

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

EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS SUBUNIDADES ATP6 MITOCONDRIAL
Y ATPc NUCLEAR DEL COMPLEJO ATP-SINTASA EN EL CAMARÓN
BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) EN CONDICIONES DE HIPOXIA

POR

OLIVIERT MARTÍNEZ CRUZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

NOVIEMBRE. DEL 2007

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Oliviert Martínez Cruz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias

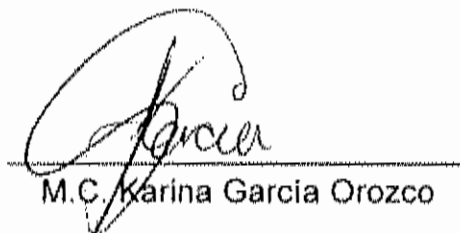


Dra. Adriana Muhlia Almazán

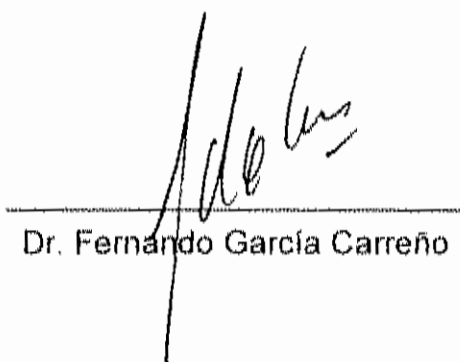
Directora de Tesis



Dra. Gloria Yepiz Flascencia



M.C. Karina García Orozco

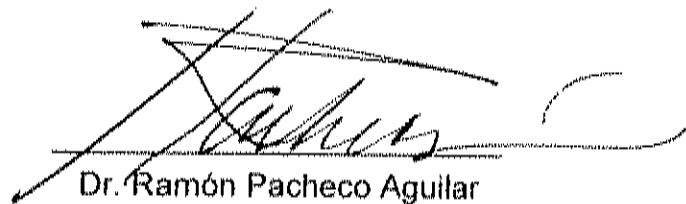


Dr. Fernando García Carreño

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ramón Pacheco Aguilar', is written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large flourish on the right side.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

DEDICATORIA

A Dios.

A mi familia, por apoyarme en todas mis decisiones y siempre estar conmigo... los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., en especial a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por su apoyo al proyecto 48989-Z y por la beca de maestría otorgada.

A la Coordinación de Docencia. Gracias a cada uno por su apoyo, en especial a la Dra. Ana María Calderón.

A la Dra. Adriana Muñoz, por creer en mí y estar siempre conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por no solo ser mi directora de tesis, sino por ser mi amiga y más que eso... mi mamá académica.

A cada uno de los miembros del comité de tesis, Dra. Gloria Yepiz, M.C Karina García y al Dr. Fernando García, por su apoyo y sus comentarios siempre tan acertados.

A cada uno de mis amigos del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos: Carmen Contreras, Mariana Rodríguez, Sarahi Vega, José Gpe. Soñanez, Antonio García, Emmanuel Aispuro, Alex Salazar, Aldo Arvizu, Martín Bustillo, Alejandro Varela, Iván Anduro, Alejandra Clavero, Arturo Sánchez, Alma Peregrino, Rogerio Sotelo. Gracias por tantos momentos agradables, sus sonrisas alimentaban mi espíritu.

A las familias Salomón Juárez y Rivera Pérez, por permitirme formar parte de sus familias.

A cada uno de mis amigos, tanto mexicanos como extranjeros ... Gracias por su cariño, amistad, apoyo y por estar al pendiente de mí ... los quiero.

ÍNDICE

APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
Estructura, función e importancia del estudio de la mitocondria.....	3
Complejos enzimáticos del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.....	4
ATP-sintasa.....	6
Porciones que conforman a la ATP-sintasa.....	7
Descripción de las porciones F_0 y F_1	7
Función las porciones F_0 y F_1	8
Subunidades codificadas en el genoma nuclear.....	9
Características de la ATP subunidad c.....	11
Subunidades codificadas en el genoma mitocondrial.....	13
Características de la ATP subunidad 6.....	14
Características del mRNA mitocondrial y nuclear y la coordinación entre genomas.....	15
Respuesta mitocondrial frente a la disminución de oxígeno.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	19

OBJETIVOS.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
METODOLOGÍA.....	21
Bioensayo	21
Cuantificación de metabolitos en plasma.....	22
Medición de la concentración de amonio en agua.....	23
Evaluación de la tasa respiratoria.....	23
Aislamiento, cuantificación e integridad del RNA total.....	23
Eliminación del DNA genómico y síntesis de DNA complementario (cDNA)..	24
Amplificación del gen mitocondrial ATP6 y nuclear ATPc por PCR.....	24
Cuantificación del mRNA por PCR en tiempo real.....	25
Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Cuantificación de metabolitos en plasma.....	29
Aislamiento y evaluación de la integridad del RNA total.....	33
Detección de gDNA en las muestras de RNA total y síntesis de cDNA.....	33
Cuantificación del mRNA de la glándula digestiva y músculo por PCR en tiempo real.....	34
CONCLUSIÓN.....	47
RECOMENDACIONES.....	48
REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos específicos diseñados para cada gen estudiado	25
Tabla 2. Peso (g) de los organismos experimentales.....	27
Tabla 3. Características de las curvas estándar de ATP6, ATPc y L8, y ajuste al modelo lineal $y = ax+b$	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Complejos enzimáticos participantes en la fosforilación oxidativa de la bacteria <i>E. coli</i>	5
Figura 2. Subunidades que conforman a la ATP-sintasa bacteriana.....	9
Figura 3. Características del transcrito de ATPc de la glándula digestiva de <i>L. vannamei</i>	13
Figura 4. Características del transcrito de ATP6 de la glándula digestiva de <i>L. vannamei</i>	15
Figura 5. Índice hepatosomático de los camarones sometidos a hipoxia.....	28
Figura 6. Concentración de lactato en el plasma del camarón. A) Camarones control y sometidos a hipoxia B) Camarones sometidos a hipoxia	29
Figura 7. Concentración de glucosa en el plasma del camarón. A) Camarones control y sometidos a hipoxia B) Camarones sometidos a hipoxia	31
Figura 8. Concentración de amonio en el agua.....	32
Figura 9. Consumo de oxígeno de los camarones sometidos a diferentes concentraciones de OD en agua.....	32
Figura 10. Integridad del RNA total extraído A) de glándula digestiva y B) de músculo de <i>L. vannamei</i>	33
Figura 11. Amplificación de un fragmento de 110 pb del gen ATP6 usando como templado A) RNA total, amplificando positivas las muestras contaminadas con gDNA. B) RNA total, muestras tratadas con DNasa I, libres de contaminación.....	34
Figura 12. Curva de disociación de los productos de PCR de ATP6 y ATPc.....	35
Figura 13. Cuantificación absoluta normalizada de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en 700 ng de RNA total de la glándula digestiva del camarón blanco.....	37
Figura 14. Cociente de expresión relativa de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en 700 ng de RNA total de la glándula digestiva de camarón blanco.....	39
Figura 15. Cantidad absoluta normalizada de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en 150ng de RNA total del músculo de camarón blanco.....	41
Figura 16. Cociente de expresión relativa de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en	

150 ng de RNA total del músculo de camarón blanco..... 42

Figura 17. Cuantificación absoluta normalizada de ATP6 y ATPc de la glándula digestiva (arriba) y de músculo (abajo), considerando 700 ng de templado..... 43

RESUMEN

El complejo enzimático conocido como ATP-sintasa mitocondrial realiza en las células eucariontes una función clave pues participa en la última reacción enzimática de la fosforilación oxidativa utilizando la energía de un gradiente electroquímico para la síntesis de ATP a partir de ADP + Pi ó para la hidrólisis de ATP. Debido a la importancia de esta enzima y al escaso conocimiento que de ella se tiene en los crustáceos, esta investigación se encuentra enfocada al estudio de los genes de dos subunidades que conforman el complejo ATP-sintasa, y que además son codificadas en diferentes genomas, la subunidad ATPc codificada en el genoma nuclear, y la ATP6 codificada en el genoma mitocondrial. El modelo de estudio utilizado durante la Investigación es el camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*), el cual fue sometido a condiciones de hipoxia con el fin de evaluar cambios en la expresión génica de las dos subunidades del complejo ATP-sintasa en estudio. De forma adicional y con el objetivo de evaluar la respuesta metabólica del camarón al efecto de la hipoxia, se cuantificaron diferentes metabolitos en el plasma de este organismo tales como glucosa y lactato, y los resultados obtenidos mostraron cambios significativos que sugieren el uso alterno de una vía anaerobia por parte de los organismos experimentales con la consecuente producción de lactato. Así mismo se midió la tasa respiratoria de los camarones que se redujo de manera proporcional a la disminución del oxígeno disuelto en el agua confirmando el efecto causado por la hipoxia. Por otro lado, la evaluación de la expresión génica de las subunidades ATP6 y ATPc en la glándula digestiva mostró cambios coordinados entre las concentraciones de ambos transcritos como respuesta a la hipoxia, sin embargo, en el músculo no se detectaron cambios coordinados entre los organismos sometidos a hipoxia, pero si una diferencia en cuanto a la cantidad de ambos transcritos en este tejido comparado con los valores observados en la glándula digestiva. De lo anterior se concluyó que los mecanismos de regulación que participan en la coordinación de la síntesis del complejo enzimático ATP-sintasa actúan en diferentes niveles y se sugiere que a nivel transcripcional puede observarse la coordinación en la expresión de los transcritos de manera tejido-específica, estando este comportamiento relacionado de manera estrecha con la función del tejido analizado.

INTRODUCCIÓN

La historia de la mitocondria la define como el escenario de acción de una serie de procesos metabólicos precisos, coordinados y vitales en las células eucariontes, pues este organelo produce hasta el 95% del ATP que provee de energía al organismo a través del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Curtis, 1983; Goffart *et al.*, 2003). A la fecha, el avance de la tecnología y el desarrollo de herramientas como la biología molecular han permitido profundizar en el estudio de la mitocondria, generando mayor conocimiento pero también estableciendo mayores retos. Así, surge la necesidad de avanzar en el estudio de las enzimas que participan en el proceso de generación de energía en la mitocondria, principalmente en modelos animales menos estudiados pero potencialmente explotables, siendo así el camarón el objeto de este estudio.

A lo largo del ciclo de vida, los crustáceos como el camarón se enfrentan a condiciones ambientales constantemente cambiantes tales como cambios en la concentración del oxígeno disuelto del agua, así como en la temperatura y la salinidad del agua. De tal manera que la maquinaria energética de estos organismos debe sufrir algunos ajustes para lograr la supervivencia celular. Cuando existe suficiente oxígeno disponible para la fosforilación oxidativa, la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial actúa como el sitio de producción de ATP en las células animales. Por el contrario, bajo condiciones de anoxia ó hipoxia, la ATP-sintasa comienza a bombear protones desde la matriz mitocondrial, en un intento de mantener el potencial de la membrana mitocondrial. Así, la mitocondria cambia su función de ser un productor de ATP a ser un consumidor (Di Lisa *et al.*, 1998).

Hasta el momento, los estudios sobre la ATP-sintasa en vertebrados se han enfocado al análisis de la proteína, existiendo escasa información sobre los genes que codifican a las diferentes subunidades de esta enzima. El estudio de las enzimas mitocondriales del camarón no es la excepción, así el objetivo principal de esta investigación es evaluar los cambios en la expresión de los genes que codifican a la subunidad mitocondrial ATP6 y la nuclear ATPc de la enzima ATP-sintasa en el

camarón blanco, y así poder inferir sobre la existencia de posibles mecanismos de coordinación durante la transcripción de genes codificados en dos diferentes genomas: nuclear y mitocondrial.

ANTECEDENTES

Estructura, función e importancia del estudio de la mitocondria

En los años 50s se realizó la primera descripción estructural de la mitocondria por microscopia electrónica, sin embargo, desde principios de 1900 se reportó la existencia de este organelo. En 1981, Margulis propuso la teoría endosimbiótica, en la que una célula protoeucariótica carente de mitocondrias evolucionó y por endocitosis capturó a una protobacteria (mitocondria). Después de establecer una relación simbiótica, los genes redundantes fueron eliminados y varios pertenecientes a la bacteria fueron transferidos al núcleo, dando como resultado la distribución observada de los genes entre los dos organelos, núcleo y mitocondria (Scheffler, 2001).

La mitocondria varía en tamaño, sin embargo, regularmente es de 1 μm , similar al tamaño de una célula bacteriana completa. Este organelo también varía en forma, número y localización, dependiendo del tipo de célula o función del tejido (Nelson y Cox, 2000). Una de las características más importantes de la mitocondria es que tiene su propio genoma (mtDNA), el cual en los vertebrados esta compuesto por aproximadamente 16,000 pb y codifica 22 RNA de transferencia (tRNA), 2 RNA ribosomales (rRNA) y 13 proteínas, algunas de las cuales son subunidades de los diferentes complejos enzimáticos del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa y se encuentran involucradas en la oxidación de nutrientes orgánicos mediante oxígeno molecular (O_2). En el genoma nuclear se encuentran codificadas el resto de las subunidades que pertenecen a estos complejos enzimáticos y que una vez traducidas son importadas a la mitocondria, en donde se realiza el ensamblaje de 4 de las 5 enzimas que forman parte de la fosforilación oxidativa (Howe, 1994).

Estas enzimas cuentan con porciones que se encuentran suspendidas en la matriz mitocondrial y otras que están embebidas en la membrana interna de la mitocondria (Dasgupta *et al.*, 2001).

Enriquez *et al.*, (1999), señalan que en la mitocondria de vertebrados se llevan a cabo rutas metabólicas múltiples y fundamentales, incluyendo la biosíntesis de pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, urea y otros metabolitos. Por otro lado, el transporte mitocondrial de electrones genera un gradiente electroquímico de protones (H^+) a través de la membrana interna, el cual es utilizado por la ATP-sintasa para la producción del 95% de ATP celular (Curtis, 1983; Goffart *et al.*, 2003). Así, la generación de ATP resulta de la transferencia de electrones de NADH o $FADH_2$ a O_2 , por medio de una serie de enzimas transportadoras de electrones. Este mecanismo se conoce como fosforilación oxidativa (Voet y Voet, 1995). Además de la importante función como generadora de ATP, se ha reportado que la mitocondria se encuentra implicada en el desarrollo de enfermedades como Parkinson, diabetes mellitus, posiblemente Alzheimer e incluso envejecimiento y apoptosis (Scheffler, 2001).

Complejos enzimáticos del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa

En la fosforilación oxidativa participan una serie de complejos multienzimáticos conocidos como complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato-coenzima Q reductasa), complejo III (citocromo reductasa), complejo IV (citocromo C oxidasa) y el complejo V (ATP-sintasa). Es importante señalar que el complejo II, en contraste con los otros complejos, no es una bomba de protones (Stryer, 1995). En la Figura 1 se observa el orden de las enzimas que realizan el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

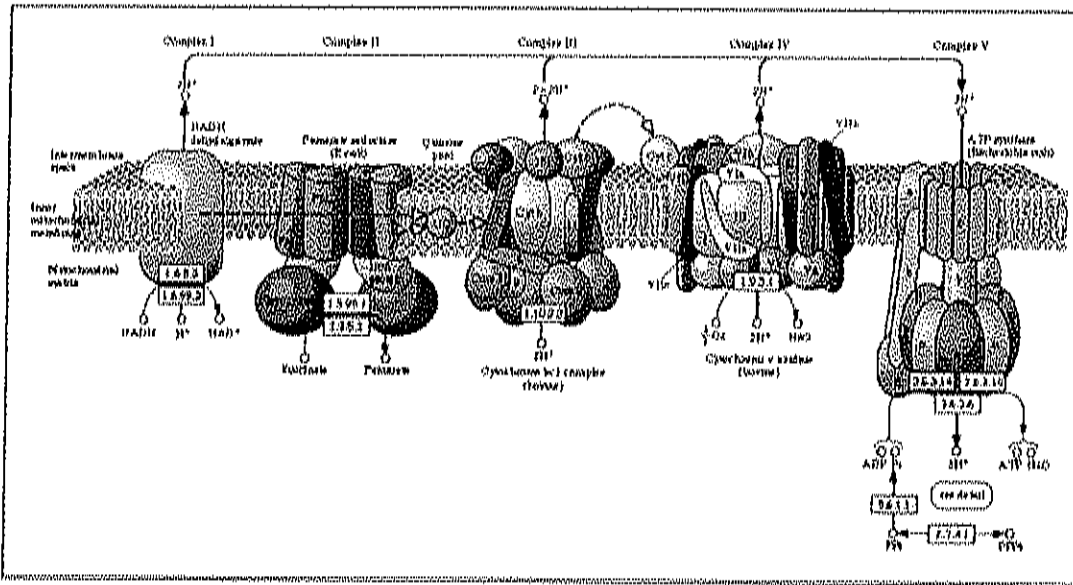


Figura 1. Complejos enzimáticos participantes en la fosforilación oxidativa de la bacteria *E. coli* (Modificado de KEGG, 2006).

