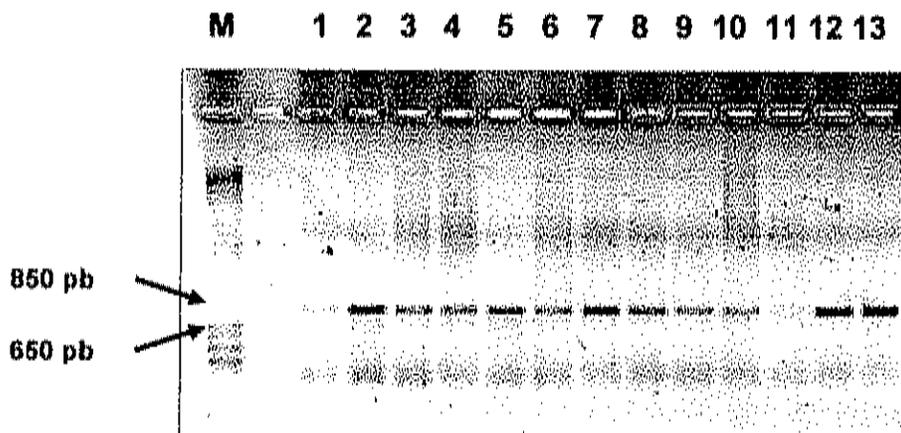


Figura 4. Amplificación de un fragmento de 700 pb del gen *COIII* para detectar contaminación con gDNA en 13 muestras de RNA total. M: estándar de masa molecular conocida 1Kb plus; carriles 1-13: Amplicón de *COIII* obtenido de a partir de algunas muestras de RNAs total.

El protocolo sugiere utilizar una relación 1:1 (1 U DNasa I /1 ug RNA), sin embargo, se demostró que aún utilizando una relación 1:4, el tratamiento para 14 de 20 muestras fue efectivo al eliminar la contaminación con gDNA; además, se ajustó la cantidad de EDTA 50 mM necesaria para parar la reacción (Tabla 3). Después del tratamiento con DNasa I, el RNA total tratado se usó como templado en la amplificación por PCR en tiempo real con iniciadores específicos para el gen *COII* y no se detectó contaminación en la mayoría de las muestras, sin embargo, fue necesario descartar aquellas en las que el tratamiento de descontaminación no funcionó totalmente. En la tabla 3 se presenta el número de camarones (2 ó 3) por tratamiento o tiempo que se analizaron por qRT-PCR en tiempo real.

Tabla 3. Tratamiento de las muestras de RNA total con DNasa I

Muestras de RNA total, Tiempo de Ayuno (h)	Identificación RNA	RNA total tratado (μ g)	(U DNasa I/RNA μ g)	EDTA 50 (mM/ μ L)	Volumen de Reaccion (μ L)
2	1	14	1:4	2	16
2	2	10	1:1	3	23
Control 24	4	14	1:4	2	16
Control 24	5	10	1:2	2	22
Control 24	6	10	1:1	3	23
Control 72	10	16	1:4	2	22
Control 72	12	16	1:4	2	22
Control 120	16	16	1:4	2	22
Control 120	17	16	1:4	2	22
Ayunado 24	19	16	1:4	2	22
Ayunado 24	20	16	1:4	2	22
Ayunado 24	21	10	1:1	3	23
Ayunado 72	25	16	1:4	2	22
Ayunado 72	26	10	1:1	3	23
Ayunado 72	27	14	1:4	1	16
Ayunado 120	31	16	1:4	2	22
Ayunado 120	32	16	1:4	2	22
Ayunado 120	33	16	1:2	2	22
Realimentado	34	16	1:4	2	22
Realimentado	35	16	1:4	2	22

Funcionalidad de la RT-PCR para COI, COII, COIII y 16S

Los niveles de los transcritos de los genes *COI-III* y *16S* fueron evaluados a partir de cDNA sintetizado con hexámeros al azar, en lugar de oligo dT, ya que la función de la señal de poliadenilación en transcritos mitocondriales en camarón probablemente es diferente a la de transcritos nucleares, de acuerdo a lo reportado en otro crustáceo como *A. franciscana*; en donde la poliadenilación de los transcritos mitocondriales es una señal de desestabilización (Eads y Hand, 2003), que activa el complejo exosoma 3'- 5' para su degradación (La Cava *et al.*, 2005).

Para verificar la funcionalidad de los cDNAs provenientes de camarones control, los mensajes mitocondriales se amplificaron por PCR convencional a partir de la misma cantidad de cDNA como templado, presentando una abundancia similar (Figura 5); por lo anterior, se decidió considerar el gen mitocondrial *16S* rRNA, como un posible gen de referencia para normalizar la expresión de los genes problema *COI*, *COII* y *COIII*.

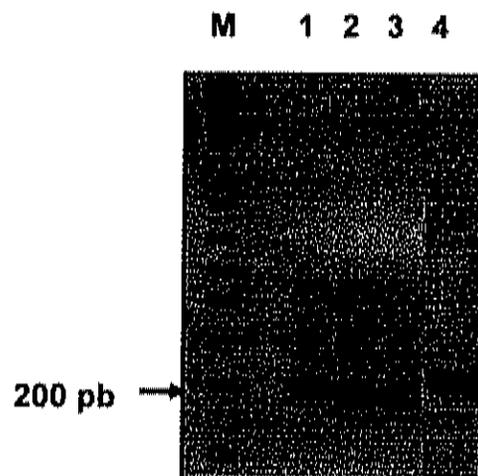


Figura 5. Amplificación de un fragmento de ~ 200 pb de los genes *COI*, *COII*, *COIII* y *16S* a partir de cDNA sintetizado con hexámeros al azar. M: Marcador de masa molecular conocida 1 Kb plus; Carriles 1, 2, 3, 4: RT-PCR de *COI*, *COII*, *COIII* y *16S*, respectivamente.

Curvas Estándar de las Corridas de PCR en Tiempo Real

La eficiencia de las reacciones de qRT-PCR en tiempo real, es un factor determinante para la cuantificación y deben tener valores numéricos en el rango de 90 a 105 % (Bio-Rad, 2006). Estas reacciones presentaron valores E de 95.2, 94.3, 97.7, 102.4 por ciento, calculados a partir de las curvas estándar de los genes *COI*, *COII*, *COIII* y *16S*, respectivamente, por lo cual se cumple con este requisito, ya que las eficiencias bajas de la PCR en tiempo real (< 90 %) se deben principalmente a un mal diseño de iniciadores. De forma opuesta, eficiencias elevadas (> 105%) pueden indicar error en el pipeteo o bien, coamplificación de productos inespecíficos (Bio-Rad, 2006). Además, se obtuvieron coeficientes de regresión (R^2) de 0.961, 0.997, 0.964 y 0.993 para los genes *COI*, *COII*, *COIII* y *16S*, respectivamente, dos de estos valores se encuentran por debajo del límite inferior teórico permisible de $R^2 > 0.980$, por la dificultad técnica de controlar estas variables experimentalmente (Bio-Rad, 2006). Por otro lado, se determinó la especificidad de la reacción para cada gen analizando la curva de disociación y los resultados mostraron un pico específico para la temperatura de disociación a partir de las curvas estándar a 79.5 °C, 80.4 °C, 80.4 °C, 75.9 °C para los genes *COI*, *COII*, *COIII* y *16S*, respectivamente.

