



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

**LAS PROTEÍNAS MITOCONDRIALES DESACOPLANTES
UCP4 y UCP5 DEL CAMARÓN BLANCO Y SU POSIBLE
FUNCIÓN DURANTE LA HIPOXIA**

Por:

I.B. Ofelia Alejandra Méndez Romero

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

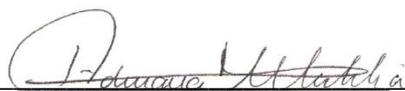
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

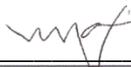
Agosto 2016

APROBACIÓN

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



Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Director de Tesis



Dra. María A. Islas Osuna
Asesor



Dra. Oliviert Martínez Cruz
Asesor



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



Dr. Pablo Wong González
Director General

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El apoyo financiero para su realización fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del proyecto con clave 241670 titulado: “BIOENERGÉTICA Y REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA DE LAS MITOCONDRIAS DEL CAMARÓN” y de una beca para estudios de Maestría en Ciencias.

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

A cada uno de los miembros del comité de tesis: Dra. María A. Islas Osuna, Dra. Oliviert Martínez Cruz, Dr. Alonso Alexis López Zavala. Gracias por su interés y disponibilidad.

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

Al CIBNOR unidad Hermosillo, en especial al Dr. Arturo Sánchez Paz, la Dra. Tania Enríquez Espinoza y el M.C. Fernando Mendoza Cano por las facilidades en su laboratorio durante la huelga de CIAD.

A cada uno de los integrantes del laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular, presentes y pasados.

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mi familia por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo a través del tiempo y por siempre estar conmigo.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS..... | x |
| LISTA DE TABLAS | xi |
| RESUMEN | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 El Camarón Blanco del Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i> como Modelo de Estudio..... | 4 |
| 2.2 Mitochondria: La Fuente Energética de la Célula | 6 |
| 2.2.1 Morfología y Función de las Mitochondrias | 6 |
| 2.2.2 La Fosforilación Oxidativa | 7 |
| 2.2.3 La Mitochondria: el Principal Productor de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS) | 8 |
| 2.3 Proteínas Desacoplantes: Estructura y Función | 10 |
| 2.3.1 Características Generales de las Proteínas Desacoplantes (UCPs)..... | 10 |
| 2.3.2 Homólogos de las Proteínas Desacoplantes..... | 12 |
| 2.3.3 Las UCPs de los Invertebrados..... | 15 |
| 2.3.4 Respuesta de las UCPs ante la Hipoxia..... | 17 |
| 2.4 La Hipoxia en el Medio Acuático y su Efecto en el Camarón..... | 18 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 21 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 22 |
| V. OBJETIVOS | 23 |
| 5.1 Objetivo General..... | 23 |
| 5.2 Objetivos Específicos..... | 23 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 24 |
| 6.1 Aislamiento del ARN Total de Varios Tejidos del Camarón Blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> | 24 |
| 6.2 Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total | 25 |

CONTENIDO (continuación)

| | | |
|-------|---|----|
| 6.3 | Eliminación del ADN Genómico Contaminante en las Muestras de ARN Total..... | 25 |
| 6.4 | Síntesis del ADNc y Diseño de Oligonucleótidos Específicos | 26 |
| 6.5 | Amplificación y Secuenciación de los Transcritos <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> | 29 |
| 6.6 | Modelación <i>In Silico</i> de la Estructura Tridimensional de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> | 31 |
| 6.7 | Análisis Filogenético de las UCPs | 31 |
| 6.8 | Expresión Génica de los Trascritos <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> en Diferentes Tejidos del Camarón..... | 32 |
| 6.9 | Cuantificación del ARNm de las UCPs y las Enzimas Antioxidantes del Camarón en Condiciones de Estrés Oxidativo | 33 |
| 6.9.1 | Organismos Experimentales y Bioensayo en Condiciones de Hipoxia.. | 33 |
| 6.9.2 | Cuantificación de las Concentraciones de Lactato en Plasma..... | 35 |
| 6.9.3 | Aislamiento, Cuantificación, Evaluación de la Integridad y Eliminación del ADNg Contaminante Presente en las Muestras de ARN total..... | 35 |
| 6.9.4 | Cuantificación del ARNm por PCR en tiempo real | 36 |
| 6.10 | Análisis Estadístico | 38 |
| VII. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 39 |
| 7.1 | Caracterización de las Secuencias Nucleotídicas y Deducidas de Aminoácidos de las Proteínas Desacoplantes <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> del Camarón Blanco <i>L. vannamei</i> | 39 |
| 7.1.1 | La UCP4 del Camarón | 39 |
| 7.1.2 | La UCP5 del Camarón | 43 |
| 7.2 | Modelación <i>in silico</i> de las UCPs de <i>L. vannamei</i> | 47 |
| 7.3 | Relaciones Filogenéticas de las UCPs del Camarón..... | 55 |
| 7.4 | Expresión de los Transcritos <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> en Diferentes Tejidos del Camarón Blanco | 58 |
| 7.4.1 | Integridad y Limpieza del ARN Total | 58 |

CONTENIDO (continuación)

| | | |
|-------|---|----|
| 7.4.2 | Expresión Relativa de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> | 59 |
| 7.5 | Efecto de la Hipoxia y Reoxigenación en la Expresión Génica de las UCPs y las Enzimas Antioxidantes del Camarón | 61 |
| 7.5.1 | Lactato en el Plasma de los Organismos Sometidos a Hipoxia y Reoxigenación..... | 61 |
| 7.5.2 | Cuantificación del ARNm de las UCPs y las Enzimas Antioxidantes Tiorredoxina (TRX), Glutación-Peroxidasa (GPX), Catalasa (CAT) y Superoxido Dismutasa de Manganeso (MnSOD)..... | 63 |
| VIII. | CONCLUSIONES | 73 |
| IX. | RECOMENDACIONES | 74 |
| X. | REFERENCIAS..... | 75 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo de vida de los camarones Peneidos. | 4 |
| Figura 2. La respiración aeróbica y la auto-regulación de la producción de EROS mitocondrial. | 10 |
| Figura 3. Superposición de los modelos estructurales 3D de la UCP2, UCP4, y UCP5 humanas, basados en la estructura cristalográfica del acarreador de ADP/ATP..... | 12 |
| Figura 4. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de UCP4 del camarón blanco <i>L. vannamei</i> | 40 |
| Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de la UCP4 en diversas especies..... | 42 |
| Figura 6. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de UCP5 del camarón blanco <i>L. vannamei</i> | 44 |
| Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de la UCP5 en diversas especies..... | 46 |
| Figura 8. Modelo estructural predictivo de la LvUCP4..... | 49 |
| Figura 9. Modelo estructural predictivo de la LvUCP5..... | 50 |
| Figura 10. Alineamiento estructural de LvUCP4 y LvUCP5..... | 53 |
| Figura 11. Alineamiento estructural de UCP5 de <i>L. vannamei</i> y diversos invertebrados marinos. | 53 |
| Figura 12. Árbol filogenético de las proteínas desacoplantes mitocondriales... | 57 |
| Figura 13. Integridad del ARN total aislado de tejidos y órganos del camarón blanco <i>L. vannamei</i> | 58 |
| Figura 14. Eliminación de ADN genómico en las muestras de ARN total del camarón..... | 59 |
| Figura 15. Expresión de LvUCP4 y LvUCP5 en diferentes tejidos/órganos de <i>L. vannamei</i> | 60 |
| Figura 16. Concentración de L-lactato en el plasma del camarón blanco <i>L. vannamei</i> expuesto a normoxia, hipoxia y reoxigenación..... | 62 |
| Figura 17. Comparación de los rangos dinámicos de cada gen. | 64 |
| Figura 18. Expresión relativa de las UCPs y los antioxidantes mitocondriales. | 68 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de <i>LvUCP4</i> y <i>LvUCP5</i> | 27 |
| Tabla 2. Características de las sondas TaqMan utilizadas en la evaluación de la expresión génica de <i>LvUCP4</i> , <i>LvUCP5</i> , CAT, TRX, GPX, MNSOD y L8 en las branquias del camarón. | 36 |

RESUMEN

Las proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs) forman parte de la familia de los acarreadores de solutos SLC25. Estas proteínas transportan directamente los protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial y se les ha involucrado en varias funciones celulares que van desde la termorregulación hasta la defensa antioxidante. En los mamíferos, la familia de las UCPs está bien caracterizada y contiene cinco miembros (UCP1-5), los cuales se expresan de manera tejido-específica. En contraste, los homólogos de estas proteínas en los invertebrados han sido mucho menos estudiados a pesar de la gran diversidad de especies. En el caso específico de los crustáceos, no existe reporte previo de estas proteínas. En este estudio, las secuencias nucleotídicas que codifican para dos proteínas desacoplantes, *LvUCP4* y *LvUCP5*, fueron caracterizadas por primera vez en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. La secuencia de ADNc de *LvUCP4* incluye una región de 959 pb de longitud que codifica para una proteína deducida de 318 residuos, con un peso molecular calculado de 35.3 kDa. *LvUCP4* se expresa en todos los tejidos y órganos del camarón probados en este estudio. La región codificante de *LvUCP5* es de 909 pb de longitud, codifica una proteína de 302 residuos y tiene un peso molecular calculado de 33.2 kDa, *LvUCP5* cuenta con expresión tejido-específica. Ambas secuencias aminoacídicas comparten una homología promedio del 50% con las UCPs de los insectos, y cuentan con el motivo conservado de la familia de acarreadores de solutos mitocondriales; lo que les confiere una estructura 3D predictiva similar. La expresión génica de *LvUCP4* y *LvUCP5* en camarones en condiciones de hipoxia no mostro diferencias significativas, por lo que su participación como parte del sistema extrínseco del organismo para prevenir la formación de especies reactivas de

oxígeno aún se desconoce. Se requieren más estudios para confirmar su asociación con la producción de EROS y como parte de una respuesta a la escasa disponibilidad de oxígeno disuelto en el agua de mar.

Palabras clave: proteínas desacoplantes, UCP4, UCP5, mitocondria, hipoxia/normoxia, camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

The mitochondrial uncoupling proteins (UCP) are part of the SLC25 family of solute carriers. These proteins directly transport protons from the intermembranal space to the mitochondrial matrix. They have been implicated in several cellular functions ranging from thermoregulation to the antioxidant defense of eukaryotes. In mammals, the UCPs family is well characterized and it contains five members (UCP1-5), which are expressed in a tissue-specific manner. In contrast, their invertebrate homologues have been much less studied despite the great diversity of these species. Specifically in crustaceans, there are no previous reports about these proteins, and their structure and function are still unknown. In this study, the nucleotides sequences encoding two mitochondrial uncoupling proteins, *LvUCP4* and *LvUCP5*, were characterized for the first time in the transcriptome of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *LvUCP4* transcript was found to be expressed in all shrimp tissues and organs; its cDNA sequence includes a 959 bp long region that encodes a deduced-protein of 318 residues long, and a calculated molecular weight of 35.3 kDa. The coding region of the *LvUCP5* transcript is 909 bp long, it encodes a protein of 302 residues with a calculated molecular weight of 33.17 kDa. *LvUCP5* was found to be expressed in a specific-tissue manner. Both deduced amino acid sequences share 50% homology with other UCPs from insects, and they contain the conserved motif of the mitochondrial carrier family and a similar theoretical 3D structure. The genes expression of *LvUCP4* and *LvUCP5* in shrimp under hypoxia did not changed; thus their participation as a part of the extrinsic system of the organism to prevent the ROS formation still unknown. Further studies of these uncoupling proteins are required to confirm their association with the ROS production, and as part of a response to the scarce availability of dissolved oxygen in the seawater.

Keywords: Uncoupling proteins, UCP4, UCP5, mitochondrion, hypoxia/normoxia, white shrimp, *Litopenaeus vannamei*

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la mitocondria, en la membrana interna mitocondrial (MIM), se localizan los 5 complejos enzimáticos multiméricos que forman la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Hatefi, 1985). Junto con el flujo de electrones, cada uno de los complejos I, III y IV, son capaces de bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal creando el gradiente de protones, la fuerza protón-motriz y el potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) a través de la membrana interna (Dzбек y Korzeniewski, 2008). Lo anterior permite que el complejo V, la F_0F_1 -ATP sintasa, en una reacción acoplada sintetice el ATP que la célula necesita para llevar a cabo sus funciones regresando todos los protones a la matriz mitocondrial.

La eficiencia de los complejos respiratorios radica en que las reacciones redox permiten la transferencia de electrones uno por uno, de un complejo enzimático a otro. Se ha sugerido que la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) aumenta a causa de un desajuste celular o por una condición patológica. Cuando los electrones libres reaccionan no-enzimáticamente con el oxígeno molecular, se forma el anión superóxido el cual se puede convertir de manera espontánea, o enzimática en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en radical hidroxilo (OH^\cdot) o en otras especies reactivas de oxígeno (Vrbacký et al., 2007).

En condiciones fisiológicas normales, las mitocondrias se producen sólo pequeñas cantidades de radicales superóxido, mismas que pueden ser secuestradas rápidamente por el sistema de enzimas antioxidantes dentro de este organelo (Fleury et al., 1997; Dröge, 2002; Zeevalk et al., 2005). Por lo

que, cualquier desajuste o falla de la función mitocondrial causa la producción excesiva de estas especies reactivas de oxígeno (EROS), mismas que exacerban el sistema antioxidante y conducen a la mitocondria a un estado de estrés oxidativo sin retorno y posteriormente a la muerte celular por apoptosis (Abele et al., 2007).

En las mitocondrias, además del sistema antioxidante, existen varios sistemas de autorregulación que les permiten prevenir la formación de EROS a través de la activación de mecanismos de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Dentro de los mecanismos de desacoplamiento extrínsecos están las proteínas desacoplates (Uncoupling proteins ó UCPs, por sus siglas en inglés. Éstas proteínas desacoplan el flujo de electrones durante la oxidación de moléculas que llevan a la síntesis de ATP, proporcionando una ruta alternativa para que el flujo de protones a través de la MIM entre hacia la matriz, pero sin la síntesis de ATP (Stuart et al., 2001; Andrews et al., 2005; Echta, 2007).

La mayoría de los estudios realizados sobre las UCPs se han enfocado sólo en modelos vertebrados como los mamíferos, en donde se han identificado hasta cinco homólogos de las proteínas desacoplates (UCP1 a UCP5). Estas proteínas están expresadas diferencialmente en varios tejidos. Sin embargo, en modelos animales menos estudiados, con potencial económico e importancia biológica, el conocimiento de estas proteínas y su función son limitados y en ocasiones nulos. Tal es el caso de los crustáceos, específicamente del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

En los invertebrados a pesar del gran número de especies, existe muy poca información sobre las proteínas desacoplates de la mitocondria. A la fecha la existencia de cada uno de los homólogos de estas proteínas, la expresión de sus genes y la respuesta de la actividad de estas proteínas ante la hipoxia aún se desconocen en crustáceos. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es identificar, secuenciar y evaluar por primera vez el ADN complementario

(ADNc) de las proteínas desacoplantes mitocondriales del camarón blanco del Pacífico, en condiciones de estrés oxidativo.

II. ANTECEDENTES

2.1 El Camarón Blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* como Modelo de Estudio

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, es nativo de la costa oriental del océano Pacífico, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20 °C durante todo el año. *L. vannamei* se encuentra distribuido en hábitats marinos tropicales, los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que las postlarvas migran a las zonas costeras a pasar la etapa juvenil y pre-adulta en estuarios, lagunas costeras y manglares (Figura 1; FAO, 2015). Estos cambios de hábitat conllevan a una variación en el oxígeno disuelto (OD), dichas variaciones obligan al organismo a desarrollar alternativas para resolver sus necesidades energéticas básicas.

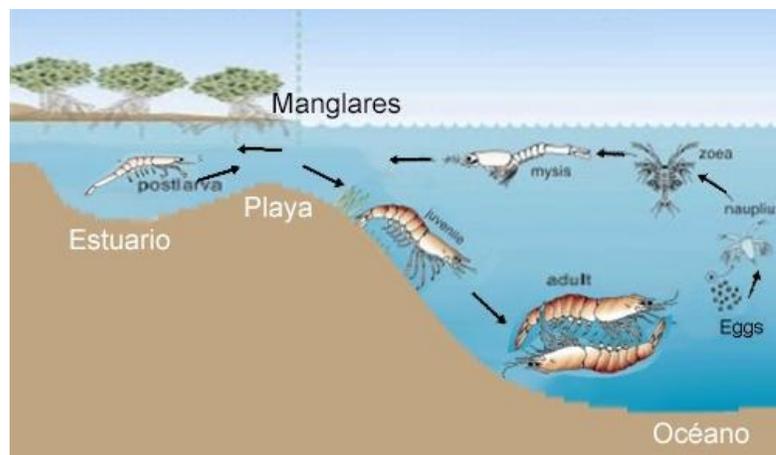


Figura 1. Ciclo de vida de los camarones Peneidos.

Debido a la característica de resistencia que presenta *L. vannamei* a la infección con el virus del síndrome de Taura (TSV), mismo que afectó a la industria camaronícola en los años 1998-1999, hoy en día el camarón blanco es el peneido más utilizado en la acuicultura (SAGARPA, 2009). Actualmente, la acuicultura es una industria que se ha convertido en una de las alternativas con mayor viabilidad económica para la producción de alimento, apoyándose en técnicas y procesos sobre los cuales se cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas (Guerrero-Olazarán et al., 2004; Montemayor-Leal et al., 2005). En las últimas dos décadas, el cultivo de camarón se ha desarrollado de manera exponencial en todo el mundo, expandiéndose más que cualquier otro sector productivo pecuario (Allsopp et al., 2008). Esta actividad desempeña un papel fundamental en los medios de subsistencia de millones de personas en todo el mundo.

En México, la camaronicultura se ha incrementado en el Noroeste del país en donde se encuentran el 89% de las hectáreas de producción. Sin embargo, el desarrollo acuícola en la zona costera ha enfrentado fuertes limitantes en los últimos años, siendo la causa principal la presencia de patógenos tales como virus y bacterias con alta incidencia en el continente Americano. Estos patógenos, han provocado cuantiosas pérdidas económicas debido al incremento en las tasas de mortalidad, ocasionado un fuerte impacto social e incrementando el desempleo como consecuencia del cierre de las granjas acuícolas (Sánchez-Paz et al., 2012).

Por otro lado, la intensificación de los sistemas de cultivo ha provocado un incremento en la presencia de eventos de hipoxia en los estanques. Las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua incrementan durante el día (debido a la fotosíntesis de las microalgas) y disminuyen considerablemente durante la noche. En los estanques los niveles más críticos de oxígeno se presentan hacia el amanecer cuando alcanzan hasta menos de los 3 mg/L, debido a la respiración de los organismos y a la descomposición de la materia

orgánica acumulada que consume el oxígeno disponible (Puente-Carreón, 2009). Es también durante el período nocturno cuando el camarón gasta una cantidad considerable de energía y produce radicales libres como respuesta al fenómeno hipóxico entrando en un estado de estrés oxidativo (Jiang et al., 2009). No obstante, los estudios sobre los mecanismos y/o enzimas que el camarón activa para contrarrestar el estrés oxidativo son escasos, por lo que se ahondará en el tema en los apartados siguientes.

2.2 Mitochondria: La Fuente Energética de la Célula

2.2.1 Morfología y Función de las Mitochondrias

Las mitochondrias son organelos presentes en el citoplasma de las células eucariotas, encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular mediante el proceso denominado fosforilación oxidativa. Las mitochondrias varían considerablemente en tamaño y forma dependiendo del tipo y estado metabólico de la célula, pero en general, son elipsoides de aproximadamente 0.5 μm de diámetro y 10 μm de largo. Estás cuentan con dos membranas: la membrana externa (MEM) y la (MIM) (Alberts et al., 1995).

La MEM contiene un número de proteínas porinas que permiten el transporte de solutos no específicos con pesos moleculares de hasta 5,000 Da (Scheffler, 2011), y actúa como una capa protectora para el organelo. Por otro lado, la MIM representa una barrera de permeabilidad a la mayoría de los solutos, separando así al espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Compuesta por una compleja mezcla de fosfolípidos, la MIM tiene un alto contenido de proteínas de membrana y es particularmente rica en enzimas que son cruciales para las

funciones mitocondriales, estas proteínas representan alrededor del 75% (en peso) de las proteínas de la MIM (Becker et al., 2003).

2.2.2 La Fosforilación Oxidativa

La producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa es la función más importante realizada por las mitocondrias. El mecanismo de síntesis de ATP en la mitocondria fue propuesto por Mitchell (1961), a través de su teoría quimiosmótica en donde los electrones generados durante el catabolismo celular conducen a la síntesis de los donadores de electrones (NADH y FADH₂). Ambos sustratos localizados en la matriz mitocondrial donan sus electrones a una serie de complejos enzimáticos embebidos en la MIM, mismos que constituyen la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Sánchez y Arboleda, 2008). En esta cadena se desarrollan distintas reacciones bioquímicas catabólicas que liberan importantes cantidades de energía, la cual se almacena en forma de ATP y es usada para mantener la actividad celular.

En la cadena de transporte de electrones el Complejo I (NADH deshidrogenasa) recibe los electrones del NADH, mientras que el Complejo II (succinato deshidrogenasa) recibe los electrones del FADH₂. Además existen otras fuentes de oxidación como los ácidos grasos o la oxidación de la gliceraldehído-3-fosfato que donan electrones directamente a Q (la ubiquinona), los electrones pasan sistemáticamente a través de los complejos respiratorios III (citocromo reductasa) y IV (citocromo c oxidasa). El receptor final de los electrones, es el O₂ molecular para producir dos moléculas de agua (Ryan y Hoogenraad, 2007).

Simultáneamente con el transporte de electrones, cuatro protones son bombeados desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, por cada uno de los complejos (excepto el complejo II), lo que establece un

gradiente electroquímico de protones a través de la MIM. La diferencia en el potencial redox entre los componentes de la cadena respiratoria permite la extrusión de protones de la matriz en los complejos I, III y IV, misma que establece una fuerza protón motriz (FPM). Esta fuerza motriz de protones se disipa cuando los protones viajan de nuevo hacia la matriz, principalmente a través del complejo V ó F_0F_1 -ATP sintasa, el cual genera ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) (Berg et al., 2002). Por lo tanto, el vínculo crucial entre el transporte de electrones y la producción de ATP es el gradiente electroquímico de protones. En el caso de que estos procesos ocurran con un 100% de eficiencia, el transporte de electrones se acopla perfectamente con la producción de ATP.

2.2.3 La Mitocondria: el Principal Productor de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS)

Siendo el principal productor de ATP, las mitocondrias son también el sitio principal para la producción de EROS, donde el anión superóxido (O_2^-) es el precursor principal. La producción de O_2^- ocurre cuando la FPM es alta y los componentes de la cadena respiratoria se encuentran en sus estados reducidos, los electrones liberados de los complejos I y III pueden reducir univalentemente el O_2 a O_2^- . Por su parte, el complejo III también puede generar EROS tanto en el espacio intermembranal, como en el lado de la matriz mitocondrial (Guerrero-Castillo, 2012).

El anión superóxido producido en la mitocondria es extremadamente reactivo. Por lo general, participa en reacciones en cadena rápidas dando lugar a efectos degradativos. El estrés oxidativo causa daños a las macromoléculas celulares tales como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, y por lo tanto conduce a su pérdida en estructura y función. Estos daños son el agente causante de muchas condiciones patológicas incluyendo la aterosclerosis,

hipertensión, isquemia-reperfusión, fibrosis quística, cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Echtay, 2007).

La reducción en la producción de superóxido desempeña un papel importante en la protección celular y la supervivencia. En la mitocondria hay varios sistemas de defensa antioxidantes, incluyendo enzimas (catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa), antioxidantes de bajo peso molecular (ascorbato, glutatión, compuestos fenólicos, tocoferoles) y varios transportadores de electrones (ubiquinona, la CoQ). Los mecanismos de desacoplamiento, producen una pequeña disminución en el potencial de membrana, por lo que se sugiere que tienen un efecto antioxidante natural (Echtay, 2007).

En los vertebrados uno de los mecanismos de desacoplamiento para regular la producción de O_2^- por las mitocondrias es la activación de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3, que atraviesan la MIM y al abrirse permiten la fuga de protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial disminuyendo la FPM y por lo tanto la producción de EROS (Figura 2). Existen además, otras proteínas mitocondriales como la adenin-nucleótido translocasa (ANT) también conocida por inducir la fuga de protones basales; sin embargo, su papel en la fuga de protones para controlar la producción de EROS en la mitocondria sigue siendo controversial (Mailloux y Harper, 2011).