La NADH deshidrogenasa (complejo I) de vertebrados es un complejo formado por 46 cadenas polipeptídicas distintas, de las cuales 39 se encuentran codificadas en el genoma nuclear y 7 en el genoma de la mitocondria (Ugalde *et al.*, 2004). El complejo además presenta algunos centros hierro-azufre, que transfieren los electrones desde la flavina reducida a otro transportador respiratorio, la coenzima Q (Mathews *et al.*, 2003).

La succinato coenzima Q reductasa (complejo II) presenta un peso molecular considerablemente menor con respecto al resto de los complejos enzimáticos, debido a que se encuentra integrada por solo cuatro polipéptidos, los cuales son codificados por el genoma nuclear. Además, es considerada como una enzima bifuncional ya que participa tanto en la cadena de transporte de electrones, como en el ciclo de Krebs. La succinato coenzima Q reductasa puede transferir electrones directamente, por medio de los centros hierro-azufre, desde el FADH₂ unido a los otros transportadores respiratorios de la membrana (Cardol *et al.*, 2005).

El complejo III es conocido también como citocromo bc1, el cual puede estar formado por 10-11 subunidades, de las cuales solo una es codificada por el genoma mitocondrial (Berry *et al.*, 2000). Este complejo también está constituido por un

citocromo de 42 kDa con dos grupos hemo del tipo b, un citocromo c1 de 31 kDa y un grupo de moléculas del tipo 2Fe-2S. Su función es transferir electrones entre ubiquinona y citocromo c (Buchana *et al.*, 2001).

El citocromo c (complejo IV) cataliza el último paso del transporte de electrones: la reducción del oxígeno en agua. En las células eucariotas está formado por siete a nueve cadenas polipeptídicas. Tres de éstas son codificadas por el genoma de la mitocondria y se sintetizan en el interior del organelo. El resto están codificadas por genes nucleares (Buchana *et al.*, 2001).

El complejo V formado por la ATP-sintasa, genera ATP a partir de ADP y Pi al final del transporte de electrones, sin embargo, también tiene la capacidad de hidrolizar ATP (Goffeau *et al.*, 2004). Nagley *et al.*, (2000) y Velours *et al.*, (2003) afirman que este complejo se encuentra integrado por una porción hidrofílica catalítica llamada F₁, la cual se localiza en la matriz de la mitocondria de levaduras y vertebrados, y en la membrana celular de las bacterias. Además, hay una porción hidrofóbica (F₀), que ancla a la enzima en la membrana mitocondrial interna y media la conducción de protones que participan indirectamente en la síntesis de ATP.

La fosforilación oxidativa y la generación de ATP pueden variar extensamente en diferentes tejidos. Por ejemplo, desde el desarrollo de un oocito fertilizado hasta un organismo multicelular, la biogénesis mitocondrial es regulada y la capacidad de llevar a cabo la fosforilación oxidativa se adapta a las demandas de ATP de un tipo de célula en particular. Por otro lado, el proceso de fosforilación oxidativa requiere proteínas codificadas por el genoma del núcleo y la mitocondria para la formación de los complejos enzimáticos (Vijayasarathy *et al.*, 2003; Misericordia *et al.*, 1998).

ATP- sintasa

Las ATP-sintasas son enzimas multiméricas que se encuentran clasificadas dentro del grupo de las hidrolasas como EC 3.6.3.14 por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés). Son conocidas como bombas de protones ATPasas, tienen como función conducir cationes a

expensas de ATP o sintetizar ATP utilizando gradientes transmembranales de iones. Esta importante familia de proteínas transportadoras de iones ha sido dividida en tres tipos, dependiendo de su distribución filogenética: A-ATPasas se encuentran principalmente en Archaea. Las F-ATPasas se localizan en mitocondrias, plástidos (en algas y plantas) y bacterias; y las V-ATPasas en eucariotas, son aquellas que predominan en vacuolas y otras vesículas de la vía endo y exocítica (Lapierre *et al.*, 2006).

La F-ATPasa utiliza la energía del gradiente electroquímico para la síntesis de ATP, haciendo que el flujo de protones regrese a la matriz mitocondrial a través de un canal transmembranal del sector F_0 al F_1 de la proteína. Bajo condiciones que son termodinámicamente favorables para la hidrólisis de ATP, la ATP-sintasa utiliza la energía de hidrólisis de ATP para bombear los protones a través de la membrana, desde la matriz hacia el espacio intermembranal (Avers, 1986). De tal manera que para conocer detalladamente como se encuentra formada cada porción del complejo enzimático, es importante describir cada una de ellas y conocer la función que realizan.

Porciones que conforman a la ATP-sintasa

La ATP-sintasa está ensamblada por dos porciones: la F_0 y F_1 que le permiten producir ATP. Cuando se transportan electrones, se bombean protones desde la matriz de la mitocondria hacia en el espacio intermembranal, creando un potencial electroquímico. Los protones entran a favor del gradiente, pasan a través del complejo enzimático para volver a la matriz mitoncondrial y la energía liberada es usada para sintetizar ATP. De esta manera sólo se sintetiza ATP cuando existe este potencial electroquímico (síntesis acoplada al transporte de electrones) (Boyer, 2002).

Descripción de las porciones F_0 y F_1

La porción F_1 constituye la sección intracitoplasmática y catalítica. Su arreglo estequiométrico se puede expresar como $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$ (Figura 2). La parte superior de

F_1 consta de tres subunidades α alternando con tres subunidades β , formando un anillo hexamérico, pero sólo las subunidades β participan en la catálisis. El tallo central está constituido por las proteínas γ y ϵ . La subunidad γ llega hasta el centro del hexámero $\alpha_3\beta_3$ y rompe su simetría: cada una de las subunidades β se distingue por la forma en que interacciona con una cara distinta de la subunidad γ (Wang y Oster, 1998).

La porción F_0 es hidrofóbica, está compuesta de las subunidades a , b_2 , c_{12} , y atraviesa la membrana mitocondrial interna que transloca los protones en *E. coli* (Figura 2). La subunidad a es la encargada de canalizar los protones a través de la membrana, mientras que las dos subunidades b sobresalen hacia el lado de la matriz mitocondrial, interaccionando con la F_1 . Las 12 subunidades de c se disponen formando una especie de cilindro transmembranoso, capaz de rotar en ambos sentidos. Además, el anillo c es un conducto para los protones que a su paso, hacen girar la subunidad γ . La columna externa, constituida por las subunidades a , b y δ hace de soporte para todo el conjunto. En la Figura 2 se ilustra la posición de cada subunidad dentro de cada porción de la enzima. Es importante mencionar que la descripción anterior corresponde a la F_1 - F_0 ATP-sintasa de bacterias, el cual es el modelo en el que se tienen importantes avances en el estudio de la estructura de este complejo enzimático (Wilkins, 2000).

Función de las porciones F_0 y F_1

La translocación de protones a través de F_0 está acoplada a la síntesis de una molécula de ATP en las subunidades β de la porción F_1 , por medio de un mecanismo de catálisis rotacional. La entrada de 3-4 protones por F_0 provoca la rotación del cilindro de c_{12} , lo que supone una torsión que se transmite a la F_1 provocando un cambio conformacional en las subunidades β . Este cambio permite que estas subunidades unan ADP y P_i produciendo entonces el ATP, volviendo las subunidades β a su configuración original. La función de $b_2\delta$ es evitar que las α y β se muevan cuando se produce la torsión de $\epsilon\gamma$ (Boyer, 2002).

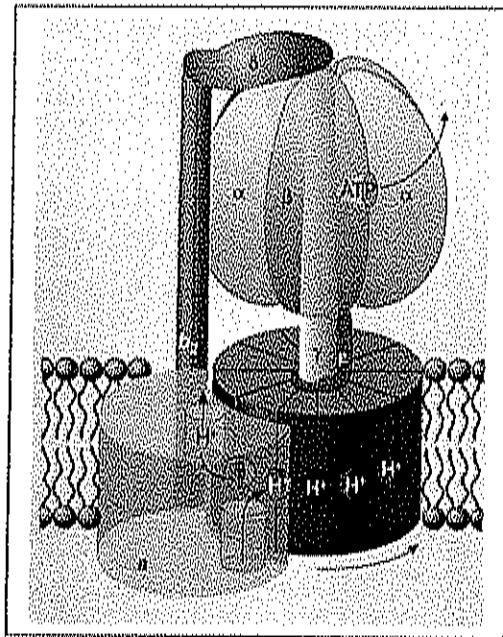


Figura 2. Subunidades que conforman a la ATP-sintasa bacteriana (tomado de Cross, 2004).

Subunidades codificadas en el genoma nuclear

El ensamblaje de la ATP-sintasa mitocondrial es un proceso muy complicado y requiere la transcripción y traducción del genoma nuclear, seguido por la importación y procesamiento de las proteínas en la mitocondria. Esta importación requiere de proteínas acarreadoras específicas en la membrana mitocondrial externa e interna, además de chaperoninas presentes en el citosol y en la matriz mitocondrial (Scheffler, 2001).

Las proteínas que serán importadas son desdobladas en el citoplasma con ayuda de chaperoninas (hsp70 citoplasmática). Además, proteínas de la matriz también son recibidas por la chaperonina hsp70 y después presentadas a un complejo mayor compuesto por las proteínas hsp60 y cpn10. Este último participa en el correcto plegamiento y ensamble de la estructura funcional de la proteína (Scheffler, 2001).

Por otro lado, existen complejos formados por varias subunidades que integran la membrana mitocondrial y forman canales para que las cadenas polipeptídicas sean translocadas a través de la membrana. Estos complejos son conocidos como TOM y TIM (translocasa de la membrana externa e interna mitocondrial, por sus siglas en inglés, respectivamente). Bauer *et al.*, (2000) señalan que en vertebrados existen dos complejos TIM distintos, el TIM23 para la importación de proteínas solubles hacia la matriz y el TIM22 para la importación e inserción de proteínas a la membrana con múltiples hélices transmembranales.

El ensamble de la ATP-sintasa requiere la síntesis de las proteínas que conforman la porción F_0 , las cuales son codificadas en el genoma mitocondrial (tres proteínas en levaduras o dos en mamíferos). En los camarones, *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* y *Fenneropenaeus chinensis*, se conocen dos proteínas, la ATP6 y la ATP8 codificadas por el genoma mitocondrial (Wilson *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2007). Estas proteínas de la porción F_0 , deben asociarse con las subunidades codificadas por el genoma nuclear, formando el holocomplejo. El ensamblaje de las porciones F_1 y F_0 de la enzima, requiere chaperonas específicas como la Atp10p, Atp11p y Alp12p, las cuales son descritas como factores de ensamblaje, así como la Oxa1p y Yta10-12p. Así, la síntesis, importación y ensamblaje de la ATP-sintasa requiere un gran número y variedad de proteínas codificadas por los genomas nuclear y mitocondrial (Puri *et al.*, 2005).

Es de suma importancia también mencionar la existencia de los factores de transcripción involucrados en la expresión de los genes nucleares. En general estos carecen de cajas TATA y CAAT, presentan sitios de iniciación de la transcripción heterogéneos, regiones regulatorias usualmente complejas y promotores específicos, incluso en los genes que codifican subunidades de los complejos enzimáticos de la fosforilación oxidativa. Por ejemplo, el promotor del gen de la subunidad α de la ATP-sintasa es regulado por el factor de transcripción YY1 y USF2, mientras que la actividad del promotor de la subunidad β de la ATP-sintasa, es dependiente de dos factores de regulación diferentes, NRF2/GABP y SP1 (Garesse y Vallejo, 2001).

El factor de transcripción SP1 (proteína específica 1, por sus siglas en inglés) pertenece a la familia conocida como dedos de zinc y es crítico para la expresión de gran cantidad de genes involucrados en funciones celulares constitutivas y tejido-específicas. Por otro lado, el factor nuclear respiratorio (NRF-1, por sus siglas en inglés) se une a un potenciador "corriente arriba", el cual es requerido para la máxima actividad del promotor. Se han propuesto dos mecanismos de regulación del NRF-1 y ambos se encuentran relacionados con la habilidad de este factor para unirse al DNA como homodímero (Garesse y Vallejo, 2001). La contribución del NRF-1 a la transcripción de los genes de la cadena respiratoria se extiende a otra clase de genes, entre ellos se encuentran constituyentes de la maquinaria transcripcional y de la replicación del DNA mitocondrial, enzimas mitocondriales y citosólicas de la vía biosintética del grupo hemo y componentes para la importación y ensamble de las proteínas. De tal manera que el NRF-1 juega un papel integrativo en las interacciones núcleo-mitocondria (Scarpulla, 2002).

El tercer factor de transcripción crítico de varios genes nucleares involucrados en la respiración, es la proteína de unión asociada al crecimiento GABP y el NRF2 factor nuclear respiratorio 2, el cual está compuesto de tres subunidades. Análisis por Northern y Western blot indicaron que la regulación de las subunidades de este factor se realiza a nivel transcripcional y post-transcripcional. La capacidad de unión de los factores de transcripción GABP y NRF2 al DNA es regulada por procesos redox *in vivo*, posiblemente por la reducción mediada por tioredoxina y la oxidación mediada por glutatión reductasa (GSSG, por sus siglas en inglés) de las cisteínas presentes en los dominios de unión al DNA y dimerización (Garesse y Vallejo, 2001).

Características de la ATP subunidad c

La subunidad c del sector F_0 se caracteriza por contener grupos funcionales que son esenciales para la translocación de protones a través de la membrana. La estructura proteica de esta subunidad, a través del estudio por resonancia magnética nuclear de un monómero en la bacteria *E. coli*, mostró estar plegado en dos hélices alfa unidas por una vuelta. El extremo carboxilo terminal de la forma hélice α es altamente conservada entre las proteínas homólogas (Girvin *et al.*, 1998). El número de copias

de la proteína c que forman el anillo parece variar entre especies, mientras que en *E. coli* se observaron 11 unidades, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* solo fueron observadas 10 proteínas (Girvin *et al.*, 1998).

En el humano, ratón y bovino, las proteínas precursoras de la subunidad c son codificada por los genes nucleares P1 y P2. Estas proteínas precursoras presentan diferentes secuencias amino terminal (péptido señal) que sirven para especificar el importe de la proteína hacia la mitocondria. Además, se han descubierto diferentes pseudogenes relacionados con P1 y P2 (Medd *et al.*, 1993).