Efecto del Ayuno en la Expresión de los Genes *COI*, *COII* y *COIII*

En este estudio se utilizó la qRT-PCR en tiempo real para estudiar el efecto del ayuno sobre la expresión de los genes mitocondriales *COI*, *COII* y *COIII* durante un periodo de hasta 120 h de ayuno, periodo similar al tiempo de ayuno de los camarones peneidos durante la muda. Mediante qRT-PCR en tiempo real se cuantificó el nivel estable de transcrito para cada gen de interés, así como del posible gen de referencia *16S*, a los distintos tiempos (2, 24, 48, 72 y 120 h), tanto de los camarones ayunados como de los controles alimentados respectivos, así como de camarones que fueron realimentados después de 96 h de ayuno.

La expresión neta de los genes *COI*, *COII* y *COIII* durante el ayuno, expresada como el cociente de la concentración (ng/ μ L) individual de transcrito en los camarones ayunados entre las medianas de la concentración de transcrito de sus controles respectivos, mostraron patrones similares. Los genes *COI*, *COII* y *COIII* aumentaron sus niveles de expresión significativamente ($p \leq 0.05$) a las 24 h de ayuno (490, 249 y 210 veces, respectivamente, comparados con el inicio del experimento), seguido de una disminución a las 72 h de ayuno similar al nivel del tiempo cero, teniendo una ligera recuperación a las 120 h y finalmente, una recuperación (1543, 113 y 787 veces, respectivamente) en los organismos realimentados después de 96 h de ayuno (Figura 6, Panel A).

La expresión neta del gen *16S* rRNA presenta un comportamiento muy similar al de los genes *COI*, *COII* y *COIII*, ya que aumenta su nivel a las 24 h, para después disminuir a las 72 h, y finalmente en los organismos realimentados se recuperó el nivel mostrado a las 24 horas de ayuno (Figura 6, Panel B). Este resultado concuerda con lo reportado por Sánchez-Paz *et al.*, (2003), utilizando dot blot y densitometría para determinar los niveles de expresión del gen *16S* en camarones *L. vannamei* sometidos a los mismos períodos de ayuno de este estudio encontrando cambios significativos entre los diferentes tiempos.

El comportamiento significativamente variable de los niveles de expresión del gen *16S* no presentó el patrón esperado para un gen de referencia que se pretendía usar como control interno. No obstante, la similitud que presentó con respecto al efecto del ayuno en la expresión de los genes *COI*, *COII* y *COIII*, va de acuerdo a lo que se conoce en otros organismos, sobre todo en vertebrados, con respecto al mecanismo de transcripción de los genes mitocondriales en mRNAs policistrónicos, cuya composición depende del orden o arreglo de los genes y de la distribución bidireccional de los mismos en la estructura circular del genoma (Carrodegua y Vallejo, 1997).