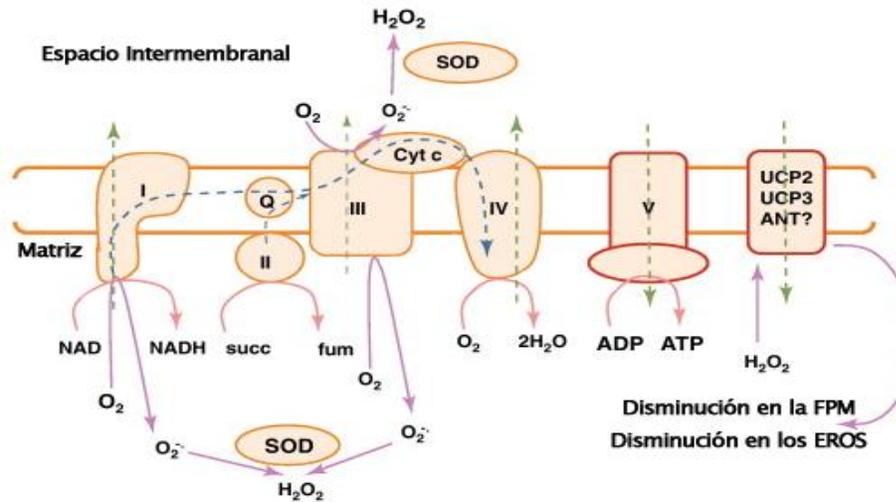


Figura 2. La respiración aeróbica y la auto-regulación de la producción de EROS mitocondrial. La dirección del flujo de electrones se indica por la línea azul punteada. La extrusión y/o importación de protones se indican con flechas de color verde, tomado de Mailloux y Harper (2011).

2.3 Proteínas Desacoplantes: Estructura y Función

2.3.1 Características Generales de las Proteínas Desacoplantes (UCPs)

En los mamífero, los miembros de la familia de acarreadores de soluto mitocondrial 25 (SLC25) son proteínas que funcionan como transportadores de una gran variedad de moléculas incluyendo ATP, ADP y aminoácidos como el glutamato, aspartato, lisina, histidina, arginina, ornitina, citrulina, compuestos como el malato y el calcio (Palmieri, 2004; Bassi et al., 2005). Todos los SLC25s (en total más de 40 miembros) se localizan en la membrana mitocondrial interna con la excepción de SLC25A17 (Palmieri, 2004) y 14 de los miembros SLC25 se encuentran expresados en el sistema nervioso central.

Dentro de la familia SLC25 existe una subfamilia de cinco proteínas denominadas proteínas desacoplantes ó UCPs, que son transportadores que

permiten la fuga de protones desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial. De esta manera el gradiente de protones generado durante la cadena de transporte de electrones se disipa y se desacopla la respiración de la síntesis de ATP. La subfamilia incluye: SLC25A7 (UCP1), SLC25A48 (UCP2), SLC25A9 (UCP3), SLC25A27 (UCP4), y SLC25A14 (UCP5) (Kim-Han et al., 2001).

Las proteínas de la familia SLC25 comparten algunas características comunes, estructurales y topológicas. Por ejemplo, todas las proteínas están codificadas por genes nucleares y su estructura primaria es tripartita con tres dominios de repetición, cada uno compuesto de dos regiones hidrofóbicas transmembranales α -helicoidales que se extienden a través de la MIM. Las dos hélices adjuntas que forman cada región repetida están conectadas por un bucle hidrófilico largo orientado hacia la matriz. Además, ambos extremos N- y C-terminal de éstas proteínas se encuentran en el espacio intermembranal (Figura 3; Pebay-Peyroula et al., 2003) .

Por último, existe un motivo conservado en la familia de acarreadores de soluto mitocondrial que es PxD/ExxK/RxK/R- (20-30 residuos) D/EGxxxxaK/RG (donde, x puede ser cualquier aminoácido). Este motivo se puede encontrar en cada región repetida con ligeras modificaciones en una o las dos secuencias de la firma de algunos acarreadores (Krauss et al., 2005; Nury et al., 2006). Los residuos de prolina situados en este motivo inducen un lazo que es responsable de la forma interceptada hacia la matriz. Mientras que los aminoácidos cargados tales como arginina y lisina pueden formar puentes salinos que fortalecen la conformación cerrada de la hélice (Krauss et al., 2005).

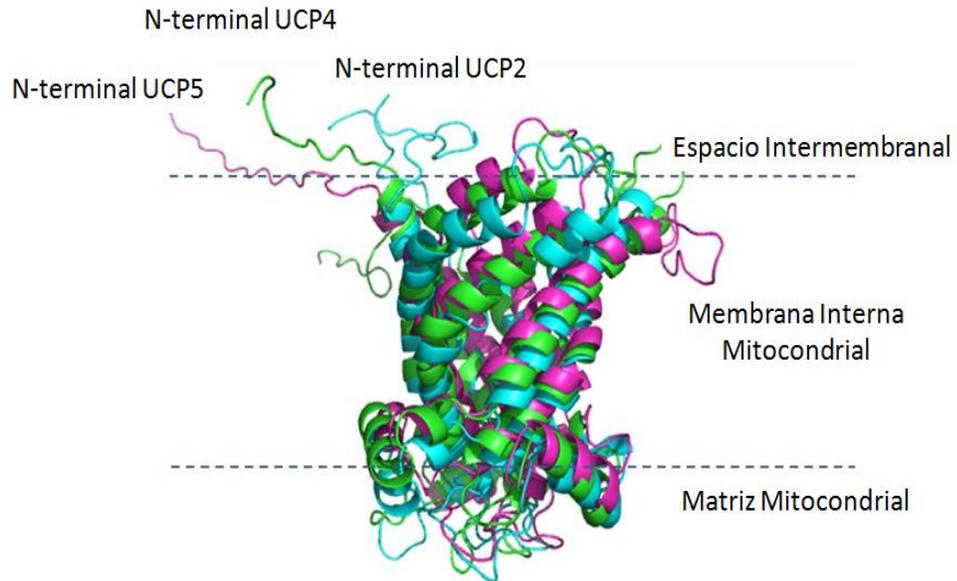


Figura 3. Superposición de los modelos estructurales 3D de la UCP2, UCP4, y UCP5 humanas, basados en la estructura cristalográfica del acarreador de ADP/ATP. Donde UCP2 se muestra en el listón azul, UCP4 se muestra en verde y UCP5 se muestra en magenta. Tomado de Pebay-Peyroula et al. (2003).

2.3.2 Homólogos de las Proteínas Desacoplantes

A la fecha, en el humano se han identificado cinco homólogos de las UCPs, de los cuales UCP1, 2 y 3 se han caracterizado a más detalle (Krauss et al., 2005). Estas proteínas se han encontrado también en otros vertebrados e invertebrados. Actualmente, se sabe que en la planta *Arabidopsis thaliana* están presentes tres isoformas de las UCPs nombradas PUM (por sus siglas en inglés) o proteínas mitocondriales desacoplantes de plantas (Borecký et al., 2001).

La mayoría de los estudios moleculares y estructurales sobre UCPs en humanos se han visto obstaculizados por la falta de estructuras cristalográficas disponibles. La estructura cristalográfica de la proteína de membrana acarreadora de ADP/ATP se ha utilizado como modelo para las UCPs, debido a

la similitud en el peso molecular (30-35 kDa) y a la secuencia primaria (~20% de identidad) entre ambas (Pebay-Peyroula et al., 2003).

En los organismos existe un gran número de procesos que podrían requerir de la participación de las UCPs. Por ejemplo, el mecanismo disipador de energía es utilizado por los mamíferos para mantener la temperatura corporal cuando están expuestos al frío e incluso para quemar el exceso de calorías ingeridas en la dieta (Nicholls y Rial, 1999). Además, las UCPs al catalizar la re-entrada de los protones a la matriz mitocondrial, aceleran la respiración mitocondrial y como consecuencia reducen la producción de EROS, siendo, por lo tanto, un elemento adicional de defensa frente al estrés oxidativo (Carrión et al., 2013).

La UCP1 de humano se expresa exclusivamente en el tejido adiposo marrón (BAT, por sus siglas en inglés), y es activada por los ácidos grasos libres y el superóxido (Echtay, 2007) e inhibida por los nucleótidos trifosfato y difosfato de purina (ATP, ADP, GTP y GDP) (Krauss et al., 2005). A pesar de que su participación en la termogénesis sigue siendo clara, no hay pruebas suficientes para apoyar el papel de la UCP1 en la minimización de los niveles de EROS en este tejido específico. Sin embargo, la fuga de protones a través de UCP2 y UCP3, que colectivamente se expresan en una amplia gama de tejidos, si ha sido asociada con una disminución en la producción de EROS en las mitocondrias (Zorzano et al., 2004). Recientemente, se demostró que la glutationilación reversible de UCP2 y UCP3, y no de UCP1, es responsable de la activación y desactivación de la fuga de protones en respuesta a pequeñas variaciones en los niveles de EROS. Por lo que, se sugiere que la glutationilación reversible de las UCPs puede controlar las emisiones periódicas de EROS (Mailloux y Harper, 2011).

En el caso particular de la UCP4 y UCP5 de humano, a diferencia de las otras UCPs, se expresan predominantemente en el sistema nervioso central (SNC) y comparten los niveles más bajos de identidad en la secuencia aminoacídica con

los otros miembros de la familia (Sanchis et al., 1998; Mao et al., 1999). Por lo tanto, la información disponible sobre estas dos proteínas es mínima a la fecha.

Estos homólogos UCP4 y UCP5 tienen la estructura característica de las otras UCPs (descrita previamente), pero el mecanismo de transporte de protones todavía no está totalmente resuelto (Jastroch et al., 2010). En 1999, la UCP4 humana se identificó por primera vez como un nuevo miembro de la familia de las UCPs. El gen que codifica a ésta proteína se encuentra en el cromosoma 6p11.2-q12, y da lugar a un transcrito único que se traduce en una proteína de 323 aminoácidos de aproximadamente 34 kDa (Mao et al., 1999). A la fecha, se ha reportado que en el cerebro de ratones los niveles de ARNm de UCP4 y UCP5 son modulados por la dieta o por los cambios de temperatura. El papel de UCP4 en la regulación de EROS se ha descrito sólo en las células neuronales (Lambert et al., 2014).

Por su parte, el gen que codifica la UCP5 en el humano, se localiza en el cromosoma Xq24. La UCP5 fue descrita y nombrada como portador mitocondrial de la proteína-1 del cerebro (BMCP1) (Sanchis et al., 1998). La UCP5 se encuentra expresada en diversos tejidos y órganos, incluyendo el cerebro (corteza, hipotálamo, sistema límbico, el cerebelo, ganglios basales, y médula espinal), testículos, útero, riñones, pulmones, estómago, hígado y corazón (Sanchis et al., 1998; Andrews et al., 2005; Echtay, 2007). Se han identificado al menos tres isoformas de UCP5 en el humano, la forma larga que contiene 325 aminoácidos (UCP5L), la forma corta que contiene 322 aminoácidos con la supresión de Val-Ser-Gly (VSG) en la posición 23-25 (UCP5S) y por último la forma de inserción corta que contiene 353 aminoácidos con VSG eliminado, pero la inserción de 31 aminoácidos entre los dominios transmembranales III y IV (UCP5SI) (Kondou et al., 2000; Yu et al., 2000; Kim-Han et al., 2001; Lengacher et al., 2004; Palmieri, 2004; Echtay, 2007).

2.3.3 Las UCPs de los Invertebrados

Los invertebrados son un grupo que está compuesto de varios phyla tales como anélidos, moluscos, esponjas, cnidarios, equinodermos y todas las especies del phylum Arthropoda (insectos, arácnidos y crustáceos). Estas especies desempeñan un papel ecológico importante, ya que con frecuencia son los componentes clave de muchas cadenas tróficas y ocupan prácticamente todos los ecosistemas disponibles en la tierra. Además, muchas especies ocupan posiciones muy importantes y específicas en la naturaleza como polinizadores, parásitos o vectores de enfermedades parasitarias que afectan a la salud humana y animal (Martinez-Cruz et al., 2012).

En los invertebrados, principalmente los artrópodos, se ha propuesto que sólo están presentes los homólogos de UCP4 y UCP5 (Sokolova y Sokolov, 2005). Sin embargo, la caracterización funcional y la relevancia fisiológica de las proteínas UCP en este grupo de animales aún son poco conocidas. Uno de los primeros homólogos de UCPs reportados fue identificado en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* por Hanák y Ježek (2001) quienes, identificaron las características estructurales y los motivos UCP-específicos en el genoma de *D. melanogaster*. Posteriormente, Fridell et al. (2004) realizaron la caracterización funcional de la UCP5 de *D. melanogaster* (*DmUCP5*) sobre-expresada en levaduras. Ellos demostraron que *DmUCP5* es 53% idéntica a UCP5 de humano y que el incremento en sus niveles de expresión en las mitocondrias desacopladas de la mosca (estado respiratorio 4) promueve un aumento en las tasas de respiración y la disminución en el $\Delta\Psi_m$, lo cual evidenció la actividad desacoplante de esta proteína. Además, se demostró que, en la mosca la proteína incrementa su expresión en los adultos y de manera específica se detectó mayor número de transcritos en la cabeza de estos. Cuatro UCPs han sido identificadas a la fecha en *D. melanogaster*, es decir, UCP4A, 4B, 4C y 5, y estudios específicos sobre *DmUCP5* han

demostrado que esta proteína no interviene en el desacoplamiento (Da-Ré et al., 2014).

En el 2011, Slocinska et al. identificaron y caracterizaron una proteína desacoplante de las mitocondrias aisladas del músculo de la pierna y de la grasa corporal de la cucaracha *Gromphadorhina coquereliana* (GcUCP), un tejido de los insectos análogo al hígado y al tejido adiposo de los mamíferos. Estos autores encontraron que en las mitocondrias en estado no fosforilante (estado respiratorio 4), la actividad de GcUCP incrementó como resultado de la adición de concentraciones micromolares de ácido palmítico y fue inhibida por los nucleótidos de purina GTP. Por otra parte, en mitocondrias en estado de fosforilación (estado respiratorio 3), la actividad GcUCP fue capaz de desviar la energía de la fosforilación oxidativa. Estos estudios indicaron una mayor actividad de desacoplamiento mediada por GcUCP en las mitocondrias del músculo en comparación con las mitocondrias del tejido graso corporal. La activación de GcUCP por ácido palmítico resultó en una disminución en la producción de anión superóxido, lo que sugirió que la protección contra el estrés oxidativo mitocondrial puede ser un papel fisiológico de las UCPs en los insectos. Además, la proteína GcUCP se inmunodetectó usando anticuerpos generados contra UCP4 de humano como una única banda de alrededor de 36 kDa (Slocinska et al., 2011).

En el 2012, Slocinska et al. estudiaron la proteína desacoplante 4 (*ZaUCP4*) del escarabajo *Zophobas atratus*, la cual mostró una alta similitud con las isoformas de UCP4 de insectos y de mamíferos, tanto en su secuencia nucleotídica como aminoacídica. Los resultados demostraron que en el estado respiratorio 4 (no fosforilación), la actividad de *ZaUCP* fue estimulada por el ácido palmítico e inhibida por el nucleótido de purina GTP. En el estado respiratorio 3, la actividad de *ZaUCP4* disminuyó el rendimiento de la fosforilación oxidativa y se inmunodetectó con anticuerpos generados contra UCP4 de humano teniendo

como resultado una banda única de 36 kDa. Estos resultados son consistentes con lo descrito previamente para la mosca de la fruta.

En fechas más recientes, en la chinche hematófaga *Rhodnius prolixus*, identificaron dos genes que codifican para las proteínas UCP (*RpUCP4* y *RpUCP5*) (Alves-Bezerra et al., 2014). *RpUCP4* es el transcrito predominante en la mayoría de los órganos de *R. prolixus*, y la expresión del ARNm y la proteína en los enterocitos aumenta después de la alimentación. El aumento en la expresión de *RpUCP4* también coincide con la disminución de la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las células de intestino medio. Además, en mitocondrias aisladas de los enterocitos, la modulación de la actividad UCP por ácido palmítico y el GDP resultó en un $\Delta\Psi_m$ alterado, así como la modulación de las tasas de generación de H_2O_2 . Estos resultados sugieren que la UCP4 de *R. prolixus* puede funcionar como un mecanismo antioxidante para proteger a las células del intestino medio contra el daño oxidativo causado por la digestión de la sangre.

Los escasos estudios realizados en los insectos a la fecha sugieren que las secuencias de los homólogos UCP4 y UCP5 se encuentran altamente conservadas y además éstas causan un efecto significativo tanto en la tasa de respiración mitocondrial, como en la producción de especies reactivas de oxígeno. Derivado de esos estudios surge la hipótesis que los crustáceos, al compartir un ancestro común con los insectos, pueden contener proteínas desacoplantes con secuencias similares y que podrían tener algunas de las funciones sugeridas para las UCPs de los insectos.

2.3.4 Respuesta de las UCPs ante la Hipoxia

Existen diversos estudios sobre el efecto de la hipoxia en los organismos vertebrados y la expresión de las proteínas desacoplantes. Por ejemplo, el

estudio realizado en 2012 por Braun et al. en células humanas del carcinoma renal, en donde se reportó que la expresión de la UCP3 en las áreas hipóxicas del tumor canceroso puede jugar un papel importante en la adaptación de las células tumorales a la hipoxia. Mientras que el estudio realizado por Zhou et al. (2000) mostró que la hipoxia induce la expresión de las UCP3 en el músculo esquelético de la rata. Dichos aumentos en la expresión de UCPs son a la vez rápidos, sin embargo, es la cantidad de proteína la que tiene potenciales consecuencias funcionales.

En 2014, Bermejo-Nogales et al. (2014) evaluaron la expresión del ARNm de la UCP2 en el pez *Sparus aurata*, encontrando que se mantiene expresado en tejidos musculares alterados o hasta en la restricción glucolítica alimenticia (músculo esquelético blanco) y en condiciones altamente oxidativas (corazón y músculo esquelético rojo). Cuando el pez se expuso a condiciones de hipoxia (saturación de oxígeno 18-19%) la expresión del ARNm de UCP2 disminuyó en células sanguíneas. También se detectó un aumento en el hematocrito y hemoglobina en la sangre, en los niveles circulantes de glucosa y lactato y la actividad antioxidante plasmática total. Estos resultados demostraron que la expresión de UCP2 está regulada a nivel transcripcional y sugiere que la UCP2 es una pieza importante del complejo equilibrio entre sensores metabólicos y estados redox. Esta característica podría evitar la activación de los ciclos fútiles de derroche de energía si los cambios en el tejido oxidativo y las capacidades antioxidantes pueden mantener regulada la producción de especies reactivas de oxígeno.

2.4 La Hipoxia en el Medio Acuático y su Efecto en el Camarón

La hipoxia es un fenómeno que puede ocurrir de manera cíclica en el ambiente marino o puede presentarse de manera espontánea bajo condiciones específicas como es el caso de los eventos hipóxicos dentro de los estanques

de cultivo (Dall et al., 1990). En el mar, los camarones migran hacia zonas estuarinas someras durante su desarrollo larvario y etapa juvenil, el agua presenta concentraciones de oxígeno cambiantes a lo largo del día desde la normoxia (6 mg/L), hasta condiciones de hipoxia (1-2 mg/L). En el día se sabe que la concentración de oxígeno disuelto en el agua incrementa debido a la alta incidencia solar característica de las zonas tropicales y a la producción continua de oxígeno de las microalgas presentes en el sistema a través de la fotosíntesis. Durante la noche, las concentraciones de oxígeno disuelto (OD) disminuyen debido a que la materia orgánica de desecho presente se oxida, no hay producción de oxígeno por fotosíntesis y además se mantiene el consumo de O₂ constante por los organismos. En estas condiciones, los camarones permanecen enterrados en el sedimento marino en donde la concentración de oxígeno es reducida (Hand y Hardewig, 1996).

Durante la reintroducción de O₂ (reoxigenación), los niveles de OD se restablecen, sin embargo, los organismos sometidos a hipoxia sufren a un estrés oxidativo. Las especies han desarrollado sus propios mecanismos adaptativos para mantener la homeostasis fisiológica en respuesta a condiciones ambientales desfavorables, incluyendo respuestas conductuales y fisiológicas a los cambios en la concentración de OD en el agua. Entre las respuestas se encuentra la depresión metabólica, el cambio de rutas metabólicas hacia las condiciones anaeróbicas, y las respuestas a nivel molecular que involucran la intervención del factor de transcripción HIF-1. Este regulador de la transcripción activa o reprime los niveles de expresión de los genes de varias proteínas y enzimas del metabolismo central en algunas especies de crustáceos en condiciones de hipoxia (Li y Brouwer, 2007; Martinez-Cruz et al., 2012).

En el periodo de hipoxia, la producción de ácido láctico, y durante el periodo de reoxigenación del sistema la producción de EROS también aumenta. Lo anterior provoca que el organismo responda activando su sistema antioxidante para

contrarrestar el daño a DNA, proteínas y lípidos entre otros (Ahuejote-Sandoval, 2004). Dentro de las principales enzimas antioxidantes del camarón se encuentran la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), la glutatión-peroxidasa (GPX), y la tiorredoxina (TRX) (Aispuro-Hernandez et al., 2008; García-Triana et al., 2010; Trasviña-Arenas et al., 2013; Wang et al., 2012). Sin embargo, a pesar de que en otros grupos de artrópodos como los insectos existen reportes de las proteínas desacoplantes como parte de la respuesta antioxidante de estos organismos, a la fecha no hay evidencia experimental de las proteínas desacoplantes en los crustáceos.

Por lo que, el objetivo del presente estudio es identificar en el camarón las proteínas desacoplantes homólogas a las de los mamíferos, caracterizar sus transcritos y las proteínas deducidas de los mismos. Además, evaluar el efecto de la hipoxia y reoxigenación en la expresión génica de estas proteínas para poder inferir sobre la función que estas cumplen en la mitocondria del camarón.

III. JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia económica del camarón blanco en el Noroeste de México y la escasez de conocimiento sobre la función mitocondrial y la bioenergética de los crustáceos, es imperativo ampliar el conocimiento y evaluar el efecto que causa la baja concentración de oxígeno en estos organismos. Especialmente es importante ampliar el conocimiento sobre las proteínas con función reguladora como las UCPs, cuya existencia en los crustáceos no ha sido confirmada y por consiguiente su función no ha sido esclarecida.

IV. HIPÓTESIS

El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* cuenta con dos proteínas desacoplantes homologas a UCP4 y UCP5, cuyos transcritos se expresan de manera tejido-específica y sus niveles de ARNm aumentan durante la hipoxia y reoxigenación.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Secuenciar y caracterizar el ADNc de las proteínas desacoplantes mitocondriales UCP4 y UCP5 del camarón blanco, evaluar su expresión génica en diferentes tejidos y cuando el organismo es expuesto a condiciones de hipoxia y reoxigenación.

5.2 Objetivos Específicos

1. Identificar y caracterizar la(s) secuencia(s) del ADNc y deducida de aminoácidos de las proteínas desacoplantes del camarón blanco.
2. Analizar las relaciones filogenéticas de las proteínas UCPs deducidas del camarón y construir un modelo estructural teórico de las mismas.
3. Evaluar la expresión de los transcritos en diferentes tejidos del camarón por PCR convencional para determinar su especificidad a tejidos.
4. Evaluar los cambios en los niveles de ARNm de los genes de las proteínas desacoplantes y cuatro enzimas antioxidantes: tioredoxina (TRX), glutatión-peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) en los camarones expuestos a hipoxia y reoxigenación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento del ARN Total de Varios Tejidos del Camarón Blanco *Litopenaeus vannamei*

El aislamiento de ARN total de los tejidos utilizados tanto para la secuenciación de los transcritos como para la evaluación de los niveles de ARNm, se realizó con Trizol[®] (Invitrogen, USA). Esta técnica se fundamenta en la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi (1987) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para la extracción del ARN se utilizaron 100 mg de cada uno de los tejidos (pleópodo, glándula digestiva, branquia, pedúnculo ocular, corazón, cordón nervioso e intestino), se homogenizaron con 500 μ L de Trizol[®] y una vez homogenizados, se adicionaron 200 μ L de cloroformo. La mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 $\times g$ por 15 min a 4 °C. Se colectó la fase acuosa y se repitió la extracción adicionando 500 μ L de Trizol[®].

Posteriormente, se obtuvo la fase acuosa de nuevo y se adicionó un volumen de isopropanol frío, se incubó por 10 min y se centrifugó a 12000 $\times g$ por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de etanol frío al 75% en agua tratada con 0.1% de dietilpirocarbonato (DEPC). Luego se centrifugó a 7500 $\times g$ por 5 min a 4 °C y de nuevo se descartó el sobrenadante, se eliminó el exceso de etanol remanente y se adicionaron 30 μ L de agua DEPC al 0.1% para resuspender el pellet de ARN total.