En el caso de los invertebrados, existen estudios aislados y los primeros acercamientos al estudio de los genes nucleares codificantes de subunidades de la ATP-sintasa, fueron realizados en insectos como la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Caggese *et al.*, 1999). En los crustáceos no existen hasta la fecha reportes al respecto. Sin embargo, en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos en CIAD Unidad Hermosillo, se ha obtenido la secuencia nucleotídica completa (GenBank, EU194608) de 773 pb del gen ATPc de *Litopenaeus vannamei* en donde se localiza una región codificante de 345 pb con un codón de inicio ATG y uno de terminación TAA. Por otro lado, este gen presenta una región no codificante (UTR) en el extremo 5' de 67 pb y al extremo 3' de 355 pb sin incluir la cola poliA, estas características son muy comunes en los genes nucleares. Así, de la secuencia deducida de aminoácidos para ATPc se genera una proteína de 116 aminoácidos equivalentes a un peso de 11.9 kDa, en donde se localiza un péptido señal de 41 aa y los 75 aa restantes corresponden a la proteína madura (Figura 3). Dentro de esta secuencia se encuentran regiones ATTTA los cuales regulan la estabilidad del transcrito y una región TATA como sitio de poliadenilación.

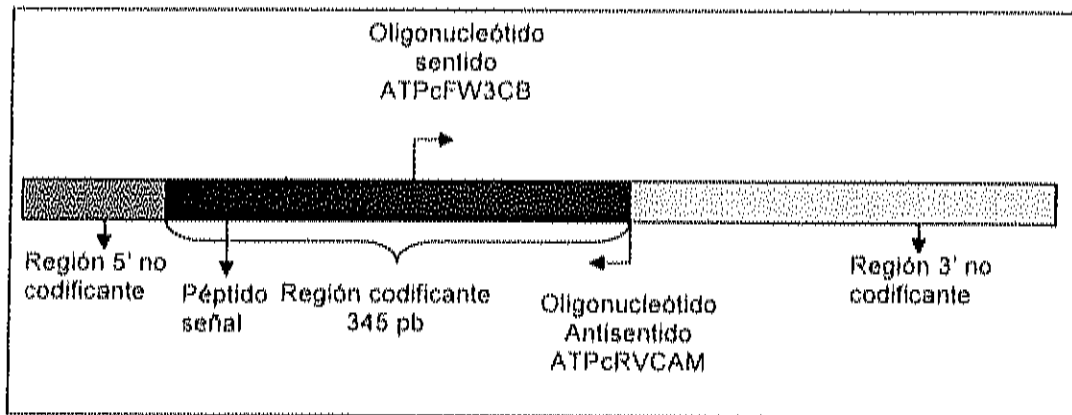


Figura 3. Características del transcrito de ATPc de la glándula digestiva de *L. vannamei*.

Subunidades codificadas en el genoma mitocondrial

En la mayoría de los animales, el genoma mitocondrial codifica 13 proteínas que en su mayoría son componentes de los complejos enzimáticos que participan en la fosforilación oxidativa. Incluye además, 22 secuencias codificantes de RNA de transferencia (tRNA) y 2 de RNA ribosomales (rRNA) requeridas para la síntesis de proteínas intramitocondriales (Temperley *et al.*, 2003).

La maquinaria transcripcional mitocondrial es relativamente mas simple que la nuclear; se encuentra constituida por una RNA polimerasa y por lo menos un factor de transcripción específico conocido como mtTFA, el cual es un polipéptido pequeño perteneciente a la familia HMG que unen DNA. Además del papel que juega en la transcripción, el mtTFA es esencial para el mantenimiento del DNA mitocondrial en levaduras y en mamíferos. Así, el mtTFA presenta un papel dual como factor específico y activador transcripcional, además en el empaquetamiento cromosomal (Garesse y Vallejo, 2001).

Por otro lado, el reconocimiento de un promotor específico depende, en *Xenopus laevis* de un segundo factor de transcripción, el mtTFB, mismo que comparte identidad con el factor sigma bacterial. En este sistema el mtTFA actúa solamente como un activador transcripcional débil.

Las subunidades de la ATP-sintasa que son codificadas por la mitocondria varían dependiendo de la Taxa. Por ejemplo, en bovinos se encuentra la ATP6 (subunidad a) y ATP8 (subunidad α), en levaduras ATP6, ATP8 y ATP9; en *E. coli* solo la subunidad a es codificada por la mitocondria (Mueller, 2000). En artrópodos como los crustáceos, específicamente las especies de camarones peneidos como el camarón café (*F. californiensis*), el camarón blanco (*L. vannamei*), el camarón azul (*L. stylirostris*) y en el camarón tigre gigante (*P. monodon*) se encuentran presentes dos subunidades de la ATP-sintasa en el mtDNA, la ATP6 y la ATP8 (Gutierrez-Millán *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2000).

Características de la ATP subunidad 6

Para establecer la estructura de la subunidad 6 de la ATP bovina se han utilizado la resonancia magnética nuclear. Esta subunidad fue descrita en 1960 y mostró ser requerida para restauración del intercambio de ATP-Pi y de la actividad ATPasa sensible a la oligomicina (Carbajo *et al.*, 2004). Es una proteína de 9 kDa, a diferencia de otras subunidades del tallo periférico, las cuales pueden formar un complejo binario estable con solo otra subunidad, la ATP6 requiere de dos subunidades (OSCP y b ó b y d) para formar un complejo estable. La función en el tallo periférico es desconocida, pero se ha sugerido que está relacionada con la regulación de la circulación sistémica (Carbajo *et al.*, 2004).

La ATP6 o cadena a, pertenece a la porción F_0 del complejo ATP-sintasa y como la subunidad ATP8 están codificadas en el genoma mitocondrial. Los genes de estas subunidades han sido estudiados ampliamente en humanos, debido a que, a diferencia de las subunidades codificadas en el núcleo, han mostrado una tasa de mutación considerablemente más elevada. Esto provoca disfunción mitocondrial y con esto, se ve afectado el funcionamiento de los complejos enzimáticos alojados en este organelo (Dubot *et al.*, 2004). En el gen de la subunidad 6 en células eucariotas se conocen mutaciones que provocan defectos específicos en el complejo enzimático y desórdenes en varios órganos del cuerpo (Temperley *et al.*, 2003; Dubot *et al.*, 2004).

Hasta el momento existe escasa información acerca del transcrito de ATP6 en crustáceos. El Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos en CIAD Unidad Hermosillo, se caracterizó la secuencia completa del gen que codifica para la subunidad ATP6 (GenBank, EU185331). Este gen tiene un tamaño de 689 pb, un codón de inicio ATG y uno de terminación ATT, y una región que codifica para 224 aminoácidos, con una masa calculada de 25.03 kDa.

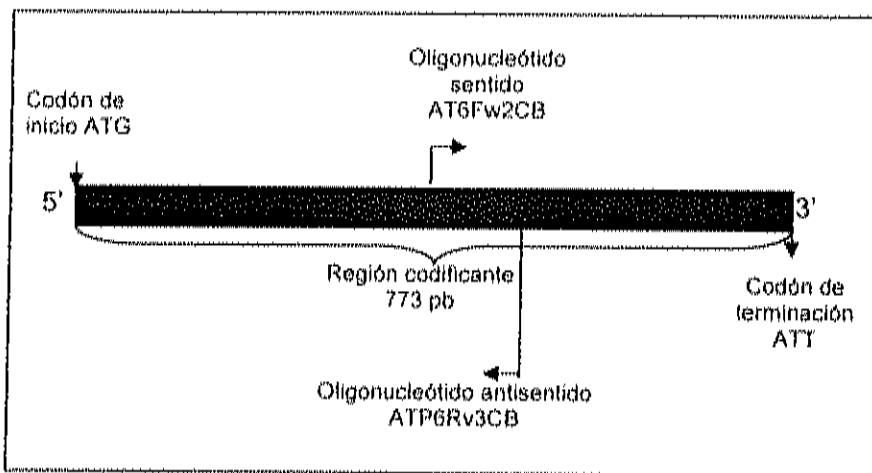


Figura 4. Características del transcrito de ATP6 de la glándula digestiva de *L. vannamei*

Características del mRNA mitocondrial y nuclear y la coordinación entre genomas

La estructura y organización del DNA mitocondrial (mtDNA) están muy conservados entre mamíferos, con el mtDNA humano como modelo. El mtDNA es una molécula de aproximadamente 16.6 kb, circular y formada por dos cadenas. Contiene 37 genes, de los cuales, se sintetizan 13 polipéptidos que conforman a cuatro complejos enzimáticos que participan en la fosforilación oxidativa. Siete de estos polipéptidos, ND1 a ND6 y ND4L son subunidades del complejo I, uno de ellos, citocromo b, es parte del complejo III, tres, COI, COII y COIII son las unidades catalíticas del complejo IV y ATPasa 6 y 8 son subunidades del complejo V. Estos genes son distribuidos asimétricamente en el mtDNA (Scheffler, 2001).

La cadena pesada (H) se encuentra la mayor cantidad de genes: los dos rRNA, 14 tRNA y los mRNA para 12 de los 13 péptidos. La cadena ligera (L) codifica para los 8 tRNA restantes y solo para un mRNA, correspondiente a la subunidad ND6. Estas subunidades proteicas codificadas por el DNA mitocondrial, son esenciales para el correcto ensamblaje o actividad correspondiente a cada complejo de la fosforilación oxidativa (Scheffler, 2001).

Los genomas mitocondriales de *Penaeus monodon*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila yakuba*, *Ceratitis capitata* y *Daphnia pulex* son idénticos y de un tamaño de 15,984 pb, contienen 37 genes, y codifican para 13 proteínas, 22 tRNA y 2 rRNA. Además se sabe que en estos genomas existen genes que se traslapan, como es el caso de *cox1* y *tmL*; *atp8* y *atp6*; *nad4L* y *nad4*; *nad2* y *tmW*; *nad6* y *cob* y entre *cob* y *tmS* (Wilson *et al.*, 2000).

Los mRNA mitocondriales tienen una cola extremadamente corta no traducida en el 5' (1-3 nucleótidos) y presentan una cola de poli (A) de 55 residuos inmediatamente después del codón de terminación. Carece de las típicas características de los mRNA nucleares como: regiones 5' y 3' no traducidas, intrones, señales 3' poliadeniladas o la estructura 5' cap (Fernández-Silva *et al.*, 2003).

La biogénesis y función de la mitocondria dependen de la coordinación de la expresión de los genomas mitocondriales y nucleares. Estudios recientes han empezado a elucidar los factores que regulan la replicación y transcripción del mtDNA, así como la expresión de los genes mitocondriales y nucleares en condiciones fisiológicas y patológicas. Los factores de transcripción que juegan un papel importante son el NRF1 y NRF2 y el mtTFA (Garnier *et al.*, 2003).

Sin embargo, existe una investigación realizada por Duborjal *et al.*, (2002) en donde al cuantificar la cantidad de mRNA de los genes de algunas subunidades que conforman el sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria en humanos, no encontraron coordinación entre el genoma mitocondrial y el nuclear, ya que al utilizar células sin mtDNA, la expresión de los genes nucleares no fue afectada. Ambos

estudios fueron realizados en tejidos o células de mamíferos, de tal manera que aun la interrogante persiste en crustáceos.

La regulación y coordinación de la expresión entre la mitocondria y el núcleo puede darse no solo a nivel transcripcional, sino también a nivel post-transcripcional. Como lo demostraron Giegé *et al.*, (2005) al privar células de la planta *Arabidopsis thaliana* de azúcar para después volver a adicionarla (realimentación) y medir la cantidad de transcrito para 40 genes mitocondriales y 79 nucleares por microarreglos, observaron que no existe coordinación a nivel transcripcional entre dichos genomas, pero sugiere una posible coordinación a nivel postranscripcional.

Respuesta mitocondrial frente a la disminución de oxígeno

En organismos aerobios es esencial la adecuada suplementación de oxígeno, ya que éste funciona como aceptor de electrones en la fosforilación oxidativa. Además, varios procesos enzimáticos requieren oxígeno molecular como sustrato (Wenger, 2000). Cuando hay suficiente oxígeno disponible para la fosforilación oxidativa, la F_1F_0 -ATP sintasa actúa como el sitio de producción de ATP en las células animales. Durante anoxia e isquemia, en células del corazón de ratas, la ATP-sintasa comienza a bombear protones desde la matriz, en un intento de mantener el potencial de la membrana mitocondrial. Así, la mitocondria cambia su función de ser un productor de ATP a ser un consumidor (Di Lisa *et al.*, 1998).

Las investigaciones de St-Pierre *et al.*, (2000), utilizando mitocondrias aisladas del músculo esquelético de ranas tolerantes a la anoxia, indicaron que el transporte de protones permanecía inalterado. Sin embargo, el gasto de ATP por la F_1F_0 -ATP sintasa fue limitado debido a una inhibición de la enzima. Esto conduce al mantenimiento de un bajo potencial de la membrana mitocondrial. De tal manera, que la mitocondria tiene una capacidad reducida de transportar sustratos comparado con sus contrapartes en condiciones de oxígeno normales (normóxicas), permitiendo la preservación del potencial de la membrana celular.

Sin embargo, el potencial de la membrana mitocondrial no puede ser anulado completamente durante la anoxia, ya que es crucial el importe de proteínas que permitan el mantenimiento de la mitocondria. Por otra parte, la interrupción del potencial podría conducir a una serie de eventos, que culminarían eventualmente en la muerte celular por apoptosis (Kroemer *et al.*, 1998).

Es importante resaltar que el cambio en la función de la ATP-sintasa ocurre solamente durante anoxia o isquemia, puesto que incluso las cantidades traza de oxígeno pueden hacer una contribución para la producción aerobia del ATP. De hecho, algunos estudios en embriones de *Artemia franciscana* muestran que la fosforilación oxidativa es más eficiente a bajas presiones de O₂ (0-1.1 kPa) que durante la saturación de aire, como resultado del escape presionado del protón y la respiración desacoplada (Gnaiger *et al.*, 2000).

Por otro lado, debido a la amplia diversidad de ambientes en que se desarrollan los artrópodos, incluyendo el ambiente marino, como es el caso de los crustáceos, se enfrentan a condiciones de estrés como altas concentraciones de sales, exposiciones a compuestos tóxicos y cambios en la concentración de oxígeno en el ambiente. De tal manera que su maquinaria energética debe sufrir algunos cambios para lograr la homeostasis celular, estos cambios se observan en los niveles de glucosa, lactato, excreción nitrogenada y consumo de oxígeno, como principales parámetros. Así, se ha observado que descensos en la concentración de oxígeno disuelto en el agua, pueden tener un efecto en el sistema inmune de camarón, lo cual puede disminuir la resistencia a enfermedades. En *Litopenaeus stylirostris* se ha observado que el efecto de la hipoxia puede alterar el ciclo de muda y el crecimiento (Mugnier y Soyez, 2005). Es importante mencionar que los escasos estudios reportados hasta el momento en crustáceos se encuentran enfocados a las respuestas fisiológicas a hipoxia y no existen reportes referentes a la expresión de genes mitocondriales y nucleares bajo dicho estímulo.

JUSTIFICACIÓN

El complejo ATP-sintasa es una enzima cuya participación en la fosforilación oxidativa es de gran importancia, sintetizando ATP a partir de ADP y Pi, y generando la mayor cantidad de ATP para que las células de los organismos realicen todas sus funciones. Aunque la estructura general del complejo enzimático ha sido ampliamente estudiada en algunas especies de vertebrados y microorganismos, se sabe que características específicas de las subunidades dependen de la especie. En el caso de los camarones peneidos, el estudio de la ATP-sintasa es nulo y aspectos relevantes como la fluctuación en la cantidad de mRNA de los genes mitocondriales y nucleares que codifican a las distintas subunidades proteicas, sometidos a hipoxia es desconocido, haciendo de esta enzima un objeto de investigación cuyo entendimiento resulta ser de gran importancia para el estudio de la fisiología de invertebrados marinos.

HIPÓTESIS

La hipoxia causa un efecto en el nivel de la expresión de los genes de la ATP-sintasa del camarón blanco (*L. vannamei*), observándose un cambio "coordinado" en la cantidad de mRNA de la subunidades ATP6 mitocondrial y ATPc nuclear.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la expresión de los genes que codifican las subunidades ATP6 mitocondrial y ATPc nuclear, de la enzima ATP-sintasa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones hipóxicas.