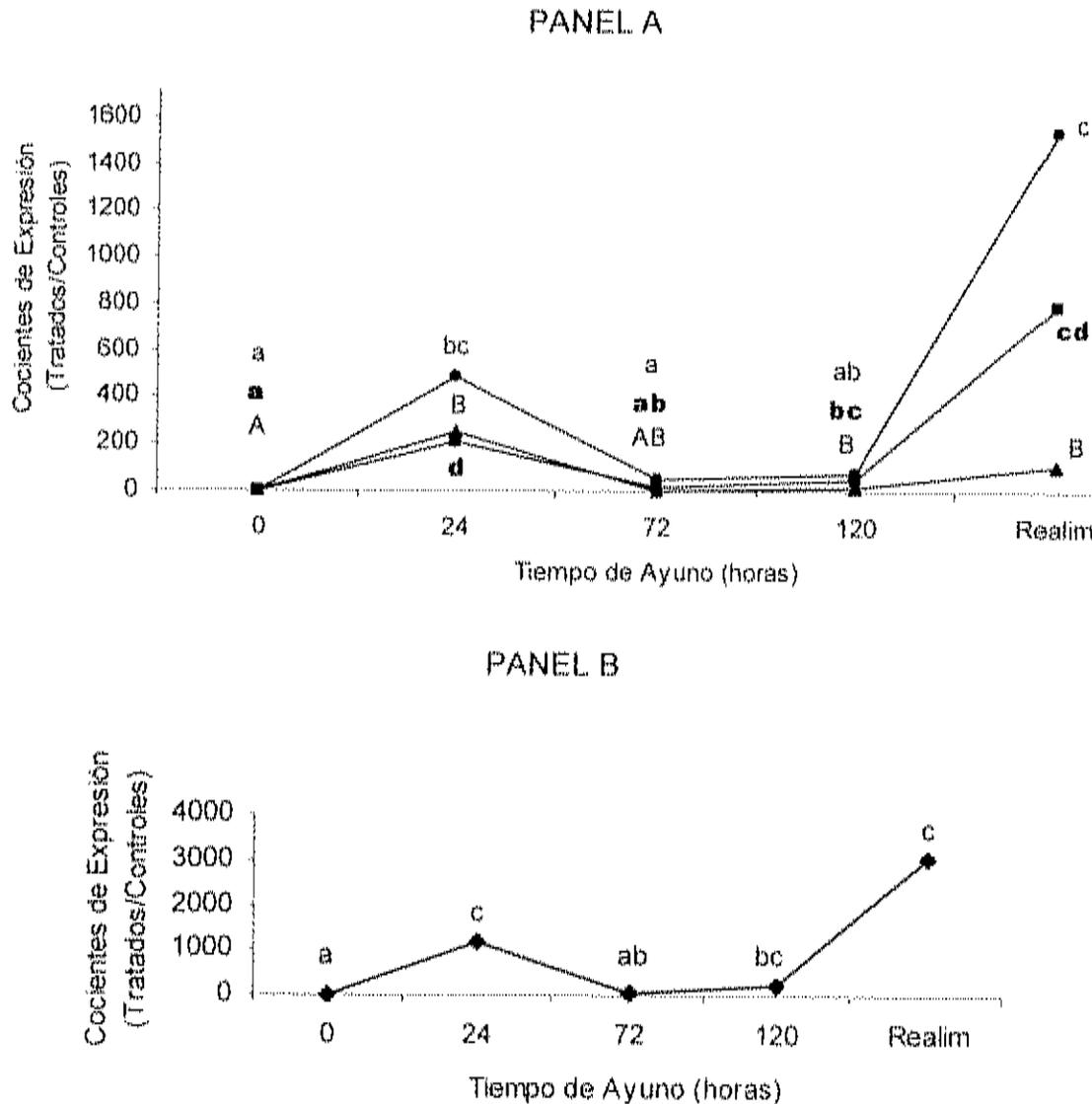


Figura 6. Niveles de expresión relativa de los genes mitocondriales a lo largo del periodo de ayuno. Panel A: *COI* (●), *COII* (▲), y *COIII* (■), Panel B: 16SrRNA. Para cada tiempo se generó un cociente con cada una de las muestras de los organismos ayunados entre la mediana de las concentraciones de transcrito (ng/μL) del control respectivo. Diferente literal en los datos, indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre tiempos de ayuno. Para distinguir las diferencias entre los tiempos de ayuno en cada gen se utilizaron letras de molde para *COI*, negritas para *COII* y mayúsculas para *COIII* ($n = 6$ para los realimentados y $n = 9$ para cada tiempo de ayuno).

Otra forma de ver los resultados es analizando los niveles de expresión de los distintos tiempos de ayuno con respecto al tiempo inicial, para lo cual, se calculó un cociente con la mediana de las concentraciones de transcrito en cada tiempo de ayuno entre la mediana del tiempo cero. En este análisis no se observó el aumento en los niveles de expresión a las 24 h de ayuno, como ocurrió con el análisis de la expresión neta de la concentración de los transcritos de *COI*, *COII* y *COIII*, sin embargo, se mantiene el aumento en los niveles de expresión en los camarones realimentados (Figura 7).

Un resultado similar se encontró al evaluar los niveles de expresión de *COI*, *COII* y *COIII* sin normalizar, ni comparar con el tiempo cero, ni con los controles alimentados, no obstante existió una diferencia, el nivel de los transcritos de *COIII* se mantuvo en los niveles del inicio del experimento (Figura 8). Lo anterior sugiere un posible sistema de regulación postranscripcional si se considera que los transcritos de *COI*, *COII* y *COIII* derivan de un mRNA policistrónico generado a partir de un promotor único y que debe ser procesado en castrones individuales para su traducción.

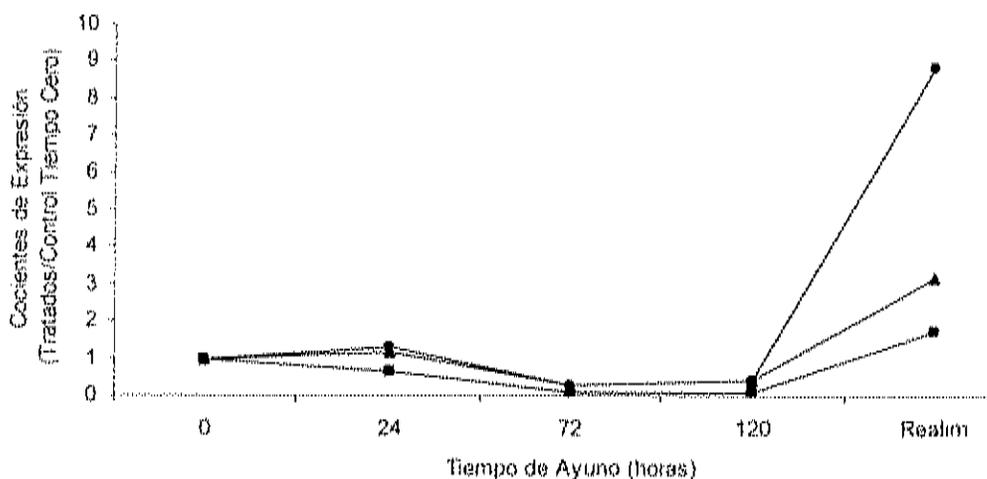


Figura 7. Expresión de los genes *COI* (●), *COII* (▲) y *COIII* (■) aplicando el análisis de cocientes contra el tiempo cero a lo largo del periodo de ayuno. Se utilizaron las medianas de las concentraciones de los tiempos de ayuno para generar un cociente con respecto a la mediana del tiempo cero.

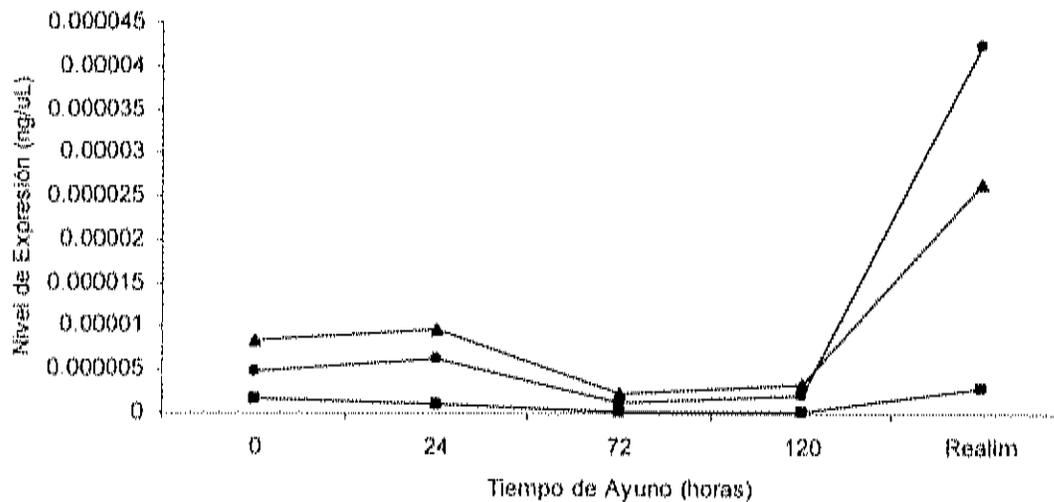


Figura 8. Nivel de expresión de los genes *COI* (●), *COII* (▲) y *COIII* (■) expresadas en ng/μL ignorando las medianas de los controles de los tratamientos a lo largo del período de ayuno.