6.2 Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total

El ARN total obtenido fue cuantificado por duplicado, para ello se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 v 3.5.2 (Thermo scientific, USA), a una longitud de onda de 260 y 280 nm. Posteriormente, se evaluó la integridad del ARN total mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones nativas. Para llevar a cabo dicha electroforesis se tomó una alícuota de 1 µg de ARN total al cual se le agregaron 2.5 µL de buffer carga 6X (glicerol 50% [v/v], EDTA 1 mM pH 8, azul de bromofenol 0.25% [p/v], xileno cianol FF 0.25% [p/v]) y se incubó a 65 °C por 10 min; posteriormente la muestra se cargó en un gel de agarosa teñido con SYBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen, USA). La electroforesis se corrió a 60 V, durante 60 min en buffer TAE 1X. La visualización de las bandas características del ARN ribosomal se realizó en un fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Bio-Rad, USA), empleando el software Image Lab™ (Bio-Rad, USA).

6.3 Eliminación del ADN Genómico Contaminante en las Muestras de ARN Total

Para eliminar la contaminación por ADN genómico (ADNg) en las muestras de ARN total, se trataron 2 µg de muestra con DNasa I recombinante libre de RNasas (10 U/µL, ROCHE, USA) como lo indican las instrucciones del fabricante. Brevemente, se adicionó 1 µL de buffer de incubación 10X (Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.9) y 0.25 µL de DNasa para proceder a aforar a 10 µL con agua DEPC, la muestra se incubó por 20 min a 35°C y para inactivar la reacción se dejó 10 min a 75 °C. Después del tratamiento con la DNasa se realizó un PCR para confirmar la ausencia del ADNg, usando el ARN total tratado como templado. Cada reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 12.5 µL del Kit Taq PCR Master Mix® (250 U, QIAGEN,

USA), 1 μ L de cada oligonucleótido para amplificar el gen de la proteína tripsina del camarón, previamente probado como control en la amplificación de ADN genómico y se agregaron 200 ng de ARN total como templado.

Las reacciones de PCR se llevaron a un volumen final de 25 μ L con agua milli Q. Se utilizó como control positivo una reacción de PCR con ADN genómico de hepatopáncreas de camarón previamente aislado como templado. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron de 95 °C por 3 min (1 ciclo), 95 °C por 45 seg, 50 °C por 1 min y 72 °C por 2 min (33 ciclos) y un tiempo de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe ® DNA gel stain (Invitrogen, USA).

6.4 Síntesis del ADNc y Diseño de Oligonucleótidos Específicos

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 5 μ g de ARN total libre de ADNg de cada uno de los tejidos a evaluar (pleópodo, glándula digestiva, branquia, pedúnculo ocular, corazón, cordón nervioso e intestino), utilizando el kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (PROMEGA, USA) y siguiendo las indicaciones del fabricante. A cada reacción se le adicionaron 5 μ g de ARN total y 1 μ L de una mezcla de Oligo (dT)₁₅ (0.5 μ g/reacción). La muestra se incubó por 5 min a 70 °C y para inactivar la reacción se enfrió en hielo 1 min. Después se adicionaron a la mezcla 4 μ L de buffer de reacción GoScript™ 5X, 4 μ L de MgCl₂ 25 mM y 1 μ L de la mezcla dinucleótidos 10 mM Posteriormente, se adicionó 1 μ L de inhibidor recombinante RNasin® de ribonucleasas y 1 μ L de GoScript™ transcriptasa reversa. Se mezcló y se incubó a 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min y la reacción se completó mediante la incubación a 70 °C durante 15 min, después se colocó en hielo.

Después de la síntesis de ADNc se realizó una reacción de PCR utilizando 12.5 µL del Kit Taq PCR Master Mix ® (250 U, QIAGEN, USA) y se adicionó 1 µL de cada oligonucleótido específico para amplificar el transcrito COX III del camarón como control positivo. Se agregó ADNc (50 ng equivalentes de ARN total) como templado y las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 µL con agua milli Q. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron de 94 °C por 1 min (1 ciclo); 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min (1 ciclo); 94 °C por 1 min, 42 °C por 1 min, 72 °C por 3 min (1 ciclo); 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min (33 ciclos) y un tiempo de extensión final a 72 °C por 10 min. La amplificación se realizó en un termociclador DNA Engine ® Peltier Cyler (Bio-Rad, USA). Los amplicones logrados a partir de la PCR se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe ® DNA gel stain (Invitrogen, USA).

Para obtener la secuencia completa de los ADNc de las dos UCPs identificadas en el camarón se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada proteína (Tabla 1) basados en las secuencias ya reportadas de otras especies, las secuencias expresadas etiquetadas (EST, por sus siglas en inglés) de *L. vannamei* previamente depositadas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y contigs del Penaeus Genome Database (PAGE) (<http://molas.iis.sinica.edu.tw/lv/>) . Además de las secuencias que se identificaron como no etiquetadas, en el transcriptoma del camarón blanco (Ghaffari et al., 2014).

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de *Lv*UCP4 y *Lv*UCP5.

| Gen | Nombre del Oligonucleótido | Secuencia (5'-3') |
|-----|----------------------------|-----------------------|
| | UCP4Fw1 | AGATGCAGATGGAGGGAC |
| | UCP4Fw2 | CTCACCTTCTGGATCACCTAC |

| | | |
|-------------|------------|-------------------------|
| | UCP4Fw3 | CAAAGCACTACGCAGATTCAG |
| | UCP4Fw4 | GGACCGGTGTTGGAATTA |
| | UCP4Fw5 | TGATCTGACCACCTACGACTC |
| | UCP4Fw6 | ATGATACAGGCCCGTGAAG |
| UCP4 | UCP4Rv1 | CTCTGGGCGACTGGTAAC |
| | UCP4Rv2 | CTTCACGGGCCTGTATCAT |
| | UCP4Rv3 | CTTCTTCGTCCCTCCATCT |
| | UCP4Rv4 | GTAGGTGATCCAGAAGGTGAG |
| | UCP4Rv6 | TAATTCCAACACCGGTCC |
| | UCP4Rv7 | GAGTCGTAGGTGGTCAGATCA |
| <hr/> | | |
| | MITOCARFw1 | ACACGCCTGATGAACCAAAG |
| | MITOCARFw2 | GCAGTAAGTGGCAATGGT |
| | MITOCARFw3 | CCGAAGGTCTATGTGGCATT |
| | MITOCARFw4 | TGATGAAAGCAATGGACAAA |
| | MITOCARFw5 | CCTACATGGCTGAGACTTGG |
| | MITOCARRv1 | CCTACATGGCTGAGACTTGG |
| | MITOCARRv2 | TGCCACATAGACCTTCGG |
| | MITOCARRv3 | TTTGTCCATTGCTTTCATCA |
| UCP5 | MITOCARv4 | TATATTACCATTTCAACATCTCA |
| | MITOCARv5 | CAGAGCAAGGATTGAGTTTGG |
| | MITOCARv7 | CTTTGGTTCATCAGGCGTGT |
| | UCP5NFw1 | GTGTAATGGGACTGAGCG |
| | UCP5NFw2 | AGGTGTCAGGGCATTGTAT |
| | UCP5Fw3 | AACCAGGAGGGAATACAGG |
| | UCP5Fw7 | AAGAGCAGGGGTCATCG |
| | UCP5NRv1 | ATACAATGCCCTGACACCT |
| | UCP5NRv2 | TACGATGACCCCTGCTCTTT |
| | UCP5Rv3 | CCTGTATTCCCTCCTGGTT |
| <hr/> | | |
| | COX3LvFw1 | CCATTCCAATTCCCTCTCCTG |

| | | |
|----------------|-----------|-----------------------|
| COX III | COX3LvRv1 | GGCAATTGTAAATGGGGCTTC |
| L8 | L8LvFw3 | ACTTCCGTGACCCTTATC |
| | L8LvRv3 | GTCACCAGTCTTCTCCTC |

6.5 Amplificación y Secuenciación de los Transcritos *LvUCP4* y *LvUCP5*

Los fragmentos de cada *LvUCP* se amplificaron por PCR usando el Kit Taq PCR Master Mix® (250 U, QIAGEN, USA) como sigue: 12.5 µL de Taq mix, 2.5 µL de colorante coral, 1 µL de oligonucleótido específico 20 µM, 500 ng equivalentes al ADNc total como templado y agua milli Q para llegar a un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación del PCR para *LvUCP4* y *LvUCP5* fueron de 94 °C por 1 min (1 ciclo); 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min (1 ciclo); 94 °C por 1 min, 42 °C por 1 min, 72 °C por 3 min (1 ciclo); 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min (33 ciclos) y un tiempo de extensión final a 72 °C por 10 min. La amplificación se realizó en un termociclador DNA Engine® Peltier Cyler (Bio-Rad, USA). Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen, USA).

El extremo 5' y 3' de las secuencias nucleotídicas se obtuvo empleando la técnica de amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE, por sus siglas en inglés). Esta técnica consistió en sintetizar el ADNc a partir de ARN libre de ADNg mediante transcripción reversa con el kit comercial Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA). Posteriormente, se realizaron PCRs empleando un oligonucleótido específico (sentido ó antisentido, Tabla 1) que alinea hacia el extremo 3' o 5' de la secuencia y el oligonucleótido CDSIII/3'PCR (5'- ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d (T) 30N-1N-3'), en los casos en los que se buscó el extremo 3', o el

oligonucleótido 5'PCR (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') cuando se buscó el extremo 5'.

Las reacciones de PCR se realizaron usando 12.5 µL Taq PCR Master Mix ® (250U, QIAGEN, USA), 0.5 µL de oligonucleótido específico (20 µM; Tabla 1), 0.75 µL de oligonucleótido CDSIII/3'PCR (20 µM) o 5'PCR (20 µM) y 50 ng de ADNc. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 3 min (1 ciclo); 95 °C por 15 seg, 68 °C por 6 min y 95 °C por 15 seg (25 ciclos) en un termociclador DNA Engine ® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). El tamaño de las bandas amplificadas, fue verificado por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con SYBR Safe ® DNA gel stain (Invitrogen, USA). El análisis electroforético fue a 60 volts y las bandas fueron detectadas en un fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Bio-Rad, USA), empleando el software Image Lab TM (Bio-Rad, USA).

Los productos de PCR obtenidos de los fragmentos y los extremos 5'-3' de las UCPs fueron purificados por columnas del kit NucleoSpin ® Extract II (Macherey-Nagel, Alemania), de acuerdo a las condiciones del fabricante. Posteriormente, cada producto amplificado se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop ® ND-1000 v 3.5.2 (Thermo scientific, USA) y se envió a secuenciar en el Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática de la Universidad de Arizona (Tucson, Arizona, USA).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas y las deducidas de aminoácidos fueron comparadas con las bases de datos de nucleótidos no redundantes y de proteínas, respectivamente utilizando los algoritmo BLAST N, X y P (Altschul et al., 1990). Los alineamientos fueron realizados con el algoritmo Clustal Ω (Sievers et al., 2011). Las secuencias deducidas de aminoácidos se obtuvieron empleando las herramientas del sitio web Expasy (<http://www.expasy.org/tools/>) y el software Mitoprot (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) fue utilizado para el

análisis de las secuencias de las proteínas mitocondriales (Claros y Vincens, 1996).

6.6 Modelación *In Silico* de la Estructura Tridimensional de *LvUCP4* y *LvUCP5*

Los modelos teóricos 3D de las proteínas *LvUCP4* y *LvUCP5* se generaron utilizando procedimientos de comparación por homología con las coordenadas de la proteína UCP2 de ratón ya depositada en el banco de datos de proteínas (PDB) con el código 2lck.1 (Berardi et al., 2011), con un 36.14 y 38.43% de identidad para *LvUCP4* y *LvUCP5*, respectivamente. Las coordenadas de los modelos se construyeron utilizando el servidor de SWISS-MODEL (Guex y Peitsch, 1997; Schwede et al., 2003) y Phyre2 (Kelley et al., 2015), disponibles en <http://swissmodel.expasy.org/> y <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>. La visualización de los modelos teóricos de *LvUCP4* y *LvUCP5* se realizó en el software PyMOL^(TM) Molecular Graphics System, Versión 1.7.5.0 y en el software CCP4MG Versión 2.10.6 (McNicholas et al., 2011).

6.7 Análisis Filogenético de las UCPs

Las relaciones filogenéticas de las proteínas desacoplantes del camarón se determinaron incluyendo tanto las secuencias deducidas de aminoácidos *LvUCP4* y *LvUCP5* obtenidas en este estudio, como las secuencias aminoacídicas de UCPs disponibles en el GenBank de varias especies de vertebrados e invertebrados. Todas las secuencias aminoacídicas se alinearon utilizando el algoritmo Clustal Ω (Sievers et al., 2011) y la construcción de la hipótesis filogenética del conjunto de datos se realizó utilizando el método de distancia de datos Neighbor-Joining con delección parcial (Saitou y Nei, 1987).

Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de la matriz-basado en JTT (Jones et al., 1992). El árbol de consenso de arranque (bootstrap) de 1000 repeticiones fue tomado para representar la historia de la evolución de los taxones. Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50% de repeticiones de arranque se eliminaron. El porcentaje de los árboles replicados en los taxones agrupados en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Cada árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis evolutivo se llevó a cabo utilizando el software MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013) .

6.8 Expresión Génica de los Trascritos *LvUCP4* y *LvUCP5* en Diferentes Tejidos del Camarón

Una vez establecidas las condiciones de amplificación de *LvUCP4* y *LvUCP5* para evaluar la expresión de los transcritos se utilizaron las muestras de un ensayo realizado previamente por el equipo de trabajo en Julio de 2015 (Dra. Adriana Muhlia, comunicación personal). En el bioensayo la concentración de oxígeno se redujo gradualmente por un periodo de 3 h hasta llegar a 1.5 mg/L, se mantuvo a los organismos a esta concentración por otras 3 h y los organismos fueron muestreados. Para reoxigenar el sistema se retiró el nitrógeno y se reincorporaron las piedras aireadoras hasta llegar a una concentración de oxígeno de 5 mg/L nuevamente, se expuso a los organismos a esta concentración por 6 h y se tomó la muestra.

De cada organismo se disectaron varios tejidos u órganos incluyendo los pleópodos (PI), las branquias (Br), los pedúnculos oculares (PO), la glándula digestiva (Hp), el músculo (M), el corazón (Co), el cordón nervioso (CN) y el intestino (In). Se extrajo el ARN total de cada tejido, se cuantificó y su integridad

fue verificada de acuerdo a los métodos antes mencionados. El ADN genómico se eliminó y se realizó la síntesis de ADNc siguiendo los protocolos previamente descritos. Se establecieron las condiciones óptimas para la amplificación de las UCPs por PCR convencional.

El tamaño de las bandas resultantes de las amplificaciones por PCR se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con SYBR Safe® DNA gel stain (Invitrogen, USA). Las bandas fueron detectadas en un fotodocumentador de luz UV Gel Doc EZ (Bio-Rad, USA), empleando el software Image Lab™ (Bio-Rad, USA).

6.9 Cuantificación del ARNm de las UCPs y las Enzimas Antioxidantes del Camarón en Condiciones de Estrés Oxidativo

6.9.1 Organismos Experimentales y Bioensayo en Condiciones de Hipoxia

Para evaluar los niveles de expresión de las UCPs a niveles del transcrito del camarón en condiciones de estrés oxidativo se utilizaron las muestras de un ensayo de hipoxia y reoxigenación previamente realizado (Martínez Cruz et al., 2011). Brevemente, se utilizaron 90 adultos de la especie *L. vannamei* (30 ± 1 g cada uno), los cuáles se adquirieron de granjas acuícolas de La Paz, B. C. S, México y se mantuvieron en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) localizado en la ciudad de La Paz, B.C.S. Los organismos se distribuyeron al azar en 6 tanques de plástico (1000 L de capacidad) llenos con 300 L de agua marina. Durante el periodo de aclimatación (8 días) los camarones se mantuvieron a 28 °C, 35 ppm de salinidad y una concentración de oxígeno disuelto en el agua 6 mg/L

(normoxia). Los camarones fueron alimentados dos veces al día con alimento peletizado. Se realizaron recambios diarios del 50 % del agua.

Después de la aclimatación los camarones se mantuvieron en ayuno por 24 h. En tres tanques los camarones se mantuvieron en condiciones control y en los 3 restantes se indujo la condición de hipoxia. Tres organismos fueron muestreados de cada tanque, tanto en los tratamientos de hipoxia como en los tratamientos controles. Se partió del tratamiento control (6 mg/L) al tiempo cero, para inducir hipoxia se retiraron las piedras aireadoras, se reemplazó el oxígeno del agua por nitrógeno gaseoso y los tanques fueron cubiertos con bolsas plásticas negras para evitar el contacto con el oxígeno atmosférico. La concentración de oxígeno fue constantemente monitoreada por medio de un oxímetro sumergible digital (Ohaus, USA).

Durante el periodo de hipoxia los organismos fueron muestreados a diferentes concentraciones de oxígeno (6, 2, 1.5, 2, 7 mg/L), la concentración de oxígeno se redujo gradualmente por un periodo de 3 h hasta llegar a 2 mg/L, se mantuvo a los organismos a esta concentración por otras 3 h y los organismos fueron muestreados. Inmediatamente después se redujo el oxígeno hasta 1.5 mg/L y se mantuvo a los organismos en esta condición por 6 h y se tomó la muestra. Para reoxigenar el sistema se retiró el nitrógeno y se reincorporaron las piedras aireadoras hasta llegar a una concentración de oxígeno de 2 mg/L nuevamente, se expuso a los organismos a esta concentración por 6 h y se tomó la muestra. Finalmente, en un periodo de 3 h se incrementó la concentración de oxígeno paulatinamente hasta llegar a una concentración final de 7 mg/L, se mantuvo a los organismos en este tratamiento por 3 h más y se tomó la muestra. El bioensayo duró un total de 24 h y en cada condición 3 organismos fueron muestreados de cada tanque.

A cada camarón se le extrajeron 400 μ L de hemolinfa a partir de la base del quinto pereiópodo, utilizando una jeringa de 1 mL conteniendo dos volúmenes

de solución anticoagulante fría (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, NA₂-EDTA 10mM, HEPES 10 mM, pH 7.3) reportada por Vargas-Albores et al. (1993). Cada muestra de hemolinfa se centrifugó a 700 x g por 10 min a 4 °C, el plasma y los hemocitos fueron separados y almacenados a -80 °C hasta su uso. Posteriormente, los camarones se sacrificaron y se disectaron el músculo, las branquias y el hepatopáncreas. El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20 °C.

6.9.2 Cuantificación de las Concentraciones de Lactato en Plasma

Se tomaron y analizaron los datos previamente obtenidos de la cuantificación de L-lactato en el plasma de los organismos experimentales. Se utilizó el kit comercial L-LACTATE-PAP (Randox, USA) para cuantificación de lactato ajustando las instrucciones del fabricante para su evaluación en microplaca; tal como lo describe Martínez-Cruz et al. (2012).

6.9.3 Aislamiento, Cuantificación, Evaluación de la Integridad y Eliminación del ADN_g Contaminante Presente en las Muestras de ARN total

El ARN total se extrajo de las branquias de los organismos experimentales, se cuantificó, se evaluó su integridad en geles de agarosa y se eliminó el ADN_g contaminante de cada una de las muestras como se describió anteriormente en los apartados 6.1, 6.2 y 6.3.

6.9.4 Cuantificación del ARNm por PCR en tiempo real

La evaluación de los niveles de ARNm de las UCPs y de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), tiorredoxina (TRX), glutatión-peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), se llevó a cabo por qRT-PCR en tiempo real utilizando el equipo StepOne (Applied Biosystems®, USA). Se utilizó el gen de la proteína ribosomal L8 (**DQ316258.1**) como control interno. Se utilizaron sondas TaqMan® específicas (Tabla 2) diseñadas para cada uno de los genes (Applied Biosystems®, USA). La cuantificación del ARNm se llevó a cabo por triplicado para cada muestra utilizando una mezcla OneStep Brilliant II QRT-PCR Master Mix Kit (Agilent, USA). Cada reacción incluyó 10 µL de la mezcla 2X OneStep, 1 µL de sonda TaqMan® (20X), 0.8 µL de enzima RT/RNase block enzyme mixture, 150 ng de ARN libre de ADNg y agua libre de pirógenos hasta alcanzar un volumen final de 20 µL. En la corrida final para cada gen evaluado se incluyeron controles sin templado (NTCs) para confirmar la ausencia de contaminación. Las condiciones de amplificación fueron: 50°C por 30 min, 95 °C por 15 min, seguido por 45 ciclos a 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min; la fluorescencia fue tomada a los 60 °C después de cada ciclo de amplificación.

Tabla 2. Características de las sondas TaqMan utilizadas en la evaluación de la expresión génica de *LvUCP4*, *LvUCP5*, CAT, TRX, GPX, MNSOD y L8 en las branquias del camarón.

| Gen | Oligonucleótido | Oligonucleótido | Secuencia de la sonda (5'-3') |
|------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Sentido (5-3') | Antisentido (5-3') | |
| UCP4 | CCGAAGGTCTATGTGGCATTAAAGAA | CAACAAGATTATAAGCTGCACTTCACTT | ATGCTACCAGGTTTCC |
| UCP5 | AGGGCATTGTATTTCCGGTATTGCT | GGAGTAATAAATGCCAAACTTGATGGT | CCGTCAGGCAACATA |
| CAT | ACATGGTGCCGGGTATTGAG | AGAAAAGAGGCGACCTTGCA | TTCCCCTGACAAAATG |
| TRX | GTGGATGTGGATGAATGTGAAGAC | CAAGCTTCTGGCCATTCTTCATG | ATTGCCCAAGATAACC |
| GPX | TGCATCATTGGACACCTGTCT | GCCGATGAGGAATTTCTCGAAGTT | CCGCTCTGACATTGC |

| | | | |
|-------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| MNSOD | AACATGGCTCCCGATGCT | CGTCAATGGCTTGTGCAACAG | CCTTGCGGCTCGCCAC |
| L8 | ATTTGCAACCTTGAGGAGAAGACT | TGGGCAATGACCTGAGCATAATT | ATCCACGGGCAATACG |

* Las sondas TaqMan® fueron marcadas con FAM, como fluoróforo reportero y NFQ como opacante.

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

$$2^{-(\Delta\Delta C_t)} = -((C_{qGenx} - C_{qL8}) \times mg/L - (C_{qGenx} - C_{qL8}) 6 \text{ mg/L}) \quad (1)$$

En donde C_{qGenx} es el promedio del C_t de la subunidad evaluada, C_{qL8} es el promedio del C_t del gen constitutivo L8, $X \text{ mg/L}$ es la condición experimental (durante hipoxia) y 6 mg/L es la normoxia (controles).

Los resultados se expresaron como el cambio en la expresión génica de la subunidad evaluada normalizada con respecto a la expresión del gen L8 como control interno y relativa a la condición de normoxia (6 mg/L OD). Previo a la corrida final, fue necesario evaluar la eficiencia de la amplificación (E) a través de la construcción de una curva estándar que tuvo como templado una dilución serial 1:5 del ARN total. Las eficiencias fueron determinadas para cada gen siguiendo la fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})-1} \quad (2)$$

debido a que en la evaluación por del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ tiene como requisito que las pendientes y las eficiencias de amplificación deben ser similares (Livak y Schmittgen, 2001).

6.10 Análisis Estadístico

Los datos de Ct fueron analizados para determinar la normalidad y homocedasticidad de la muestra. Para buscar significancia entre los datos se usó análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las diferencias entre tratamientos fue por medio de pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer, con un nivel de confianza del 95% ($p = 0.05$) usando el software NCSS 2007.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de las Secuencias Nucleotídicas y Deducidas de Aminoácidos de las Proteínas Desacoplantes *LvUCP4* y *LvUCP5* del Camarón Blanco *L. vannamei*

Se identificaron en el transcriptoma del camarón blanco *L. vannamei* (Ghaffari et al., 2014) dos transcritos que codifican para dos proteínas desacoplantes putativas. Estas proteínas fueron denominadas como *LvUCP4* y *LvUCP5*, de acuerdo a los porcentajes de identidad con respecto a las proteínas de otros organismos ya reportadas en el GenBank.