Objetivos específicos

- 1) Determinar el efecto de la hipoxia en las concentraciones de glucosa y lactato del plasma de camarón blanco.
- 2) Calcular la tasa respiratoria y de excreción nitrogenada para confirmar el estrés en los organismos por efecto de la hipoxia.
- 3) Evaluar la cantidad de los mRNA de ATP6 y ATPc en la glándula digestiva y el músculo de camarones sometidos a hipoxia por PCR en tiempo real.

METODOLOGÍA

Los bioensayos se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., situado en la ciudad de La Paz, B.C.S. Un total de 300 camarones juveniles de la especie *L. vannamei*, con un peso entre 28 y 31 g, se aclimataron a condiciones de laboratorio, en dos tanques de 1200 L de capacidad durante un periodo de 8 días. Las condiciones controladas fueron: salinidad (35 ppm), temperatura (28 °C) y oxígeno disuelto (OD) en agua a una concentración de 6 mg/L (normoxia) por medio de aireadores. Los camarones fueron alimentados a saciedad con alimento pelletizado (PIASA, México), con un contenido de proteína del 35%, dos veces por día. Los restos de alimento y las heces fueron retirados diariamente por sifoneo. Se realizaron cambios del 85% del volumen de agua marina diariamente.

Bioensayo

Durante el bioensayo se utilizaron un total de 270 camarones de la especie *L. vannamei*, con un peso promedio de 31 ± 1 g, los cuales fueron previamente seleccionados en intermuda por el método de setogénesis (Chan *et al.*, 1988). Los camarones fueron distribuidos al azar en 9 tanques con 300 L de agua marina cada uno a una salinidad de 35 ppm, una temperatura de 28 °C y una concentración de 6 mg/L de OD. En cada tanque se colocaron 30 camarones los cuales se mantuvieron bajo las condiciones antes mencionadas.

Los camarones se aclimataron por un periodo de 8 días a las condiciones de laboratorio antes establecidas y posteriormente fueron ayunados 24 h antes de iniciar el bioensayo, con el objetivo de asegurar que todos estuvieran bajo las mismas condiciones energéticas. Tres tanques fueron utilizados como control, los cuales permanecieron aireados y en una concentración constante de 6 mg/L de OD. En los seis tanques experimentales restantes los aireadores fueron retirados y la concentración de OD fue monitoreada hasta que disminuyó a 1.5 mg/L. En cada una de las concentraciones preestablecidas de OD en el agua (6, 4, 2 y 1.5 mg/L) se

tomaron 2 camarones por tanque, tanto de los controles como en los sometidos a hipoxia. Posteriormente, se colocaron de nuevo los aireadores y cuando el agua alcanzó una concentración de OD de 7 mg/L se tomó la muestra final, obteniendo un total de 90 muestras individuales. A lo largo del experimento y en cada concentración de OD evaluada se tomó una muestra de 1.5 mL de agua de cada uno de los tanques con el fin de cuantificar las concentraciones de amonio.

Cada organismo se pesó y se extrajo un volumen de hemolinfa a partir de la base del quinto pereiópodo, utilizando una jeringa de 1 mL conteniendo dos volúmenes de solución anticoagulante (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Na₂-EDTA 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3) (Vargas-Albores *et al.*, 1993). A partir de cada muestra de hemolinfa se separaron los hemocitos centrifugando a 800 xg por 10 min a una temperatura de 4 °C y se recuperó el plasma para el posterior análisis de las concentraciones de glucosa y lactato (Hernández-López, 2001). Después de sacrificar cada camarón, tanto la glándula digestiva (GD), como el músculo (M) fueron disectados y pesados. La GD se conservó en 250 µL de TRIzol[®] (GIBCO, Life Technologies USA), mientras que el músculo se congeló con nitrógeno líquido. Todas las muestras fueron almacenadas a -80 °C y transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos en CIAD, Hermosillo.

Cuantificación de metabolitos en plasma

Se realizó la cuantificación de glucosa y lactato en el plasma obtenido de cada uno de los organismos experimentales, para ello se emplearon los kits GOD/PAP (incluye: buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.0, fenol 11 mmol/L, 4-aminofenazona 0.77 mmol/L, glucosa oxidasa ≥ 1.5 kU/, peroxidasa ≥ 1.5 kU/L) y L-LACTATE (PAP) (buffer Pipes 50 mmol/L a pH 7.5, p-clorofenol 6 mmol/L, lactato oxidasa 0.2 kU/L, peroxidasa 3 kU/L y p-aminoantipirina 0.4 mmol/L) (Randox, USA) respectivamente, ajustando las instrucciones del fabricante para su evaluación en microplaca. Brevemente, se colocaron 10 µL de plasma y 200 µL del reactivo del kit en cada

pozo. Cada muestra fue evaluada por triplicado en un lector de placa Synergy (Bio-Tek instruments, USA) a una longitud de onda de 500 nm para glucosa y 550 nm para lactato.

Medición de la concentración de amonio en agua

La concentración de amonio en el agua fue cuantificada a partir de las muestras tomadas a lo largo del bioensayo. Se utilizó la técnica de azul de indofenol (Horn y Squire, 1966) ajustado a microplaca, colocando 150 μ L de muestra y 700 μ L de reactivo (NaCl 4 M, NaOH 6.5 M, NaClO 0.38 N, 1% p/v $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, reactivo de fenol [125 g fenol + 36 mL de acetona aforado a 200 mL con etanol]) por muestra evaluada por triplicado. Se leyó a una longitud de onda de 655 nm.

Evaluación de la tasa respiratoria

Se calculó la tasa respiratoria de los camarones en los diferentes tiempos muestreados, para ello se dividió la cantidad de oxígeno disuelto presente en el agua de cada tanque (mg), entre el peso húmedo de los camarones (g) y el tiempo transcurrido entre cada muestreo (h), siendo las unidades resultantes (mg/g*h).

Aislamiento, cuantificación e integridad del RNA total

Para realizar la extracción de RNA total de la glándula digestiva y músculo de los organismos experimentales, se empleó el reactivo TRIzol[®] (GIBCO, Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 400 y 130 mg de tejido, respectivamente. El pellet de RNA total obtenido de cada muestra, fue suspendido en 50 μ L de agua DEPC al 0.01% y fue cuantificado por triplicado, a una longitud de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 v 3.2, USA. La integridad del RNA total se evaluó por electroforesis en gel de

agarosa-formaldehído al 1% en condiciones desnaturalizantes y libre de RNasas (Fourney *et al.*, 1988).

Eliminación de DNA genómico y síntesis de DNA complementario

Con el fin de eliminar la posible contaminación con DNA genómico (gDNA), se trataron 8 μg de RNA total de cada muestra con DNasa I (1 U/ μg de RNA) (Sigma,USA) incubando a una temperatura de 37 °C por 20 min y se inactivó la enzima adicionando 1 μL de EDTA 50 mM y elevando la temperatura a 70 °C por 10 min.

Posteriormente, se tomaron 7 μg de RNA total libre de gDNA para sintetizar DNA complementario (cDNA) de cada muestra por transcripción reversa, utilizando el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies, USA). Durante el proceso se emplearon 2 μL de hexámeros al azar y se siguieron las indicaciones del fabricante.

Amplificación del gen mitocondrial ATP6 y nuclear ATPc por PCR

Se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación por PCR de los fragmentos de los genes (95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min (ATP6 y L8) ó 63 °C por 1 min (ATPc), 72 °C por 1 min, y una extensión final de 72° C por 10 min). Durante el proceso de amplificación se utilizaron como templado 700 y 150 ng de cDNA equivalentes de RNA total de la glándula digestiva y músculo, respectivamente. Además de los genes ATP6 y ATPc, se amplificó el gen de la proteína ribosomal L8 con el fin de utilizarla como gen constitutivo (GenBank, DQ316258). Los oligonucleótidos específicos usados para la amplificación de los tres genes, fueron previamente diseñados y sus productos secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos de CIAD, A.C. (Tabla 1).

El tamaño de las bandas resultantes de la amplificación por PCR de los genes ATP6, ATPc y L8, fue verificado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe® (Molecular Probes, USA). Cada gel se corrió a 60 volts y las bandas fueron detectadas en un fotodocumentador de luz UV Gel Logic 200 Imaging System, empleando el programa Molecular Imaging System V 4.0.2 (Kodak, USA).

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos específicos diseñados para cada gen estudiado.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia nucleotídica	Longitud (bases)	T _m	%GC	Tamaño amplicón
ATP6	ATP6Fw2CB	5'-GCTCATCTTGTTCCGCAAGG-3'	20	66.9	55.00	110 pb
	ATP6Rv3CB	5'-CTGCTAATCGCACTGCTAAGG-3'	21	63.7	54.55	
ATPc	ATPcFw3CB	5'-AATTGGATCCGTCTTTGGTTCC-3'	22	66.8	45.45	113 pb
	ATPcRevCAM	5'-TTAGAAAAGCGAAAAGCAACAGG-3'	22	64.2	40.91	
L8	L8Fw3	5'-ACTTCCGTGACCCTTATC-3'	18	56.3	50.00	186 pb
	L8Rv3	5'-GTCACCAGTCTTCTCCTC-3'	18	54.1	55.56	

Cuantificación del mRNA por PCR en tiempo real

La cuantificación del mRNA de los genes ATP6, ATPc y L8 por RT-PCR en tiempo real fue realizada en un equipo IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) basado en la detección y cuantificación del fluoróforo SYBR-Green intercalado en las dobles cadenas de los productos de PCR. Las condiciones de amplificación establecidas para cada gen fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 35 s (ATP6 y L8) ó 63 °C por 35 s (ATPc), 68 °C por 55 s, y un programa final de evaluación de la curva de disociación que incluye la detección de la fluorescencia, desde una temperatura de 95 hasta 60 °C, disminuyendo 0.3 °C cada 20 s.

La curva estándar de cada gen se construyó realizando diluciones seriadas 1:10 a partir de un producto de PCR purificado, utilizando una columna GFX (General Electric, USA). La curva estándar del gen ATP6 se construyó a partir de una concentración inicial de 2.5 ng/μL, mientras que en el caso del gen de ATPc y L8 se

partió de una concentración inicial de 1.5 ng/μL. Las diluciones se prepararon con agua estéril en tubos siliconizados.

Cada reacción de PCR en tiempo real incluyó 12.5 μL de una mezcla de Bio-Rad 2x (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM a pH 8.4, mezcla de dNTP 1.6 mM, iTaq DNA polimerasa 50 U/mL, MgCl₂ 6 mM, SYBR- Green I, fluoresceína 20 nM, estabilizadores y agua estéril), 1 μL de cada oligonucleótido, y como templado 700 ó 150 ng de cDNA equivalentes de RNA total de glándula digestiva y músculo, respectivamente. El volumen final de todas las reacciones de PCR fue de 25 μL y cada muestra fue amplificada por triplicado. En las reacciones de PCR utilizadas para construir la curva estándar se adicionó como templado 1 μL de cada una de las diluciones. Así mismo en cada corrida de PCR en tiempo real se incluyeron controles negativos sin templado y sin oligonucleótidos.

Con base en el valor de la pendiente de cada una de las curvas construidas se determinó el porcentaje de la eficiencia de la reacción de PCR, basándose en la fórmula $E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$ (Bacca *et al.*, 2005). Así, para el análisis de la expresión génica se utilizaron dos métodos 1) La cuantificación absoluta normalizada, que parte del hecho de que las eficiencias tanto del gen problema como del gen constitutivo son iguales, consiste en dividir la cantidad calculada del mRNA del gen problema (ATP6 o ATPc) entre la cantidad del mRNA del gen constitutivo (L8) (ng) para cada uno de los tejidos evaluados, y 2) el cociente de expresión relativa (R) de ATP6 o ATPc, el cual se calcula con base en el valor del C_t (número de ciclos en donde se supera la fluorescencia base) del gen problema respecto al valor del C_t del gen de referencia (L8) aplicando la siguiente fórmula: $R = 2^{-(C_t \text{ gen problema} - C_t \text{ gen de referencia})}$ (Bacca *et al.*, 2005).

Análisis estadístico

Para determinar la homogeneidad de la muestra respecto al peso total de los camarones, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey (HSD) fue utilizada para discriminar entre las

medias. Para analizar los resultados de las cuantificaciones de glucosa y lactato en el plasma y de la expresión génica, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas, puesto que los datos no mostraron distribución normal ni homogeneidad de varianzas. Para evaluar las diferencias entre las medianas de los grupos experimentales se utilizó el análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney para discriminar entre pares de medianas utilizando el programa Statistica 6.0, considerando un intervalo de confianza del 95% ($p=0.05$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de noventa camarones con un peso de 30.58 ± 4.31 g en promedio, no presentaron diferencias significativas entre los grupos evaluados ($p>0.05$), indicando con ello que se partió de una muestra homogénea (Tabla 2).

Tabla 2. Peso (g) de los organismos experimentales

Oxígeno disuelto (mg/L)	Media \pm D.E
6	30.16 ± 4.84^a
4	29.41 ± 5.29^a
2	31.60 ± 3.63^a
1.5	31.26 ± 3.70^a
7	30.47 ± 4.09^d

Valores con la misma literal no son significativamente diferentes

El índice hepatosomático de cada organismo se determinó, dividiendo el peso de la glándula digestiva entre el peso total del camarón. Este índice puede reflejar el efecto de algún estrés agudo en el peso de la glándula digestiva, según lo reportado por Sánchez-Paz *et al.*, (2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio no mostraron diferencias significativas entre los grupos sometidos a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en el agua ($p>0.05$), indicando con ello que el estrés causado por el efecto de la hipoxia, no afectó de manera significativa el peso corporal ni el de la GD de los organismos experimentales. En la Figura 5 se muestran sobre las barras, los valores calculados del índice hepatosomático de cada grupo

experimental. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sánchez-Paz *et al.*, (2003), quienes evaluaron el efecto del ayuno en camarones de la especie *L. vannamei* no encontrando diferencias significativas en el índice hepatosómico y en el peso total de los organismos a las 24 h de ayuno. Sin embargo, si encontraron diferencias significativas a las 72 h, lo cual pudiera sugerir que el tiempo que se sometieron los camarones a condiciones de hipoxia no fue el suficiente como para observar efectos sobre el índice hepatosómico o que la hipoxia no afecta de manera directa a la glándula digestiva como lo hace el ayuno.

Por otro lado, durante este estudio se observaron cambios en el comportamiento de los camarones, pues conforme disminuyó la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, estos presentaban nado errático y paulatinamente entraban a un estado de letargo, caracterizado por inactividad. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Zhang *et al.*, (2006), quienes encontraron que este comportamiento es una estrategia de supervivencia asociado a las respuestas fisiológicas adaptativas como la supresión de la demanda de ATP, modificaciones en el balance ácido-base de la hemolinfa y en la capacidad de la hemocianina para unir oxígeno, entre otras, que presenta el camarón frente al efecto de la hipoxia.