Con base en el genoma mitocondrial completo reportado para el camarón asiático *Penaeus monodon* (Wilson *et al.*, 2000) (Figura 9), y a los resultados obtenidos para *L. vannamei* en el LBMOA del CIAD, AC (datos no publicados), se sabe que los genes *COI*, *COII* y *COIII* están codificados en la misma cadena (H), mientras que el gen 16S está codificado en la opuesta (L), y se esperaría se encontrasen en policistrones diferentes. Esto no significa que su expresión se regule de manera distinta, puesto que posiblemente los promotores de la transcripción tienen la misma secuencia y fuerza, y por lo tanto la RNA polimerasa transcriba igual las dos cadenas de mtDNA (Carrodegua y Vallejo, 1997). De esta forma, es posible que se produzca la misma proporción de ambas cadenas poligénicas.

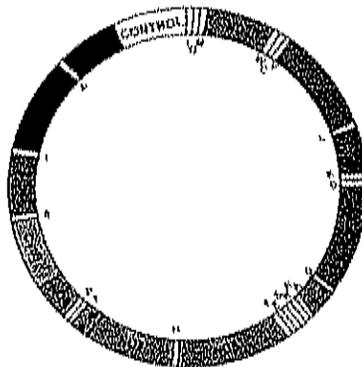


Figura 9. Organización del genoma mitocondrial de *Daphnia pulex* (<http://www.cladocera.uoguelph.ca/tools/>), la cual es idéntica a la del camarón asiático *Penaeus monodon* (Gen Bank NC 002184).

No obstante las anteriores consideraciones, se decidió normalizar la expresión génica de *COI*, *COII* y *COIII* con respecto a *16S*, mostrándose un comportamiento contrario al observado para la expresión sin normalizar de los mismos (Figura 10). La expresión relativa de *COI* disminuyó (0.58 veces) a las 24 h de ayuno, a continuación recuperó el nivel inicial a las 72 h, sin embargo, disminuyó (0.68 veces) a las 120 h y terminó con una ligera recuperación (0.51 veces) con los camarones realimentados comparados con el tiempo cero. La tendencia de la expresión relativa del gen *COIII* fue similar a *COI* aunque con cambios más sutiles. Por otra parte, *COII* difirió de la tendencia mostrada por los genes antes mencionados, ya que su expresión relativa disminuyó de forma constante a partir de las 24 h de ayuno y no mostró un aumento posterior (Figura 10).

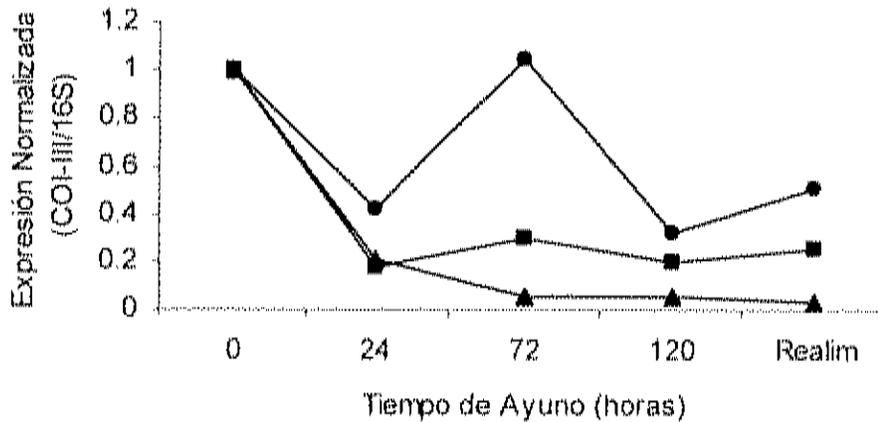


Figura 10. Expresión de los genes *COI* (●), *COII* (▲) y *COIII* (■) normalizada con la expresión del gen *16S* rRNA a lo largo del período de ayuno. Se usaron los cocientes de las medianas de cada tratamiento en el gen problema entre los correspondientes en el gen constitutivo, (n=1 para cada tiempo de ayuno).

Al analizar los datos obtenidos por el método de Pfaffl, de acuerdo a la fórmula descrita en la página 28, se obtuvieron resultados con el mismo comportamiento, aunque con diferentes proporciones que los obtenidos al normalizar las concentraciones de los mensajes de los genes *COI*, *COII* y *COIII* con *16S*, como se muestra en la Figura 11.

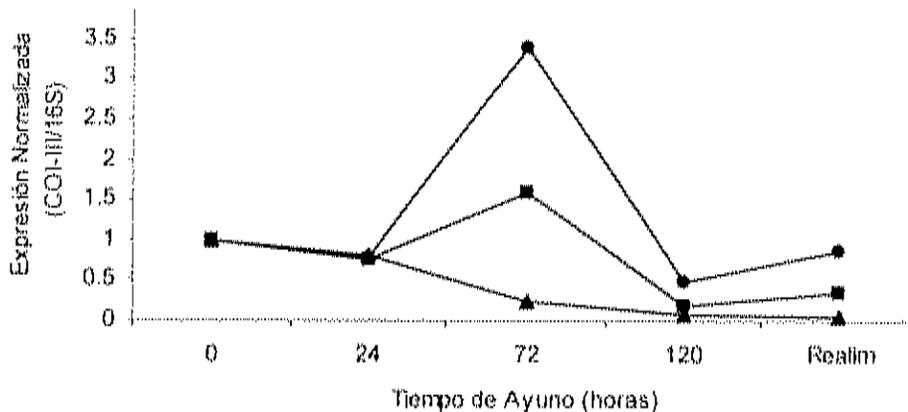


Figura 11. Expresión de los genes *COI* (●), *COII* (▲) y *COIII* (■) normalizada con la expresión del gen *16S* rRNA a lo largo del período de ayuno, aplicando el método de Pfaffl, (n=1 para cada tiempo de ayuno).

La diferencia en la expresión entre los genes mitocondriales se hizo evidente, ya que al evaluar su expresión neta poseen una tendencia similar, cuando se normalizaron contra el gen *16S* se mostró que *COII* fue menos variable que el resto de los genes (Figura 10 y 11). Al analizar los datos de la expresión relativa al gen *16S*, ignorando los controles de cada tiempo, se registró un aumento en la concentración de transcrito a las 24 h de ayuno (3.33, 2.94 y 1.64 veces, respectivamente para *COI*, *COII* y *COIII*) seguido por una disminución de 1.8, 1.9 y 0.65 veces a las 72 h para los genes *COI*, *COII* y *COIII*, respectivamente. Los genes *COI* y *COII* recuperaron 2.4 y 2.24 veces la concentración anterior, respectivamente a las 120 h, mientras *COIII* disminuyó 0.58 veces. Finalmente, en los organismos realimentados se registró una recuperación de 1.43 veces en *COI*, mientras que la recuperación de *COIII* fue solo del 0.17 veces y *COII* disminuyó 0.86 veces comparados con la concentración a las 120 h de ayuno (Figura 12). El mismo comportamiento se observó al realizar el análisis de la expresión normalizada con *16S* sin controles (Figuras 13).