7.1.1 La UCP4 del Camarón

La secuencia de *LvUCP4* consta de 1809 pb, con un codón de inicio ATG localizado en la posición 1, el codón de término TAG que se encuentra en la posición 957, y una región 3' UTR (untranslated region, por sus siglas en inglés) de 850 pb, la cual incluye la señal de poliadenilación en la posición 1763 y la cola poliA en la 1780. La región codificante tiene una longitud de 959 pb y codifica a una proteína deducida de 318 residuos, con un peso molecular calculado de 35.349 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 9.65 (Figura 4).

```

-5      C G G G G A T C G T G G T G G C T C A G C G A G G G G T T A T C C C G C C C C A A A G C A C T A C G C A G A T T C A
1      M V V A Q R G V I P P P K H Y A D S
55     G C C T G G T T C A A G T A T A T T T T G T C G T G C T G T G C A A C C A C A G C G G A G C T A G T C A C A T A T
19     A W F K Y I L S C C A A T T A E L V T Y
115    C C A C T G G A C T T G G C C A A A A C T C G A C T C C A G A T C C A G G G G A A A A A G G A C T C A A C A G C A A T
39     P L D L A K T R I Q I Q G E K G L N S N
175    G G C T T G C A A C C T T A C A G A G G C T T G G C A G G G A C C G G T G T T G G A A T T A T A C G A G A A G A G G G A
59     G L Q P Y R G L A G T G V G I I R E E G
235    G C A C T A A A G T T A T G G C A A G G T A T T A C T C C A G C T G T A T A T A G G C A T T T A A T A T A T T C T G G C
79     A L K L W Q G I T P A V Y R H L I Y S G
295    A C A C G T A T G G T C C T T T A T G A G A A G G T A C G A G A T C A C C T C T T T A C A A C A C G G C C T G A T G G C
99     T R M V L Y E K V R D H L F T T R P D G
355    A C A A G G C C A G T C T G G C A G G C C A T T G T G G G A G G T A T T T T A G T G G G A G G A A T T G C A C A A T T C
119    T R P V W Q A I V G G I L V G G I A Q F
415    C T G G C C T C C C C T G C T G A C C T G G T C A A A G T G C A G A T G C A G A T G G A G G G A C G A A G A A G G C T G
139    L A S P A D L V K V Q M Q M E G R R R L
475    G A A G G C A A C C C C C A C A G A G T T C A C T C A G C T G G G G A A G C C T T C A T C A A G A T C T A T C A A G C A
159    E G K P P R V H S A G E A F I K I Y Q A
535    G G T G G A A T G C G T G G G C T G T G G A A A G G T T G T A T G C C A A T G T C T A T C G G T C A G C A C T A G T C
179    G G M R G L W K G C M P N V Y R S A L V
595    A A C C T C G G T G A T C T G A C C A C C T A C G A C T C A G T C A A G A G A T A C T T T T G T G A A C A G T T G G G G G
199    N L G D L T T Y D S V K R Y F V N S W G
655    T T G C C C G A T A C A T A T T G G A C C C A T G C T T T G T C A A G T A C C T T A T C T G G C C T G G T G C G G C
219    L P D T Y W T H A L S S T L S G L V S A
715    G T C T T G G G C T G C C C T G C C G A C G T A G T T A A G G C C A G G A T A A T G A A C C A G C C A A C T G A C A G T
239    V L G C P A D V V K A R I M N Q P T D S
775    A A G T C C A G G G G T C T T T T A T A T C G A A A T T C A G C G G A C T G C T T C T T G A A G A C A C T C C G T A A T
259    K S R G L L Y R N S A D C F L K T V R N
835    G A A G A T T C T G G G C A C T G T A C A A G G G C T T T G T C C C C T G C T G G C T G C G C A T G G G T C C T T G G
279    E G F W A L Y K G F V P C W L R M G P W
895    T C C C T C A C C T T C T G G A T C A C C T A C G A A C A G A T A C G A A A T G C T T G C G G C A C A T C A G C A T T C
299    S L T F W I T Y E Q I R N A C G T S A F
955    T A G A A T C A C G A C T G T T A T T A C C C A C T G T T T T T T T A C T C T T T A C C A T A T G C A A A G G A A G
319    *
1015   C A C C T T T G A A G T G A G A A G T C T G A A T C T T C T T C G A C C C G T T G A A T C C T C A C C T T A A A G A A A
1075   A A A T A C T A T A T A T A T A G A A C A A A A A G A A A A C A A T T G A C G G G A A C C A T A T T T A C A A T
1135   A A A A A G A C A G A A A A G A A A A A G A G G A C A A T T A T T T T G T A T A A A A C A T G T A T C T C T T A T
1195   T T C T A T G A T A T A A C A T T T T T T T G A A T A C C C T A A C T G T T A T T A C A T T A A T A T T C C A A C
1255   A C A A A T T T T A G A A T C C G T T T C T T A C T A A G G G T G T A C C A T G G A A T G A A A A T C T C A T T C C T
1315   A C C A A A A T C A A C G T T T T A G G G T G A A C G T C A T T C T C T T T C T A C T C G T C T A G T G A G T T A A
1375   G T G T T G A C A C C T T G C C T T C T T C C A A T G A T A C A G G C C C G T G A A G T T G A T C T C C G C A C C T G G
1435   C C A T G G G A A A A G A A C G T C A T G G C C T G A T C G T T C T T C T A C A G G G A T G C T G A A G A G C A A G
1495   A G A A G G A G G A A G C T G C C A A G G C C G A G G C T G C C A A G G C T G A G G C T G A G G C T G C C A A G G T A G
1555   A G A C C C C T G C T G C C G A G A A C T G G G G C G T G A T G T G A A T G A T C C C G A T G C C G T A G C T G C T G
1615   C T G C C G G T G C T G G G A C T G C T G C C C C T G T G G C T C C T G C G C T A C C G G G A C T G C T G C C C C T G T
1675   G G C T G C T G C T A C T G C T G C T G T T G C A C C A G C A G C T A C T G T T G A T G A C T G G G G T C A
1735   G A C T G G T G A T G A T T G G G C T G C T G C A C C A G T T A C T G G A A C T G G T G A T G A C T G G G G A G G G C A
1735   G C T G A T G G A C C C A C T G G T A A C A G A A A T A A A T G A T A G C T G C T G T A A A A A A A A A A A A A A A
1795   A A A A A A A A A A A A A A A

```

Figura 4. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de UCP4 del camarón blanco *L. vannamei*. Los codones de inicio y término se encuentran enmarcados; la señal de poliadenilación y la cola poli A se encuentran doblemente subrayadas; las firmas características de la familia de los acarreadores mitocondriales están sombreados en gris (Ježek, 2002).

La secuencia deducida de aminoácidos comparte identidad con la UCP4 de otros invertebrados como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (44% isoforma 4A, GenBank con el número de acceso: **NP 573246.1**; 53% isoforma 4B, **NP 608977.1**; y el 39% isoforma 4C, **NP 608976.1**), el mosquito del sur *Culex quinquefasciatus* (46%, **XP 001870223.1**), el piojo *Pediculus humanus corporis* (52%, **XP 002429177.1**), el pulgón del guisante *Acyrtosiphon pisum* (55%, **XP 001944640.1**), la pulga del mar *Caligus rogercresseyi* (52%, **ACO11693.1**), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (43%, **CCD68613.1**). Además, comparte identidad con los homólogos UCP4 de vertebrados como el ratón *Mus musculus* (54%, **NP 082987.1**), el bovino *Bos taurus* (54%, **NP 001193123.1**) y el humano *Homo sapiens* (54% isoforma 1, **NP 004268.3**, y el 50% isoforma 2, **NP 001190980.1**). La Figura 5 muestra el alineamiento de UCP4 de diferentes especies.

| | | | |
|------------------------------|---|-------------------------------------|-----|
| | | 1° | |
| <i>L. vannahmei</i> | -----MVVAQRGVIPPPKHYADSAWFKYILSCCAATTAE | | 34 |
| <i>S. purpuratus</i> | -----MVNPDSFFFKYGLSACAATVAE | | 22 |
| <i>M. musculus</i> | -----MPIAEEEEKLLPLTQRWPRTSKFLLSGCAATVAE | | 33 |
| <i>R. norvergicus</i> | -----MPFPEEESLQPLTQRWPRTSKFLLSGCAATVAE | | 33 |
| <i>B. taurus</i> | -----MSTPDDAERLSPLAQRWPRACKFLLSGCAATVAE | | 34 |
| <i>H. sapiens</i> isoforma 1 | -----MSVPPEEEERLLPLTQRWPRASKFLLSGCAATVAE | | 34 |
| <i>C. rogercresseyi</i> | -----MASDSFSIPTKYLMSIAAASVAE | | 23 |
| <i>T. castaneum</i> | -----MCQSDNKLIVAGFLVKMPQIPPPKHEKHYVDSLWCMYMVSVVGAWNAE | | 46 |
| <i>P. humanus corporis</i> | -----MPSAVPPSLLSSN-----SDSQEFFNKRLDYS-KLIATYIMSVLAASIAE | | 44 |
| <i>A. pisum</i> | -----MVFTQVVS IKDKAPGTKVYNYADSFWCYTIIVSVAASVAE | | 40 |
| <i>D. melanogaster</i> | ---MAAKTDESSPAV-ASSTSSN---PAPSSGRHQLRPVKFDYADSFACCTYIVSVVAASIAE | | 55 |
| <i>A. aegypti</i> | MRTTGKIAEKPDPEVVGSSSSSTPAAATMQQSTRTEMRPVKYHYADSFWCYTLISVFAASIAE | | 63 |
| | | : : * . * ** | |
| | | 1° | 2° |
| <i>L. vannahmei</i> | LVVYLDLAKTRLQIQGEKGLNS----NGLQPYRGLAGTGVGIIREEGALKLWQGITPAVYR | | 92 |
| <i>S. purpuratus</i> | TVVYLDITKTRLQIQGEVAAAKHY-RTAEAI PYRGMVVRTALGIVQEEGLKLLWQGVTPAIYR | | 84 |
| <i>M. musculus</i> | LATFELDLTKTRLQMQGEAALARLGDGAVDSAPYRGMVVRTALGIVQEEGFLKLLWQGVTPAIYR | | 96 |
| <i>R. norvergicus</i> | LATFELDLTKTRLQMQGEAALARLGDGAMESAPYRGMVRTALGIVQEEGFLKLLWQGVTPAIYR | | 96 |
| <i>B. taurus</i> | LATFELDLTKTRLQIQGEAALARLGDGATESAPYRGMVVRTALGIVQEEGFLKLLWQGVTPAIYR | | 97 |
| <i>H. sapiens</i> isoforma 1 | LATFELDLTKTRLQMQGEAALARLGDGAREAPYRGMVVRTALGIVQEEGFLKLLWQGVTPAIYR | | 97 |
| <i>C. rogercresseyi</i> | LVVYLDLTKTRLQIQGEMALGSQ-----GQARYQGMSTALGVVKEEGIFMLWRGMSPALLR | | 81 |
| <i>T. castaneum</i> | LVVYLDLAKTRLQIQGEVANTKD---ASMVKAPYRGLFRFRTAVGIVSEEGFLKLLWQGAYAAALYR | | 107 |
| <i>P. humanus corporis</i> | IVVYLDLTKTRLQIQGERAGHFG-----KNVVRGMLHTAIGIVHEEGLLKLLWNGITPALYR | | 102 |
| <i>A. pisum</i> | ILTYLDLTKTRLQIQGEVATS-----SKPTQYRGMMLKTAIGIVNEEGALKLWQGVTPALYR | | 97 |
| <i>D. melanogaster</i> | LATYLDLTKTRLQIQGEAAHSA---GKSNMQYRGMVATAFGIAREEGALKLWQGVTPALYR | | 115 |
| <i>A. aegypti</i> | TVVYLDLTKTRLQIQGEATAVTG---AIKLLKYRGMMLATASGIIREEGALKLWQGVTPALYR | | 123 |
| | ***:****:*****:*** | : * : * . * : * * : * * * * : * * * | |

| | | | |
|------------------------------|---|----|--|
| | 2° | 3° | |
| L. vannamei | HLIYSGTRMVLVEYKVRDHLFTTRPDGTRPVWQAIIVGGILVGGIAQFLAS | | ADLVKVMQMEGR |
| <i>S. purpuratus</i> | HIVYTGCRMGSYEYIRDRLFQGNPDGTFVSVWKAI IAGSTAGAFQFLSS | | TDLVKVQMTEGR |
| <i>M. musculus</i> | HVYSGGRMVTYEHLEREVVFQKSEDKHYPLWKS VIGMMAGVIGQFLAN | | TDLVKVQMMEGK |
| <i>R. norvergicus</i> | HVYSGGRMVTYEHLEREVVFQKSEDEHYPLWKS VIGMMAGVIGQFLAN | | TDLVKVQMMEGK |
| <i>B. taurus</i> | HIVYSGGRMVTYEHLEREVVFQKSEDKHYPLWKS VIGMMAGVIGQFLAN | | TDLVKVQMMEGK |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | HVYSGGRMVTYEHLEREVVFQKSEDEHYPLWKS VIGMMAGVIGQFLAN | | TDLVKVQMMEGK |
| <i>C. rogercresseyi</i> | HAIYTGIRMSAYEEVRSNMQK-KDNGFPLWKKVLAGMTAGGLQLVAS | | TDLVKVQIQMEGR |
| <i>T. castaneum</i> | HLFYSGTRIVTYKHLKDKKDFDSGTEQYFPVWKSALCGVTAGAFQYIAS | | ADLLKVLQMEGK |
| <i>P. humanus corporis</i> | HVIYSGVRIVSYETLRDKILDKDPDRKFSWKS AVTGAASGAFQFLAN | | TDLVKVQIQMEGK |
| <i>A. pisum</i> | HVYSGIRIVSYETMRDKLLKNEDEGSFPWKS AISGVMGVIQYVAS | | ADLVKVMQMEGK |
| <i>D. melanogaster</i> | HVYSGVRICSYDLMRKEF-TQNGTQALPWWKSALCGVTAGAVQWLAS | | ADLVKVMQMEGR |
| <i>A. aegypti</i> | HIVYSGVRIVTYDNLRRKCL--RNGNDFALWQSA LAGVAGGLAQWLAS | | ADLVKVHIQMEGK |
| | * .*: * * : * . : . . : : * : * * . . * : . : * * * . * : * * : | | 155 147 159 159 160 160 143 170 165 160 177 184 |
| | | | |
| | 2° | 4° | 3° |
| L. vannamei | RRLEGKPPRVHSAGEAFIKIYQAGGMRGLWKGCMNPVYRSALVNLGDLT TYDSVKRYFVNSWG | | |
| <i>S. purpuratus</i> | RRLEGRPPRVNTAFQCFREILHDGGIRGLWKGWPNVQRAALVNMGDLT TYDTVKHLLLNHTT | | |
| <i>M. musculus</i> | RRLEGKPLRFRGVHHAFAKILAEGGIRGLWAGWIPNIQRAALVNMGDLT TYDTVKHYLVLNTPT | | |
| <i>R. norvergicus</i> | RRLEGKPLRFRGVHHAFAKILAEGGIRGLWAGWIPNIQRAALVNMGDLT TYDTVKHYLVLNTPT | | |
| <i>B. taurus</i> | RKLEGKPLRFRGVHHAFAKILAEGGIRGLWAGWIPNIQRAALVNMGDLT TYDTVKHYLVLNTPT | | |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | RKLEGKPLRFRGVHHAFAKILAEGGIRGLWAGWIPNIQRAALVNMGDLT TYDTVKHYLVLNTPT | | |
| <i>C. rogercresseyi</i> | RRLQGLEPRVHGM L DAFKKI I AQAGV LGLWRGCWPNVQRAALVNLDLST YDSVKSAILRNTH | | |
| <i>T. castaneum</i> | RKIMGLPPRVNGLDFARFKT VETAGVRLWKG SVPNVQRAALVNLDLST YDSAKRFILRNTH | | |
| <i>P. humanus corporis</i> | RKLGLGLEPRVHSTYHAFKKILKENGIRGLWKGSI PNIQRAALVNLDLST YDTAKQF I LKNTS | | |
| <i>A. pisum</i> | RRLMGEPPRVLSAAHAFKKI VSES GVRGLWKGSI PNVQRAALVNLDLST YDTAKQVIMHKTG | | |
| <i>D. melanogaster</i> | RRLMGEPPRVHSAGHAFRQIVQRGGIKGLWKGSI PNVQRAALVNLDLST YDTIKHLIMNRLQ | | |
| <i>A. aegypti</i> | RRLGLGLEPRVHGAHAFREIVSRGGIAGLWKG SVPNVQRAALVNLDLST YDTVKRFVMMKKS | | |
| | * : : * * . . . * : * : * * * * * * : * : * * * * * * : * : * * * * * * : * : * | | |
| | | | |
| | 5° | 3° | 6° |
| L. vannamei | LPDITYWTHALSSTLSGLVSAVLGCFADVVVKARIMNQPTDSKSRGLLYRNSADCF LKTVRNEGF | | |
| <i>S. purpuratus</i> | LRDNVYTHGLSSICSGLVAAIVSTADVVVKTRIMNQGTDTSGRPLLYKSSMDCLLKS SVKQEGF | | |
| <i>M. musculus</i> | LEDNISTHGLSSLSGLVASILGTADVIKSRIMNQPRDKQGRGLLYKSSADCLIQAVQGE GF | | |
| <i>R. norvergicus</i> | LEDNIATHGLSSLSGLVASILGTADVIKSRIMNQPRDKQGRGLLYKSSTDCLIQAVQGE GF | | |
| <i>B. taurus</i> | LEDNIVTHGLSSLSGLVASILGTADVIKSRIMNQPRDKQGRGLLYKSSTDCLIQAVQGE GF | | |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | LEDNIMTHGLSSLSGLVASILGTADVIKSRIMNQPRDKQGRGLLYKSSTDCLIQAVQGE GF | | |
| <i>C. rogercresseyi</i> | LKDNSLTHCLSSACAGLVGAIMGTADVVVKARIMNQPTSPDGKGLVYKNSIDCIQKTVGNEGF | | |
| <i>T. castaneum</i> | LEDNHLVHCLSSACAGLVAAALMGTADVIKTRVMNQPMDEQGRGLLYKSSIDCFKKS VQNEGF | | |
| <i>P. humanus corporis</i> | LTDNHCTHVLSSACAGLVAAATVGTADVVVKTRIMNQPTDKNGRGLLYKSSLDCLKKT IQDEGI | | |
| <i>A. pisum</i> | LPDSHLLHCLSSICAGLVAAATLGTADVVVKTRVMNQPTDKNGIGLYKGLSLDCLFKT IENEGF | | |
| <i>D. melanogaster</i> | MPDCHTVHVLASVCAGFVAAIMGTADVVVKTRIMNQPTDENGRGLLYRGSVDCLRQTVSKEGF | | |
| <i>A. aegypti</i> | LPDCHLVHIISSICAGLVAAATMGTADVVVKTRVMNQPTDINGKGLLYKGLSLDCLQQTIGKEGF | | |
| | : * * * : * : * : . : * * * * * : * * * * . . . * : * * * . : : * * : | | |
| | | | |
| | 4° | | |
| L. vannamei | WALYKGFVPCWLRMAPWSLTFWITFEQIRNACGTSAF | | |
| <i>S. purpuratus</i> | WSLYKGF LPIWLRMAPWSLTFWISYEEIRKLAGTASF | | |
| <i>M. musculus</i> | LSLYKGF LPSWLRMT PWSMVFWLTYEKIREMSGVSPF | | |
| <i>R. norvergicus</i> | LSLYKGF LPSWLRMT PWSMVFWLTYEKIRQLSGVSPF | | |
| <i>B. taurus</i> | LSLYKGF LPSWLRMT PWSLFWLTYEKIREMSGVSPF | | |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | MSLYKGF LPSWLRMT PWSMVFWLTYEKIREMSGVSPF | | |
| <i>C. rogercresseyi</i> | FALYKGF LPCWLRMAPWSLTFWLSFEQIRSSFGAKSW | | |
| <i>T. castaneum</i> | GALYKGF LPIWLRMAPWSLTFWLSYEEVLRLLGAEQF | | |
| <i>P. humanus corporis</i> | LAIYKGF LPIWLRMAPWSLTFWLSFEQIRHTMGVRAF | | |
| <i>A. pisum</i> | FALYKGF LPVWLRMAPWSLTFWMSFEQIRHMLGATGF | | |
| <i>D. melanogaster</i> | VALYKGF LPCWLRMAPWSLTFWLSFEQIRKIMIGASGY | | |
| <i>A. aegypti</i> | FALYKGF LPVWLRMAPWSLTFWLSFEQIRTSLGAGGY | | |
| | : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : | | |

Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias de la UCP4 en diversas especies. Residuos con alta identidad (*), residuos con alta similitud (:) y los residuos con baja similitud (.). Las regiones marcadas en la parte superior con (___) indican el segmento citosólico, (_____) indican el segmento transmembranal, (_____) indican el segmento de la matriz y (_____) indican las hélices transmembranales (Ježek y Urbánková, 2000). Sombreados en gris claro están los residuos prolina y en gris se muestran los residuos cargados negativamente conservados en UCP4, en negro los residuos que conforman el sitio de unión de los nucleótidos de purina.

7.1.2 La UCP5 del Camarón

La secuencia parcial de *Lv*UCP5 consta de 1548 pb, con un codón de inicio ATG localizado en la posición 1, un codón de término TAG localizado en la posición 907, y un 3' UTR parcial de 634 pb. Esta región codifica para una proteína deducida de 302 residuos de longitud con un peso molecular calculado de 33.177 kDa y pI de 9.58 (Figura 6).

La secuencia de aminoácidos deducida de *Lv*UCP5 del camarón muestra identidad con las secuencias de las proteínas UCP5 de los insectos como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (54% isoformas 5a y 5b, **NP 729738.1** y **NP 648501.1**, respectivamente), el insecto chupa sangre *Rhodnius prolixus* (57%, Alvares-Bezerra et al., 2014), la abeja *Apis mellifera* (51%, **XP 397152.2**), la avispa *Nasonia vitripennis* (54%, **XP 001606647.1**), la chinche *Cimex lectularius* (57%, **XP 014251704.1**), el escarabajo del pino *Dendroctonus ponderosae* (55%, **AEE63135.1**), el ostión americano *Crassostrea virginica* (54%, **ACQ57806.1**) y el ostión japonés *Crassostrea gigas* (54%, **XP 011435266.1**). También con los homólogos de UCP5 de vertebrados como del bovino *Bos taurus* (46%, **NP 001039610.1**), la rata *Rattus norvegicus* (46%, **NP 445953.1**), y el humano *Homo sapiens* (45% isoformas 1 y 2, **NP 001269124.1** y **NP 001269125.1**, respectivamente; 41% isoforma 3, **NP 001269126.1** y 51% isoforma 4, **NP 001269127.1**) (Figura 7).