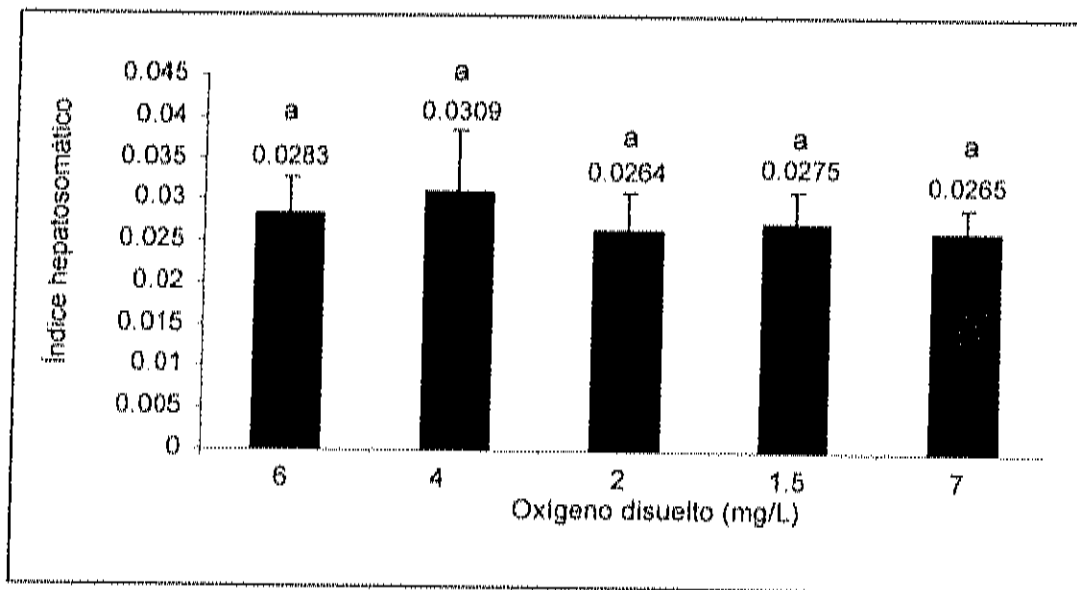


Figura 5. Índice hepatosómico de los camarones sometidos a hipoxia (n=90). Valores con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Cuantificación de metabolitos en plasma

Lactato

En la Figura 6A se muestra la concentración de lactato (mg/mL) en el plasma de los organismos control y los sometidos a hipoxia. Los organismos controles no presentaron diferencias significativas en los diferentes tiempos de muestreo ($p>0.05$), indicando con ello que la variación de la concentración de este metabolito observada en los organismos tratados, se debe al efecto causado por la hipoxia. De acuerdo a la observaciones de Rosas *et al.*, (2004), la concentración de lactato en el plasma del camarón *Litopenaeus setiferus* puede variar de 0.01 a 0.8 mg/mL, por lo tanto los valores obtenidos en este estudio se encuentran dentro de los límites reportados.

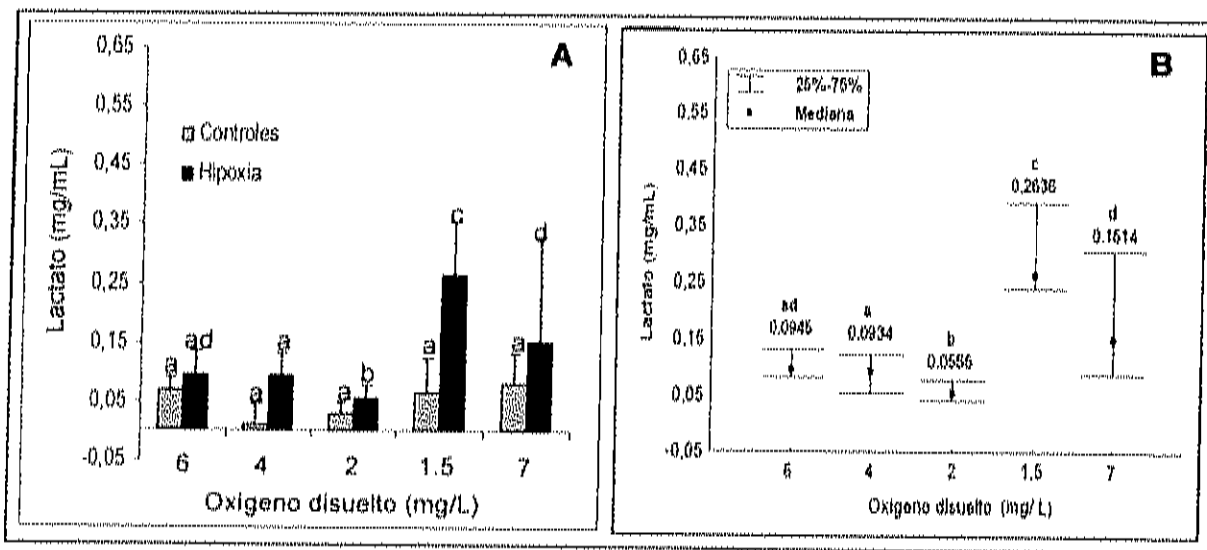


Figura 6. Concentración de lactato en plasma de camarón. A) Camarones control y sometidos a hipoxia (n=90). B) Camarones sometidos a hipoxia (n=60). Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p<0.05$).

En la Figura 6B, se muestran las concentraciones de lactato en el plasma de los organismos en hipoxia, las cuales mostraron diferencias significativas ($p<0.05$), detectándose el valor más alto en la concentración de OD de 1.5 mg/L, mismo que mostró ser 78% mayor con respecto a la concentración de este metabolito cuando los organismos fueron expuestos a 2 mg/L de OD, el cual fue el valor más bajo registrado. Este incremento observado en los organismos sometidos a la menor concentración de oxígeno disuelto en agua, puede deberse a que los camarones

entraron a una fase alterna de metabolismo anaerobio. Según lo observado por Zou *et al.*, (1996), en el cangrejo *Eriocheir sinensis*, esta condición se caracteriza por un aumento en la concentración de lactato debido a que el NADH producido en la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato, se utiliza para reducir el piruvato a lactato mediante la enzima lactato deshidrogenasa.

De acuerdo a lo observado en la Figura 6B, cuando se oxigenó nuevamente el sistema y la concentración de oxígeno en el agua alcanzó los 7 mg/L, se detectó un decremento del 42% en la concentración de lactato, indicando con ello un nuevo cambio de los organismos hacia el metabolismo aerobio. Lo anterior concuerda con lo reportado por Abe *et al.*, (2007) quienes sometieron al camarón de la especie *Marsupenaeus japonicus* a condiciones de hipoxia y observaron un importante decremento en los niveles de lactato que se restablecieron después de oxigenar de nuevo el sistema.

Glucosa

La concentración de glucosa en plasma varió de manera similar a lo detectado en las concentraciones de lactato. No se observaron diferencias significativas entre los organismos control, como lo ilustra la Figura 7A ($p>0.05$). Los valores más altos de glucosa se detectaron en el plasma de los camarones sometidos a 1.5 mg/L de OD, obteniendo una concentración 8 veces mayor a la observada a 2 mg/L de OD (Figura 7B). Este comportamiento coincide con los resultados de un estudio realizado por Zou *et al.*, (1996) en el cangrejo *Eriocheir sinensis* bajo condiciones de hipoxia severa, quienes sugieren que el aumento en la concentración de glucosa en plasma bajo el efecto de hipoxia severa, se debe a que el metabolismo del cangrejo se está preparando para llevar a cabo un cambio hacia la ruta del metabolismo anaerobio.

Por otro lado, los resultados de la cuantificación de amonio en agua se muestran en la Figura 8. La concentración más elevada ocurrió en los tanques que se encontraban a 1.5 mg/L de oxígeno disuelto, mientras que la más baja se detectó a 6 mg/L. Weihrauch *et al.*, (2004) señalan que en los crustáceos la principal fuente de amonio se origina del catabolismo de aminoácidos.

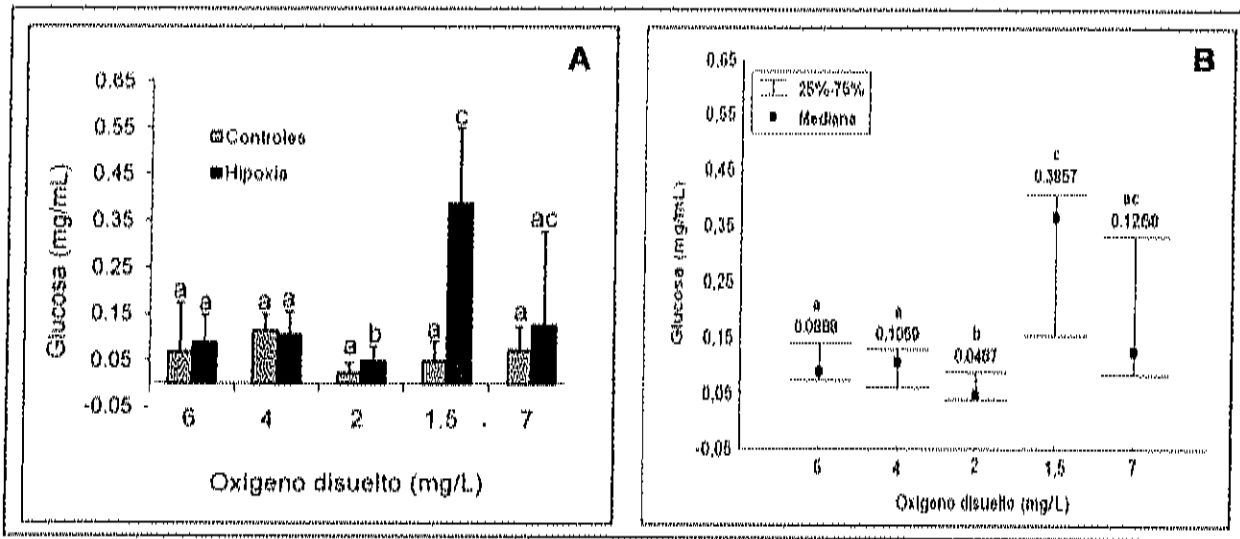


Figura 7. Concentración de glucosa en plasma de camarón. A) Camarones controles y sometidos a hipoxia (n=90). B) Camarones sometidos a hipoxia (n=60). Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El amonio presente dentro del sistema es producto de la deaminación enzimática de glutamina, glutamato, serina y asparagina. Es importante mencionar que también se genera amonio por la degradación de las bases nitrogenadas que conforman a los ácidos nucleicos, sin embargo, lo anterior contribuye solo con una pequeña cantidad. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la concentración de amonio en agua entre los tanques a 6 mg/L de OD y los que se encontraban en hipoxia. Lo anterior puede explicarse debido a que el sistema en el que se mantuvieron los organismos experimentales dentro del laboratorio es cerrado, lo que implica la ausencia de un recambio constante de agua, por lo tanto es de esperarse un incremento en la concentración de amonio en agua como consecuencia de su acumulación a través del tiempo del bioensayo.

Posteriormente, se calculó el consumo de oxígeno de los camarones en los diferentes tratamientos. Se observó un decremento en la tasa respiratoria de los organismos, conforme los niveles de oxígeno disuelto en el agua fueron disminuyendo (Figura 9). Estos valores concuerdan con lo señalado por Harper y Reiber (2006) en el *Triops longicaudatus* y es atribuido a un mecanismo de supervivencia, en donde el organismo disminuye el consumo de oxígeno e inicia un

estado de letargo, caracterizado por inactividad, observado también por Zhang *et al.*, (2006) en *L. vannamei*.

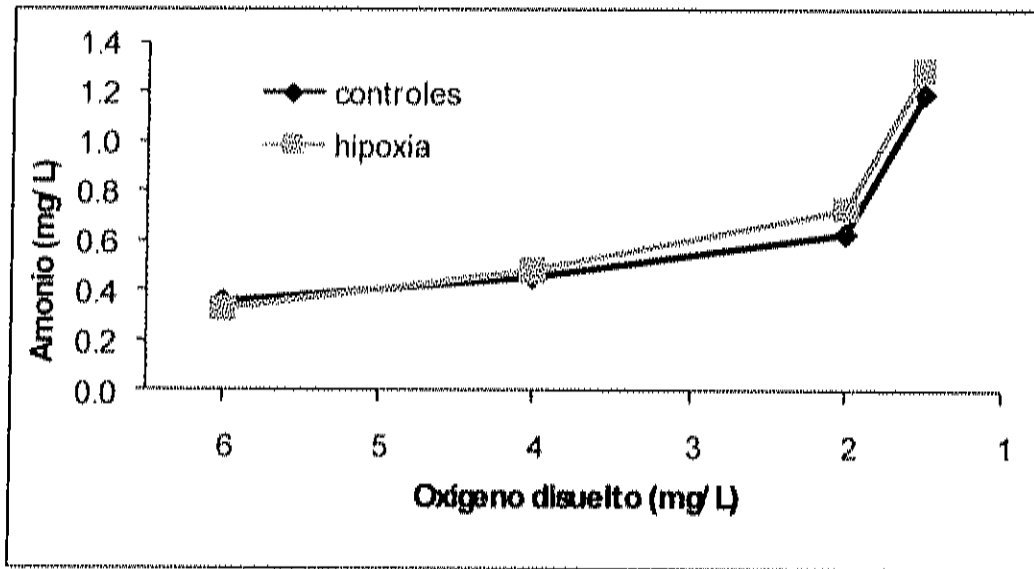


Figura 8. Concentración de amonio en el agua. (Valores expresados en medias)

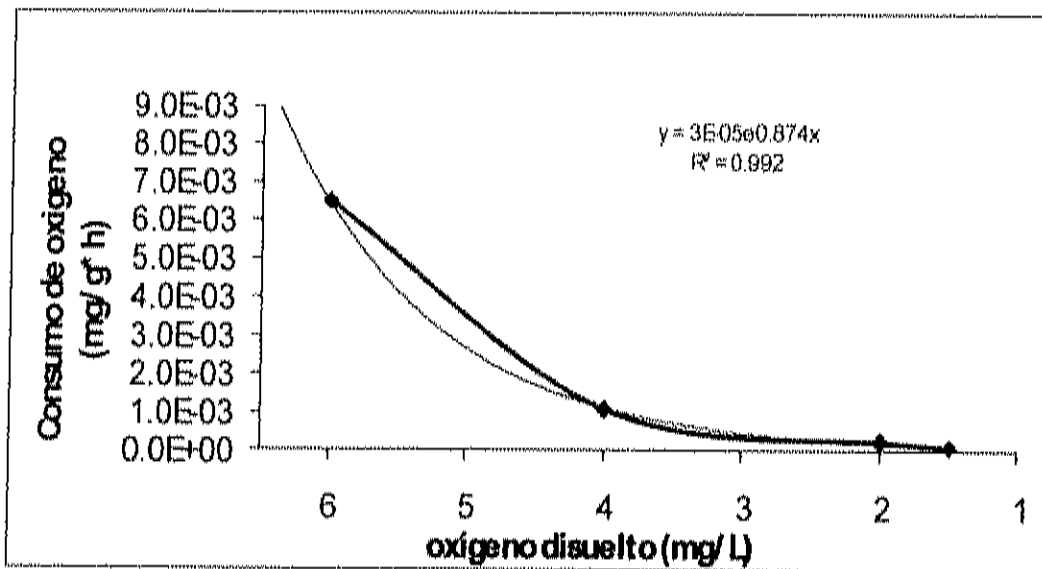


Figura 9. Consumo de oxígeno de los camarones sometidos a diferentes concentraciones de OD en agua. (Valores expresados en medias).

Aislamiento y evaluación de la integridad del RNA total

Se realizaron las extracciones de RNA total de 45 muestras de la glándula digestiva y 45 muestras de músculo de los organismos experimentales. Una vez cuantificadas, se analizaron por electroforesis en gel desnaturante de agarosa-formaldehído en donde se observó un patrón de bandeo similar en todas las muestras de RNA de la glándula digestiva (Figura 10A) y las del músculo (Figura 10B). En ambos tejidos la mayoría de las bandas se encuentran entre 7.46 y 4.4 Kb correspondientes a los RNA ribosomales, según lo indica el marcador empleado. La presencia de las bandas observadas corrobora la integridad de RNA total extraído.