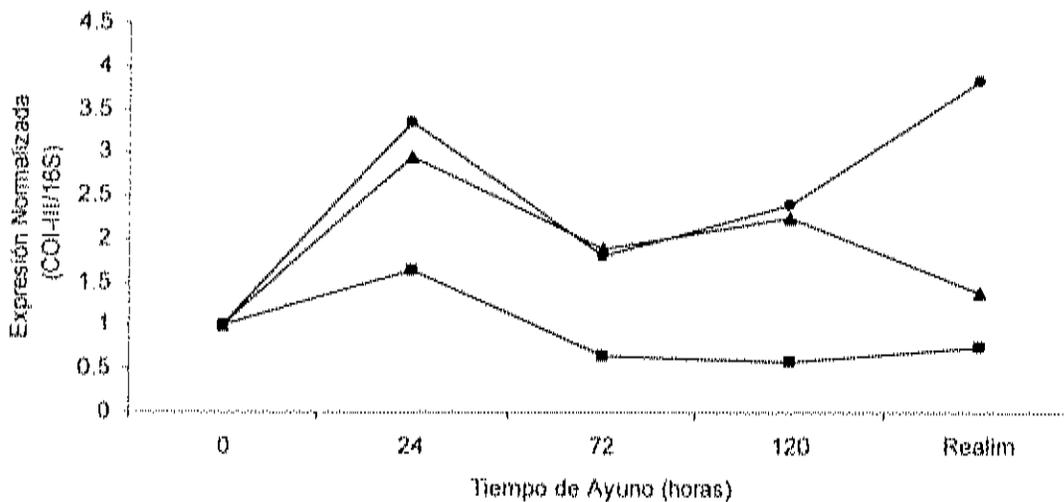


Figura 12. Expresión de los genes *COI* (●), *COII* (▲) y *COIII* (■) normalizada con la expresión del gen *16S* rRNA aplicando el análisis de cocientes contra el tiempo cero a lo largo del período de ayuno. Se utilizaron las medianas de los tiempos de ayuno para generar un cociente con respecto a la mediana del tiempo cero.

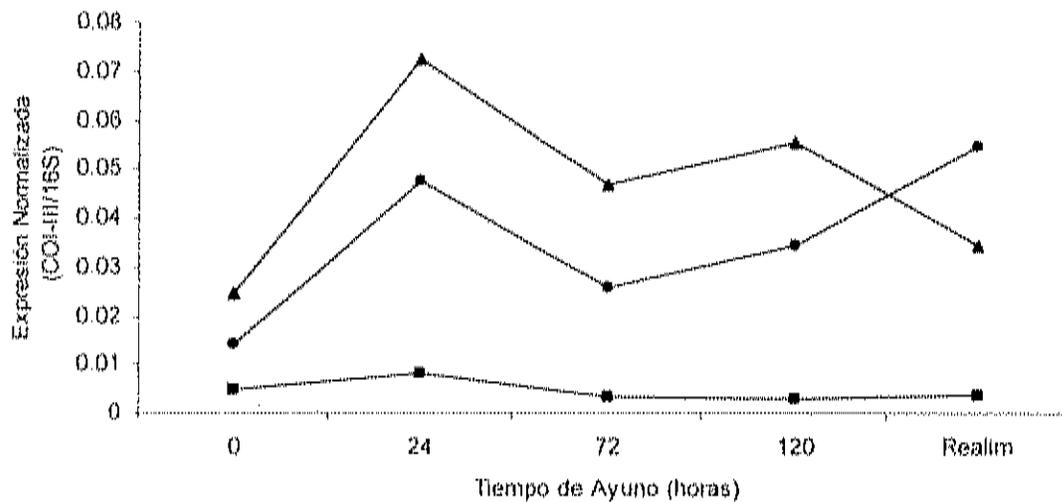


Figura 13. Expresión de los genes *COI* (●), *COII* (▲) y *COIII* (■) normalizada con la expresión del gen *16S* rRNA analizados ignorando las medianas de los controles de los tratamientos a lo largo del período de ayuno.

Con la finalidad de normalizar los niveles de expresión con otro gen constitutivo para obtener información más válida, se usaron los resultados de la evaluación de la expresión del gen de la proteína ribosomal *L8* para las mismas muestras (Sánchez-Paz *et al.*, manuscrito en preparación). Las mediciones del gen *L8* se llevaron a cabo bajo condiciones de amplificación similares a los genes *COI*, *COII* y *COIII* y *16S* a partir de las mismas muestras de RNA total.

La expresión de los genes *COI*, *COII* y *COIII* relativa al gen *L8* tuvo una tendencia común entre los diferentes genes al aumentar solo los niveles de expresión relativa en los camarones realimentados (Figura 14). La magnitud de la expresión neta para *L8* fue tan baja (aproximadamente cuatro órdenes de magnitud) comparada con la de los genes mitocondriales que prácticamente no presenta ningún efecto al usarse como gen de referencia. Ésto concuerda con un mayor número de copias de los genomas mitocondriales con respecto a los nucleares (Alberts *et al.*, 2002), a partir de la cual se puede esperar una mayor abundancia de los mensajes mitocondriales.

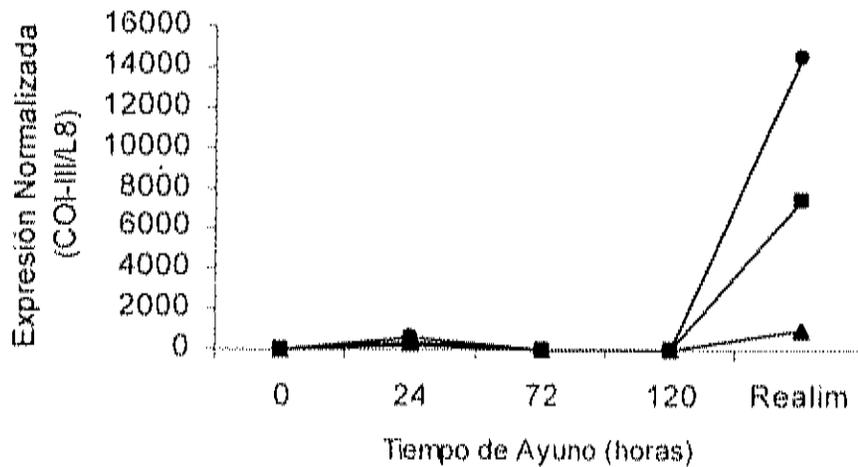


Figura 14. Expresión de los genes *COI* (●), *COII* (▲) y *COIII* (■) normalizada con la expresión del gen de la proteína ribosomal *L8* a lo largo del periodo de ayuno. Se usaron los cocientes de las medianas de cada tratamiento en el gen problema entre los correspondientes en el gen constitutivo.