-5 gtgta**ATC**GGACTGAGCGATTGGCGCCCTTTTGTATACGGGGCGTGTCTGCCTGCATA
1 M G L S D W R P F V Y G G V S A C I

55 CGAGAGTTTGGGACGTTTCCCATCGACACCACCAAGACTCGGCTGCAGATCCAAGGAGCC
19 A E F G T F **P I D T T K T R L** Q I Q G A

115 CGCAGCGATGGGGCCAGATCGTTGCCAAGCGATACAAGGCATGATCCATGCTCTTCTC
39 R S D G G Q I V A K R Y K G M I H A L L

175 AAGATATCGAGTGAGGAAGGTGTCAGGGCATTGTATTTTCGGTATTGCTCCAGCTGTCTC
59 K I S S E E G V R A L Y F G I A P A V L

235 CGTCAGGCAACATATGGAACCATCAAGTTTGGCATTATTACTCCCTGAAACAGATGCTG
79 R Q A T Y G T I K F G I Y Y S L K Q M L

295 ACAAAAAATCCCAATGAAGAGAGATTGGGCATCAACGTTTTTTGTGCAGTCACTGCAGGT
99 T K N P N E E R L G I N V F C A V T A G

355 GTGGTGTCAAGTGCTATGGCCAACCCCACTGACGTCCTGAAAGTCAGGTTACAGAGTGGG
119 V V S S A M A N **P T D V L K V R L** Q S G

415 CGTTCGGACTTCAAGGAGAAGTCTCTCCTTCAGGCATTTATTAGTATATATAACCAGGAG
139 R S D F K E K S L L Q A F I S I Y N Q E

475 GGAATACAGGGCCTATGGAGAGGAGTTTGCCCAACGGCGCAAAGAGCAGGGGTGATCGTA
159 G I Q G L W R G V C P T A Q R A G V I V

535 GGAGTAGAGCTGCCAATTTACGACATGTGCAAACACTATTTTCATCAAGATGAACTTGCTG
179 G V E L P I Y D M C K H Y F I K M N L L

595 CCAGATAATTCTACAAACCACTTCTTGTGCGAGCTTCATATCTAGCCTGGGGGGTGCAGTT
199 P D N S T N H F L S S F I S S L G G A V

655 GCATCAACGCCTCTGGATGTTGTGAGGACACGCCTGATGAACCAAGAAAACCTTAAAGCT
219 A S T **P L D V V R T R L** M N Q R K L K A

715 CCAGCTGCAGTAAGTGGCAATGGTGTGTTGTACATCCCAGTGTATGCTAGCACTGCA
239 P A A V S G N G A V C T S P V Y A S T A

775 GACTGTTTCATACAGACTGTTAAGGCTGAGGGACCCCTGGCTCTCTATAAGGGCTTTATC
259 D C F I Q T V K A E G P L A L Y K G F I

835 CCTACATGGCTGAGACTTGGCCCATGGAACATCATCTTCTTTGTCACCTTCGAGCAACTC
279 P T W L R L G P W N I I F F V T F E Q L

895 AAGAAGTTTAT**TAG**gttgtgtagcaactccattggacccatgtgaagctcaagacatct
299 K K F Y *

955 aatgaagttcctgttaccttccgaaggtctatgtggcattaagaagatctaattgggaaac
1015 ctggtagcattaaagtgaagtgcagcttataatcttgggtgatctatgtcatagatgga
1075 gttcatggttcaaaaccatttcatgaactaaagacatttcctggaatttcatgtctgat
1135 gacttgcatttgttccactacagagttgtccacttgatgaaagcaatggacaaa

Figura 6. Secuencia de ADNc y deducida de aminoácidos de UCP5 del camarón blanco *L. vannamei*. Los codones de inicio y término se encuentran enmarcados y las firmas características de la familia de los acarreadores mitocondriales están sombreados en gris (Ježek, 2002).

| | | | |
|------------------------------|--|-------------------------|----|
| | | 1° | |
| <i>L. vannamei</i> | -----MGLSDWRPFVYGGVSACTA | | 19 |
| <i>D. melanogaster</i> | -----MGEVKDWRPFVYGGVASITA | | 20 |
| <i>C. capitata</i> | -----MSDVKDWRPFVYGGGLASITA | | 20 |
| <i>B. dorsalis</i> | ---MQQVGTAT--TDFTQPQHHLQQQQIQTQTRRKQQVPMNNVNDWRPFVYGGGLASITA | | 55 |
| <i>H. halys</i> | -----MGERDWRPFVYGGGLASCTA | | 19 |
| <i>R. prolixus</i> | -----MGERDWRPFVYGGGLASCTA | | 19 |
| <i>C. lectularius</i> | -----MGERDWRPFVYGGGLASCTA | | 19 |
| <i>R. norvegicus</i> | MGIFPGIILIFLVRKFATA-----AVIVSGHQKSSALSHEMSGLNWKPFVYGGGLASIVA | | 54 |
| <i>B. taurus</i> | MGIFPGIILIFLVRKFATA-----AVIVSGHQKSATVSHEMSGLNWKPFVYGGGLASIVA | | 54 |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | MGIFPGIILIFLVRKFATA-----AVIVSGHQKSTTVSHEMSGLNWKPFVYGGGLASIVA | | 54 |
| <i>C. virginica</i> | -----MNDWRPFVYGGGLASVAA | | 17 |
| <i>C. gigas</i> | -----MNDWRPFVYGGGLASVAA | | 17 |
| | | : * : * : * : * : * : * | |

| | | | | |
|------------------------------|--|----|----|-----|
| | | 1° | 2° | |
| <i>L. vannamei</i> | EFGTPEIDTTKTRLQIQGARSDDGGQIVAKRYKGMHALLKISSEEGVRLYFGIAPAVLR | | | 79 |
| <i>D. melanogaster</i> | EFGTPEIDTTKTRLQIQGQKIDQS-FSQLRYRGMDFAFVKISREEGLRALYSGIWPVAVLR | | | 79 |
| <i>C. capitata</i> | EFGTPEIDTTKTRLQIQGQKIDQT-FSQLRYRGMDFAFVKISQEEGLRALYSGIWPVAVLR | | | 79 |
| <i>B. dorsalis</i> | EFGTPEIDTTKTRLQIQGQKIDQT-FSQLRYRGMDFAFVKISQEEGLRALYSGIWPVAVLR | | | 114 |
| <i>H. halys</i> | ELGTPEIDTTKTRLQVQGQKDFDK-CASLKRYRGMDFALLKISKQEGFIALYSGISPAVLR | | | 78 |
| <i>R. prolixus</i> | EFGTPEIDTTKTRLQVQGQKIDSH-YAHLKRYRGMDFAFVKISKQEGFIALYSGIWPVAVLR | | | 78 |
| <i>C. lectularius</i> | EFGTPEIDTTKTRLQVQGQIDRS-CTRLRYRGMDFAILKISKQEGFKAFYGIWPVAVLR | | | 78 |
| <i>R. norvegicus</i> | EFGTPEVDLTKTRLQVQGQSIDVR-FKEIKYRGMFHALFRIYREEGILALYSGIAPALLR | | | 113 |
| <i>B. taurus</i> | EFGTPEVDLTKTRLQVQGQSIDVR-FKEIKYRGMFHALFRIYKEEGVLALYSGIAPALLR | | | 113 |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | EFGTPEVDLTKTRLQVQGQSIDAR-FKEIKYRGMFHALFRICKEEGVLALYSGIAPALLR | | | 133 |
| <i>C. virginica</i> | ESGTPEIDTTKTRLQVQGQTIIDVR-LKEIKYRGMVHALKRIYAEEGVRLYSGIAPALLR | | | 76 |
| <i>C. gigas</i> | ESGTPEIDTTKTRLQVQGQTIIDAR-LKEIKYRGMVHALKRIYAEEGIRALYSGIAPALLR | | | 76 |
| | * **** : * ***** : * * : * : * : * : * : * : * : * : * | | | |

| | | | | |
|------------------------------|---|----|----|-----|
| | | 2° | 3° | |
| <i>L. vannamei</i> | QATYGTIKFGIYYSLKQMLTK-----NPNEERLGINVFCAVTAGVSSAMANE | | | 132 |
| <i>D. melanogaster</i> | QATYGTIKFGTYYTLKLANERGLLIN-EDGSEVRVSNILCAAAGAISSAIANE | | | 138 |
| <i>C. capitata</i> | QATYGTIKFGTYYTLKKYANNYGLLVDHETGSEVRWANILCAATAGAVSSAIANE | | | 139 |
| <i>B. dorsalis</i> | QATYGTIKFGTYYTLKKYAHNYGLLVDHETGAERVWANILCAATAGAVSSAIANE | | | 174 |
| <i>H. halys</i> | QATYGTIKFGSYSLKDFLE-----NGEESVSTNICCAVAVAGMVSSAIANE | | | 129 |
| <i>R. prolixus</i> | QATYGTIKFGTYYTLKDI FV-----KNEEDNVGVNICCAVAVAGMVSSAIANE | | | 130 |
| <i>C. lectularius</i> | QATYGTIKFGTYYSLKSFV-----N-GEEDVTVNICCAVAVAGMVSSAIANE | | | 129 |
| <i>R. norvegicus</i> | QASYGTIKIGIYQSLKRLFVE-----RLEDETLINMICGVVSGVSSAIANE | | | 165 |
| <i>B. taurus</i> | QASYGTIKIGIYQSLKRLFVE-----RLEDETLINMICGVVSGVSSAIANE | | | 165 |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | QASYGTIKIGIYQSLKRLFVE-----RLEDETLINMICGVVSGVSSAIANE | | | 165 |
| <i>C. virginica</i> | QSAYGTIKIGVYYSLKGFVYR-----NPEDETLPINVFCGVVAGVSSVSSAIANE | | | 128 |
| <i>C. gigas</i> | QSAYGTIKIGVYYSLKGIIVP-----NPDEDETLPINVFCGVVAGVSSVSSAIANE | | | 128 |
| | * : * * * * * : * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | | | |

| | | | | | |
|------------------------------|--|----|----|----|-----|
| | | 2° | 4° | 3° | |
| <i>L. vannamei</i> | VRLQSGRSDFKKESLLQAFISIIYQEGIQGLWRGVCPTAQRAAGVIVGVLELPYIDMKKHYF | | | | 192 |
| <i>D. melanogaster</i> | VRMQVHGKQGH-KGLLGCFCGEIYKYEGVRGLWRGVGPTAQRAAVIASVELPVYDFCKLQL | | | | 197 |
| <i>C. capitata</i> | VRMQVHGKSAHQHGLIGSFLEIYRFEGVRGLWRGVGPTAQRAAVIASVELPVYDFCKMQL | | | | 199 |
| <i>B. dorsalis</i> | VRMQVHGKAAHQHGLLGSFLEIYRYEGVRGLWRGVGPTAQRAAVIASVELPVYDFCKMQL | | | | 234 |
| <i>H. halys</i> | VRMQVLGMD-NRGLGFACFKDIYNLEGLSGLWRGVGPTSQRAAVIAAVLELPYIDFKKHL | | | | 188 |
| <i>R. prolixus</i> | VRMQVLGVH-NHRSLIACFQDVYKNEGISGLWRGVGPTSQRAAVIAAVLELPYIDSKKHL | | | | 189 |
| <i>C. lectularius</i> | VRMQVLGGSYEKRLGFACFKEVYRNEIGGLWRGVGPTSQRAAVIAAVLELPYIDFKKHL | | | | 189 |
| <i>R. norvegicus</i> | IRMQAQGSFLF-QGSMIGSFIDIIYQEGTRGLWRGVVPTAQRAAIVVGVLELPYIDITKKHL | | | | 224 |
| <i>B. taurus</i> | IRMQAQGSFLF-QGSMIGSFIDIIYQEGTRGLWRGVVPTAQRAAIVVGVLELPYIDITKKHL | | | | 224 |
| <i>H. sapiens isoforma 1</i> | IRMQAQGSFLF-QGSMIGSFIDIIYQEGTRGLWRGVVPTAQRAAIVVGVLELPYIDITKKHL | | | | 224 |
| <i>C. virginica</i> | VRMQAQRENGGRETFSQAFIKIYKQEGVSGLWRGVSPTAQRAAVVAGVILPAYDICKFQL | | | | 188 |
| <i>C. gigas</i> | VRMQAQKENGGRETFTQAFVKIYKQEGVSGLWRGVSPTAQRAAVVAGVILPAYDICKFQL | | | | 188 |
| | : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | | | | |

| | 5° | 3° | |
|------------------------------|--|----|-----|
| <i>L. vannamei</i> | IKMNL LPDNSTNHF LSSFI SSLGAVAST PLDV VTRTRLMN QRKL KAPAAVSGNGAVCTSP | | 252 |
| <i>D. melanogaster</i> | --MNAFGDHVGNHF ISSFI ASLGS AI AST PLD VIRTRLMN QRPV SITMN-GVVTA AA ATPK | | 254 |
| <i>C. capitata</i> | --MNTFGDHVANHF ISSFI ASLGS AV AST PLD VIRTRLMN QRHL TVV---DGVT VT NTQK | | 254 |
| <i>B. dorsalis</i> | --MTAFGDHVNHFV SSFI ASLGS AI AST PLD VIRTRLMN QRHL TVV---NGVAV AN TQK | | 289 |
| <i>H. halys</i> | --KSKIGDSVSNHF ISSFI ASL GT AVAST PLD VLRLTRLMN QRKFI ITD-----RKSS N | | 239 |
| <i>R. prolixus</i> | --KDHLGDTVTNHFV SSFI ASLGS AI AST PLD VIRTRLMN QRKLL SVK-----TSD K | | 238 |
| <i>C. lectularius</i> | --MERFGDNI TNHF ISS F ASIG S AVAST PLD VVTRTRLMN QRRL LVG-----GNN K | | 238 |
| <i>R. norvegicus</i> | IVSGMLGDTIL THFV SS FT CGLG AL AS NP VDV V TRTRM NQ RAIV-----GH V D | | 273 |
| <i>B. taurus</i> | ILSGLMGDTIL THFV SS FT CGLG AL AS NP VDV V TRTRM NQ RAIV-----GH V D | | 273 |
| <i>H. sapiens</i> isoforma 1 | ILSGMMGDTIL THFV SS FT CGLG AL AS NP VDV V TRTRM NQ RAIV-----GH V D | | 273 |
| <i>C. virginica</i> | RHNLQLEDSMST HFM AS F AG L V G AV F ST PLD VV K TRM NQ KK Y K P SVL--KSGG V E A AP | | 246 |
| <i>C. gigas</i> | RHNLHLEDSMST HFM AS F AG L V G AV F ST PLD VV K TRM NQ KK Y K P SL--KSGG V E A AP | | 246 |
| | : * .**::** ... *: *.**::** : ::: | | |
| 6° 4° | | | |
| <i>L. vannamei</i> | VY ASTADCF IQT V K AE G PL ALY K G F I PT W L RL GP W NI I FF V TF EQ L K K F Y- | | 302 |
| <i>D. melanogaster</i> | LYSGSLDCAV Q T IR NE G LP ALY K G F I PT W VR M GP W NI I FF I TF EQ L K K Y -- | | 303 |
| <i>C. capitata</i> | LYKGSFDCAV Q T VR NE G L ALY K G F I PT W VR M GP W NI I FF I TF EQ L K K L -- | | 303 |
| <i>B. dorsalis</i> | LYKGSFDCAV Q T VR NE G L ALY K G F I PT W VR M GP W NI I FF I TF EQ L K K L -- | | 338 |
| <i>H. halys</i> | IYK G TL D CL I Q T V K NE G I ALY K G F I PT W IR M GP W NI I FF I TF EQ F K K I F- | | 289 |
| <i>R. prolixus</i> | IY T G S I D CL L Q T V K NE G F ALY K G F V PT W VR M GP W NI I FF I TF EQ L K K F Y- | | 288 |
| <i>C. lectularius</i> | IY T G S I D CL I Q T V R HE G F ALY K G F T PT W VR M GP W NI I FF I TF EQ L K K F Y- | | 288 |
| <i>R. norvegicus</i> | LYK G TL D G I L K M W K H E G F F ALYK G F W PN W L R L G P W NI I FF I TF EQ L K R L Q I | | 333 |
| <i>B. taurus</i> | LYK G TL D G I L K M W K H E G F F ALYK G F W PN W L R L G P W NI I FF I TF EQ L K R L Q I | | 333 |
| <i>H. sapiens</i> isoforma 1 | LYK G T V D G I L K M W K H E G F F ALY K G F W PN W L R L G P W NI I FF I TF EQ L K R L Q I | | 333 |
| <i>C. virginica</i> | IYK S S L D C L I R T V K T E G P C ALY K G F C P T W V R L G P W N I I F F M M Y E Q L K K V Y - | | 305 |
| <i>C. gigas</i> | IYK S S I D C L I Q T V K S E G P R ALY K G F C P T W V R L G P W N I I F F M M Y E Q L K K V Y - | | 305 |
| | :* .: * :: : ** ***** *.**::*****: :**::* | | |

Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de la UCP5 en diversas especies.

Los residuos con identidad alta se encuentran marcados con (*), los que presentan similitud alta con (:), y los residuos con similitud débil (.). Los residuos subrayados con (___) son el segmento citosólico, (____) el segmento transmembranal, (_____) son el segmento de la matriz y (_____) la hélice transmembrana (Ježek y Urbánková, 2000). Sombreados en gris claro están los residuos prolina y en gris se muestran los residuos cargados negativamente conservados en UCP4, en negro los residuos que conforman el sitio de unión de los nucleótidos de purina.

En este estudio, el análisis de las secuencias primarias de aminoácidos muestra que *Lv*UCP4 y *Lv*UCP5 conservan los residuos cargados negativamente Glu34 (en UCP4) y Glu20 (en UCP5) situados en la hélice transmembranal 1 (TMH1), los cuáles podrían estar implicados en la unión de los protones en las UCPs (Echtay et al., 2000). De manera adicional, tanto *Lv*UCP4 como *Lv*UCP5 conservan los 3 residuos de prolina en las hélices de número impar (TMH1, -3 y -5) y los 3 residuos de arginina en las hélices de número par (TMH2, -4 y -6) que se ha propuesto son esenciales para la unión de nucleótidos de purina (Figuras 5 y 7). Basados en lo anterior, se sugiere que las dos proteínas

deducidas identificadas en el camarón con alta homología a otras UCPs, son proteínas putativas desacoplantes UCP4 y UCP5, que podrían exhibir la capacidad de transportar protones a través de la MIM y ser sensibles a nucleótidos de purina (Echtay et al., 2000; Hoang et al., 2012).

7.2 Modelación *in silico* de las UCPs de *L. vannamei*

De acuerdo a los análisis realizados, ambas secuencias de aminoácidos del camarón *LvUCP4* y *LvUCP5*, incluyen las firmas **PxD/ExxK/RxK/R** (donde x es cualquier aminoácido), las cuales son motivos comunes en la estructura de la familia de acarreadores de soluto mitocondrial (Ježek, 2002). Estos motivos se encuentran en 3 regiones repetidas, en *LvUCP4* fueron ubicados en las posiciones 39-47, 142-150 y 243-251. Mismas que incluyen una sustitución en la segunda firma conservada en las secuencias de UCP4, encontrándose un residuo Glu149, que es un aminoácido polar sin carga, en lugar de una Arg que es un aminoácido de carga positiva. De acuerdo con Krauss et al., (2005) la carga conferida por la arginina puede formar puentes de sal que podrían fortalecer la conformación cerrada de la hélice. En el caso de la secuencia *LvUCP5* las firmas se ubicaron en las posiciones 25-33, 127-135 y 222-230 siendo regiones conservadas en su totalidad.

La conformación global de *LvUCP4* y *LvUCP5* se asemeja a la proteína UCP2 de ratón (*Mus musculus*), el único estudio reportado sobre la estructura de las UCPs (Berardi et al., 2011). A pesar de que las proteínas deducidas del camarón únicamente comparten un 36% de identidad con la secuencia de aminoácidos de UCP2, el modelo predictivo que se construyó permite observar que las estructuras secundarias de *LvUCP4* y *LvUCP5* (Figura 8A y 9A) tienen una estructura tripartita. Esta estructura consta de 3 regiones hidrofóbicas conformadas por dos hélices α cada una, que se extienden a través de la MIM atravesándola 6 veces, así cada hélice transmembranal ha sido denominada

como TMH1-6. Las 2 hélices adjuntas que forman cada región repetida están conectadas por una hélice anfipática (APH) orientada hacia la matriz (Figuras 8B y 9B). Los extremos N- (marcados en azul oscuro) y C-terminales (marcados en rojo) de estas proteínas se encuentran en el espacio intermembranal (Figura 8A y 9A).

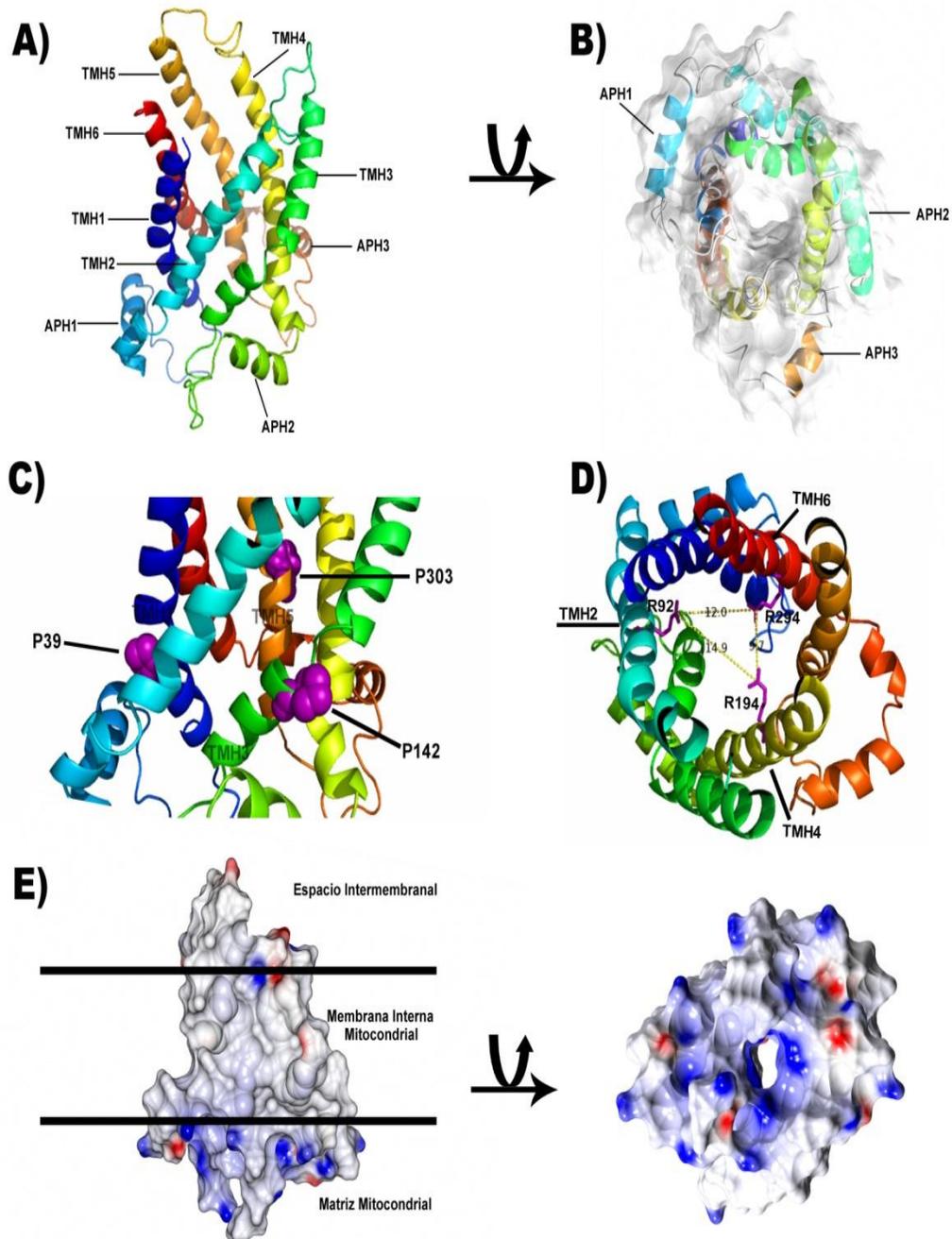


Figura 8. Modelo estructural predictivo de la LvUCP4. A) Estructura secundaria B) Vista del canal desde la matriz con estructura secundaria y la representación de la superficie. C) Posiciones de los residuos de prolina conservados en las torceduras de las TMH1, TMH2 y TMH3 D) Vista desde el espacio intermembranal de los residuos conservados de arginina. E) Vista desde la matriz mitocondrial y distribución espacial de las cargas de los residuos en LvUCP4, las cargas positivas marcadas en azul, los residuos de carga negativa marcados en rojo y los residuos de carga neutra en blanco, vista desde la matriz

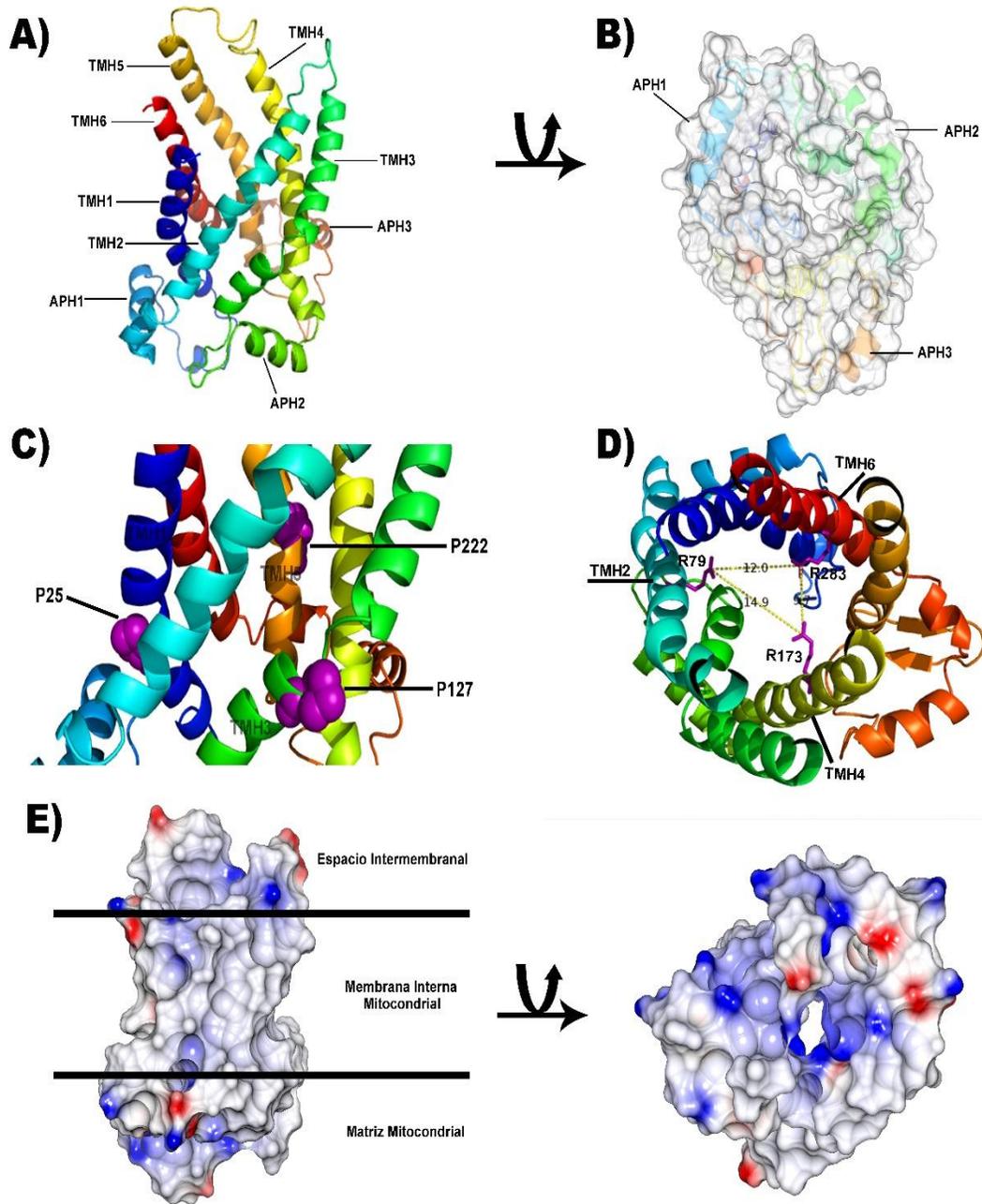


Figura 9. Modelo estructural predictivo de la LvUCP5. A) Estructura secundaria B) Vista del canal desde la matriz con estructura secundaria y la representación de la superficie. C) Posiciones de los residuos de prolina conservados en las torceduras de las TMH1, TMH2 y TMH3 D) Vista desde el espacio intermembranal de los residuos conservados de arginina. E) Vista desde la matriz mitocondrial y distribución espacial de las cargas de los residuos en LvUCP5, las cargas positivas marcadas en azul, los residuos de carga negativa marcados en rojo y los residuos de carga neutra en blanco, vista desde la matriz

En ambas proteínas del camarón se identificaron también los residuos de prolina característicos de los miembros de la familia de los acarreadores de soluto mitocondrial. En *LvUCP4*, éstos se localizan en las posiciones Pro39 (TMH1), Pro142 (TMH3) y Pro303 (TMH5) (Figura 8C), mientras que en *LvUCP5* se localizan en la Pro25 en la TMH1, Pro127 en la TMH3 y Pro222 en la TMH5 (Figura 9C). Se ha reportado que los residuos de prolina conservados inducen en las TMH1, TMH3 y TMH5 una torcedura distintiva las cuales permiten que las hélices sean más largas (Berardi et al., 2011).