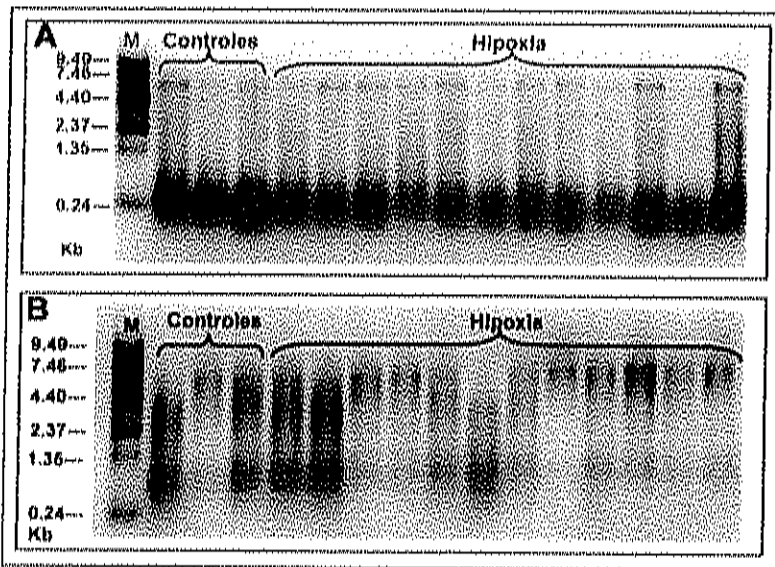


Figura 10. Integridad del RNA total extraído A) de la glándula digestiva y B) de músculo de *L. vannamei*.

Detección de gDNA en las muestras de RNA total y síntesis de cDNA

Una vez confirmada la integridad del RNA total, se realizó la amplificación por PCR de los fragmentos de interés con la finalidad de detectar la presencia de gDNA contaminante, usando como templado el RNA total de cada una de las muestras evaluadas, y como control positivo, cDNA ya probado para la amplificación de ATP6. En la Figura 11A se muestra la fotografía de un gel de agarosa al 2% en donde se

observan productos de PCR de 110 pb, mismos que corresponden a la banda del control positivo, indicando con ello la presencia de gDNA contaminante.

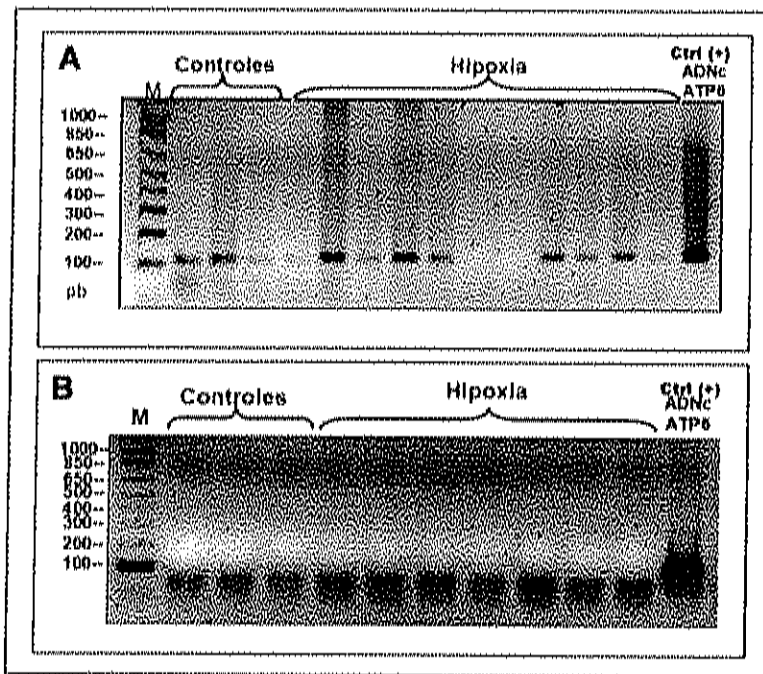


Figura 11. Amplificación de un fragmento de 110 pb del gen ATP6 usando como templado A) RNA total, amplificando positivas las muestras contaminadas con gDNA B) RNA total, muestras tratadas con DNasa I, libres de contaminación.

Después de tratar con DNasa I cada una de las muestras de RNA total, se amplificó por PCR convencional un fragmento del gen ATP6 y al no obtenerse productos amplificados, se asumió la no contaminación de las muestras (Figura 11B). Posteriormente se realizó la síntesis de cDNA de todas las muestras, para después evaluar la cantidad de transcrito de los genes de interés por RT-PCR en tiempo real.

Cuantificación del mRNA por PCR en tiempo real en la glándula digestiva y músculo

Se realizó la cuantificación absoluta del mRNA de ATP6, ATPc y L8 en las muestras de la glándula digestiva y músculo para lo cual se construyeron las curvas estándar de cada uno de los genes, cuyas características se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de las curvas estándar de ATP6, ATPc y L8, y ajuste al modelo lineal $y = ax+b$

Tejido	Gen	Eficiencia (%)	R ²	Pendiente (a)	Intercepto-y (b)	Temperatura de disociación °C
Músculo	ATP6	102.8	0.998	-3.257	2.272	79.2
	ATPc	100.1	1.000	-3.319	4.335	83.4
	L8	102.3	0.996	-3.268	4.108	83.7
Glándula digestiva	ATP6	113.5	0.977	-3.040	8.314	79.2
	ATPc	104.8	0.998	-3.211	7.491	83.4
	L8	102.5	0.989	-3.263	3.711	83.7

La Figura 12 muestra la amplificación de un solo producto durante la reacción de PCR, indicando la especificidad de la misma y asegurando que se cuantifique únicamente la fluorescencia emitida por la formación del producto específico de cada gen.

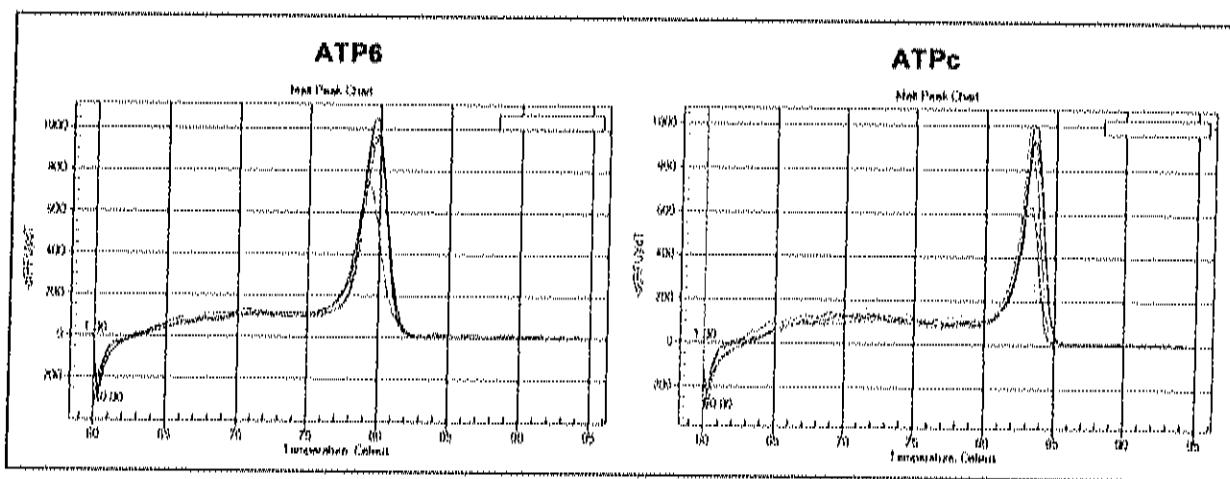


Figura 12. Curva de disociación de los productos de PCR de ATP6 y ATPc.

Glándula digestiva

En la Figura 13 se observa la cantidad normalizada del mRNA de los genes ATP6 y ATPc, con respecto al mRNA del gen L8 encontrados en la glándula digestiva. En esta figura se observan diferencias en la cantidad del mRNA de ATP6 tanto entre los organismos control, como entre los camarones sometidos a una concentración de 4 y 2 mg/L de OD ($p < 0.05$). Los cambios detectados en el grupo control pueden estar

relacionados con el efecto que pudo provocar la manipulación y el ayuno de los camarones durante el bioensayo. Estas diferencias observadas en los grupos control experimentales han sido previamente reportadas por diversos autores en *L. vannamei* y otras especies de crustáceos, sugiriendo la existencia de una alta variabilidad entre los organismos, así como diferentes grados de susceptibilidad al estrés provocado por la manipulación y la confinación de los mismos (Mercier *et al.*, 2006; Sánchez-Paz *et al.*, 2007).

En los camarones sometidos a hipoxia, se observó un incremento en la cantidad de mRNA de ATP6 cuyo valor máximo se alcanzó en 1.5 mg/L OD, encontrándose una diferencia de 99.33% entre las concentraciones de 6 y 1.5 mg/L ($p < 0.05$). Estos resultados concuerdan con los resultados de Rissanen *et al.*, (2006), quienes al someter hepatocitos de trucha a hipoxia encontraron que la cantidad del mRNA de ATP6 incrementó en condiciones de hipoxia severa (1 KPa, equivalente a 0.3 mg/L OD), sugiriendo la reorganización de la energía en adaptación a la baja cantidad de oxígeno.

Al evaluar la cantidad del mRNA de ATPc nuevamente se encontraron diferencias significativas entre los organismos control, cuando se tomaron las muestras de los organismos en 2 y 1.5 mg/L de OD (Figura 13). Respecto a los camarones sometidos a hipoxia, se observaron diferencias hasta de un 99.56% entre los grupos sometidos a las concentraciones de 1.5 y 7 mg/L ($p < 0.05$) de OD, en respuesta al efecto de la hipoxia. En un estudio realizado por Vijayasarathy *et al.*, (2003) en células de mamíferos (macrófagos, miocitos y adrenales) expuestas a hipoxia, evaluaron la cantidad de mRNA de los genes de las subunidades nucleares (IV, Vb y VIIa), y mitocondriales (I y II) de la citocromo c oxidasa, detectando una reducción en la cantidad de mRNA de dichos genes, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo de regulación coordinado en la expresión de los genes mitocondriales y nucleares. Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, en donde se registraron cambios en las cantidades de mRNA en las mismas concentraciones de oxígeno disuelto en agua, tanto en las subunidades

mitocondriales como en las subunidades nucleares. Lo anterior sugiere la posible existencia de un mecanismo de coordinación en la expresión génica de estas subunidades en la glándula digestiva, reflejando la necesidad de este órgano de suplir la demanda energética bajo hipoxia y así mantener la homeostasis celular (Muhlia-Almazán *et al.*, 2003).

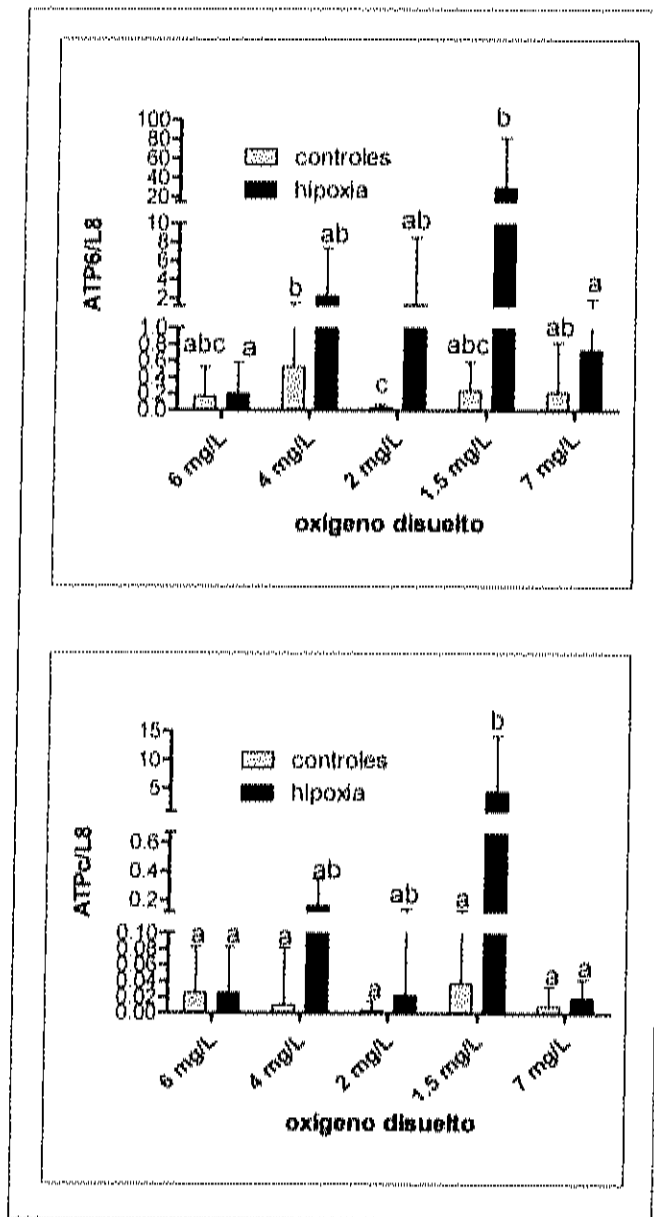


Figura 13. Cuantificación absoluta normalizada de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en 700 ng de RNA total de la glándula digestiva del camarón blanco. Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Es importante resaltar el efecto de la reoxigenación (7 mg/L de OD) en el sistema, puesto que se observó que la cantidad de mRNA tanto de ATP6, como de ATPc de los camarones que se encontraban a 1.5 mg/L de OD, disminuyó entre ~50 y 200 veces respectivamente en un lapso aproximado de 2 h, alcanzando las cantidades detectadas a 6 mg/L de OD, lo cual refleja la rápida capacidad de adaptación de los camarones en respuesta a la cantidad de OD en agua.

Los resultados obtenidos de la evaluación del cociente de expresión relativa en la glándula digestiva mostraron resultados similares para ambos genes. Se detectó un cambio del 88.55% en la cantidad de mRNA del gen ATP6 en las concentraciones de 4 y 1.5 mg/L de OD, mientras que el mRNA del gen de ATPc presentó una diferencia del 89.3% entre 2 y 1.5 mg/L de OD (Figura 14) en los controles. En general los organismos sometidos al efecto de la hipoxia mostraron cantidades mayores de mRNA con respecto a los controles ($p < 0.05$). La concentración de mRNA de los genes ATP6 y ATPc, incrementaron un 99.8% en los camarones sometidos a 6 mg/L con respecto a aquellos en 1.5 mg/L de OD.

Los resultados analizados por ambos métodos, la cuantificación absoluta y el cociente de expresión, mostraron tendencias similares respecto a los cambios detectados en los organismos sometidos al efecto de la hipoxia. Las mayores cantidades de mRNA tanto del gen ATP6, como del gen ATPc, se encontraron en las menores concentraciones de OD, mientras que las menores cantidades se detectaron en condiciones de normoxia, ya sea 6 ó 7 mg/L OD.

Músculo

En la Figura 15 se muestran los valores de la cuantificación absoluta normalizada del mRNA del gen ATP6 y ATPc en el músculo. En este tejido se encontraron diferencias significativas en la cantidad de mRNA del gen ATP6, tanto en los camarones controles como en aquellos bajo el efecto de la hipoxia. Los cambios en los organismos controles representaron un 94.05% cuando se tomaron las muestras en 1.5 y 7 mg/L de OD. Con respecto a los camarones sometidos a hipoxia, se

detectaron cambios de un 98.65% entre la concentración de 2 y 6 mg/L de OD. Estos cambios en la cantidad de mRNA del gen ATP6 sugieren una respuesta rápida de la mitocondria al efecto de la hipoxia para suplir las demandas energéticas.