Estos resultados contrastan con los de los estudios anteriores ya que la expresión de *L8* fue usada para normalizar la expresión de algunos genes, por ejemplo, el gen nuclear *HDL-BGBP* por efecto del ayuno, así como por diferentes composiciones dietarias en *L. vannamei* utilizando RT-PCR convencional y densitometría proporcionando buenos resultados (Muhlía-Almazán *et al.*, 2005).

De igual manera, otros genes de proteínas ribosomales así como de rRNA han sido previamente usados como genes constitutivos. Por ejemplo, Hittel y Storey (2002), utilizaron el gen nuclear del RNA ribosomal 28 S para normalizar la expresión de *COI*, *COIV*, *ATP6/ATP8* y *ATP α* empleando Northern blot. En un estudio con fibroblastos humanos utilizaron a los genes mitocondriales *Cyt b* y *ND1* para normalizar la expresión de *ATP6-CO3* por qRT-PCR en tiempo real (Jesina *et al.*, 2004). Al estudiar la expresión de los genes *ATP6* y *ATP8* en *Saccharomyces cerevisiae* por Northern blot, se utilizó al gen mitocondrial *14S* rRNA como gen constitutivo generando buenos resultados (Pelissier *et al.*, 1992).

Es importante mencionar que los estudios realizados en nuestro mismo laboratorio para determinar la variación en la concentración de las reservas energéticas en el hepatopáncreas de *L. vannamei* por efecto del ayuno, así como la evaluación de la expresión del gen de fosfofructocinasa (*PFK*) y piruvato cinasa (*PK*) durante el ayuno de *L. vannamei*, y el presente trabajo de investigación, se realizaron utilizando muestras del mismo bioensayo. Los experimentos de amplificación por PCR en tiempo real de los diferentes transcritos se trabajaron en condiciones similares a las descritas en este trabajo.

En esa investigación de la expresión génica de las enzimas de la glucólisis se encontró, que la expresión de *PFK* disminuyó significativamente a las 96 h de ayuno recuperándose rápidamente a las 120 h (Soñanez-Organis *et al.*, manuscrito en preparación). Lo anterior, sugiere una interesante relación entre sus niveles estables de transcrito y la disponibilidad de las reservas energéticas. Por ejemplo, la concentración de glucosa disminuyó significativamente en el hepatopáncreas de *L. vannamei* a partir de las 24 h de ayuno, mientras que el glucógeno disminuyó gradualmente a partir de las 24 h de ayuno y presentó su menor concentración a las 96 h (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). En contraste, el mRNA de *PK* no presentó cambios significativos en respuesta al ayuno (Sánchez-Paz *et al.*, manuscrito en preparación).

Existe una relación entre los hallazgos antes mencionados y los resultados de este estudio, puesto que la expresión neta de los genes mitocondriales presentó un aumento significativo a las 24 h, al igual que en los organismos realimentados. Lo anterior, tal vez se deba a una respuesta rápida a nivel de las primeras enzimas de la glucólisis (*PFK*) que ya no es sensible en los pasos posteriores (*PK*). Ésto también sugiere la utilización de otras fuentes de energía en el ciclo de Krebs, ya que la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa son la parte final del metabolismo energético y solo requieren del poder reductor generado por la glucólisis y el ciclo de Krebs. Éste último es también alimentado por los productos del catabolismo de lípidos y aminoácidos.

Por otra parte, el incremento en el nivel de mRNA de *COI* y el nivel constante de mRNA de *COIV* en el riñón de la ardilla *S. tridecemlineatus* bajo condiciones de hibernación, comparado con las ardillas control sin hibernación (Hittel y Storey, 2002), sugieren una frágil relación 1:1 entre las subunidades mitocondriales y nucleares de la enzima. Partiendo del antecedente de que existen alrededor de 1000 mitocondrias por célula hepática de ratas (Lehninger, 1975), y que las copias del genoma mitocondrial guardan una relación de 10,000:1 con las copias del genoma nuclear (Alberts *et al.*, 2002), es posible que el exceso de los transcritos de *COI* sean regulados a nivel de traducción, o bien, por la menor estabilidad de los mensajes mitocondriales comparada con la de los nucleares, permitiendo la formación de la estructura funcional de la citocromo c oxidasa. De cualquier forma, los resultados de este estudio concuerdan en el notable aumento en el nivel de expresión para el gen *COI*, lo que podría indicar que el nivel de transcrito *COI* es más estable en el tiempo que el mRNA de *COII* y *COIII*, pero menos estable que las subunidades nucleares.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias significativas en la expresión neta de los genes *COI*, *COII* y *COIII*, con respecto a los controles alimentados a través de los diferentes tiempos de ayuno. Los niveles de expresión de estos genes mitocondriales experimentaron un aumento significativo a las 24 h de ayuno, el cual coincide con la disminución de glucosa y glucógeno en hepatopáncreas de camarón blanco a las 24 h de ayuno, así como en los camarones realimentados (Sánchez-Paz *et al.*, 2006).

A pesar de la variación en la expresión del gen mitocondrial *16S rRNA* por efecto del ayuno, similar a la de los genes *COI*, *COII* y *COIII*, se decidió usar este gen para normalizar la concentración de los transcritos de los genes mitocondriales *COI*, *COII* y *COIII*, generando resultados contrarios a la expresión sin normalizar, debido a la mayor abundancia de transcritos de *16S* que puede estar relacionado con su mayor estabilidad comparado con los genes de la citocromo c oxidasa.

Sugerimos que el gen *16S rRNA* no es el mejor gen de referencia para normalizar los transcritos del sistema mitocondrial cuando se pretende estudiar el efecto del ayuno en camarón. El comportamiento de la expresión del *16S* es indicador de cambios generales en la transcripción del genoma mitocondrial y se explica por la transcripción policistronica mitocondrial.

El gen nuclear de la proteína ribosomal *L8* no se puede considerar como un gen de referencia adecuado para la normalización de los niveles de expresión de los genes mitocondriales *COI*, *COII* y *COIII*, debido a las grandes diferencias en copias de los genomas mitocondriales y nucleares, aunado a los niveles de expresión entre genes nucleares y mitocondriales.

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar un mayor número y tipo de posibles genes de referencia en estudios posteriores sobre efecto del ayuno en la expresión de genes mitocondriales de camarón.

Evaluar la expresión del gen nuclear *COIV*, ya que se ha reportado su participación en la regulación de la biogénesis del complejo enzimático citocromo c oxidasa.

Utilizar iniciadores purificados por HPLC para utilizarlos en la amplificación por PCR en tiempo real y evitar la coamplificación de productos inespecíficos.