Previos reportes han mostrado que en la UCP1 de humano hay 3 residuos de arginina, Arg83 (TMH2), Arg182 (TMH4) y Arg276 (TMH6), que son esenciales para la unión de los nucleótidos de purina como el GDP, ADP, ATP o GTP, los cuales funcionan como inhibidores ya que revierten el efecto del desacoplamiento mediante la inhibición de la fuga de protones inducida (Yamaguchi et al., 2004; Krauss et al., 2005; Vercesi et al., 2006) . En el presente estudio fue posible identificar los residuos de arginina en ambas proteínas desacoplantes del camarón. En la *LvUCP4* se ubicaron en las posiciones Arg92 (TMH2), Arg192 (TMH4) y Arg294 (TMH6) (Figura 8D) y en *LvUCP5* en la posición Arg79 (TMH2), Arg173 (TMH4) y Arg283 (TMH6) (Figura 9D).

El análisis estructural de los residuos en el modelo predictivo de las UCPs del camarón, indican que la distancia promedio entre los residuos de arginina es $>10 \text{ \AA}$, dicho valor es consistente con lo encontrado por Hoang (2011), quien reportó que los grupos fosfato del ATP se pueden alinear en el centro del “bolsillo de argininas” de la UCP2 de humano. Hoang sugirió que la molécula de ATP podría interactuar electrostáticamente con los 3 residuos de Arg, por lo que la unión de ATP a la UCP podría ocurrir localmente y no inducir cambios estructurales drásticos en la proteína.

De acuerdo al modelo espacial predictivo de *LvUCP4* y *LvUCP5*, se observó que el espacio embebido en la MIM tiene una carga neutra hacia el exterior; sin embargo, existe una alta carga positiva en la cavidad de las UCPs como se demuestra en las figuras (8E y 9E). Lo anterior va de acuerdo con las siguientes observaciones: en primer lugar, la MIM contiene una alta cantidad de lípidos cargados negativamente, que están en contacto directo con las proteínas. Los nucleótidos de purina (con cargas -4 o -3) se unen a las cargas positivas de la cavidad de las UCPs inhibiendo la fuga de protones y finalmente, las UCPs también pueden mediar el transporte de aniones. Por lo tanto, el potencial electrostático positivo de las UCPs podría participar en la mejora de su actividad y regulación (Echtay, 2007; Hoang, 2011).

Al realizar la superposición estructural de ambas proteínas *LvUCP4* y *LvUCP5* (Figura 10), se identificó un giro beta anti-paralelo adicional en *LvUCP5*, ubicado en un lazo de la hélice transmembranal 5 y la hélice anfipática 3 en el lado de la proteína localizado en la matriz mitocondrial. Dicho giro consta de 10 residuos (RKLKAPAAVS), mismo que no se encuentra presente en las secuencias aminoacídicas de UCP5 en los insectos, pero si se encuentra como una inserción única en las UCP5 de varios invertebrados marinos (Figura 11). Dentro de los aminoácidos que conforman esta inserción, Lys234 es el residuo conservado, por lo que se propone que este aminoácido de carga positiva es esencial para la formación del giro beta anti-paralelo de UCP5. Además, se sugiere que esta inserción podría representar una característica adaptativa de UCP5 en los organismos acuáticos. Sin embargo, se requiere obtener la estructura cristalográfica de estas UCPs para hacer estudios más detallados y probar esta hipótesis.

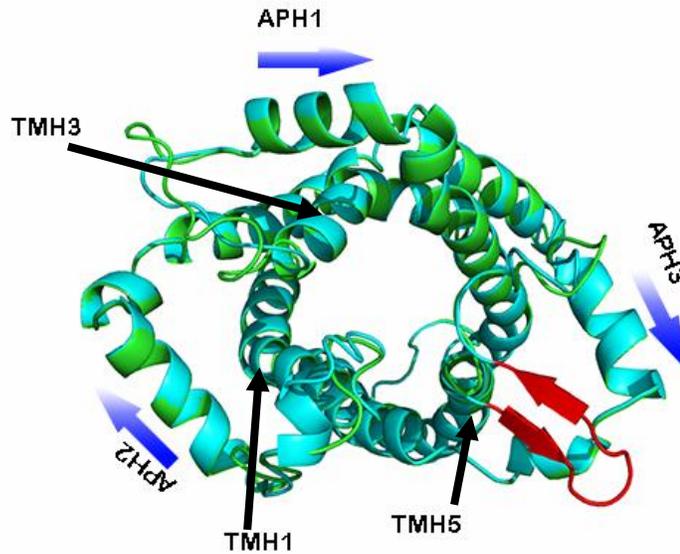


Figura 10. Alineamiento estructural de *LvUCP4* y *LvUCP5*. Los elementos de estructura secundaria de las UCPs se muestran en diagrama de listones, con la proteína UCP4 en verde y UCP5 en cian. En rojo el giro beta anti-paralelo correspondientes a UCP5.

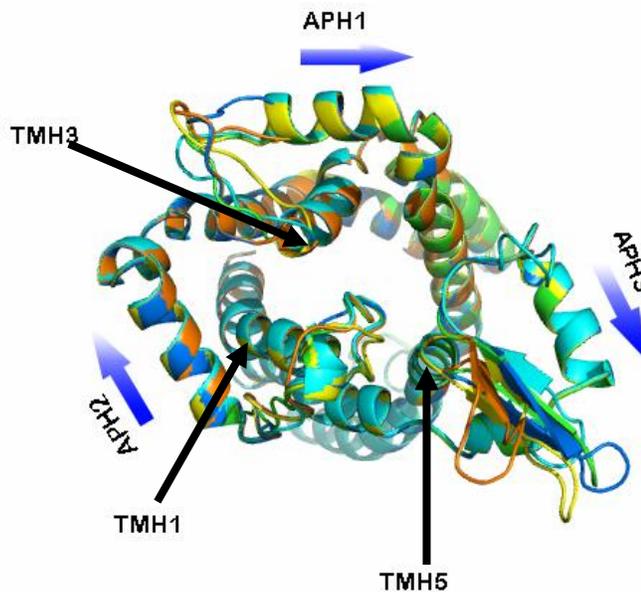


Figura 11. Alineamiento estructural de UCP5 de *L. vannamei* y diversos invertebrados marinos. Donde la estructura del camarón se muestra en cian, la del cangrejo cacerola *Limulus polyphemus* se muestra en verde, la de la babosa marina *Aplysia californica* en amarillo, y las de los ostiones *Crassostrea gigas* en azul y *Crassostrea virginica* en naranja.

En un análisis estructural teórico de *LvUCP4* y *LvUCP5* adicional, usando como templado la proteína del translocador de nucleótidos de adenina (ANT1) de *Bos taurus* (acceso PDB: **1OKC**; Pebay-Peyroula et al., 2003; datos no mostrados), se encontraron semejanzas importantes entre ambas proteínas. Lo anterior apoya la hipótesis de que los miembros de la superfamilia de acarreadores tienen una estructura muy conservada, y que las pequeñas variaciones detectadas en los pliegues de los lazos y sus cargas determinan la especificidad de unión al sustrato en el canal de la proteína (Kunji, 2004; Nury et al., 2006).

Las principales diferencias entre las estructuras de las UCPs de *L. vannamei* y la ANT1 de *B. taurus* están en la ubicación de las hélices anfipáticas, pues en la ANT1 las APHs se pliegan hacia dentro del canal, cercanas a las TMHs con numeración impar; mientras que, en las UCPs del camarón, las hélices anfipáticas se ubican por fuera del canal, pero cerca de las TMHs con numeración impar.

Otra diferencia entre las proteínas de ambas especies es la torcedura conferida por los residuos conservados de Pro que en las TMHs de la ANT de bovino cierran el canal interior haciéndolo más pequeño (Figuras 8A, 8C, 9A y 9C). En consecuencia, en las UCPs del camarón, el lado del canal hacia la matriz mitocondrial es más abierto que en la ANT1 (Pebay-Peyroula et al., 2003; Berardi et al., 2011). El tamaño de la apertura del canal de estas proteínas podría sugerir la multifuncionalidad de las mismas, tal como lo indica la hipótesis de Emre et al. (2007), quienes proponen que las UCPs ancestrales eran capaces de acarrear varios tipos de moléculas. Sin embargo, la relevancia funcional de estas diferencias estructurales en los modelos teóricos se podrá demostrar cuando se obtenga la estructura experimental.

7.3 Relaciones Filogenéticas de las UCPs del Camarón

El análisis filogenético de *LvUCP4* y *LvUCP5* se realizó utilizando un total de 36 secuencias de las proteínas desacoplantes UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 y UCP5 de organismos clasificados en varios grupos taxonómicos. Además, se incluyeron en el análisis 7 secuencias del translocador de nucleótidos de adenina (ANT). El ANT es miembro de la superfamilia de los acarreadores de solutos mitocondrial, considerado como un portador primitivo cuyas características y metabolitos transportados está relacionado con las UCPs y se propuso como un ancestro común a partir del cual las UCPs evolucionaron (Kuan y Saier, 1993).

Para el análisis filogenético se incluyeron 9 secuencias diferentes de UCPs de insectos, 2 de nemátodos y 4 de mamíferos. El cladograma resultante mostró que *LvUCP4* y *LvUCP5* se agruparon en diferentes clados, cada uno correspondiente con sus respectivos homólogos. La proteína deducida *LvUCP4* y las UCPs de especies de insectos se agrupan en un único clado, que está separado de los clados de mamíferos, nemátodos y copépodos (Figura 12).

Por su parte, la proteína deducida *LvUCP5* también se agrupa con las proteínas homólogas de los insectos (Figura 12), mientras que las UCPs homólogas de los vertebrados se encuentran en un clado diferente al igual que en el caso de las UCP4; enraizando el árbol se observaron las secuencias proteicas de los ANTs (Figura 12). Estos resultados muestran que los homólogos de UCP de *Litopenaeus vannamei* comparten porcentajes de identidad más altos con las UCPs 4 y 5 de otras especies, que con otras como las UCPs 1, 2 y 3, mientras que el grupo filogenético más relacionado con los crustáceos son los insectos.

De acuerdo a los hallazgos de Emre et al. (2007), se sabe que la UCP1 se originó a partir de una proteína tipo ANT y que a través de dos rondas de duplicación de genes se presentó la evolución temprana que dió origen a las UCP3 y UCP2 en los vertebrados (Hanák y Ježek, 2001). Se sabe que durante la evolución del linaje de los vertebrados, el aumento de la complejidad fue acompañado por la duplicación de genes o genomas tempranos. Lo anterior puede explicar el aumento del número de homólogos de las UCP en mamíferos en comparación con los insectos y crustáceos(Emre et al., 2007).

Por otro lado, según la hipótesis de Sokolova y Sokolov (2005), la divergencia genética de la familia de las proteínas desacoplantes UCP se produjo muy temprano en la evolución, antes de que los protóstomos y los deuteróstomos divergieran. Esta divergencia genética temprana sería entonces la razón de la diversidad de funciones celulares que estas proteínas, llevan a cabo, incluyendo la regulación fisiológica de la fuga de protones, la producción de EROS mitocondrial y la apoptosis. Por ejemplo, las funciones termogénicas de la UCP1 probablemente se establecieron más tarde en la evolución a través de la mejora de las propiedades de desacoplamiento basales compartidos por estas proteínas (Sokolova y Sokolov, 2005).

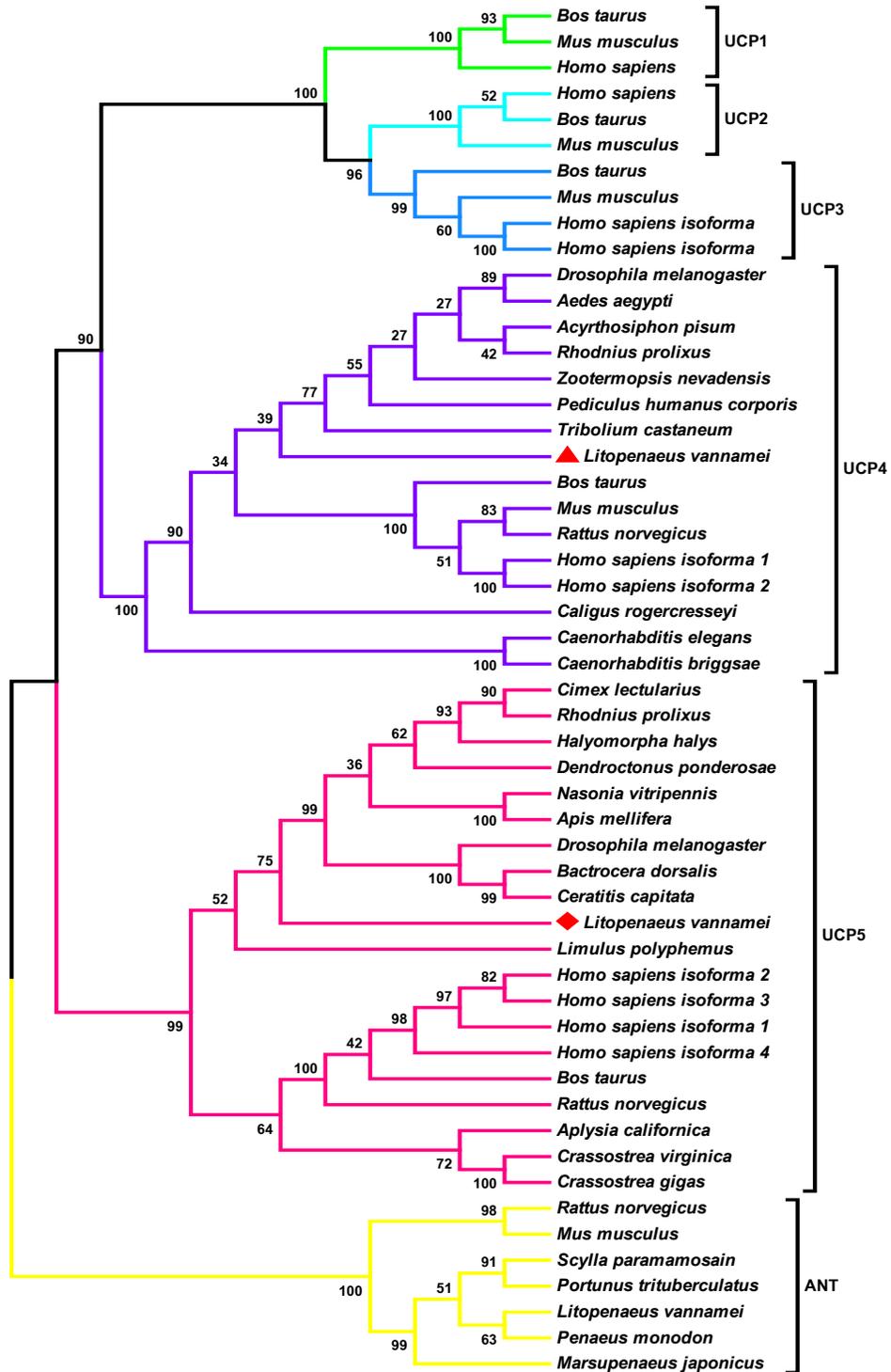


Figura 12. Árbol filogenético de las proteínas desacoplantes mitocondriales. Construido utilizando el método del vecino más cercano con la supresión de pares de secuencias de aminoácidos. Los números por arriba/debajo de los nodos indican los porcentajes de arranque no paramétricos del bootstrap (1000 repeticiones).

7.4 Expresión de los Transcritos *LvUCP4* y *LvUCP5* en Diferentes Tejidos del Camarón Blanco

7.4.1 Integridad y Limpieza del ARN Total

Se realizaron las extracciones de ARN total de varios tejidos y órganos del camarón incluyendo: pleópodos (PI), branquias (Br), pedúnculo ocular (PO), glándula digestiva (Hp), músculo (M), corazón (Co), cordón nervioso (Cn) e intestino del camarón blanco (In). La Figura 13 muestra el patrón de bandeo de ARN ribosomal similar en todas las muestras, en donde la presencia de las subunidades 28S y 18S observadas corrobora la integridad del ARN total aislado.

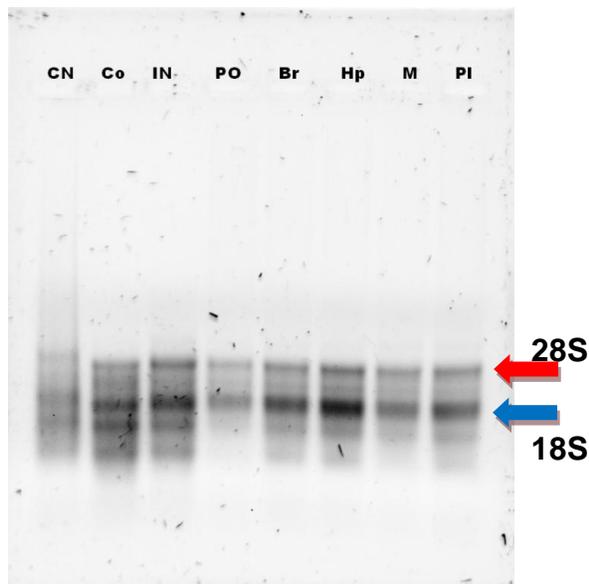


Figura 13. Integridad del ARN total aislado de tejidos y órganos del camarón blanco *L. vannamei*. Donde (CN) cordón nervioso, (Co) corazón, (IN) intestino, (PO) pedúnculo ocular, (Br) branquias, (Hp) glándula digestiva, (M) músculo y (PI) pleópodos.

En la Figura 14 se muestran las amplificaciones de tripsina a partir de las muestras de ARN de los tejidos (PI, Hp, Br, M, PO y Co) que fueron utilizados como templado en las reacciones de PCR y el control positivo (+) a partir de ADN de Hp. En el carril + se observa a la banda que corresponde al producto de PCR de 166 pb donde se utilizó ADN como templado. En los carriles de PI, Hp, Br, M, PO y Co la ausencia de bandas corrobora que el ARN total está libre de contaminación con ADN. Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc de todas las muestras para después amplificar los fragmentos de las proteínas de interés.

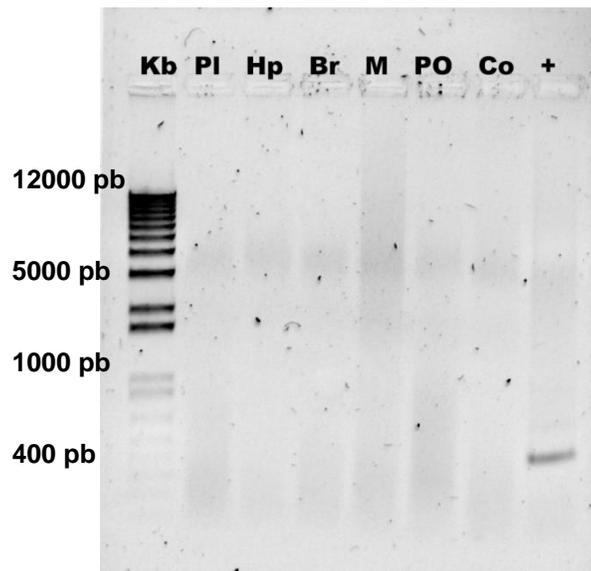


Figura 14. Eliminación de ADN genómico en las muestras de ARN total del camarón. Donde Kb plus: marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), (PI) pleópodos, (Hp) glándula digestiva, (Br) branquias, (M) músculo, (PO) pedúnculo ocular, (Co) corazón y (+) control positivo.

7.4.2 Expresión Relativa de *LvUCP4* y *LvUCP5*

Los intentos para determinar las funciones fisiológicas de las distintas UCPs se han basado en su patrón de expresión en diversos tejidos. Debido a los bajos

niveles de expresión (con la excepción de UCP1 en BAT), la función termogénica de UCP2, UCP3, UCP4 y UCP5 se ha excluido y como función más relevante se ha propuesto la atenuación de la producción de EROS mitocondrial (Alán et al., 2009). En este estudio, se encontró que el transcrito de la *LvUCP4* se expresa en todos los tejidos/órganos analizados del camarón, por lo cual se determinó que esta proteína es de expresión ubicua; la expresión de *LvUCP4* en la glándula digestiva o hepatopáncreas demostró ser mayor que en el resto de los tejidos.

Por otro lado, se observó que *LvUCP5* sólo se expresa en tres de los tejidos probados en este estudio, en branquias, músculo y pleópodos siendo las branquias donde se expresan los niveles más altos (Figura 15), por lo que se concluyó que *LvUCP5* cuenta con expresión tejido-específica como ocurre en los ratones (Yu et al., 2000) . De acuerdo a estos resultados, el tejido óptimo para realizar la evaluación de los niveles de los transcritos de las proteínas desacoplantes y las enzimas antioxidantes del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* son las branquias.

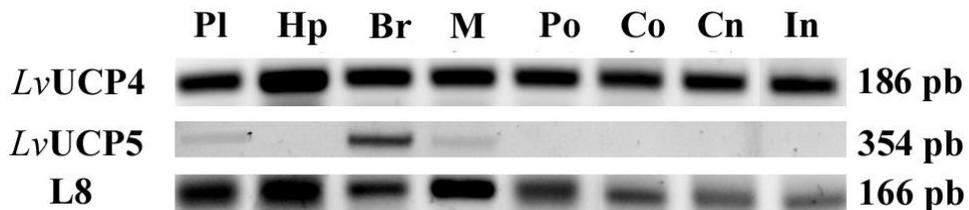


Figura 15. Expresión de *LvUCP4* y *LvUCP5* en diferentes tejidos/órganos de *L. vannamei*. Dónde: (PI) pleópodos, (Hp) glándula digestiva, (Br) branquias, (M) músculo, (Co) corazón, (Cn) cordón nervioso y (In) intestino.