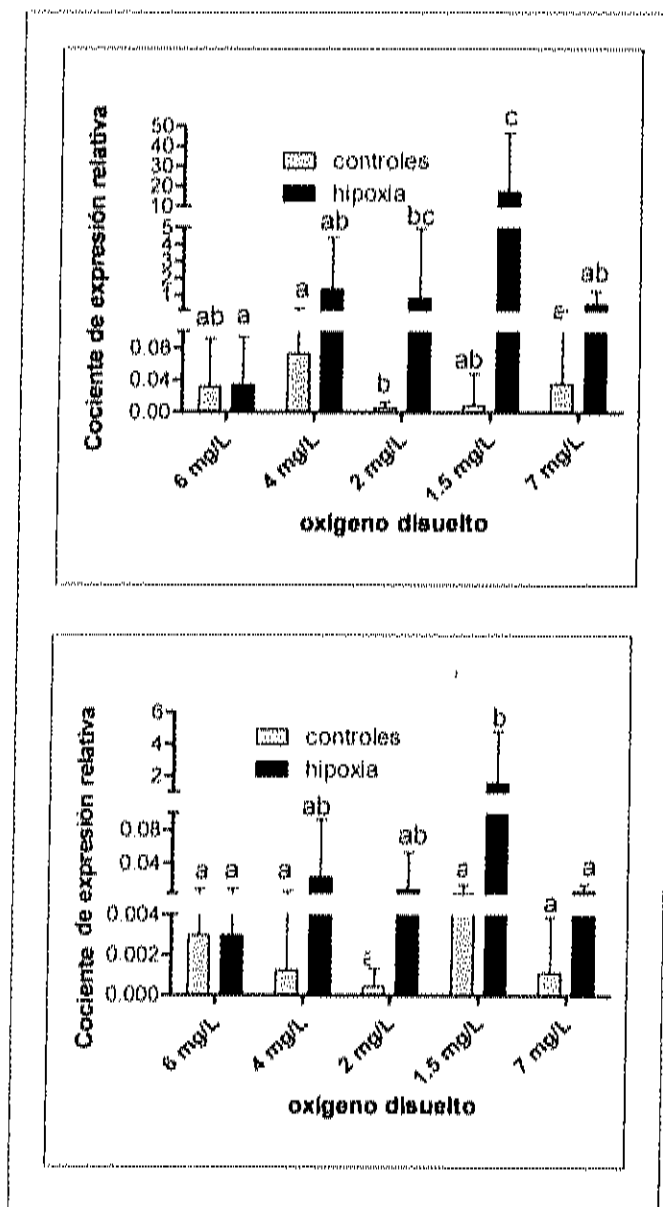


Figura 14. Cociente de expresión relativa de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en 700 ng de RNA total de la glándula digestiva de camarón blanco. Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La cantidad de mRNA del gen ATPc en el músculo permaneció sin cambios ante el efecto de la hipoxia, coincidiendo con lo reportado por Hudson *et al.*, (2006), quienes evaluaron la cantidad de transcrito del gen de la proteína nuclear UCP2 (involucrada en la protección frente al estrés oxidativo), en ranas que se encontraban en un periodo de depresión metabólica llamado estivación, condición en la que el organismo disminuye el nivel de consumo de oxígeno, sin mostrar cambios en la cantidad de los transcritos.

A diferencia de los resultados observados en la cuantificación absoluta, los resultados del cociente de expresión relativa (Figura 16) mostraron diferencias en la cantidad de transcrito tanto del gen ATP6, como de ATPc entre los grupos controles y entre aquellos sometidos a condiciones de hipoxia. En las muestras de los camarones en hipoxia la cantidad de mRNA de ATP6 mostró la mayor diferencia (85.03%) entre los organismos sometidos a 4 y 2 mg/L de OD. Mientras que la cantidad de mRNA del gen ATPc aumentó un 83.4% entre los organismos sometidos a 4 y 7 mg/L de OD.

Es importante señalar que dentro de los procedimientos de estandarización de la amplificación en PCR en tiempo real, se presentaron diferencias importantes entre los dos tejidos estudiados. Para analizar el mRNA del músculo se utilizaron 150 ng de cDNA como templado para cada reacción, mientras que en el caso de la glándula digestiva fue necesario incrementar dicha cantidad a 700 ng. De tal manera, que para establecer una comparación de los resultados entre ambos tejidos, se calculó la cantidad de mRNA existente en 700 ng de templado, a partir de los datos obtenidos de la cuantificación absoluta del músculo (Figura 17).

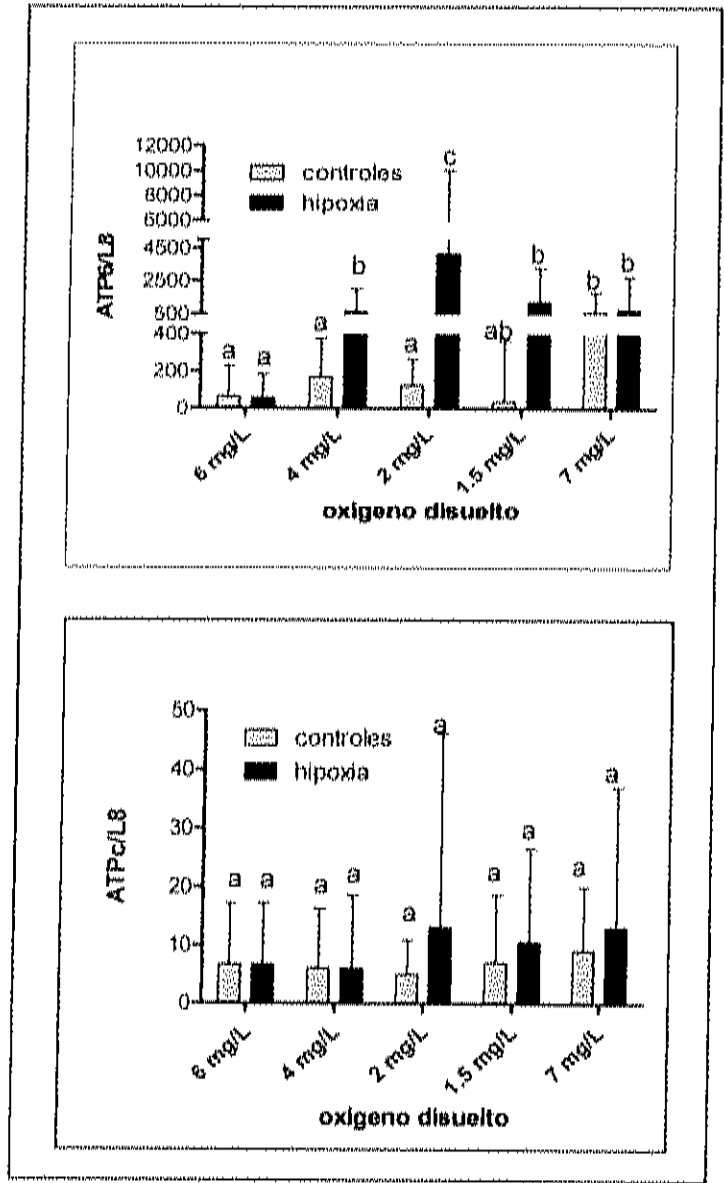


Figura 15. Cantidad absoluta normalizada de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en 150ng de RNA total del músculo de camarón blanco. Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

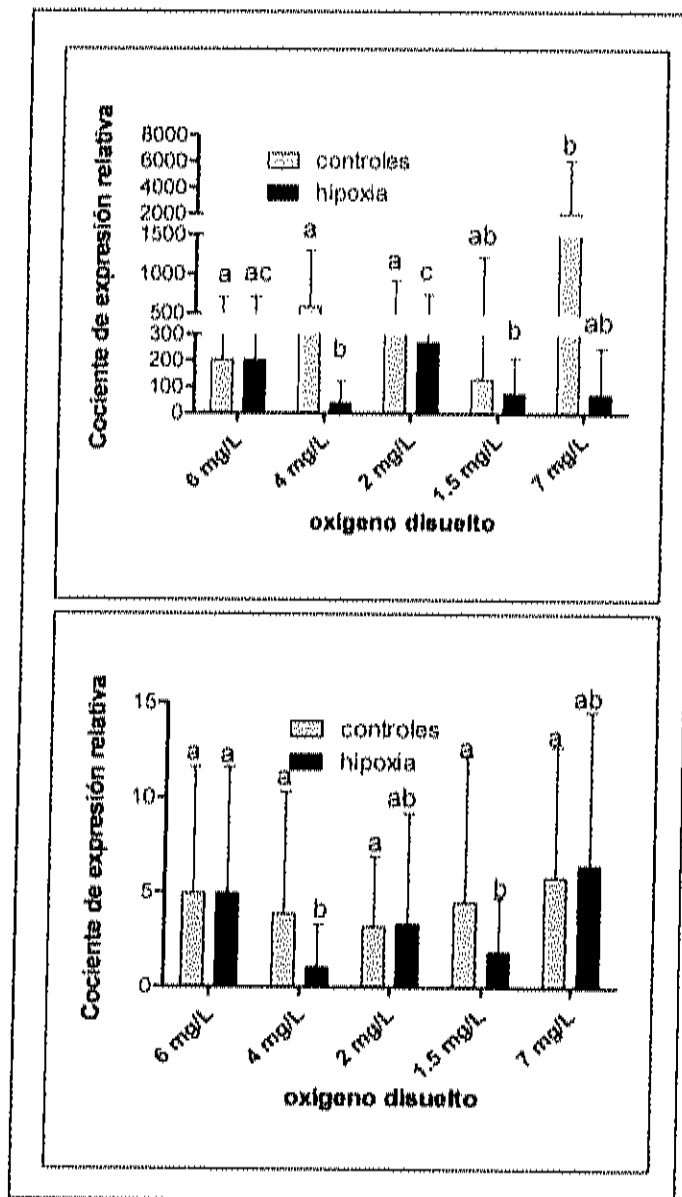


Figura 16. Cociente de expresión relativa de ATP6 (arriba) y ATPc (abajo) en 150 ng de RNA total del músculo de camarón blanco. Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

De acuerdo a lo observado en la figura 17, la cantidad de mRNA de ambos genes en la glándula digestiva se incrementó en 1.5 mg/L de OD, respecto a los organismos sometidos a 6 mg/L, sugiriendo una coordinación en la cantidad de ATP6 y ATPc en este tejido. Mientras que en el músculo, sólo se observaron cambios en la concentración del mRNA de ATP6 por efecto de la hipoxia a diferencia del mRNA de ATPc, el cual no resultó afectado, de ahí que no se observó una respuesta coordinada.

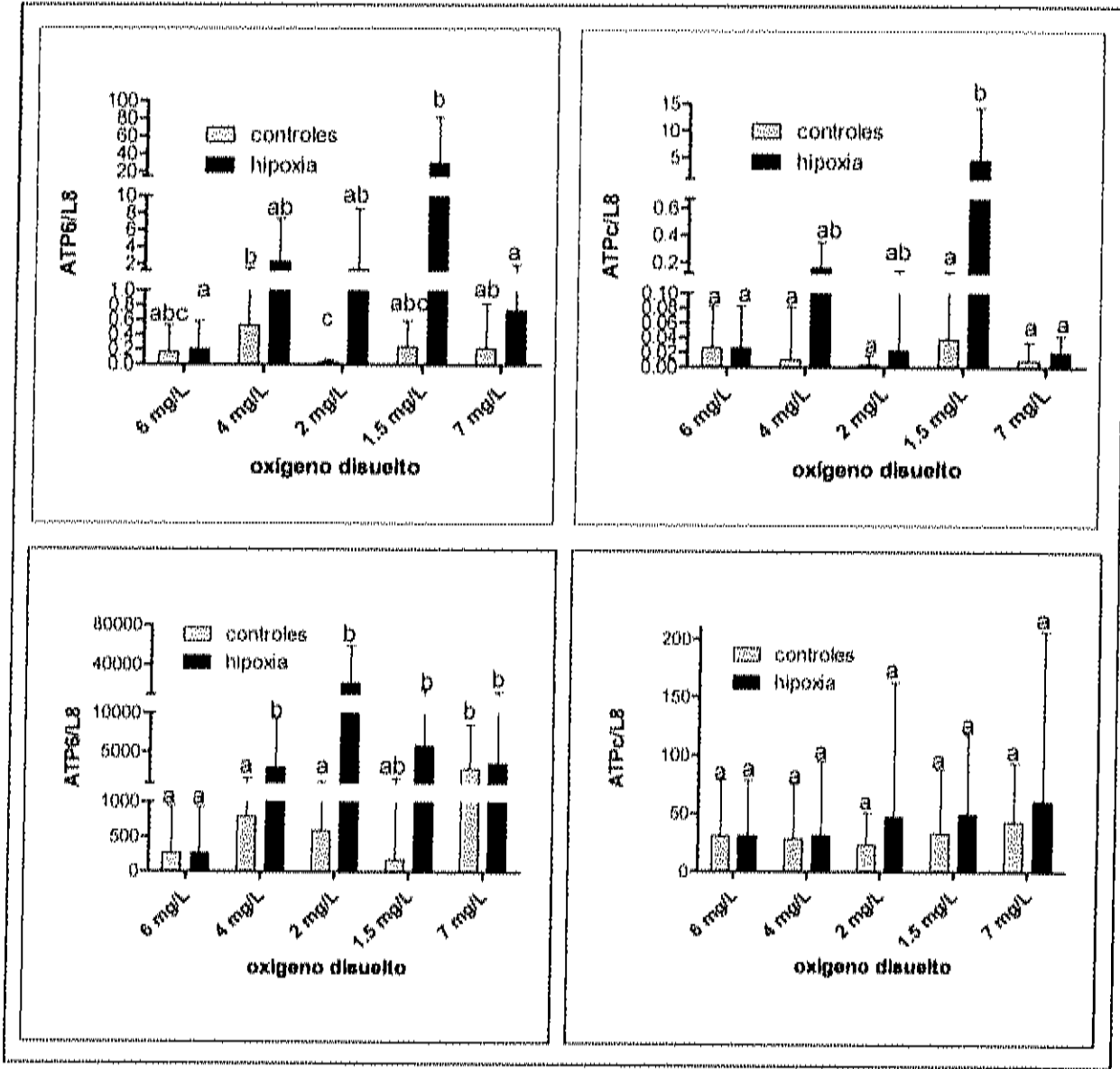


Figura 17. Cuantificación absoluta normalizada de ATP6 y ATPc de la glándula digestiva (arriba) y de músculo (abajo), considerando 700 ng de templado. Valores con diferente literal son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Lo anterior sugiere que la expresión de ATP6 y ATPc en la glándula digestiva fue más susceptible a los cambios en la concentración de OD en el agua, que en el caso del músculo, lo cual puede estar relacionado con la función específica de cada uno de los tejidos en el camarón. En el 2003, Muhlia-Almazán *et al.*, reportaron que en la glándula digestiva se lleva a cabo la degradación del alimento y que este órgano se encuentra relacionado con la movilización de las reservas energéticas cuando el

camarón es expuesto a factores fisiológicos como el ciclo de muda o el ayuno, de allí que los cambios en la concentración de OD presenten mayor efecto en la glándula digestiva. Por otro lado, los camarones al desplazarse utilizan una considerable cantidad de ATP, la cual es necesaria para la contracción muscular. Durante la hipoxia, la movilidad de los organismos disminuyó considerablemente, lo cual sugiere que la hidrólisis del ATP disminuyó y posiblemente esto afectó la coordinación de las subunidades evaluadas en el músculo, lo que refleja una condición tejido-específica.

Es importante resaltar que en este estudio las cantidades de mRNA del gen ATP6 fueron entre uno y dos órdenes de magnitud mayores que los de ATPc. Lo anterior es debido a la diferencia entre el número de copias del genoma mitocondrial (10^3 - 10^4), respecto a la única copia del genoma nuclear existente en cada célula (Garesse y Vallejo, 2001). Además, es necesario tomar en cuenta las diferencias que pueden existir en el número de mitocondrias presentes en cada uno de los diferentes órganos de los camarones.

La cantidad de mRNA del gen constitutivo L8 varió tanto en los camarones sometidos a la hipoxia como en los del grupo control. Warrington *et al.*, (2000) reportaron que un gen constitutivo es aquel que se expresa para mantener la función celular, de tal manera que se esperarían cambios en la cantidad de mRNA de este gen. Sin embargo, dicho cambio debe ser mínimo y su expresión no debe de estar relacionada con el estrés que se esté evaluando. A pesar de la variación encontrada en la cantidad de mRNA del gen L8, éste ha sido utilizado como gen constitutivo en otros estudios realizados en *L. vannamei*, bajo diferentes estímulos evaluados (Sánchez-Paz, 2006; Soñanez-Organis, 2006), por lo tanto de este estudio se concluye que bajo el efecto de la hipoxia, el gen de L8 confirmó ser útil como un gen constitutivo.