REFERENCIAS

- Adams, S.H., Alho, C.S., Asins, G., Hegardt, F.G. y Marrero, P.F. (1997). Gene expression of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in a poorly ketogenic mammal: effect of starvation during the neonatal period of the piglet. *Biochem. J.* **324**: 65-73.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Publishing. 1294.
- Allen, J. F. (2003). The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **358**: 19-37.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van-Wormhoudt, A. y Moal, J. (2005). Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comp. Biochem. Physiol.* **140**: 635-646.
- Barnes, B. D. (1996). Zoología de los Invertebrados. México, Interamericana-McGraw-Hill. 1114.
- Batuecas, B., Garesse, R., Calleja, M., Valverde, J.R. y Marco, R. (1988). Genome organization of *Artemia* mitochondrial DNA. *Nucleic Acid Res.* **16**:6515-6529.
- Bio-Rad Laboratories, Inc (2006). Real-Time PCR Applications Guide. Bulletin 5279 US/EG Rev A.
- Brehm, A., Harris, D.J., Hernandez, M., Cabrera, V.M., Larruga, J.M., Pinto, F.M. y Gonzalez, A.M. (2001). Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the *Drosophila subobscura* subgroup. *Insect. Mol. Biol.* **10**: 573-578.
- Carrodegua, J.A. y Vallejo, C.G. (1997). Mitochondrial transcription initiation in the crustacean *Artemia franciscana*. *Eur. J. Biochem.* **250**:514-523.

- Chan, S.M., Rankin, S. M. y Keeley, L. L. (1988). Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids and glucose. *Biol. Bull.* **175**, 185-192.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Corless, C.E., Guiver, M. Borrow, R., Edwards-Jones, V., Kaczmarek, E.B. y Fox, A. (2000). Contamination and sensitivity issues with a Real-Time universal 16S rRNA PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1747-1752.
- Crease, T. J. (1999). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene* **233**: 89-99.
- Dall, W., Hill, B. J., Rothlisberg, P. C., y Sharples, D. J. (1990). Moulting and growth. En: *Advances in marine biology*, vol. 27, The biology of the Penaeidae. Blaxter, J. H. S., y Southward A. J. (eds). Academic Press Ltd. 213-250.
- De Lange, P., Ragni, M., Silvestri, E., Moreno, M., Schiavo, L., Lombardi, A., Farina, P., Feola, A., Goglia, F. y Lanni, A. (2004). Combined cDNA array/RT-PCR analysis of gene expression profile in rat gastrocnemius muscle: relation to its adaptive function in energy metabolism during fasting. *FASEB J.* **18**: 350-2.
- Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H. R. y Cheng, C. H .K. (2004). Effects of food deprivation on expression of growth hormone receptor and proximate composition in liver of black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Comp. Biochem. Phys.* **137B**: 421–432.
- Duborjal, H., Beugnot, R., De Camaret, B. M. y Issartel, J.P. (2002). Large Functional Range of Steady-State Levels of Nuclear and Mitochondrial Transcripts Coding for the Subunits of the Human Mitochondrial OXPHOS System. *Genome Res.* **12**:1901–1909.

- Eads, B.D. y Hand, S.C. (2003). Mitochondrial mRNA stability and polyadenylation during anoxia-induced quiescence in the brine shrimp *Artemia franciscana*, *J. Exp. Biol.* **206**: 3681-92.
- Fafournoux, P., Bruhat, A. y Jousse, C. (2000). Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J.* **351**: 1-12.
- Fourney, R. M., Miyakoshi, J., Day III, R. S. y Paterson, M. C. (1988). Northern Blotting: Efficient RNA Staining and Transfer. *FOCUS*. **10**: 5-7.
- Garesse, R. (1988). *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* **118**: 649-663.
- Garesse, R. y Vallejo, C. G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes, *Gene*. **263**: 1-16.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. y Mathieu, C. (2001). An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*. **25**:386–401.
- Gómez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. y Yepiz-Plascencia, G. (2006). The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. *Dev. Comp. Immun.* **30**: 893-900.
- Hickerson, M.C., Cunningham, C.W. (2000). Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura) *Mol. Biol Evol.* **17**:639-644.
- Hittel, D.S y Storey, K.B. (2002). Differential expression of mitochondria-encoded genes in a hibernating mammal. *J. Exp. Biol.* **205**: 1625–1631.
- Ikeguchi, K., Ineno, T., Itoi, S., Kondo, H., Kinoshita, S. y Watabe, S. (2006). Increased Levels of Mitochondrial Gene Transcripts in the Thermally

- Selected Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Strain During Embryonic Development. *Mar. Biotech.* **8**:178–188.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. y Gyllenstein, U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* **408**: 708-713.
- Invitrogen Life Technologies. (2003). Superscript[®] first-strand synthesis system for RT-PCR, Instruction Manual. Catálogo No. 11904-018. Versión E.
- Jensen, P., Wilson, M. T., Aasa, R. y Malmstrom, B. G. (1984). Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochem. J.* **22**:829-837.
- Jesina, P., Tesarova, M., Fornuskova, D., Vojtiskova, A., Pecina, P., Kaplanova, V., Hansikova, H., Zeman, J. y Houstek, J. (2004). Diminished synthesis of subunit a (ATP6) and altered function of ATP synthase and cytochrome c oxidase due to the mtDNA 2 bp microdeletion of TA at positions 9205 and 9206. *Biochem. J.* **383**:561–571.
- Kelly, D.P. y Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes and Dev.* **18**: 357-368.
- Keeton, W.T. (1972). Biological Science. Segunda Edición. W.W. Norton and Company, Inc. US.
- Khalimonchuk, O. y Rodel, G. (2005). Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* **5**: 363–388.
- Kuai, L., Fang, F., Butler, J.S. y Sherman, F. (2004). Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 8581–8586.
- La Cava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A. y Tollervy, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex, *Cell.* **121**:713–724.

- Le May, C., Pineau, T., Bigot, K., Kohl, C., Girard, J. y Pegorier, J. P. (2000). Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPAR α null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase gene expression. *FEBS Lett* **475**: 163-6.
- Leary, S.C., Battersby, B.J y Moyes, C.D. (1998). Inter-tissue differences in mitochondrial enzyme activity, RNA and DNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *J. Exp Biol.* **201**: 3377–3384.
- Lehnert, S.A. y Johnson, S.E. (2002). Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* **133B**: 163–171.
- Lehninger, A. (1975). Biochemistry. Segunda Edición. Worth Publishers, Inc. US.
- Lewin, B. (2001). Genes VII. 7ª Edición. España. Oxford University Press. 990.
- Lindsley, J.E. y Rutter, J. (2004). Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **139B**: 543-59.
- Liss, B. (2002). Improved quantitative real time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res.* **30**: 1-9.
- Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Hüttemann, M., Lee, I. y Kadenbach, B. (2001). Cytochrome c Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation. *CHEMBIOCHEM*, **2**: 392-403.
- Martínez-Córdova, L.R. (1999). Biología del camarón. Cultivo de Camarones Peneidos. Principios y Prácticas. México, AGT Editor. 1,368.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y Ahern, K. G. (2002). Biología. 3ª Edición. Madrid, Addison Wesley. 1368.
- Matsushima, Y., Garesse, R. Kaguni, L.S. (2004). *Drosophila* mitochondrial transcription factor B2 regulates mitochondrial DNA copy number and transcription in schneider cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 26900–26905.