Un comportamiento de la expresión similar se observó en el insecto *R. prolixus*, donde el ARNm de *RpUCP4* fue altamente expresado en el intestino medio y en el músculo del vuelo anterior, y en pequeñas cantidades en los ovarios. Del

mismo modo, el intestino de las larvas de *D. melanogaster* muestra altos niveles de mRNA de un homólogo UCP4 (Alves-Bezerra et al., 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, en los mamíferos los transcritos de las proteínas UCP4 y UCP5 se expresan de manera tejido-específica; principalmente en el cerebro, donde su función parece ser un sistema de protección para evitar daños del estrés oxidativo (Ramsden et al., 2012). Aunque no exista una descripción detallada de la distribución regional en el cerebro humano, se supone que este sigue el patrón que se presenta en los roedores. En el ratón, UCP5 se expresa fuertemente en la amígdala, en el núcleo del hipotálamo dorsomedial, el hipocampo, el núcleo talámico paraventricular, el núcleo talámico dorsal medio y el hipotálamo ventromedial (Sanchis et al 1998;. Huang et al 2011). UCP4 aparece en las neuronas y en menor medida en los astrocitos de tejido neuronal murino en los primeros 12-14 días del desarrollo embrionario (Smorodchenko et al., 2011).

7.5 Efecto de la Hipoxia y Reoxigenación en la Expresión Génica de las UCPs y las Enzimas Antioxidantes del Camarón

7.5.1 Lactato en el Plasma de los Organismos Sometidos a Hipoxia y Reoxigenación

Para confirmar el efecto de la hipoxia y reoxigenación en los camarones sometidos al bioensayo antes descrito, se analizaron los datos de la concentración de L- lactato en el plasma de los organismos (Martinez-Cruz et al., 2012). Como se muestra en la figura 16, hubo un incremento significativo ($p < 0.05$) en los animales en condiciones de hipoxia (1.5 mg/L) respecto a los camarones en normoxia (6 mg/L); sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grupos expuestos a 2 y 6 mg/L de oxígeno disuelto ($p > 0.05$; Figura

16). En los crustáceos, la acumulación de lactato en plasma representan una respuesta típica a la hipoxia y una medición directa del metabolismo anaeróbico (Ellington, 1983).

Los resultados muestran que la concentración de oxígeno disuelto por debajo de 1.5 mg/L determina el incremento en la concentración de lactato en el plasma del camarón. En condiciones de hipoxia la concentración de lactato incrementó significativamente hasta 11 veces con respecto a la concentración de lactato en normoxia. Una vez que el sistema fue reoxigenado por 6h la concentración de lactato disminuyó sin llegar a las concentraciones iniciales.

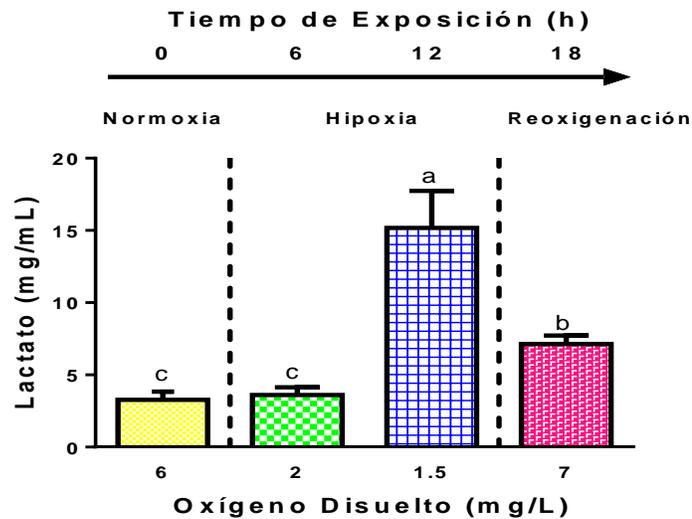


Figura 16. Concentración de L-lactato en el plasma del camarón blanco *L. vannamei* expuesto a normoxia, hipoxia y reoxigenación. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras representan las medias \pm error estándar.

Estos resultados concuerdan con lo anteriormente reportado para *L. vannamei* por Racotta et al., 2002; Martinez-Cruz et al., 2011; Jimenez-Gutierrez et al., 2013, y para otras especies de crustáceos como *Marsupenaeus japonicus* (Abe et al., 2007), *Parastacus defossus*, *Parastacus brasiliensis* (da Silva-Castiglioni

et al., 2011). Dichos estudios reportaron incrementos significativos en la concentración de lactato en el plasma cuando las concentraciones de oxígeno disuelto eran menores a 2 mg/L de OD. Estudios previos han demostrado que frente a la hipoxia, HIF-1 es el factor de transcripción responsable de inducir la expresión de la lactato deshidrogenasa (LDH), misma que se encarga de la producción de lactato a partir de piruvato en el último paso de la glucólisis anaeróbica. De esta manera, el lactato es el principal producto del metabolismo anaerobio en los crustáceos, por lo que varias especies presentan una alta concentración de este metabolito cuando se enfrentan a condiciones de hipoxia. Sin embargo, cuando las concentraciones de oxígeno se restablecen, el lactato puede ser oxidado a CO₂ y H₂O, excretado o puede convertirse en glucógeno (Ellington, 1983; Soñanez-Organis et al., 2012).

7.5.2 Cuantificación del ARNm de las UCPs y las Enzimas Antioxidantes Tiorredoxina (TRX), Glutación-Peroxidasa (GPX), Catalasa (CAT) y Superoxido Dismutasa de Manganeso (MnSOD)

Se evaluó la expresión relativa de UCP4, UCP5, TRX, GPX, CAT y MnSOD y L8 (como gen de referencia) en las branquias de los organismos sometidos a hipoxia y reoxigenación y sus respectivos controles en normoxia. Para determinar las eficiencias de amplificación de los productos de PCR, se hicieron rangos dinámicos para cada par de oligonucleótidos (Figura 17). Por un análisis de regresión, se obtuvo el valor de ajuste (R^2) a un modelo lineal y se obtuvo la pendiente. Con base en estos resultados se calcularon las eficiencias de amplificación de los genes evaluados. La eficiencia de amplificación de L8 fue 95%, para *LvUCP4* 98%, para *LvUCP5* 98% y 97% para la MnSOD, como representante del grupo de enzimas antioxidantes, cumpliéndose así el supuesto establecido por Livak y Schmittgen (2001) para el análisis de los resultados por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

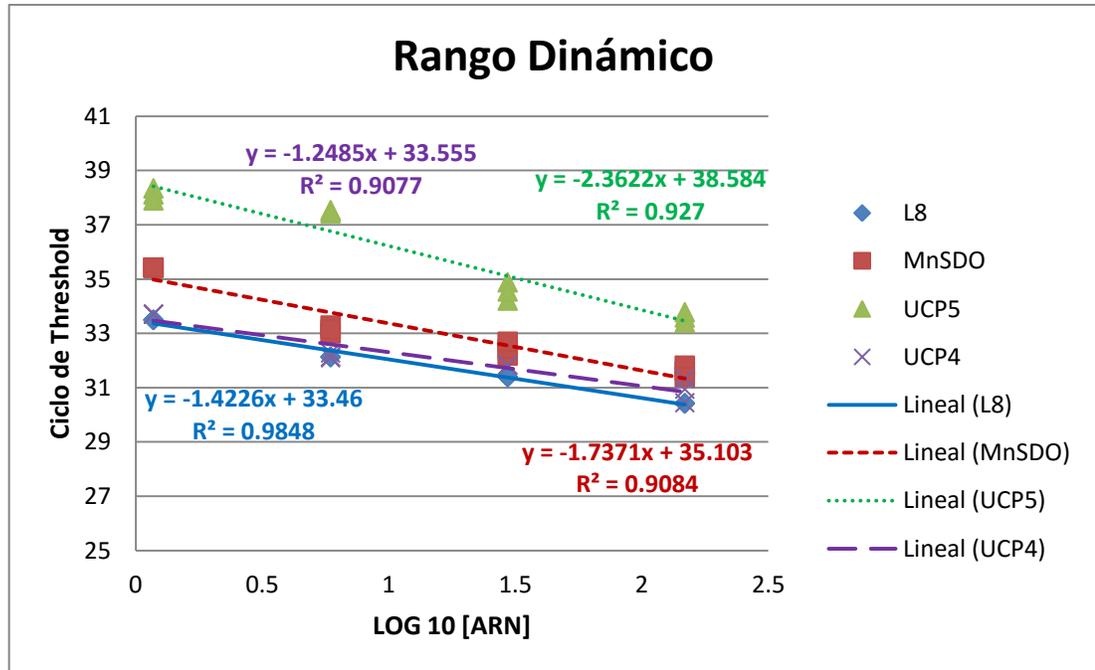


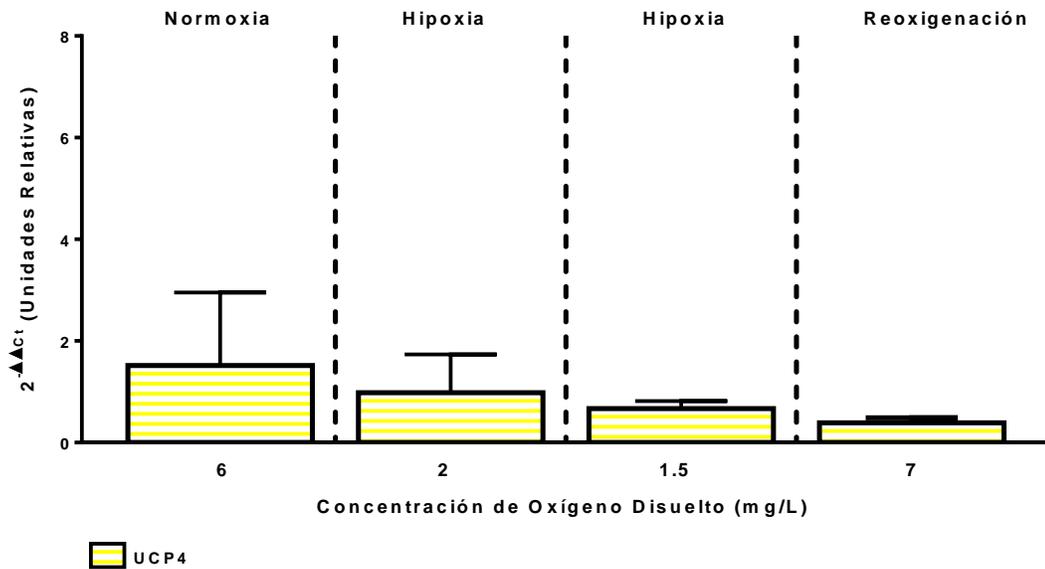
Figura 17. Comparación de los rangos dinámicos de cada gen.

En la Figura 18 se muestra la expresión relativa de los ARNm de los principales antioxidantes del camarón y ambas proteínas desacoplantes bajo el efecto de la hipoxia y reoxigenación.

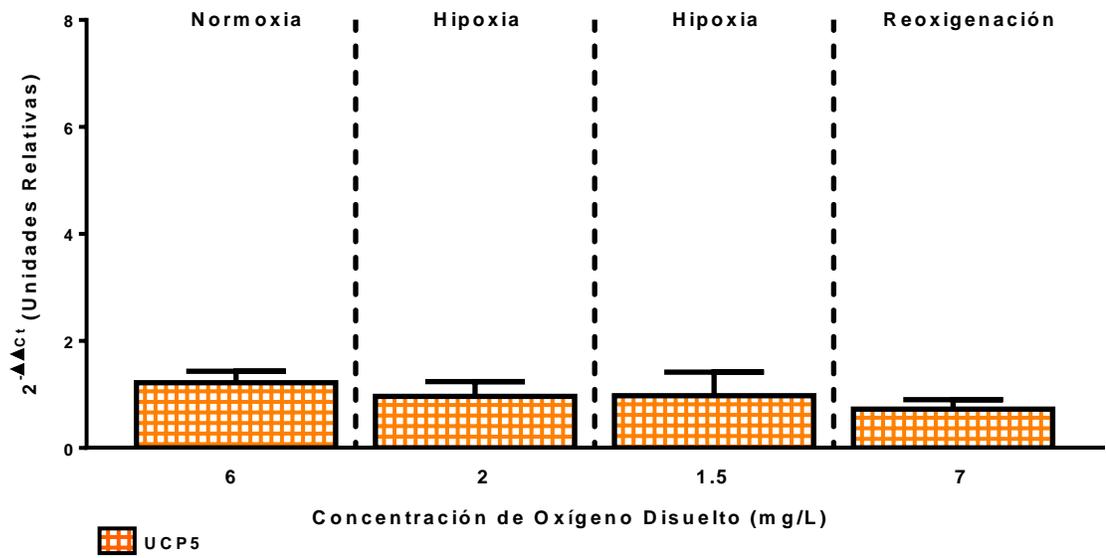
El análisis estadístico de los resultados muestran que los niveles de ARNm de *LvUCP4* y *LvUCP5* de los grupos experimentales: normoxia, hipoxia y reoxigenación no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Sin embargo, se observó que en los transcritos de *LvUCP4* con respecto a la normoxia, hubo un 35% de decremento en los niveles de *LvUCP4* durante la hipoxia (2mg/L) y del 56% en hipoxia (1.5mg/L) y una disminución del 75% cuando el organismo fue reoxigenado (Figura 18A). Mientras que para *LvUCP5* respecto a la normoxia, hubo un decremento del 20% durante la hipoxia (2 mg/L) y del 40% cuando el camarón fue reoxigenado (Figura 18B).

Respecto a los cambios observados en los niveles de transcritos de las enzimas antioxidantes, se observan respuestas diferentes en las condiciones evaluadas, en donde únicamente hubo diferencias estadísticas en los transcritos de GPX entre la hipoxia y la reoxigenación, y en la catalasa durante la reoxigenación ($p < 0.05$). Sin embargo, es posible observar en la expresión de las enzimas antioxidantes, excepto la catalasa, un incremento durante la hipoxia y un decremento en la reoxigenación. Estas tendencias no corresponden con lo observado para *LvUCP4* y *LvUCP5* lo cual sugiere que las UCPs del camarón podrían ser parte de la respuesta antioxidante retardada, o tener una función diferente.

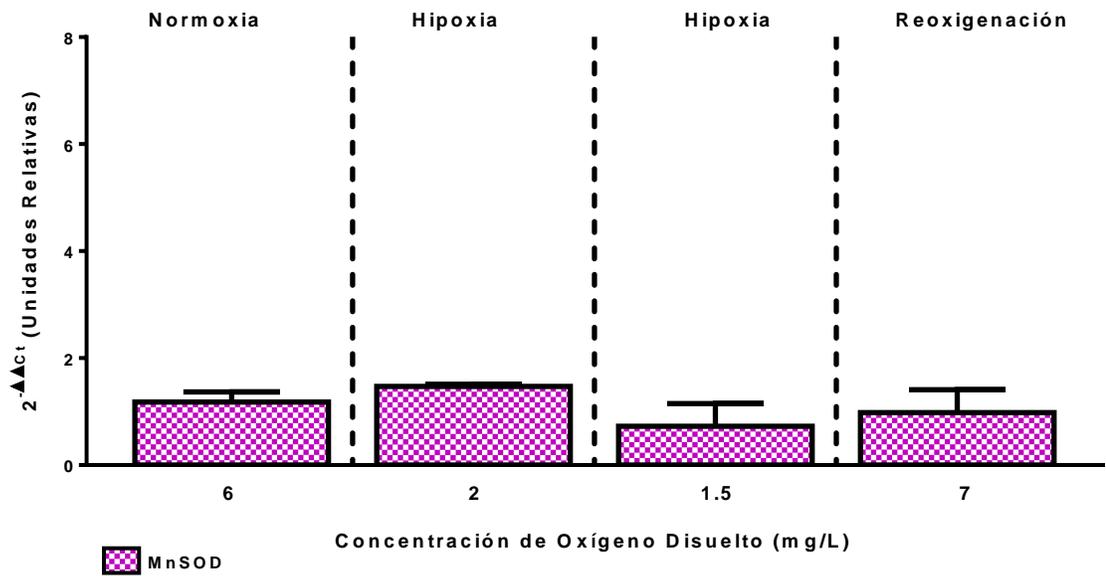
A)



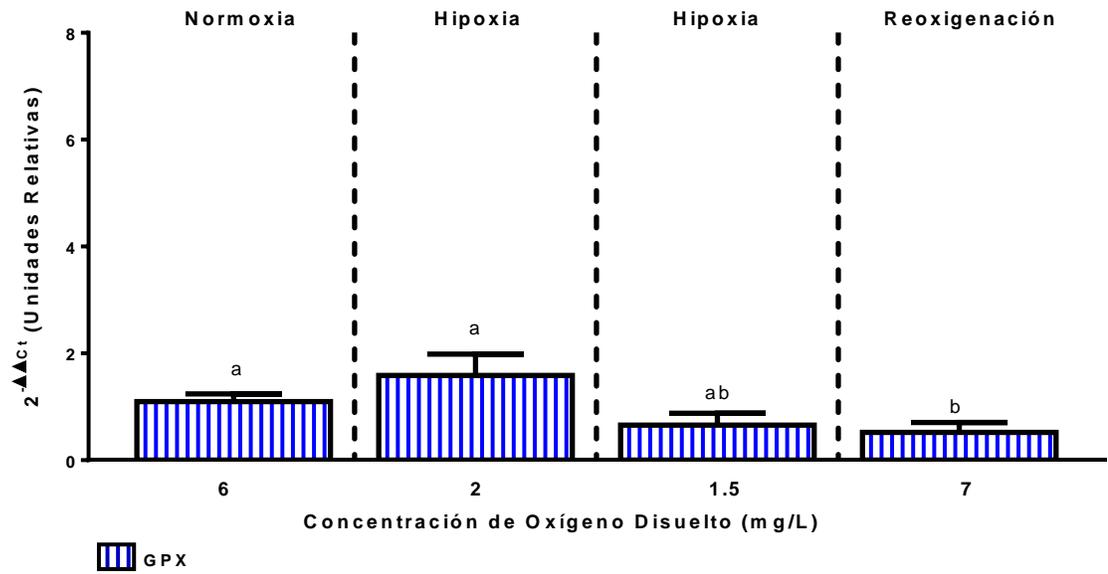
B)



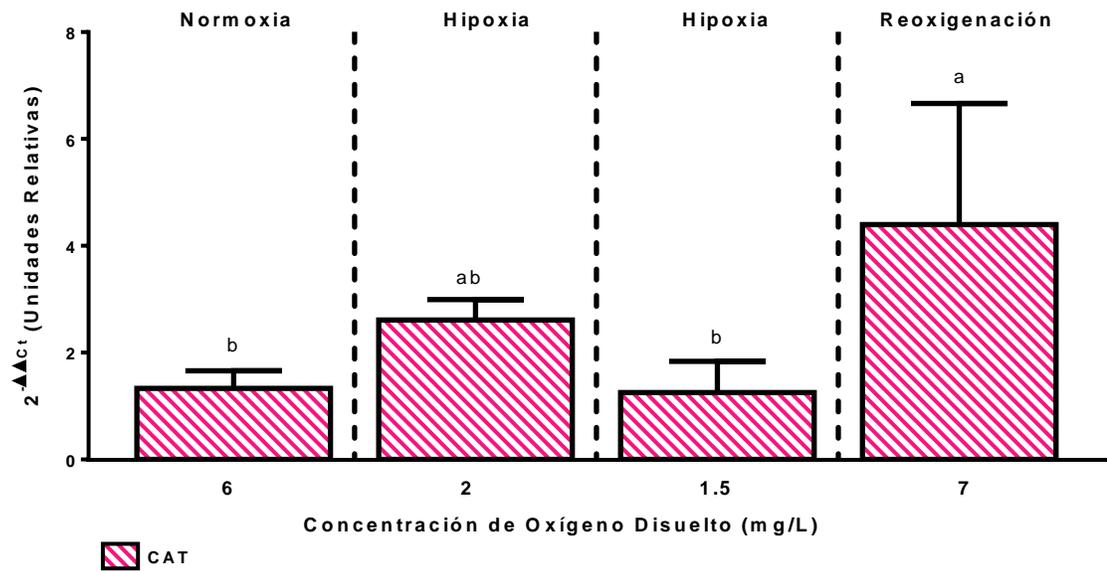
C)



D)



E)



F)

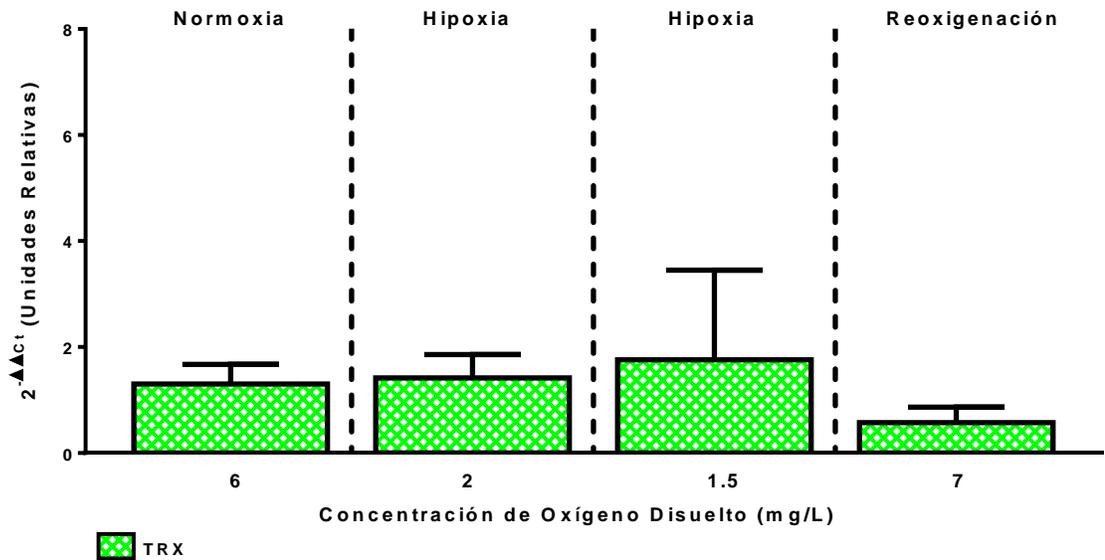


Figura 18. Expresión relativa de las UCPs y los antioxidantes mitocondriales, superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) glutatión-peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y tiorredoxina (TRX). Letras diferentes indican diferencia significativa en $p < 0.05$. Las barras representan las medias \pm desviación estándar.

Los eventos de hipoxia y reoxigenación representan un importante reto fisiológico para el cultivo del camarón. Se ha reportado que en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* se aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) debido a la entrada repentina de oxígeno (O_2) al sistema después de la hipoxia ambiental. La catalasa, la glutatión peroxidasa, peroxirredoxina, tiorredoxina, y la superóxido dismutasa de manganeso citosólica son parte de la respuesta antioxidante inicial que permite a varias especies de invertebrados adaptarse para sobrevivir a los ciclos repetitivos de hipoxia y reoxigenación. Este sistema antioxidante contrarresta la producción de EROS y controla el daño celular por estrés oxidativo en estos organismos (Echtay, 2007; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011).

La superóxido dismutasa (SOD) convierte el radical superóxido ($O^{\cdot-2}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y la glutatión peroxidasa (GPX) puede convertir hidroperóxidos orgánicos y peróxido. Ambas enzimas tienen un papel muy importante en el mantenimiento del equilibrio de los radicales libres y la reducción del daño oxidativo (Echtay, 2007). En un estudio realizado por Li et al. (2016), se observó que las actividades de las enzimas MnSOD y GPX aumentaron en varios tejidos del camarón incluyendo hepatopáncreas, branquias y hemolinfa cuando éstos se expusieron a la hipoxia. Estos resultados indican que la hipoxia y reoxigenación podrían inducir las actividades de las enzimas SOD y GPX, las cuales disminuyen después de un período de reoxigenación. Lo anterior sugiere que la regulación de las enzimas antioxidantes por efecto de la hipoxia puede darse a nivel post-transcripcional.

La catalasa (CAT), es una hemoproteína ubicua con una alta actividad catalítica, responsable de la detoxificación de H_2O_2 en agua y oxígeno. En 2013, Trasviña-Arenas et al. reportaron respuestas diferentes en la expresión génica y la actividad de la catalasa en las branquias y hepatopáncreas de camarones en hipoxia y reoxigenación. Los niveles de transcripción y de actividad de la enzima no cambiaron en el hepatopáncreas de *L. vannamei*; sin embargo, en las branquias hubo un aumento en los niveles de ARNm de la catalasa en hipoxia y reoxigenación, dichos resultados coinciden con los encontrados en este estudio.