En esta investigación, la cantidad del mRNA del gen L8 (gen nuclear) se utilizó para normalizar la cantidad de los mRNA del gen ATP6 (mitocondrial). Lo anterior debido a que no se ha encontrado un gen constitutivo adecuado para la normalización de los

genes mitocondriales, ya que el genoma mitocondrial es transcrito como una unidad originada de una cantidad limitada de promotores específicos. Así, la disminución de la cantidad del mRNA refleja el decremento de la transcripción de genoma mitocondrial de manera general (Vijayasathya, 2003).

Respecto a la existencia de mecanismos de coordinación entre el genoma mitocondrial y nuclear, de algunas subunidades que participan en la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, existen reportes que se contradicen. Algunos apoyan la existencia de coordinación entre el genoma mitocondrial y el nuclear, y otros la descartan. Hood *et al.*, (1989) detectaron un incremento en la cantidad de mRNA de una subunidad codificada por el genoma mitocondrial y otra nuclear, de la enzima citocromo c oxidasa en músculo esquelético de rata bajo estimulación del nervio. Estos autores sugirieron la existencia de la coordinación entre dos genomas físicamente separados dentro de la célula. De igual manera, Vijayasathya *et al.*, (2003) en células de mamíferos encontraron una coordinación entre los transcritos del genoma mitocondrial y nuclear en la citocromo c oxidasa.

Sin embargo, Duborjal *et al.*, (2002) no detectaron coordinación entre el genoma mitocondrial y el nuclear al cuantificar los mRNA de los genes de algunas subunidades del sistema de fosforilación oxidativa en células humanas privadas de DNA mitocondrial. Este resultado lo atribuyen a que la cantidad de mRNA de los genes nucleares permaneció inalterada. De igual manera, Giegé *et al.*, (2005) al estudiar células de la planta *Arabidopsis thaliana* en ausencia de azúcar, observaron que no existe coordinación a nivel transcripcional entre ambos genomas, pero sugieren una posible coordinación a nivel postranscripcional.

Los resultados del presente estudio han mostrado un patrón de variación similar en la cantidad de mRNA de los genes ATP6 y ATPc en la glándula digestiva de los camarones sometidos a las mismas concentraciones de OD en el agua, lo que sugiere la existencia de coordinación entre el genoma mitocondrial y nuclear en este

órgano. Además, estos resultados muestran la importancia de la glándula digestiva en la reserva de energética del camarón y así mantener la homeostasis en condiciones de hipoxia. También es importante mencionar que la cantidad de mRNA alcanzó los niveles de los organismos controles después de haber adicionado oxígeno al sistema, indicando la capacidad que tiene el camarón para ajustarse rápidamente a las demandas de oxígeno. Además, se sugiere que los incrementos en la cantidad de mRNA de ambas subunidades en respuesta a hipoxia en la glándula digestiva, se deban a la formación de nuevos complejos enzimáticos, como un intento de la mitocondria por mantener el potencial electroquímico en la membrana. Lo anterior pudiera estar relacionado con la capacidad de la ATP-sintasa de hidrolizar ATP en lugar de generarlo (Di Lisa *et al.*, 1998).

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se abordó el análisis de una de las rutas metabólicas más importantes en los organismos eucariontes, cuyo resultado es la generación del 95% del ATP que un animal requiere para llevar a cabo sus funciones. Así, la fosforilación oxidativa, y la glucólisis anaerobia, han sido procesos fisiológicos poco estudiados en especies de invertebrados marinos como el camarón. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la hipoxia es capaz de inducir cambios significativos en las concentraciones de metabolitos en el plasma del camarón, confirmando la habilidad de estos organismos para utilizar una vía alterna en la producción de ATP (glucólisis anaerobia) con el fin de mantener la homeostasis celular.

Por otro lado, la cantidad de mRNA de los genes ATP6 y ATPc de la glándula digestiva mostró cambios similares a las diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en el agua. Sin embargo, en el músculo solo se detectaron cambios en la subunidad mitocondrial. Lo anterior sugiere que a nivel transcripcional la coordinación en la cantidad del mRNA de los genes ATP6 y ATPc pertenecientes a la enzima ATP-sintasa, es de manera tejido-específica. Además, dicha coordinación se encuentra íntimamente ligada con la función que realizan la glándula digestiva y el músculo, y la capacidad de estos órganos para movilizar las reservas energéticas cuando el camarón es sometido a hipoxia.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere abordar el estudio de las subunidades ATP6 y ATPc a nivel postranscripcional en el músculo de camarón, midiendo la cantidad de cada una de las subunidades que se encuentran en este tejido, ya que los resultados sugieren una regulación a nivel traduccional.
- Evaluar la actividad de la ATP-sintasa en la glándula digestiva y el músculo, además de la cantidad de ATP en cada tejido, para poder establecer una relación con la cantidad del mRNA.
- Investigar sobre un gen constitutivo que pueda ser utilizado para normalizar la cantidad de mRNA de los genes mitocondriales.

REFERENCIAS

- Abe, H., Hirai, S., Okada, S., 2007. Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* Comparative Biochem Physiol A, 146: 40–46.
- Avers, C. J., 1986. Molecular Cell Biology. USA: Addison-Wesley Publishing Company, Inc. Capitulo 9, Mitochondria, p. 332.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J.-Y., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A., Moal, J. 2005. Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 140 (4): 635-646.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W., Brunner, M., 2000. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. Trends. Cell. Biol. 10, 25-31.
- Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L., Crofts, A. R., 2000. Structure and function of cytochrome *bc* complexes. Annu. Rev. Biochem. 69:1005–75.
- Boyer, P. D., 2002. Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. FEBS Letters. 512, 29-32.
- Buchana, B., Gruissem, W., Jones, R. L., 2001. Biochemistry & molecular biology of plants. USA: American society of plant physiologists. Chapter 14, Respiration and photorespiration. p. 692 y 694.
- Caggese, C., Ragone, G., Perrini, B., Moschetti, R., De Pinto, V., Caizzi, R., Barsanti, P., 1999. Identification of nuclear genes encoding mitochondrial proteins: isolation of a collection of *D. melanogaster* cDNAs homologous to sequences in the human gene index database. Mol. Gen. Genet. 261, 64-70.
- Carbajo, R. J., Silvester, J. A., Runswick, M. J., Walker, J. E., Neuhaus D., 2004. Solution structure of subunit F6 from the peripheral stalk region of ATP synthase from bovine heart mitochondria. J. Mol. Biol. 342, 593–603.
- Cardol, P., González-Halphen, D., Reyes-Prieto, A., Baurain, D., Matagne, R. F., Remacle, C., 2005. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the genome sequencing project. Plant. Physiol. Vol. 137, 447-459.
- Chan, S. M., Rankin, S. M., 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.

- Cross, L. R., 2004. Turning the ATP motor. *Nature*. 427, 407-408.
- Curtis, H., 1983. *Biology*. 4th ed. USA: Worth Publishers. pp. 84 – 85.
- Dasgupta, S. F., Stanley, I., Rapoport, S. I., Gerschenson, M., Murphy, E., Fiskum, G., Russell, S. J., Chandrasekaran, K., 2001. ATP synthesis is coupled to rat liver mitochondrial RNA synthesis. *Mol. Cell. Biochem.* 221, 3–10.
- Di Lisa, F., Menabò, R., Canton, M., Petronilli, V., 1998. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim. Biophys. Acta.* 1366, 69–78.
- Duborjal, H., Beugnot, R., Mousson de Camaret, B., 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.
- Dubot, A., Godinot, C., Dumur, V., Sablonnière, B., Stojkovic, T., Cuisset, J.M., Vojtiskova, A., Pecina, P., Jesina, P., Houstek, J., 2004. GUG is an efficient initiation codon to translate the human mitochondrial ATP6 gene. *Bioph. Res. Co.* 313, 687–693.
- Enríquez, J. A., Fernández-Silva, P., Montoya, J., 1999. Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription. *Biol. Chem.* 380, 737 – 747.
- Fernández-Silva, P., Enríquez, J. A., Montoya, J., 2003. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.* 88 (1), 41–56.
- Fourney, R., Miyakoshi, J., Day III, R. S., Paterson, M., 1988. Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus.* 10(1), 5-7.
- Garesse, R., Vallejo, C.G., 2001. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene.* 263, 1-6.
- Garnier, A., Fortin, D., Deloménie C., Momken, I., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., 2003. Depressed mitochondrial transcription factor and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol.* 551, 491-501.
- Giegé, P., Sweetlove, L.J., Cognat, V., Leaver, C. J., 2005. Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17, 1497–1512.
- Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L., Fillingame R. H., 1998. Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F1Fo ATP synthase. *Biochem.* 37(25), 8818 – 8824.

- Gnaiger, E., Méndez, G., Hand, S. C., 2000. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11080–11085.
- Goffart, S. Y Wiesne, R. J., 2003. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp. Physiol.* 88(1), 33–40.
- Goffeau, A., Falson, P., Boutry, M., Jault, J. M., 2004. Structural insight into the cooperativity between catalytic and noncatalytic sites of F1-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1658, 133-140.
- Gutierrez-Millán, L. E., Peregrino-Uriarte, A.B., Sotelo-Mundo, R., Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., 2002. Sequence and conservation of a rRNA and tRNA Val mitochondrial gene fragment from *Penaeus californiensis* and comparison with *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. *Mar. Biotechnol.* 4, 392-398.
- Harper, S. L., Reiber, C. L., 2006. Metabolic, respiratory and cardiovascular responses to acute and chronic hypoxic exposure in tadpole shrimp *Triops longicaudatus*. *J. Exp. Biol.* 209, 1639-1650.
- Hernández-López, J., 2001. Diseño de técnicas para la cuantificación de moléculas plasmáticas de camarón. Tesis doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Hermosillo, Sonora, México.
- Hood, D.A., Zak, R., Pette, D. 1989. Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome-c-oxidase subunits. *Eur. J. Biochem.* 179, 275-280.
- Horn, D. B., Squire, C. R., 1966. The estimation of ammonia using the indophenol blue reaction. *Clin. Chim. Acta.* 14(2), 185-194.
- Howe C. J., 1994. Mitochondrion. En: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Blackwell Science. p. 667.
- Hudson, N. J., Lehnert, S. A., Ingham, A. B., Symonds, B., Franklin, C. E., Harper, G. S., 2006. Lessons from an estivating frog: sparing muscle protein despite starvation and disuse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R836–R843.
- KEGG, 2006. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Disponible en: <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00190.html> (21 Abril 2006).
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M., 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 619–642.

- Lapierre, P., Shial, R., Gogarten, J. P., 2006. Distribution of F- and A/V-type ATPases in *Thermus scotoductus* and other closely related species. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 15–23.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G., 2003. Bioquímica. 3ra ed. España: Addison Wesley. Capítulo 15, Transporte electrónico, fosforilación oxidativa y metabolismo del oxígeno. p. 594 – 595.
- Medd, S. M., Walker, J. E., Jolly, R. D., 1993. Characterization of the expressed genes for subunit c of mitochondrial ATP synthase in sheep with ceroid lipofuscinosis. *Biochem. J.* 293, 65-73.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, Á. I., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R., Racotta, I. S., 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258, 633-640.
- Misericòrdia, R., Picornell, A., Castro, J. A., 1998. Mitochondrial DNA: A tool for populational genetics studies. *Internatl. Microbiol.* 1, 327-332.
- Mueller, D. M., 2000. Partial assembly of the yeast mitochondrial ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32 (4), 391-400.
- Mugnier, C. y Soyez, C., 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. *Aquaculture*. 244, 315-322.
- Muhlía-Almazán, A., García-Carreño, F. L., Sánchez-Paz, J. A., Yepiz-Plascencia, G. Peregrino-Uriarte, A. B., 2003. Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol B.* 135, 373–383
- Nagley, P., Devenish, R. J., Prescott, M., Roucou, X., 2000. Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1458, 428-442.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M., 2000. Lehninger Principles of Biology. 3ra ed. USA: Worth Publishers. pp. 36 -37.
- Nomenclature Committee of IUB (NC-IUB) IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Newsletter. 1984. 4(2), 177-180
- Puri, N., Lai-Zhang, J., Meier S., Mueller, D. M., 2005. Expression of bovine F₁ ATPase with functional complementation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280 (23), 22418–22424.

- Rissanen E., Tranberg H. K., Nikinmaa M., 2006. Oxygen availability regulates metabolism and gene expression in trout hepatocyte cultures. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1507–R1515.
- Rosas, C., Cooper, E. L., Pascual C., Brito, R., Gelabert R., Moreno, T., Miranda, G., Sánchez, A., 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Mar. Biol.* 145, 401-413.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Hernández-Saavedra, N. 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., 2006. Efecto del ayuno sobre las reservas energéticas plasmáticas y hepatopancreáticas, y en la expresión de los genes de la fosfofructocinasa y piruvato cinasa en el hepatopáncreas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Hermosillo, Sonora, México.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340: 184–193
- Scarpulla, R., 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1576, 1-14.
- Scheffler, I. E., 2001. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1. 3-31.
- Shen X., Ren J., Cui Z., Sha Z., Wang B., Xiang J., Liu B., 2007. The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. *Gene.* 403(1-2):98-109.
- Soñanez-Organis, J. G., 2006. Caracterización y expresión de los genes de hexocianasa, fosfofructocinasa y piruvato cinasa de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Hermosillo, Sonora, México.
- St-Pierre, J., Brand, M. D., Boutilier, R. G., 2000. Mitochondria as ATP consumers: Cellular treason in anoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8670–8674.
- Stryer, L., 1995. *Biochemistry*. 4ta ed. USA: W. H. Freeman and Company. p. 534.

- Temperley, R. J., Seneca, S. H., Tonska, K., Bartnik E., Bindoff, L. A., Lightowlers R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M.A., 2003. Investigation of a pathogenic mtDNA microdeletion reveals a translation-dependent deadenylation decay pathway in human mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 12 (8), 2341–2348.
- Ugalde, C., Janssen, R., van den Heuvel, L. P., Smeitink J., Nijtmans L., 2004. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOS complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet*, 13 (6), 659–667.
- Vargas-Albores, F., Guzman-Murillo, M.A., Ochoa, J.L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 299-303.
- Velours, J., Arselin, G., Giraud, M. F., Dautant, A., Vaillier, J., Brethes, D., Coulyar-Salin, B., Schaeffer, J., 2003. The GxxxG motif of the transmembrane domain of subunit e is involved in the dimerization/oligomerization of the yeast ATP synthase complex in the mitochondrial membrane. *Eur. J. Biochem.* 270, 1875–1884.
- Vijayasathy, C., Damle, S., Prabu, S. K., Otto C. M., Avadhani, N., 2003. Adaptative 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.
- Voet, D. Y Voet, J. G., 1995. *Biochemistry*. 2da ed. USA: John Wiley & Sons. Inc. p. 596.
- Wang, H. y Oster, G., 1998. Energy transduction in the F_1 motor of ATP synthase. *Nature*. 396, 279-282.
- Warrington, J. A., Nair, A., Mahadevappa, M., Tsyganskaya, M., 2000. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics*. 2, 143–147.
- Weihrauch, D., Morris, S., Towle, D. W., 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. *J. Exp. Biol.* 207, 4491-4504.
- Wenger, R. H., 2000. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J. Exp. Biol.* 203, 1253–1263.
- Wilkins, S., 2000. F_1F_0 -ATP synthase - stalking mind and imagination. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32 (4), 333- 339.
- Wilson, K., Cahil, V., Ballment, E., 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 (6), 863-874.

- Zhang, P., Zhang, X., Li, J., Huang, G., 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. 256, 579-587.
- Zou, E., Du, N., Lai W., 1996. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 114A (2), 105-109.

- Zhang, P., Zhang, X., Li, J., Huang, G., 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. 256, 579-587.
- Zou, E., Du, N., Lai W., 1996. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 114A (2), 105-109.