- Meyer-Fernandes, J.R., Clark, C.P., Gondim, K.C. y Wells, M. A. (2001). Fat body fructose-2,6-bisphosphate content and phosphorylase activity correlate with changes in hemolymph glucose concentration during fasting and re-feeding in larval *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **31**: 165-70.
- Meyer-Fernandes, J.R., Gondim, K.C. y Wells, M. A. (2000). Developmental changes in the response of larval *Manduca sexta* fat body glycogen phosphorylase to starvation, stress and octopamine. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**: 415-22.
- Mi-Hyun-Ryu, M.S., Daily, J. W. y Cha, Y. S. (2005). Effect of starvation on hepatic acyl-CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase-I, and acetyl-CoA carboxylase mRNA levels in rats. *Nutrition.* **21**: 537–542.
- Muhlia-Almazán, A. y García-Carreño, F. (2002). Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol.* **133B**: 383-394.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, J. A., García-Carreño, F., Peregrino-Uriarte, A. B. y Yepiz-Plascencia, G. (2005). Starvation and diet composition affect mRNA levels of the high density-lipoprotein-h glucan binding protein in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **142B**: 209-216.
- Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB) IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Newsletter 1984. *Biosci. Rep.* **4**:177-180.
- Pelissier, P.P., Camougrand, M.M., Manon, S.T., Velours, G.M. y Guerin, M.G. (1992). Regulation by Nuclear Genes of the Mitochondrial Synthesis of Subunits 6 and 8 of the ATP Synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267**, 2467-2473.

- Petriella, A. M. y Boschi, E. E. (1997). Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. *Invest. Mar. Valparaíso*. **25**: 135-157.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2002-2007.
- Pich, M. M., Raulea, N., Catanib, L., Fagiolib, M. E., Faenzac, I., Coccoc, L. y Lenaza, G. (2004). Increased transcription of mitochondrial genes for Complex I in human platelets during ageing. *FEBS*. **558**:19-22.
- Royo, L.J., Álvarez, I., Beja-Pereira, A., Molina, A., Fernández, I., Jordana, J., Gómez, E., Gutiérrez, J.P. y Goyache, F. (2005). The Origins of Iberian Horses Assessed via Mitochondrial DNA. *J. Heredity*. **96**: 663–669.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Hernández-Saavedra, N. Y. y Yepiz-Plascencia, G. (2003). Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **292**: 1-17.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López J, Muhlia-Almazán, A. y Yepiz-Plascencia, G. (2006). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* En prensa.
- Santiago, J y Vallejo, C.G. (1998). Identification of a mitochondrial RNA polymerase in the crustacean *Artemia franciscana*. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**: 276-284.
- Scott, R. C., Schuldiner, O. y Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell.* **7**: 167-178.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gom, V., Singer, M.J. y Reed, M.W. (2000). Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain

- Reaction to study mRNA decay: Comparison of Endpoint and Real-Time methods. *Anal. Biochem.* **285**:194–204.
- Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H y Kubista, M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry.* **50**:509-515.
- Stryer, L. (1995). Biochemistry. New York, Freeman and Company. 1089.
- Suslov, O. y Steidler, D.A. (2005). PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Res.* **33**:2-12.
- Sylvestre, J., Margeot, A., Jacq, C., Dujardin, G. y Corral-Debrinski, M. (2003). The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 3848-3856.
- Szuplewski, S. y Terracol, R. (2001). The cyclope gene of *Drosophila* encodes a cytochrome c oxidase subunit VIc homolog. *Genetics.* **158**: 1629-43.
- Takata, k., Yoshida, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Kai, M., Oshige, M., Sakimoto, I., Koiwai, O. y Sak, K. (2001). *Drosophila* Mitochondrial Transcription Factor A: Characterization of its cDNA and expression pattern during development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**:474-483.
- Torres, J., Darley-Usmar, V. y Wilson, M. T. (1995). Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem. J.* **312**: 169-173.
- Vijayasarathy, C., Damle, S., Subbuswamy., Prabu, K., Otto, C. M. y Avadhani, N. G. (2003). Adaptive changes in the expression of nuclear and mitochondrial encoded subunits of cytochrome c oxidase and the catalytic activity during hypoxia. *Eur. J. Biochem.* **270**: 871–879.

- Whitaker, J.D. (2005). [dnr.state.sc.us/](http://www.dnr.state.sc.us/). [página en internet]: disponible en <http://www.dnr.state.sc.us/.../seascience/shrimp.html> Sea science. The South Carolina Department of Natural Research. [Consultada el 11 de mayo del 2005].
- Wilson, K., Cahill, V., Ballment, E. y Benzie, J. (2000). The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of the Crustacean *Penaeus monodon*: Are Malacostracan Crustaceans More Closely Related to Insects than to Branchiopods?. *Mol. Biol. Evol.* **17**:863–874.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**:130–138.
- Zaid, A., Hughes, H. G., Porceddu, E. y Nicholas, F. (2004). Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación. Departamento de Desarrollo Sustentable. *FAO*, 524.
- Zhang, J., Underwood, L. E. y D'Ercole, A. J. (2001). Hepatic mRNAs up-regulated by starvation: an expression profile determined by suppression subtractive hybridization. *FASEB. J.* **15**: 1261-3.
- Zhang, J., Desai, M., Ozanne, S.E., Doherty, E., Hales, D.N. y Byrne, C.D. (1997). Two variants of quantitative reverse transcriptase PCR used to show differential expression of a-, b- and c-fibrinogen genes in rat liver lobes. *Biochem. J.* **321**:769-775.
- Zhao, X., Li, N., Guo, W., Hu, X., Liu, Z., Gong, G., Wang, A., Feng, J. y Wu, C. (2004). Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity.* **93**: 399–403.
- Zinke, I., Schutz, C.S., Katzenberger, J.D., Bauer, M. y Pankratz, M.J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J.* **21**: 6162-6173.

Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh, M. y Zorova, L. D. (1997). Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Biosci. Rep.* **17**: 507-20.

Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh, M. y Zorova, L. D. (1997). Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Biosci. Rep.* **17**: 507-20.