En el caso de la tiorredoxina (TRX), una proteína Redox, puede donar electrones a la glutatión peroxidasa, y ser un cofactor para las tiorredoxina-peroxidases, conocidas como peroxirredoxinas, dando lugar a los procesos de detoxificación eficaz en seres humanos. Además, se sabe que la expresión del gen *TRX* está regulado por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) (Maulik y Das, 2008). La tiorredoxina del camarón *L. vannamei* es una proteína antioxidante, Aispuro-Hernandez et al. (2008) reportaron resultados

similares a los observados en este estudio cuando evaluaron el efecto de la hipoxia y reoxigenación. En las branquias, después de 6 h de exposición a la hipoxia (2 mg/L) y 1 h de reoxigenación, detectaron un aumento leve de la expresión de los transcritos de TRX.

La exposición de los camarones a estrés oxidativo (hipoxia y reoxigenación) no afectó los niveles de ARNm de UCP4 y UCP5 en *L. vannamei*. Se detectó una ligera disminución en los niveles de ARNm de UCP4 y UCP5 en las branquias en respuesta a la hipoxia, a continuación, una disminución en la reoxigenación cambios que no fueron estadísticamente significativos debido a la alta variabilidad individual entre los organismos. En las mitocondrias de los mamíferos la reperfusión después de la isquemia tiene como resultado una fuerte regulación positiva de la expresión del ARNm de UCP2 en el riñón de ratas, el cual se incrementa de 2.8 veces en el día 1 después de la reperfusión, y se recupera a la línea de base en el día 4. UCP2 está implicado en la modulación de la generación del anión superóxido, por lo que podría ser un regulador intracelular de estrés oxidativo (Nègre-Salvayre et al., 1997).

Además, UCP2 está involucrada en la defensa celular contra el estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno 200 μ mol/L) en células beta clonales que sobreexpresan UCP2 de rata (Li et al., 2002; Yoshida et al., 2002). Por otro lado, Mark et al. (2006) estudiaron a los peces *Zoarces viviparus* y encontraron que la expresión de UCP2 es claramente dependiente de la temperatura; encontrando que existe una regulación general durante la adaptación al calor y frío. La regulación incluye los ARNm y los niveles de expresión de la proteína, que mostraron las mismas tendencias en tejidos de ambas actividades metabólicas de alta y baja. Los autores plantearon la hipótesis de que la UCP2 tiene un papel importante en el metabolismo energético mitocondrial de los ectotermos, y especialmente durante el estrés térmico puede funcionar como una proteína reguladora, el control del potencial de membrana mitocondrial para equilibrar la formación de ROS y la producción de ATP.

Cabe señalar que los niveles de expresión de los transcritos de las proteínas desacoplantes *LvUCP4* y *LvUCP5* no llegan a los niveles iniciales (de la normoxia) cuando los organismos son sometidos a reoxigenación y después de mantenerse en hipoxia. Sin embargo, este comportamiento se ha observado anteriormente en otras proteínas que forman parte de los complejos de la cadena del transporte de electrones. Por ejemplo, las subunidades que conforman el complejo multimérico citocromo C oxidasa (COX) del camarón blanco: COXI, COX IV, COX Va y COX Vb, (Jimenez-Gutierrez et al., 2013). Así, como las subunidades que conforman la porción F_1 de la F_0F_1 -ATP sintasa de *L. vannamei*: ATP α , ATP β , ATP γ , ATP δ y ATP ϵ (Martinez-Cruz et al., 2015; Martinez-Cruz et al., 2011). Por lo anterior, se sugiere que el ajuste en la función de las mitocondrias para mantener la fosforilación oxidativa durante la reoxigenación, combinada con la capacidad de suprimir la exigencia de ATP en diversas funciones celulares durante la hipoxia, puede contribuir a la capacidad de recuperación de los camarones al estrés producido por la hipoxia y reoxigenación, lo cual ayuda a mantener la homeostasis energética en estas condiciones.

Los resultados de este estudio sugieren similitudes estructurales básicas entre las UCPs de varias especies de vertebrados e invertebrados, siendo ambas proteínas *LvUCP4* y *LvUCP5* del camarón, parte de la familia de proteínas desacoplantes. Asimismo, las relaciones filogenéticas indicaron claramente que las proteínas UCP4 y UCP5 se diferencian en su estructura de UCP1, UCP2, y UCP3, aunque su función no se ha confirmado aún en la mayoría de los modelos de estudios de vertebrados.

Así, este estudio representa el primer reporte sobre la existencia de proteínas desacoplantes en las mitocondrias de los crustáceos, cuya ubicación y funcionalidad requieren ser confirmadas aún. Sin embargo, la presencia y expresión de los transcritos de ambas proteínas en las mitocondrias del camarón representa a su vez, el primer mecanismo fisiológico de

desacoplamiento reportado para estas especies de crustáceos, puesto que a la fecha, no se ha confirmado la existencia de otro mecanismo desacoplante mitocondrial como pudieran ser un poro mitocondrial de transición de la permeabilidad (Konrad et al., 2012), ó la presencia de enzimas alternas a la cadena de transporte de electrones que promovieran el desacoplamiento de las mitocondrias según se ha observado en otras especies marinas (Cabrera-Orefice et al., 2014).

A pesar del rol sugerido de UCP4 y UCP5 en otros organismos en la respuesta al estrés oxidativo, a nivel transcripcional las *LvUCP4* y *LvUCP5* no mostraron diferencias significativas frente a la hipoxia y la reoxigenación, sugiriendo que la respuesta podría ser a nivel traduccional, post-traduccional y/o que estas proteínas están involucradas en funciones alternas como la regulación del calcio mitocondrial, la diferencia celular y la apoptosis (Smorodchenko et al., 2009).

Así, una serie de preguntas quedan aún por resolver, por lo que se requieren estudios adicionales para confirmar su asociación con la producción de EROS y como parte de una respuesta a la escasa disponibilidad del oxígeno disuelto en el agua de mar. Además, el papel funcional de las UCPs y sus patrones de expresión requieren investigación adicional con el fin de obtener evidencia de su contribución a la regulación de la función de la mitocondria y el metabolismo en ectotermos de este importante grupo de proteínas.

VIII. CONCLUSIONES

En el transcriptoma del camarón blanco *L. vannamei* se identificaron los transcritos codificantes de dos proteínas mitocondriales desacoplantes: *LvUCP4* y *LvUCP5*. Estas proteínas cuentan con las firmas características y aminoácidos conservados específicos de los miembros de la superfamilia de acarreadores mitocondriales. Además, basándose en análisis filogenéticos, estas dos proteínas están estrechamente relacionadas con las UCPs de insectos.

Adicionalmente, se determinó que la *LvUCP4* se expresa de manera ubicua en todos los tejidos/órganos probados y *LvUCP5* se expresa de manera tejido-específica en organismos en normoxia (5 mg/L OD). Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión de los transcritos de *LvUCP4* y *LvUCP5* en branquias bajo las condiciones probadas en este estudio, por lo que su participación como parte del sistema extrínseco del organismo para prevenir la formación de EROS aún se desconoce. Por lo que estudios futuros indicarán la función de estas proteínas del camarón durante la fuga mitocondrial de protones.

IX. RECOMENDACIONES

- Obtener anticuerpos específicos para *LvUCP4* y *LvUCP5* e identificar y localizar las UCPs del camarón blanco en las mitocondrias aisladas a través de un análisis de Western blot.
- Evaluar la funcionalidad de las proteínas desacoplantes del camarón a través de ensayos de oximetría, medición del potencial de membrana utilizando sustratos e inhibidores específicos y determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno.
- Inferir acerca de la función de las UCPs del camarón mediante silenciamiento génico, a través del uso de técnicas de ARN de interferencia de los transcritos de *LvUCP4* y *LvUCP5* y de la expresión génica de estas proteínas en condiciones de hipoxia y reoxigenación.

X. REFERENCIAS

- Abe, H., Hirai, S., & Okada, S. (2007). Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(1), 40-46.
- Abele, D., Philipp, E., Gonzalez, P., & Puntarulo, S. (2007). Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Frontiers in Bioscience*, 12, 933-946.
- Ahuejote-Sandoval, M. (2004). *Estrés oxidativo en camarón blanco (Litopenaeus vannamei) en respuesta a hipoxia y reoxigenación*. Maestría en Ciencias con Especialidad en Manejo de Recursos Marinos, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur.
- Aispuro-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K. D., Muhlia-Almazan, A., del-Toro-Sanchez, L., Robles-Sanchez, R. M., Hernandez, J., Gonzalez-Aguilar, G., Yepiz-Plascencia, G., & Sotelo-Mundo, R. R. (2008). Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(1), 94-99.
- Alán, L., Smolková, K., Kronusová, E., Šantorová, J., & Ježek, P. (2009). Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(1), 71-78.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., & Grimstone, A. (1995). Molecular biology of the cell (3rd edn). *Trends in Biochemical Sciences*, 20(5), 210-210.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Alves-Bezerra, M., Cosentino-Gomes, D., Vieira, L. P., Rocco-Machado, N., Gondim, K. C., & Meyer-Fernandes, J. R. (2014). Identification of uncoupling protein 4 from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* and its possible role on protection against oxidative stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 24-33.

- Allsopp, M., Johnston, P., & Santillo, D. (2008). La industria acuícola y de engorde: Un reto de sostenibilidad. *Greenpeace Intenacional. Amsterdam, The Netherlands*, 24-25.
- Andrews, Z. B., Diano, S., & Horvath, T. L. (2005). Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 829-840.
- Bassi, M. T., Manzoni, M., Bresciani, R., Pizzo, M. T., Della Monica, A., Barlati, S., Monti, E., & Borsani, G. (2005). Cellular expression and alternative splicing of SLC25A23, a member of the mitochondrial Ca²⁺-dependent solute carrier gene family. *Gene*, 345(2), 173-182.
- Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J., & Raasch, J. (2003). *The world of the cell* (Vol. 6): Benjamin Cummings San Francisco.
- Berardi, M. J., Shih, W. M., Harrison, S. C., & Chou, J. J. (2011). Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching. *Nature*, 476(7358), 109-113.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. New York: WH Freeman and Co.
- Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J. A., & Pérez-Sánchez, J. (2014). Tissue-specific gene expression and functional regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) by hypoxia and nutrient availability in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): implications on the physiological significance of UCP1–3 variants. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3), 751-762.
- Borecký, J., Maia, I. G., & Arruda, P. (2001). Mitochondrial uncoupling proteins in mammals and plants. *Bioscience Reports*, 21(2), 201-212.
- Braun, N., Rudner, J., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Bamberg, M., Huber, S., & Bedke, J. (2012). 310 UCP-3 uncoupling protein confers hypoxia resistance in renal epithelial cells and is upregulated in renal cell carcinoma. *European Urology Supplements*, 11(1), e310.
- Cabrera-Orefice, A., Guerrero-Castillo, S., Díaz-Ruíz, R., & Uribe-Carvajal, S. (2014). Oxidative phosphorylation in *Debaryomyces hansenii*: Physiological uncoupling at different growth phases. *Biochimie*, 102, 124-136.

- Carrión, J., Abengozar, M. A., Fernández-Reyes, M., Sánchez-Martín, C., Rial, E., Domínguez-Bernal, G., & González-Barroso, M. M. (2013). UCP2 deficiency helps to restrict the pathogenesis of experimental cutaneous and visceral leishmaniasis in mice. *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases*, 7(2), e2077.
- Claros, M. G., & Vincens, P. (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry*, 241(3), 779-786.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Da-Ré, C., De Pittà, C., Zordan, M. A., Teza, G., Nestola, F., Zeviani, M., Costa, R., & Bernardi, P. (2014). UCP4C mediates uncoupled respiration in larvae of *Drosophila melanogaster*. *European Molecular Biology Organization Reports*, 15(5), 586-591.
- da Silva-Castiglioni, D., Oliveira, G. T., & Buckup, L. (2011). Metabolic responses in two species of crayfish (*Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis*) to post-hypoxia recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 159(3), 332-338.
- Dall, W., Hill, B., Rothlisberg, P., & Sharples, D. (1990). *Advances in marine biology (vol. 27): The biology of the Penaeidae*: London: Academic Press.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Dzbek, J., & Korzeniewski, B. (2008). Control over the contribution of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) and proton gradient (ΔpH) to the protonmotive force (Δp) *in silico* studies. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33232-33239.
- Echtay, K. S. (2007). Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role? *Free Radical Biology and Medicine*, 43(10), 1351-1371.
- Echtay, K. S., Winkler, E., Bienengraeber, M., & Klingenberg, M. (2000). Site-directed mutagenesis identifies residues in uncoupling protein (UCP1) involved in three different functions. *Biochemistry*, 39(12), 3311-3317.

- Ellington, W. R. (1983). The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. *Journal of Experimental Zoology*, 228(3), 431-444.
- Emre, Y., Hurtaud, C., Ricquier, D., Bouillaud, F., Hughes, J., & Criscuolo, F. (2007). Avian UCP: the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins. *Journal of molecular evolution*, 65(4), 392-402.
- FAO. (2015). Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*, from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 783-791.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., & Ricquier, D. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genetics*, 15(3), 269-272.
- Fridell, Y.-W., Sánchez-Blanco, A., Silvia, B., & Helfand, S. (2004). Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(3), 219-228.
- García-Triana, A., Zenteno-Savín, T., Peregrino-Uriarte, A. B., & Yepiz-Plascencia, G. (2010). Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(11), 1230-1235.
- Ghaffari, N., Sanchez-Flores, A., Doan, R., Garcia-Orozco, K. D., Chen, P. L., Ochoa-Leyva, A., Lopez-Zavala, A. A., Carrasco, J. S., Hong, C., Briebe, L. G., Rudiño-Piñera, E., Blood, P. D., Sawyer, J. E., Johnson, C. D., Dindot, S. V., Sotelo-Mundo, R. R., & Criscitiello, M. F. (2014). Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. [Article]. *Scientific Reports*, 4.
- Guerrero-Castillo, S. (2012). *Diferencias en la asociación de complejos respiratorios de Yarrowia lipolytica en respuesta a los requerimientos energéticos*. Doctorado en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

- Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E. L., Galán-Wong, L. J., & Viader-Salvadó, J. M. (2004). Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 16-19.
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.
- Hanák, P., & Ježek, P. (2001). Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis – UCP4 as the ancestral uncoupling protein. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 495(3), 137-141.
- Hand, S. C., & Hardewig, I. (1996). Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annual Review of Physiology*, 58(1), 539-563.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 1015-1069.
- Hoang, T., Smith, M. D., & Jelokhani-Niaraki, M. (2012). Toward understanding the mechanism of ion transport activity of neuronal uncoupling proteins UCP2, UCP4, and UCP5. *Biochemistry*, 51(19), 4004-4014.
- Huang, P.-S., Son, J.-H., Abbott, L., & Winzer-Serhan, U. (2011). Regulated expression of neuronal SIRT1 and related genes by aging and neuronal β 2-containing nicotinic cholinergic receptors. *Neuroscience*, 196, 189-202.
- Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., & Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry*, 47, 53-67.
- Ježek, P. (2002). Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins—UCPn. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(10), 1190-1206.
- Ježek, P., & Urbánková, E. (2000). Specific Sequence Motifs of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 49(1), 63-70.

- Jiang, H., Li, F., Xie, Y., Huang, B., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, C., Li, S., & Xiang, J. (2009). Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics*, 9(12), 3353-3367.
- Jimenez-Gutierrez, L., Hernandez-Lopez, J., Islas-Osuna, M., & Muhlia-Almazan, A. (2013). Three nucleus-encoded subunits of mitochondrial cytochrome c oxidase of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA characterization, phylogeny and mRNA expression during hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 166(1), 30-39.
- Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8(3), 275-282.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. [Protocol]. *Nature Protocols*, 10(6), 845-858.
- Kim-Han, J. S., Reichert, S. A., Quick, K. L., & Dugan, L. L. (2001). BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *Journal of Neurochemistry*, 79(3), 658-668.
- Kondou, S., Hidaka, S., Yoshimatsu, H., Tsuruta, Y., Itateyama, E., & Sakata, T. (2000). Molecular cloning of rat brain mitochondrial carrier protein-1 cDNA and its up-regulation during postnatal development. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1457(3), 182-189.
- Konrad, C., Kiss, G., Torocsik, B., Adam-Vizi, V., & Chinopoulos, C. (2012). Absence of Ca²⁺- induced mitochondrial permeability transition but presence of bongkrekate-sensitive nucleotide exchange in *C. crangon* and *P. serratus*. *Public Library of Science One*, 7(6), e39839.
- Krauss, S., Zhang, C.-Y., & Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 248-261.
- Kuan, J., & Saier, M. H. (1993). The Mitochondrial Carrier Family of Transport Proteins: Structural, Functional, and Evolutionary Relationships. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(3), 209-233.

- Kunji, E. R. (2004). The role and structure of mitochondrial carriers. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 564(3), 239-244.
- Lambert, H. P., Zenger, M., Azarias, G., Chatton, J.-Y., Magistretti, P. J., & Lengacher, S. (2014). Control of mitochondrial pH by uncoupling protein 4 in astrocytes promotes neuronal survival. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31014-31028.
- Lengacher, S., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2004). Quantitative RT-PCR analysis of uncoupling protein isoforms in mouse brain cortex; methodological optimization and comparison of expression with brown adipose tissue and skeletal muscle. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24(7), 780-788.
- Li, L.-X., Skorpen, F., Egeberg, K., Jørgensen, I. H., & Grill, V. (2002). Induction of uncoupling protein 2 mRNA in β -cells is stimulated by oxidation of fatty acids but not by nutrient oversupply. *Endocrinology*, 143(4), 1371-1377.
- Li, T., & Brouwer, M. (2007). Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: molecular characterization and response to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147(1), 11-19.
- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., & Diao, X. (2016). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, 144, 234-240.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Mailloux, R. J., & Harper, M.-E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6), 1106-1115.
- Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., & Pan, G. (1999). UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 443(3), 326-330.
- Mark, F. C., Lucassen, M., & Pörtner, H. O. (2006). Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 1(3), 365-374.

- Martinez-Cruz, O., Arvizu-Flores, A., Sotelo-Mundo, R. R., & Muhlia-Almazan, A. (2015). The nuclear encoded subunits gamma, delta and epsilon from the shrimp mitochondrial F1-ATP synthase, and their transcriptional response during hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1-12.
- Martinez-Cruz, O., Garcia-Carreño, F., Robles-Romo, A., Varela-Romero, A., & Muhlia-Almazan, A. (2011). Catalytic subunits atp α and atp β from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* FOF1 ATP-synthase complex: cDNA sequences, phylogenies, and mRNA quantification during hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(2), 119-133.
- Martinez-Cruz, O., Muhlia-Almazan, A., Sanchez-Paz, A., Garcia-Carreño, F., Jimenez-Gutierrez, L., & Toro, M. d. I. A. N. d. (2012). *Invertebrates Mitochondrial Function and Energetic Challenges*: INTECH Open Access Publisher.
- Maulik, N., & Das, D. K. (2008). Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1780(11), 1368-1382.
- McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K. S., & Noble, M. E. M. (2011). Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallographica Section D*, 67(4), 386-394.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144-148.
- Montemayor-Leal, J., Mendoza-Alfaro, R., Aguilera-González, C., & Rodríguez-Almaraz, G. (2005). Moléculas sintéticas y extractos animales y vegetales como atractantes alimenticios para el camarón blanco *Litopenaeus*. *Revista Aquatic*(22), 1-10.
- Nègre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 11(10), 809-815.
- Nicholls, D., & Rial, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(5), 399-406.

- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G., Brandolin, G. a., & Pebay-Peyroula, E. (2006). Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 713-741.
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447(5), 689-709.
- Parrilla-Taylor, D. P., & Zenteno-Savín, T. (2011). Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*, 318(3-4), 379-383.
- Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., & Brandolin, G. (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature*, 426(6962), 39-44.
- Puente-Carreón, E. (2009). *Respuesta fisiológicas de juveniles de camarón blanco Litopenaeus vannamei, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura* Doctorado en Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional La Paz, Baja California Sur.
- Racotta, I. S., Palacios, E., & Méndez, L. (2002). Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 35(4), 269-275.
- Ramsden, D. B., Ho, P. W. L., Ho, J. W. M., Liu, H.-F., So, D. H. F., Tse, H.-M., Chan, K.-H., & Ho, S.-L. (2012). Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain and Behavior*, 2(4), 468-478.
- Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 701-722.
- SAGARPA. (2009). Estudio de la infraestructura logística para la expostación del camarón blanco a algunas ciudades de Estados Unidos y Canadá, from http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercao/CAMARONICULTORES.pdf

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Sánchez-Paz, A., Sotelo-Mundo, R., & Muhlia-Almazán, A. (2012). The challenges of developing a treatment that fully protects shrimp against WSSV infection: a perspective. *Advances in Zool Res*, 1, 1-30.
- Sánchez, R., & Arboleda, G. (2008). Mitochondria y muerte celular. *NOVA*, 6(10).
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Gubern, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., & Lévi-Meyrueis, C. (1998). BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34611-34615.
- Scheffler, I. E. (2011). *Mitochondria*. New York: John Wiley & Sons.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381-3385.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 539-539.
- Slocinska, M., Antos-Krzeminska, N., Rosinski, G., & Jarmuszkiewicz, W. (2011). Identification and characterization of uncoupling protein 4 in fat body and muscle mitochondria from the cockroach *Gromphadorhina cocquereliana*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(6), 717-727.
- Slocinska, M., Antos-Krzeminska, N., Rosinski, G., & Jarmuszkiewicz, W. (2012). Functional characterization and regulation of UCP4 expression by adipokinetic hormone in larva and pupa fat body mitochondria from the beetle *Zophobas atratus*. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1817, Supplement(0), S45.

- Smorodchenko, A., Rupprecht, A., Fuchs, J., Gross, J., & Pohl, E. E. (2011). Role of mitochondrial uncoupling protein 4 in rat inner ear. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 47(4), 244-253.
- Smorodchenko, A., Rupprecht, A., Sarilova, I., Ninnemann, O., Bräuer, A. U., Franke, K., Schumacher, S., Techritz, S., Nitsch, R., & Schuelke, M. (2009). Comparative analysis of uncoupling protein 4 distribution in various tissues under physiological conditions and during development. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1788(10), 2309-2319.
- Sokolova, I., & Sokolov, E. (2005). Evolution of mitochondrial uncoupling proteins: novel invertebrate UCP homologues suggest early evolutionary divergence of the UCP family. *FEBS letters*, 579(2), 313-317.
- Soñanez-Organis, J. G., Rodriguez-Armenta, M., Leal-Rubio, B., Peregrino-Uriarte, A. B., Gómez-Jiménez, S., & Yepiz-Plascencia, G. (2012). Alternative splicing generates two lactate dehydrogenase subunits differentially expressed during hypoxia via HIF-1 in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Biochimie*, 94(5), 1250-1260.
- Stuart, J., Cadenas, S., Jekabsons, M., Roussel, D., & Brand, M. (2001). Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1504(1), 144-158.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Trasviña-Arenas, C. H., Garcia-Triana, A., Peregrino-Uriarte, A. B., & Yepiz-Plascencia, G. (2013). White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 164(1), 44-52.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.-A., & Ochoa, J.-L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(2), 299-303.
- Vercesi, A. E., Borecký, J., Maia, I. d. G., Arruda, P., Cuccovia, I. M., & Chaimovich, H. (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 383-404.

- Vrbacký, M., Drahota, Z., Mráček, T., Vojtíšková, A., Ješina, P., Stopka, P., & Houštěk, J. (2007). Respiratory chain components involved in the glycerophosphate dehydrogenase-dependent ROS production by brown adipose tissue mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1767(7), 989-997.
- Wang, L., Wu, J., Wang, W.-N., Cai, D.-X., Liu, Y., & Wang, A.-L. (2012). Glutathione peroxidase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and its regulation upon pH and Cd exposure. *Ecotoxicology*, 21(6), 1585-1592.
- Yamaguchi, H., Jelokhani-Niaraki, M., & Kodama, H. (2004). Second transmembrane domain of human uncoupling protein 2 is essential for its anion channel formation. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 577(1-2), 299-304.
- Yoshida, T., Kurella, M., Beato, F., Min, H., Ingelfinger, J. R., Stears, R. L., Swinford, R. D., Gullans, S. R., & Tang, S.-S. (2002). Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney International*, 61(5), 1646-1654.
- Yu, X. X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., & Pan, G. (2000). Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 14(11), 1611-1618.
- Zeevalk, G., Bernard, L., Song, C., Gluck, M., & Ehrhart, J. (2005). Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(9-10), 1117-1139.
- Zhou, M., Lin, B.-Z., Coughlin, S., Vallega, G., & Pilch, P. F. (2000). UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 279(3), E622-E629.
- Zorzano, A., Bach, D., Pich, S., & Palacín, M. (2004). Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 48, 30-35.